THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A L'INSERM AU CENTRE DE RECHERCHE TRANSLATIONNELLE EN MEDECINE MOLECULAIRE

Ecole doctorale n°554

Environnements - Santé

Doctorat de Biochimie et biologie moléculaire

Par

Madame CHAVANTON Aude

OPTIMISATION DE TRAITEMENTS IMMUNOTHERAPEUTIQUES DANS LE CANCER

Thèse présentée et soutenue à DIJON, le 13 septembre 2024

Composition du Jury :

Mme EYMIN Béatrice	DR2 – INSERM	Rapporteuse - Présidente du jury
Mme ROCCHI Palma	DR2 – INSERM	Rapporteuse
M ROGER Sébastien	PU – Université de Tours	Examinateur
M HERMETET François	MCU – Université de Bourgogne	Examinateur
Mme GARRIDO Carmen	DRCE – INSERM	Directrice de thèse

Remerciements

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier les membres du jury, le **Dr. Béatrice EYMIN** et le **Dr. Palma ROCCHI** pour avoir accepté d'être toutes deux rapporteuses de ma thèse, pour le temps accordé à la lecture de ce manuscrit et pour votre présence lors de ma soutenance. Je remercie également le **Pr. Sébastien ROGER** et le **Dr. François HERMETET** d'avoir accepté d'être les examinateurs de ma thèse. Je suis très reconnaissante du temps que vous allez accorder au jugement de mes travaux de recherche et c'est une chance pour moi de pouvoir avoir votre retour à tous les quatre et votre expertise sur ces travaux.

Je souhaite également remercier la **région Bourgogne Franche-Comté** d'avoir financé ces trois années de thèse et d'avoir répondu à toutes mes questions d'ordre administratif.

Je remercie le **Dr. Carmen GARRIDO**, ma directrice de thèse, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son équipe de recherche. Je la remercie également pour son écoute et sa prise de décision dans les moments où cela a été nécessaire au cours de ma thèse. Enfin, merci pour son aide dans la rédaction de ma revue scientifique.

Merci au **Pr. Alvaro BAEZA GARCIA**, d'avoir accepté de prendre le relais pour mon encadrement de thèse au début de ma deuxième année. Cela m'a apporté un soutien scientifique/expérimental nécessaire pour finir cette thèse du mieux possible. Je lui souhaite une belle continuation dans son nouveau laboratoire et sa nouvelle vie belge.

Mes remerciements vont également au **Dr. Jimena ABREY RECALDE**, ma partenaire scientifique de tous les jours. Je la remercie grandement de m'avoir permis de rejoindre son projet de recherche et d'avoir partagé avec moi quasiment toutes les expériences. Avoir une collaboratrice avec qui il est possible d'avancer ensemble et de s'entraider au quotidien a été pour moi un soutien important et un soulagement moral. Je lui souhaite de réussir et de s'épanouir dans son nouveau laboratoire à Bordeaux, et surtout de prendre soin d'elle !

Ces remerciements ne pourraient pas être présents sans mentionner le nom de mes coéquipiers de la première partie de ma thèse : le **Dr. Hafidha BENTAYEB**, **Estefania MAGALHAES TEIXEIRA** et le **Dr. Valentin VAUTROT**. Un grand merci à eux pour tous les moments partagés ensemble, qu'ils soient de nature scientifique ou personnel, car en effet, ils m'ont beaucoup apporté à ces deux niveaux. Merci à **Hafidha** pour m'avoir

soutenu dans mon premier projet de recherche, pour m'avoir laissé de la place et m'avoir accompagné dans mes premières expériences à l'animalerie. Merci également pour m'avoir apaisé lors de mes coups de stress avec ces fameuses cellules mortes en culture cellulaire juste avant de vouloir les injecter aux souris… Je ne comprends toujours pas pourquoi il y avait autant de mortes dans ces flasques à cette période… Merci pour le partage de son expérience et de ses connaissances sur les exosomes, j'ai un protocole d'isolation d'exosomes au top du top maintenant ! Merci pour tous les repas que nous avons partagé ensemble, je lui souhaite plein de bonheur dans sa future vie avec ses trois petits anges. Je suis très reconnaissante de l'aide qu'elle m'a apportée et qu'elle continue de m'apporter malgré son départ du laboratoire. Prends soin de toi Hafidha ! Merci à **Estefania**, la petite dernière de l'équipe, pour sa joie de vivre quotidienne, son soutien sans faille et ses compétences ! Je suis ravie d'avoir eu la chance de pouvoir lui apprendre quelques techniques de laboratoire. Elle a été pour moi une « élève » exemplaire, toujours à l'écoute, toujours à vouloir bien faire, à ne pas hésiter à redemander s'il y a quelque chose dont elle n'est pas sûre, à être curieuse. J'ai pris beaucoup de plaisir à échanger avec elle, à lui apprendre des choses (que je maîtrise à peu près) et à la soutenir aussi lorsque cela était nécessaire. Je suis ravie qu'elle s'épanouisse aujourd'hui dans son nouveau laboratoire dijonnais. Je lui souhaite le meilleur pour la suite ! Merci à **Valentin**, l'ingénieur de l'équipe, pour m'avoir accueilli dans ce laboratoire et m'avoir accompagné dans mes premiers pas expérimentaux. Merci pour m'avoir appris un tas de choses sur les exosomes et sur les techniques de laboratoire permettant de les caractériser. Merci de m'avoir appris à utiliser ce fameux Nanosight, que je crois que je détesterai toujours… Merci pour sa patience ! Je lui souhaite de s'épanouir dans son nouveau travail avec la bio-informatique !

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'équipe qui m'ont aidé lors de certaines expériences, que ce soit de près ou de loin, toute aide est bénéfique et contribue à renforcer les liens et à partager des connaissances. Ainsi, merci à **Flavie MIALHE**, **Rim BELKAID**, **Cassandre PIGNOL** et **Nicolas PERNET** pour leur aide ! J'ai une pensée également pour le **Dr. Steven DE ALMEIDA** et **Mathilde REGIMBEAU** qui m'ont particulièrement aidé lors de mon stage de master 2, notamment pour la mise en place d'un protocole de cytométrie, d'un panel et pour m'avoir appris à utiliser le cytomètre LSR FORTESSA. Je n'oublierai pas les nombreuses heures passées à réaliser ces fameuses expériences de cytométrie et les soirées tardives passées devant le cytomètre. Merci pour votre aide et votre

patience ! Je tiens à remercier également le **Dr. Abdelmnim RADOUA**, le papa du laboratoire, qui passe sa vie à maniper et sur qui tous les membres de l'unité savent que l'on peut compter. Merci pour sa disponibilité, son aide et sa bienveillance ! Enfin merci au **Dr. Mohammed ELMALLAH**, pour sa joie de vivre quotidienne et ses blagues, plus ou moins réussies, je dois l'avouer… Mais la positive attitude qu'il véhicule est tellement incroyable que l'on finit toujours par rigoler ! Merci de m'avoir appris la culture cellulaire et quelques mots/phrases de la langue arabe. Merci pour ce partage de culture ! Je souhaite remercier également le **Dr. Romain MARY**, **Valentin BAVEREL** et **Aleksandra GEORGIEVSKI** pour les discussions scientifiques que nous avons pu avoir au cours de ma thèse, que ce soit pour des mises en place d'expériences ou des utilisations de logiciel. Je vous souhaite de réussir vos projets. Très belle continuation à vous !

Un grand merci à **Mannon GEINDREAU** pour son aide dans la mise en place de mes expériences *in vivo*, pour son partage de connaissances, son expérience et ses fameux 5 panels de cytométrie pour analyser l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs. Merci également pour toutes les sorties que nous avons faites ensemble et avec les autres doctorants, pour tenter de faire redescendre la pression. Je lui souhaite une belle réussite dans sa thèse et dans son futur emploi !

Merci à **Flavie GAUCHER** pour nos discussions scientifiques et personnelles dans la salle de culture L1 le vendredi soir où nous nous retrouvions souvent au moment de passer les cellules. Je lui souhaite une belle continuation !

Je souhaite également remercier le **Dr. Marine CORDONNIER**, ancienne doctorante de l'équipe, avec qui j'ai beaucoup échangé lors de mon arrivée au laboratoire et pendant ma première année de thèse. Malgré nos échanges presque exclusivement par mails du fait de son départ du laboratoire, elle a été pour moi un soutien important autant scientifique que moral. Elle a fait partie de mes premiers interlocuteurs et je suis contente d'avoir pu poursuivre la suite de son projet. Je lui souhaite plein de réussite pour son avenir !

Un grand merci aux membres de mon CSST, le **Dr. Cédric REBE** et le **Pr. Sébastien ROGER**, pour nos échanges toujours intéressants, pertinents et constructifs. Merci d'avoir accepté de faire partie de ce CSST, je suis chanceuse d'avoir pu échanger avec vous. Merci également pour votre humanité et pour votre soutien scientifique. Un grand merci également à **Elias BOU-MAROUN**, mon référent de thèse, qui m'a accompagné avec bienveillance et

générosité au cours de cette thèse. Je suis très reconnaissante d'avoir pu échanger avec lui. Je lui souhaite plein de bonnes choses !

Une pensée pour notre ingénieure administrative, **Andreea Gabriela EDU**, avec qui le dialogue a toujours été possible. Merci pour sa réactivité, lorsque j'avais des commandes urgentes à passer, c'est toujours un plaisir d'échanger avec elle. Je lui souhaite une belle continuation !

Mes remerciements vont également à **Coralie BIGUZZI**, **Sophie LORENT** et tous les doctorants et médiateurs scientifiques avec qui j'ai pu échanger lors de nos sessions expérimentarium et nos excursions Bourguignonnes dans des classes scolaires ou journées grand public pour parler de nos travaux de recherche de manière vulgarisée. Ces expériences ont été pour moi très enrichissantes et m'ont permis de développer des compétences transversales.

Merci à mes **amis extra-labo** de m'avoir soutenu et permis de partager des moments loin de la paillasse et des pipettes. Je pense notamment à mes amis de la fac, à ma team AJA, mes amies footballeuses et mes alliées danseuses.

Enfin, un grand merci à **ma famille** et particulièrement **mes parents**, qui m'ont soutenu, encouragé tout au long de cette expérience, que je nomme une expérience de vie. Merci de m'avoir écouté, comprise et aidé à garder la tête froide. J'espère que vous serez fière de moi. Merci à mon frère, **Fabien**, et sa compagne, **Audrey**, pour avoir été présents dans les moments de joie et les moments plus difficiles.

Cette thèse aura été pour moi une expérience complètement folle, parsemée d'embûches et de remises en question. Elle m'a beaucoup apportée d'un point de vue personnel.

Merci à tous

Résumé

Résumé

Le cancer est une maladie provoquée par la prolifération de cellules transformées et incontrôlables par l'organisme entraînant à terme le décès. Elle est de nos jours la première cause de mortalité en France, ce qui en fait un centre d'intérêt majeur pour la recherche. Malgré le large arsenal thérapeutique disponible actuellement en clinique pour lutter contre le cancer (chimiothérapies, radiothérapies, hormonothérapies, …), de nombreux patients ne répondent pas à ces thérapies et le taux de décès est encore très conséquent. Il y a une quinzaine d'années, l'immunothérapie a fait ses premiers pas en clinique et a démontré des effets prometteurs, devenant ainsi une nouvelle arme thérapeutique prometteuse contre le cancer. L'immunothérapie est une approche thérapeutique visant à stimuler le système immunitaire de façon à l'aider à mieux détruire les cellules cancéreuses. L'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 a démontré des effets prometteurs dans divers types de cancers. Néanmoins, malgré une belle efficacité chez certains patients, beaucoup de patients ne répondent pas à ces thérapies dans de multiples types de cancer, dont le cancer colorectal. Dans ce contexte, l'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué mon doctorat a mis en évidence que la protéine de choc thermique HSP110 favorise la prolifération des cellules cancéreuses colorectales et est associée à un mauvais pronostic dans le cancer colorectal. Une molécule inhibitrice de HSP110 appelée i007 a ainsi été développée. L'objectif de ces travaux de thèse repose sur l'évaluation de l'efficacité de la double thérapie anti-PD-L1/i007 dans le cancer colorectal afin d'identifier si l'inhibition de HSP110 peut améliorer l'efficacité des anti-PD-L1. Nous avons pu identifier un effet antitumoral de cette double thérapie, probablement médié par les cellules $CD8^+$ épuisés et la sécrétion de granzyme A, B, interféron γ et perforine. Les macrophages, cellules NK et mastocytes semblent également être impliqués dans la réponse immunitaire induite par la double thérapie, mais leur rôle exact reste à définir. Enfin, une ouverture sur un éventuel nouveau projet cherchant à potentialiser l'effet des anti-PD-L1 a été mis en lumière, en combinant les anti-PD-L1 à des anti-LAG-3.

Abstract

Abstract

Cancer is a disease caused by the proliferation of transformed cells that cannot be controlled by the body, ultimately leading to death. Today, it is the leading cause of death in France, making it a major focus of research interest. Despite the wide range of cancer treatments currently available in clinical practice (chemotherapy, radiotherapy, hormone therapy, etc.), many patients do not respond to these therapies, and the death rate is still very high. Some fifteen years ago, immunotherapy took its first clinical steps and demonstrated promising effects, becoming a promising new therapeutic weapon against cancer. Immunotherapy is a therapeutic approach designed to stimulate the immune system to better destroy cancer cells. Anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy has shown promising effects in various types of cancer. However, despite their efficacy in some patients, many do not respond to these therapies in multiple cancer types, including colorectal cancer. In this context, the research team in which I carried out my PhD demonstrated that the heat shock protein HSP110 promotes colorectal cancer cell proliferation and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. This led to the development of an HSP110 inhibitor molecule called i007. The aim of this thesis work is to evaluate the efficacy of anti-PD-L1/i007 dual therapy in colorectal cancer, and to identify whether HSP110 inhibition can improve the efficacy of anti-PD-L1. We were able to identify an antitumor effect of this dual therapy, probably mediated by depleted $CD8^+$ cells and the secretion of granzyme A, B, interferon γ and perforin. Macrophages, NK cells and mast cells also appear to be involved in the immune response induced by double therapy, but their exact role remains to be defined. Finally, an opening to a possible new project seeking to potentiate the effect of anti-PD-L1 was highlighted, by combining anti-PD-L1 with anti-LAG-3.

Table des matières

Table des matières

Remerciements 2
Résumé 7
Abstract 9
Liste des figures 16
Liste des tableaux 18
Liste des abréviations 19
I. Introduction 23
1. Le cancer 24
1.1. Généralités 24
1.2. Mécanisme de la cancérogenèse 24
1.3. Particularités des cellules cancéreuses 25
1.4. Le cancer colorectal (CCR) 29
1.4.1. Généralités 29
1.4.2. Les facteurs de risque 30
1.4.3. La méthode d'analyse de l'évolution de la maladie et des métastases 31
1.4.4. Les principales classes de traitements 33
1.4.4.1. La chirurgie 34
1.4.4.2. La chimiothérapie 34
1.4.4.3. La radiothérapie 35
1.4.4.4. Les thérapies ciblées 36
1.4.4.5. L'immunothérapie 39
2. Le système immunitaire 42
2.1. La réponse immunitaire innée 42
2.2. La réponse immunitaire adaptative 43
2.2.1. La réponse cellulaire 43
2.2.2. La réponse humorale 46
2.3. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) 48
2.3.1. Les macrophages de type M1 48
2.3.2. Les macrophages de type M2 48
2.4. Les différents types de lymphocytes T 51
2.4.1. Les lymphocytes T $CD4^+$ 52
2.4.2. Les lymphocytes T $CD8^+$ 57

2.4.3. Les lymphocytes NKT 60
2.4.4. Les lymphocytes Tγδ 61
2.5. Les points de contrôles immunitaires 61
3. L'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 64
3.1. La voie PD-1/PD-L1 64
3.2. Les anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1 66
3.3. La toxicité et l'efficacité des anti-PD-1/PD-L1 70
3.4. Les mécanismes de résistance aux anti-PD-1/PD-L1 72
3.4.1. La faible reconnaissance d'antigènes tumoraux 72
3.4.2. Le dysfonctionnement des lymphocytes T 73
3.4.3. Le microenvironnement tumoral immunosuppresseur 74
3.4.4. Les mutations JAK1/2, EGFR et de l'homologue de la phosphatase et de la tensine (PTEN) 76
3.4.5. Le microbiote intestinal 76
3.5. Les principaux biomarqueurs prédictifs de la réponse aux anti-PD-1/PD-L1 77
3.5.1. L'analyse de l'expression de PD-L1 dans les tumeurs 77
3.5.2. La charge mutationnelle tumorale élevée (TMB-H) 78
3.5.3. Le statut dMMR/MSI-H 79
3.6. Nouvelles stratégies thérapeutiques 80
4. Les protéines de choc thermique 81
4.1. Généralités sur les HSPs 81
4.2. La synthèse des HSPs 82
4.3. La protéine HSP110 83
4.3.1. Généralités 83
4.3.2. Structure 84
4.3.3. Cycle de renaturation des protéines 86
4.3.4. Son rôle dans la vaccination 87
4.3.4.1. Faciliter la présentation antigénique et la réponse immunitaire 88
4.3.4.2. Essais cliniques de phase I 89
4.3.5. Son implication dans le cancer colorectal 89
4.3.5.1. La mutation de HSP110 : formation de protéines HSP110ΔE9 89
4.3.5.2. Les molécules ciblant HSP110 en phase d'essais pré-cliniques 91
II. Projet de recherche 96
III. Matériels et méthodes 99

IV. Résultats 112

1. Projet principal : optimiser l'efficacité des anti-PD-L1 par l'ajout d'un inhibiteur de HSP110 dans un modèle de cancer colorectal 113

1.1. Identification des cibles thérapeutiques dans deux modèles de cancers colorectaux *in vitro* : une lignée plutôt résistante à l'immunothérapie (CT26) et une lignée plutôt sensible à l'immunothérapie (MC38) 113

1.2. Effet de i007 sur le taux de protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses et dans les macrophages de type M1 et M2 *in vitro* 114

1.3. Effet de la double combinaison thérapeutique anti-PD-L1/i007 sur la croissance tumorale dans le modèle de cancer colorectal CT26 *in vivo* 120

1.4. Effet de la triple combinaison thérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3/i007 sur la croissance tumorale dans le modèle de cancer colorectal CT26 *in vivo* 131

1.5. Données supplémentaires 135

2. Ouverture sur un nouveau projet : optimiser l'efficacité des anti-PD-L1 par l'ajout d'un anti-LAG-3 dans un modèle de cancer colorectal 138

2.1. LAG-3 : structure, ligands et fonction 138

2.2. Effet de la double combinaison immunothérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur la croissance tumorale dans le modèle de cancer colorectal CT26 WT *in vivo* 140

2.3. Effet de la double combinaison immunothérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs dans le modèle de cancer colorectal CT26 *in vivo* 142

2.4. Effet de la double combinaison immunothérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur la survie dans le modèle de cancer colorectal CT26 *in vivo* 143

V. Discussion et perspectives 146

1. Projet principal : optimiser l'efficacité des anti-PD-L1 par l'ajout d'un inhibiteur de HSP110 dans un modèle de cancer colorectal 147

2. Ouverture sur un nouveau projet : optimiser l'efficacité des anti-PD-L1 par l'ajout d'un anti-LAG-3 dans un modèle de cancer colorectal 154

VI. Conclusion générale 156

VII. Références bibliographiques 158

VIII. Annexes 184

1. Participation à des congrès scientifiques 185

2. Publication d'une revue scientifique 185

3. Réalisation d'activités complémentaires au doctorat 198

Liste des figures, tableaux et abréviations

Liste des figures

Figure 1. Mécanisme de la cancérogenèse 25
Figure 2. Les caractéristiques des cellules cancéreuses. 29
Figure 3. Les différents stades de développement du cancer du côlon. 33
Figure 4. La réponse immunitaire innée et adaptative à médiation cellulaire au cours d'un cancer. 45
Figure 5. La lyse cellulaire dépendante des anticorps 47
Figure 6. La polarisation des macrophages. 51
Figure 7. Les 3 signaux qui induisent l'activation et la polarisation du lymphocyte T. 52
Figure 8. Les différents sous-types de lymphocytes T $CD4^+$ et leur production de cytokines. 54
Figure 9. Les différents sous-types de lymphocytes T $CD8^+$ et leur production de cytokines. 58
Figure 10. Les principaux points de contrôle immunitaire activateurs et inhibiteurs sur les lymphocytes T. . 62
Figure 11. Structure de PD-1 et PD-L1. 65
Figure 12. La voie PD-1/PD-L1. 66
Figure 13. Les taux de réponse objective des patients aux monothérapies anti-PD-1/PD-L1 dans divers cancers. 71
Figure 14. Les phases d'épuisement d'un lymphocyte T. 73
Figure 15. Synthèse des HSPs. 83
Figure 16. Structure de HSP110. 85
Figure 17. Le cycle de renaturation des protéines dénaturées par le complexe Hsp70/Hsp110. 87
Figure 18. Survie sans maladie des patients atteints de cancer colorectal de stade III à statut MSI HSP110ΔE9Low/High. 91
Figure 19. Les inhibiteurs chimiques de HSP110 de première génération. 92
Figure 20. Effet de la molécule chimique 33 sur la croissance tumorale. 93
Figure 21. Structure chimique de 007 et son site de liaison à HSP110. 94
Figure 22. Effet de 33 (composé 1) et 007 (composé 7) sur la croissance tumorale dans un modèle de souris xénogreffées avec des cellules cancéreuses colorectales humaines HCT116. 95
Figure 23. Principe de fonctionnement de la technologie nanostring. 109
Figure 24. Anneau blanc contenant les PBMCs après centrifugation du sang humain dilué dans du PBS 1X et du milieu de séparation des lymphocytes. 110
Figure 25. Identification des cibles thérapeutiques PD-L1 et HSP110 dans les modèles de cancers colorectaux CT26 WT et MC38 WT. 113
Figure 26. Effet de i007 sur l'expression de PD-L1 dans les lignées CT26 WT et MC38 WT *in vitro*. 115
Figure 27. Effet de i007 sur la différenciation des macrophages de type M1 et M2. 117
Figure 28. Effet de l'inhibition de HSP110 dans les cellules cancéreuses sur les taux protéiques de PD-L1 dans les macrophages et les tumeurs. 119
Figure 29. Effet de la double combinaison anti-PD-L1 / inhibition de HSP110 sur la croissance tumorale dans le modèle CT26. 121

Figure 30. Effet de la double thérapie anti-PD-L1/i007 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs. 123
Figure 31. Effet de l'inhibition de HSP110 uniquement sur les cellules tumorales associée à des anti-PD-L1 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs. 126
Figure 32. Effet de la double thérapie anti-PD-L1/i007 sur l'expression génique au sein des tumeurs par rapport à la monothérapie anti-PD-L1. 129
Figure 33. Effet de la triple combinaison anti-PDL1/i007/anti-LAG-3..... 132
Figure 34. Résumé de l'effet observé *in vitro* de la molécule i007 et *in vivo* de la combinaison thérapeutique anti-PD-L1 + i007..... 134
Figure 35. Test d'ensemencement pour les lignées CT26 WT et MC38 WT..... 135
Figure 36. Détermination de l'IC50 de i007 sur les lignées CT26 WT et MC38 WT..... 137
Figure 37. Les ligands de LAG-3 et leur rôle dans le cancer. 139
Figure 38. Effet de la double combinaison anti-LAG-3/anti-PD-L1 sur la croissance tumorale..... 141
Figure 39. Effet de la double combinaison anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs. 143
Figure 40. Effet de la double combinaison anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur la survie..... 144

Liste des tableaux

Tableau 1. La classification TNM du cancer du côlon. 32
Tableau 2. Les thérapies ciblées approuvées par la FDA dans le CCR métastatique. 37
Tableau 3. Les immunothérapies approuvées par la FDA dans le CCR métastatique. 39
Tableau 4. Les anti-PD-1 approuvés par la FDA et utilisés actuellement en clinique. 68
Tableau 5. Les anti-PD-L1 approuvés par la FDA et utilisés actuellement en clinique. 69
Tableau 6. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western-blotting 103
Tableau 7. Liste des anticorps murins utilisés pour la cytométrie en flux 107
Tableau 8. Liste des anticorps humains utilisés pour la cytométrie en flux 111

Liste des abréviations

Numéro

5-FU : 5-Fluorouracile

Symbole

αPD-L1 : Anti-PD-L1
αLAG-3 : Anti-LAG-3

A

AA : Acides aminés
ADAM : A désintégrine et métalloprotéinase
ADCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps
ADCP : Phagocytose cellulaire dépendante des anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP : Adénosine diphosphate
AhR : Récepteur d'hydrocarbures aryliques
AKT : Protéine kinase B
ALK : Kinase du lymphome anaplasique
ARN : Acide ribonucléique
ATP : Adénosine triphosphate

B

β2M : β2-microglobuline
B7-DC : Membre de la famille B7
B7-H1 : Membre de la famille B7
Bcl-2 : Leucémie/lymphome à cellules B-2
Bcl2a1a : Protéine A1 liée à BCL2
BCL6 : Lymphome à cellules B-6
BNC2 : Basonucline 2, protéine à doigts de zinc
BRAF : v-Raf homologue B1 de l'oncogène viral du sarcome murin
BSA : Albumine de sérum bovin
BTLA : Atténuateur de lymphocytes B et T

C

CA9 : Anhydrase carbonique IX
CAM : Complexe d'attaque membranaire
CBPC : Cancer du poumon à petites cellules
CCL : Ligand de chimiokine à motif C-C
Ccl4 : CCL4
CCR : Cancer colorectal
CCR6 : Récepteur 6 de chimiokine de type C-C
CD : Cluster de différenciation
CD1d : Cluster de différenciation 1-d
Cd86 : CD86
CD40L : Ligand de CD40
CDC : Cytotoxicité dépendante du complément
cDC1 : Cellule dendritique conventionnelles de type 1
cDC2 : Cellule dendritique conventionnelle de type 2
CDCC : Cytotoxicité cellulaire dépendante du complément
CDCP : Phagocytose cellulaire dépendante du complément
CMH I-II : Complexe majeur d'histocompatbilité de type I-II
CO_2 : Dioxygène
Col6a3 : Collagène type VI α3
CPA : Cellule présentatrice d'antigènes
Cpa3 : Carboxypeptidase A3
CPNPC : Cancer du poumon non à petites cellules
CRC : Cancer colorectal
CSF1 : Facteur 1 stimulateur de colonie
CSF1R : Récepteur de CSF1
CT26 : Lignée cellulaire de carcinome du côlon de souris
CTLA-4 : Antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques
Ctsw : Cathepsine W
CXCL : Chimiokine à motif C-X-C
CXCL9 : Ligand 9 de la CXCL
CXCL10 : Ligand 10 de la CXCL
CXCR3 : Récepteur 3 de chimiokines à motif C-X-C
Cxcr4 : CXCR4

D

DAMP : Motif moléculaire associé aux dommages
DC : Cellule dendritique
Dectin-1 : Lectine de type C associée aux cellules dendritiques-1
DLBCL : Lymphome diffus à grandes cellules B
DMEM : Milieu de Eagle modifié par Dulbecco
dMMR : MMR déficient
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DNAJ : HSP40

E

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique
EOMES : Eomesodermine

ER+BC : Cancer du sein à récepteurs d'œstrogènes positifs
ERK : Kinase régulée par le signal extracellulaire

F

Fas : Antigène de surface cellulaire associé à FS7
FasL: Ligand de Fas
Fbn1 : Fibrilline 1
FcR : Récepteur Fc
FcγRIIIa : Récepteur FcγIIIa
FDA : Administration des aliments et des médicaments
FGL-1 : Protéine 1 analogue au fibrinogène
FOXO4 : Boîte à tête de fourche O4
Foxp3 : Boîte à tête de fourche P3
Fstl1 : Follistatine 1
FVS : Coloration de la viabilité fixable

G

Galectine 3 : Galactose lectine-3
GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GATA3 : Protéine 3 de liaison à GATA
GITR : Récepteur du TNF induit par les glucocoticoïdes
GM-CSF : Facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages
gp100 : glycoprotéine 100
GRP170 : Protéine 170 régulée par le glucose
GzA : Granzyme A
GzB : Granzyme B

H

HBSS : Solution saline équilibrée de Hanks
HCC : Carcinome hépatocellulaire
HCT116 : Lignée cellulaire de carcinome du côlon humain
HCl : Acide chlorhydrique
HER2 : Récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain
HLA : Antigène leucocytaire humain
HLA-DR : Antigène leucocytaire humain - *DR*
HMGB1: Protéine 1 du groupe de haute mobilité
HNSCC : Carcinome épidermoïde de la tête et du cou
HPV16 : Papillomavirus humain 16
HSC70 : Protéine cognitive de choc thermique
HSE : Elément de choc thermique
HSF1 : Facteur de choc thermique 1
HSP : Protéine de choc thermique
HSPH1 : Membre 1 de la famille H des protéines de choc thermique
HSP110ΔE9 : ARNm HSP110 dépourvu d'exon 9
HVEM : Médiateur d'entrée du virus de l'herpès

I

IC50 : Concentration inhibitrice semi-maximale
ICOS : Le costimulateur inductible
IFNγ : Interféron γ
Ig : Immunoglobuline
IgG : Immunoglobuline de type G
IL : Interleukine
Il10ra : Sous-unité α du récepteur de l'IL-10
IL-1R : Récepteur à l'IL-1
Il2rb : Sous-unité β du récepteur de l'IL-2
ILT2-3 : Transcrits de type immunoglobuline 2-3
iNKT : NKT invariant
iNOS : Oxyde nitrique synthase inductible
IRF4 : Facteur de régulation de l'interféron 4
ITIM : Motif d'inhibition des immunorécepteurs basés sur la tyrosine
ITSM : Motif de commutation des immunorécepteurs basé sur la tyrosine

J

JAK : Kinase janus

K

kDa : Kilodalton
$KHCO_3$: Bicarbonate de potassium
Klrd1 : Récepteur D1 de type lectine des cellules tueuses
KRAS : Homologue de l'oncogène viral du sarcome du rat de Kirsten
Ku70/Ku80 : Protéine hétérodimérique Ku

L

LAG-3 : Gène 3 d'activation des lymphocytes
LIF : Facteur inhibiteur de la leucémie
Lox : Lysyl oxydase
LPS : lipopolysaccharides
LSECTin : Lectine de type C des cellules sinusoïdales du foie et des ganglions lymphatiques

M

MAPK : Protéine kinase activée par les mitogènes
MCC : Carcinome à cellules de Merkel
MC38 : Lignée cellulaire d'adénocarcinome du côlon
M-CSF : Facteur de stimulation des colonies de macrophages

MDSC : Cellule myéloïde suppressive
MEK : Protéine kinase activée par les mitogènes
MerTK : Tyrosine kinase Mer
MLH1 : Homologue humain de MutL
MMP : Métalloprotéases matricielles
MMR : Système de réparation des mésappariements de l'ADN
Ms4a4a : 4 domaines membranaires A4A
MSH2-6 : Homologue mutS 2-6
MSI : Statut à microsatellites instables
MSI CRC : Cancer colorectal à haute instabilité des microsatellites
MSI-H : MSI élevé
MSS : Statut à microsatellites stables
MyD88 : Facteur de différenciation myéloïde 88

N

NaF : Fluorure de sodium
NBD : Domaine de liaison aux nucléotides
Ncr1 : Récepteur 1 de déclenchement de la cytotoxicité naturelle
NF-κB : Facteur nucléaire kappa B
NH_4Cl : Chlorure d'ammonium
NHEJ : Jonction non homologue des extrémités de l'ADN
NK : Cellule tueuse naturelle
NKG2A : Protéine membre A du groupe 2 des NK
NKG2D : Récepteur du groupe 2D des NK
Nkg7 : Protéine 7 des granules des NKs
NKp46 : CD335
NKT : Cellule T tueuse naturelle
NO : Monoxyde d'azote
NOD/SCID : Diabète non obèse/déficience immunitaire combinée sévère
Nude : Souris ayant un système immunitaire déficient
NSCLC : Cancer du poumon non à petites cellules
NTRK : Récepteur tyrosine kinase neurotrophique

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
ORR : Taux de réponse objective
Osm : Oncostatine M
OSp94 : Protéine de stress osmotique de 94 kDa
OX40 : CD134

P

PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique
PBS : Tampon phosphate salin
PCNSL : lymphome primaire du système nerveux central
PD-1 : Protéine de mort cellulaire programmée 1
pDC : Cellule dendritique plasmacytoïde
PD-L1/2 : Ligand 1/2 du récepteur de mort cellulaire programmée 1
Pi : Phosphate inorganique
PMA : Phorbol myristate acétate
Pmaip 1 : Protéine 1 induite par le phorbol-12-myristate-13-acétate
PMBCL : lymphome primaire médiastinal à cellules B
pMMR : MMR performant
PMSF : Fluorure de phénylméthanesulfonyle
PMS2 : Ségrégation post-méiotique augmentée 2
Prf1 : Perforine 1
PTEN : Homologue de la phosphatase et de la tensine
PU-1 : Membre de la famille des facteurs de transcription Ets
PVDF : Fluorure de polyvinylidène

Q

Qa-1 : HLA-E chez l'homme

R

RAS : Homologue de l'oncogène viral du sarcome du rat
RCC : Carcinome à cellules rénales
RORγt : Récepteur orphelin lié au récepteur de l'acide rétinoïque γt
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RPMI : Institut Mémorial Roswell Park
RT : Température ambiante
Runx3 : Facteur de transcription 3 lié à Runt

S

S100A4 : Protéine A4 de liaison au calcium S100
SBDβ : Domaine de liaison au substrat
SBDα : Domaine α-helix
SCC : Carcinome épidermoïde
SCLC : Cancer du poumon à petites cellules
SD : Déviation standard
SDS : Dodécyl sulfate de sodium
SDS-PAGE : Gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécylsulfate
SEM : Erreur standard à la moyenne
shCtl : Cellules CT26 préalablement infectées avec un virus contrôle
sh110 : Cellules CT26 ayant des niveaux de protéines HSP110 faibles
SHP-1/2 : Protéine tyrosine phosphatase 1/2 contenant l'homologie src-2

STAT : Transducteur et activateur de signaux de transcription
Stat1 : STAT1
SVF : Sérum de veau fœtal
SW480 : Lignée cellulaire humaine de cancer du côlon

T

TAM : Macrophage associé aux tumeurs
Tapbp : Protéine de liaison à la TAP
Tbet : Protéine T-box exprimée dans les cellules T
TBS : Solution tampon-tris
Tc1 : Cellule T $CD8^+$ 1
TCF-1 : Facteur 1 des cellules T
TCR : Récepteur des cellules T
TEM : Transition épithelio-mésenchymateuse
Tfh : Lymphocyte T auxiliaire folliculaire
TGFβ : Facteur de croissance transformant β
Th : Lymphocyte T auxiliaire
Tie2 : Kinase 2 des cellules endothéliales de la tunique interne enrichie
Tim-3 : Immunoglobuline des cellules T et domaine contenant de la mucine-3
TLR2 : Récepteur 2 de type Toll
TLR4 : Récepteur 4 de type Toll
TMB-H : Charge mutationnelle tumorale élevée
TNBC : Cancer du sein triple négatif
Tnf : TNF
TNFα : Facteur de nécrose tumorale α
TNM : Tumeurs, ganglions, métastases
Tpsab1 : Tryptase αβ1
Tpsb2 : Tryptase β2
Treg : Lymphocyte T régulateur
TRAIL : Ligand induisant l'apoptose lié au TNF

V

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VISTA : Immunoglobuline à domaine V suppresseur de l'activation des cellules T

W

WT : Type sauvage

Y

YAP : Protéine associée au oui

Z

ZAP70 : Protéine associée à zeta

I. Introduction

I. Introduction

1. Le cancer

1.1. Généralités

Le cancer est caractérisé par la prolifération de cellules transformées et incontrôlables par l'organisme, nuisant ainsi au bon fonctionnement des organes et du corps. Cette maladie très répandue aussi bien chez les hommes que les femmes est la première cause de mortalité en France et la deuxième dans le monde. En 2023, 433 000 cancers ont été diagnostiqués selon *Santé Publique France* avec une majorité de cancer du sein chez la femme et de la prostate chez les hommes, suivi par les cancers pulmonaire et colorectal pour les deux sexes. Les cancers sont classés en 2 grandes catégories : les cancers solides et liquides. Les cancers solides sont caractérisés par la naissance de la maladie dans des tissus et comprennent les carcinomes, provenant de cellules épithéliales [1] et les sarcomes, provenant de cellules de tissus conjonctifs [2]. Quant aux cancers liquides, ils prennent naissance dans la circulation sanguine ou lymphatique et comprennent les lymphomes, provenant de globules blancs appelés les lymphocytes [3] et les leucémies, provenant de cellules du sang et/ou de la moelle osseuse [4,5].

1.2. Mécanisme de la cancérogenèse

La cancérogenèse est le processus qui conduit à l'apparition d'un cancer. Ce processus débute par une phase d'initiation au cours de laquelle l'acide désoxyribonucléique (ADN) d'une cellule normale va se léser spontanément ou suite à son exposition à un agent cancérigène [6]. Les altérations génétiques engendrées vont favoriser la prolifération, la survie et la différenciation de cette cellule devenue anormale. Il s'en suit une phase de promotion où la cellule, considérée comme pré-néoplasique, prolifère de façon active, ce qui va former un amas cellulaire appelé tumeur. Des changements génétiques, phénotypiques et une augmentation rapide de la taille de la tumeur apparaissent ensuite au cours de la phase de progression : les cellules sont alors considérées comme néoplasiques [6]. La phase terminale de la cancérogenèse implique le détachement de cellules cancéreuses de la tumeur qui vont

migrer dans le sang ou la lymphe et coloniser d'autres parties du corps pour former des tumeurs secondaires appelées métastases [6] (**Figure 1**).

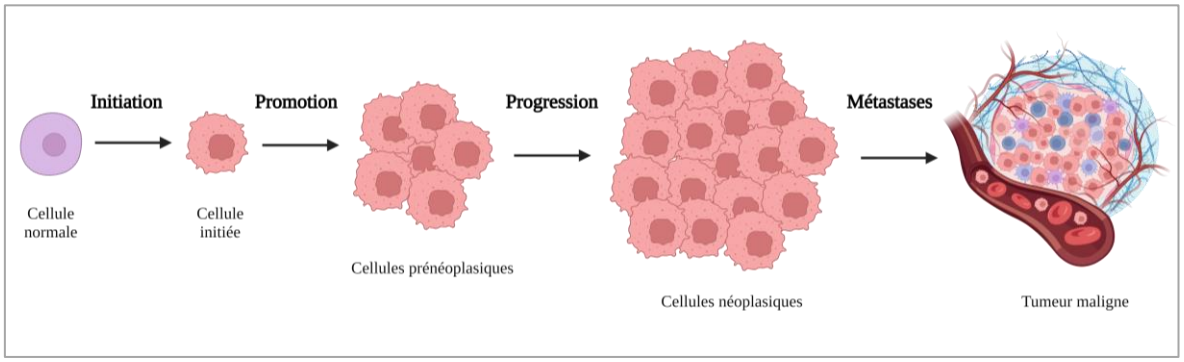


Figure 1. Mécanisme de la cancérogenèse. La cancérogenèse est le processus conduisant à l'apparition d'un cancer. Elle se déroule en quatre étapes. La phase d'initiation apparaît lorsque l'ADN d'une cellule normale est lésé spontanément ou suite à son exposition à un agent cancérigène. La cellule, appelée alors cellule initiée, va ensuite proliférer de façon active pendant la phase de promotion et donner naissance à des cellules pré-néoplasiques. Des changements génétiques, phénotypiques et une augmentation rapide de la taille de la tumeur apparaissent ensuite au cours de la phase de progression, donnant naissance à des cellules néoplasiques. Des cellules néoplasiques peuvent ensuite se détacher de la tumeur et circuler dans le sang ou la lymphe afin de coloniser d'autres organes/tissus : c'est la phase de formation de métastases. *Schéma réalisé par Siddiqui et al., 2015 [6] et adapté par Aude Chavanton.*

1.3. Particularités des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses développent des mécanismes qui leur permettent de survivre dans un environnement donné. En 2011, Hanahan.D et Weinberg.R ont résumé les 10 grandes caractéristiques des cellules cancéreuses qui ont été complétées en 2022 par l'ajout de quatre nouvelles caractéristiques [7,8]. Les 14 caractéristiques actuellement mises en évidence sont résumées ci-dessous **(Figure 2)**.

- **Le maintien de la prolifération** : les cellules cancéreuses peuvent maintenir leur prolifération grâce à des protéines appelées « facteurs de croissance », qui proviennent des cellules voisines ou de la cellule cancéreuse elle-même [9–11]. Les cellules cancéreuses peuvent également induire une activation constitutive de la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes (MEK) / kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK), impliquée dans la croissance tumorale lorsque la protéine « v-Raf homologue B1 de l'oncogène viral du sarcome murin » (BRAF) est mutée ($BRAF^{V600E}$) [12–14].

- ♣ **L'échappement aux suppresseurs de croissance** : les cellules cancéreuses peuvent contourner les effets antiprolifératifs des gènes suppresseurs de tumeurs, qui sont des gènes inhibant la prolifération cellulaire et le développement tumoral [15,16]. Ainsi, dans de nombreuses tumeurs les gènes suppresseurs de tumeurs sont mutés ou absents.
- ♣ **L'activation de l'invasion et des métastases** : les cellules cancéreuses peuvent acquérir de nouvelles propriétés afin de se détacher des autres cellules et faciliter leur intravasation et leur migration dans le sang ou la lymphe pour rejoindre et coloniser d'autres tissus/organes. Ce processus s'appelle la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) qui implique une disparition des jonctions intercellulaires pour laisser place à des facteurs mésenchymateux tels que la N-cadhérine, Vimentine, Fibronectine ou encore la protéine A4 de liaison au calcium S100 (S100A4) [17] qui sont impliqués dans le processus migratoire ou métastatique [18–21].
- ♣ **L'immortalité réplicative** : les cellules cancéreuses possèdent un enzyme ADN polymérase qui ajoute des fragments répétés au bout des télomères des chromosomes : il s'agit de l'ADN télomérase. Cet enzyme est très faiblement présent dans des cellules non immortalisées et sa présence dans les cellules cancéreuses permet à ces dernières d'éviter le raccourcissement des télomères des chromosomes et ainsi la mort cellulaire par sénescence ou apoptose [22–25].
- ♣ **L'induction de l'angiogenèse** : l'angiogenèse est un processus qui vise à former de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un vaisseau sanguin initial. Ce processus est très répandu dans les tumeurs puisque les cellules cancéreuses ont besoin de ces vaisseaux pour éliminer leurs déchets/CO2 mais également pour s'approvisionner en nutriments et croître. Il existe plusieurs facteurs impliqués dans l'activation de l'angiogenèse et notamment le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) [26–28].
- ♣ **La résistance à la mort cellulaire** : les cellules cancéreuses peuvent éviter la mort cellulaire en perdant la fonction suppressive de tumeurs de p53 [29], en augmentant l'expression de facteurs anti apoptotiques ou en diminuant l'expression des facteurs pro apoptotiques, ce qui limite l'apoptose [30–33]. Elles peuvent également utiliser l'autophagie afin de générer des catabolites qui

pourront être réutilisés pour la biosynthèse, et également pour le métabolisme énergétique [7,34].

- **La dérégulation du métabolisme cellulaire** : les cellules cancéreuses peuvent reprogrammer leur métabolisme cellulaire, notamment la voie métabolique du glucose, en favorisant la conversion du pyruvate issu de la glycolyse en lactate en présence d'oxygène. Ce phénomène s'appelle l'effet warburg ou glycolyse aérobie. Le lactate va acidifier le milieu et limiter l'action des défenses immunitaires [35,36].
- **L'instabilité et la mutation du génome** : des gènes impliqués dans la surveillance de l'intégrité du génome peuvent être affectés, ce qui compromet la réparation de l'ADN, et peut conférer un avantage sélectif à la cellule en facilitant sa croissance et sa domination dans un environnement tissulaire local [7]. Ainsi, l'instabilité génomique peut faciliter la progression tumorale [7,37,38].
- **L'inflammation favorisant les tumeurs** : dans certaines tumeurs, une inflammation est générée, visible par l'infiltration de cellules immunitaires. L'inflammation peut faciliter la progression tumorale en délivrant de multiples facteurs, tels que des facteurs de croissance, des facteurs pro-angiogéniques ou encore des signaux facilitant l'activation de la TEM [7].
- **L'évitement de la destruction immunitaire** : les cellules cancéreuses peuvent avoir la capacité d'échapper à la surveillance du système immunitaire qui est impliqué dans la reconnaissance et la destruction des cellules cancéreuses. Divers mécanismes peuvent être utilisés tels que la sécrétion de facteurs immunosuppresseurs ou le recrutement de cellules immunitaires immunosuppressives qui vont limiter l'action des cellules immunitaires antitumorales [7,39–41].
- **Le déblocage de la plasticité phénotypique** : les cellules cancéreuses peuvent se dédifférencier, c'est-à-dire passer d'un stade de cellule différenciée à un stade de cellule progénitrice. Elles peuvent également bloquer leur différenciation et rester sous forme de cellules progénitrices ou encore se transdifférencier en divers types cellulaires [8].
- **Leur capacité à entrer en sénescence** : la sénescence est un état de dormance dans lequel la cellule arrête de proliférer de façon irréversible. Les cellules

cancéreuses semblent avoir la capacité d'entrer en sénescence de façon transitoire et réversible et ainsi de retrouver leur état de prolifération [8]. Par ailleurs, les cellules sénescentes sont capables de générer des effets pro-tumoraux, notamment par l'activation d'un phénotype sécrétoire associé à la sénescence qui peut favoriser l'induction de l'angiogenèse, stimuler l'invasion et les métastases, mais aussi éviter l'apoptose [8,42,43].

- **Les microbiomes polymorphes** : il s'agit de micro-organismes présents dans différents organes/muqueuses, mais également dans les tumeurs. Ils peuvent avoir une incidence sur le développement du cancer en générant des effets protecteurs ou délétères. Ils peuvent par exemple favoriser les métastases [8,44].
- **La reprogrammation épigénétique non mutationnelle** : le cancer pourrait être lié également à des altérations épigénétiques modulant l'expression des gènes, mais ne faisant pas intervenir de mutations [8]. Par exemple, certaines hyperméthylations ou hypométhylations de gènes peuvent favoriser les métastases [45–48].

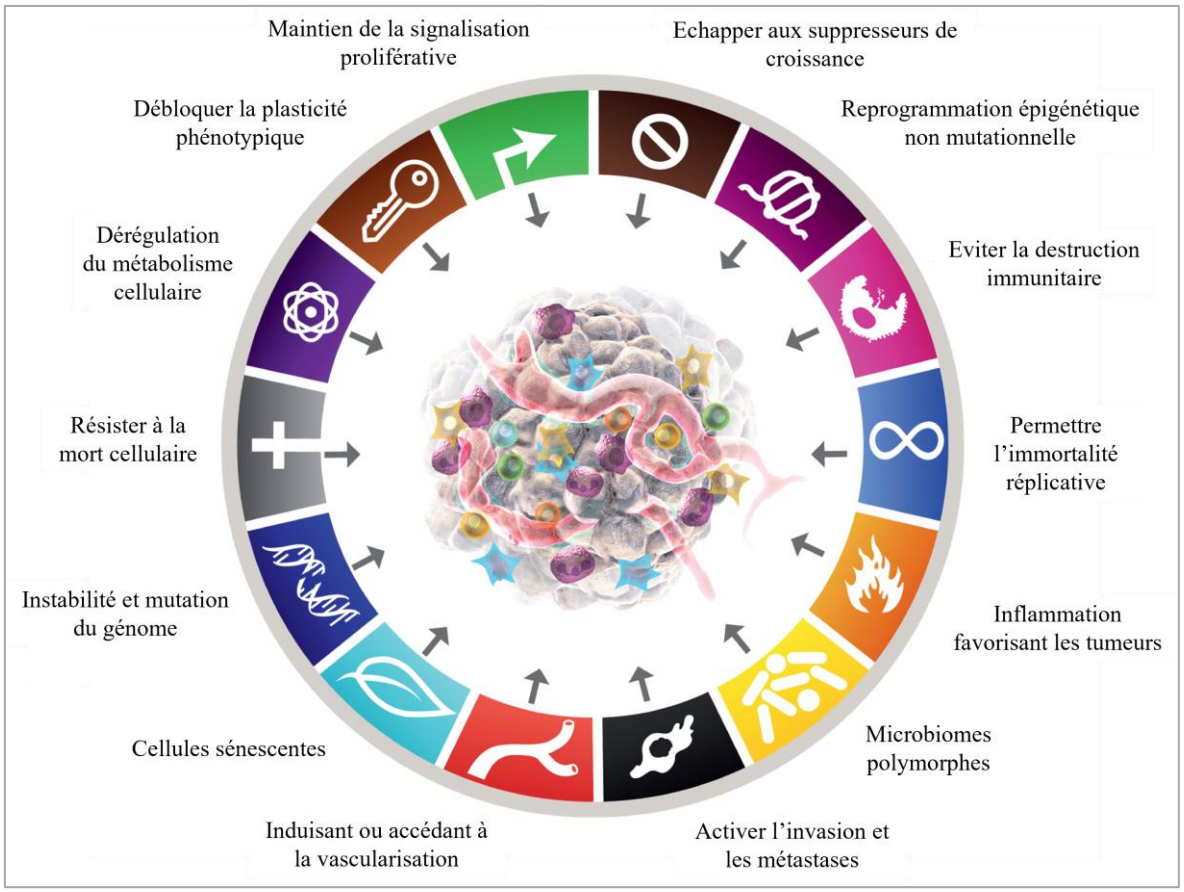


Figure 2. Les caractéristiques des cellules cancéreuses. Les 14 principales caractéristiques des cellules cancéreuses sont le maintien de la prolifération, l'échappement aux suppresseurs de croissance, l'activation de l'invasion et des métastases, l'immortalité réplicative, l'induction de l'angiogenèse, la résistance à la mort cellulaire, la dérégulation du métabolisme cellulaire, l'instabilité et mutation du génome, l'inflammation favorisant les tumeurs, l'évitement de la destruction immunitaire, le déblocage de la plasticité phénotypique, la capacité à entrer en sénescence, la présence de microbiomes polymorphes dans les tumeurs et la reprogrammation épigénétique non mutationnelle. *Schéma réalisé par Hanahan .D, 2022* [8] *et adapté par Aude Chavanton.*

1.4. Le cancer colorectal (CCR)

1.4.1. Généralités

Le cancer colorectal est le troisième cancer le plus répandu et l'un des cancers les plus meurtriers avec environ 900 000 décès enregistrés en 2022, ce qui en fait la deuxième cause de décès par cancer dans le monde selon l'*Organisation Mondiale de la Santé (OMS)*. Le taux de mortalité élevé du CCR peut être souligné par un diagnostic généralement tardif de la maladie [49], ce qui limite le choix dans les options thérapeutiques. Le CCR regroupe

l'ensemble des cancers prenant naissance dans le côlon ou le rectum, les deux parties terminales du tube digestif [50]. Le côlon se divise en quatre parties : le côlon ascendant (droit), transverse, descendant (gauche) et sigmoïde (**Figure 3**). Suivant la localisation du cancer, la survie globale des patients peut être plus fortement impactée. En effet, chez les patients atteints de cancer du côlon à un stade avancé, la localisation du cancer dans le côlon droit est associée à une survie globale à 5 ans plus faible que la localisation du cancer dans le colon gauche [51,52]. Les symptômes associés au CCR sont principalement l'obstruction partielle ou totale de l'intestin qui est souvent associé à la constipation, les nausées, la distension abdominale et les douleurs abdominales lorsque le cancer est localisé du côté gauche, et des saignements rectaux et une anémie ferriprive (carence en fer) lorsque le cancer est localisé du côté droit [49].

Les CCRs se développent en général entre 10 et 15 ans et se classent en trois grands types de cancers : les cancers sporadiques qui représentent la majorité des CCRs (70% des cas), les cancers héréditaires qui sont associés au syndrome de Lynch et à la polypose adénomateuse familiale (3 à 5% des cas), et les cancers associés à la colite, une inflammation du côlon (moins de 2% des cas) [50,53]. Le syndrome de Lynch est caractérisé par la mutation de gènes de la famille du système de réparation des mésappariements de l'ADN et est classé comme un cancer sans polypose. 95% des CCRs sont des adénocarcinomes, les 5% restants correspondant à des cancers très rares. Les adénocarcinomes regroupent les adénocarcinomes liberkühniens qui sont générés dans les glandes de liberkühn de la muqueuse colique (85% des cas) et les adénocarcinomes mucineux qui contiennent beaucoup de mucus (10% des cas).

1.4.2. Les facteurs de risque

Les principaux facteurs de risques du CCR sont liés à l'environnement et au mode de vie. En effet, l'obésité, le manque d'activité physique, le tabagisme, la consommation élevée d'alcool, de sel ou de viandes rouges sont des risques importants du CCR [54–56]. Un mode de vie sain pourrait ainsi limiter les risques de développer ce type de cancer. Les infections bactériennes par *Helicobacter Pylori* ou virales par les papillomavirus humains ou encore le virus de l'hépatite B ont également été associés à un risque de développement du cancer colorectal [57–59]. Par ailleurs, l'augmentation de l'âge est un facteur de risque [60,61], mais des

études démontrent que l'incidence du CCR augmente chez les jeunes [62,63]. De plus, une méta-analyse démontre que le surpoids à un jeune âge est positivement corrélé au risque de développer un CCR [64]. Les antécédents familiaux sont également des facteurs de risque, notamment chez les personnes de 50 ans ou moins [65]. Le risque de développer un CCR est d'autant plus important lorsque plusieurs parents du premier degré ont été atteints d'un CCR et que l'âge au moment du diagnostic était jeune [66]. Les personnes présentant des maladies génétiques telle que le syndrome de Lynch sont également à risque [53,67], de la même manière que les patients ayant une maladie inflammatoire de l'intestin telles que la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse [54,68]. Enfin, le stress au travail est également un facteur de risque du CCR [69].

1.4.3. La méthode d'analyse de l'évolution de la maladie et des métastases

De nos jours en clinique, une cellule cancéreuse unique n'est pas détectable, la maladie cancéreuse n'est détectable qu'au stade où la tumeur est formée. Une classification internationale nommée TNM pour Tumeur/Ganglion lymphatique/Métastase, permet d'évaluer le stade de la maladie cancéreuse, c'est-à-dire, le degré d'avancement de la maladie [70]. Ainsi, selon la taille de la tumeur primaire (T), le degré d'invasions des ganglions lymphatiques adjacents (N) et la présence ou non de métastases (M), le stade du cancer peut s'étendre de 1 à 4 (**Tableau 1**). Le stade 4 étant le stade le plus avancé de la maladie, associé à la présence de métastases. Il est considéré comme la principale cause de mortalité induite par le CCR [71].

Tableau 1. La classification TNM du cancer du côlon. *D'après Lackman et Wilkinson, 2024* [72]
LN : ganglions lymphatiques ; TNM : tumeur, ganglion lymphatique, métastase.

CATEGORIE	DESCRIPTION
T	**Tumeur primaire**
Tx	La tumeur primaire ne peut pas être évaluée
T0	Absence de preuve d'une tumeur primaire
T1	La tumeur envahit la sous-muqueuse
T2	La tumeur envahit la musculeuse
T3	La tumeur traverse la musculeuse pour envahir les tissus péri-colorectaux
T4	La tumeur envahit jusqu'au péritoine viscéral ou aux organes ou structures adjacents
N	**LN régional**
Nx	Le LN régional ne peut pas être évalué
N0	Aucun LN
N1	1-3 LN positifs
N2	≥4 LN positifs
M	**Métastases distantes**
M0	Aucune métastase distante selon l'imagerie
M1	Métastases à 1 ou plusieurs sites distants

Dans le cancer du côlon, les stades sont principalement déterminés selon le degré d'invasion des différentes couches de la paroi du côlon : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculeuse et la séreuse. Le stade 0 est appelé carcinome *in situ* et correspond à la présence de cellules cancéreuses dans la muqueuse de la paroi du côlon (couche la plus interne). À ce stade, les cellules cancéreuses forment un adénome ou polype. Il est à noter qu'à ce stade la tumeur formée peut être bénigne, non cancéreuse. Les polypes adénomateux peuvent devenir cancéreux et envahir la couche suivante de la paroi du côlon, la sous-muqueuse ou la musculeuse. Le développement du cancer passe alors au stade I. Lorsque la tumeur croît davantage, elle va envahir la séreuse, passant ainsi au stade II puis le péritoine viscéral pour passer au stade III. Le stade métastatique correspondant à la migration de cellules

cancéreuses dans le sang ou la lymphe pour coloniser d'autres organes permettant de passer au stade IV du développement du CCR [50,73] (**Figure 3**).

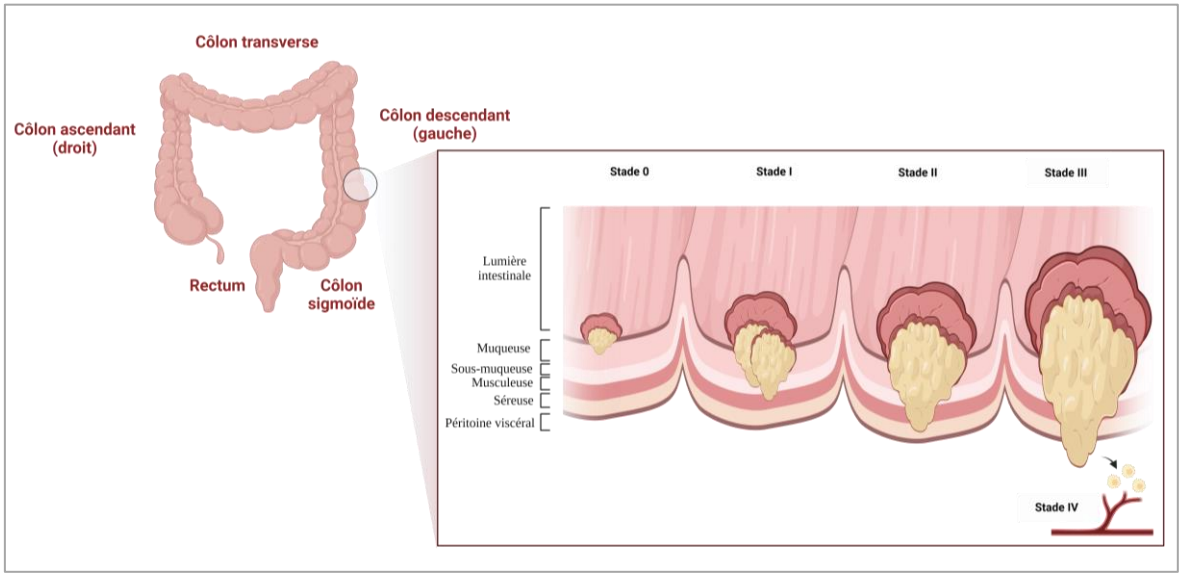


Figure 3. Les différents stades de développement du cancer du côlon. Le stade 0 correspond au moment où les cellules cancéreuses sont situées dans la muqueuse. Lorsque la tumeur croît elle peut envahir la sous-muqueuse ou musculeuse, passant ainsi au stade I. Lorsque la tumeur croît davantage, elle peut envahir la séreuse (stade II) puis le péritoine (stade III). Enfin, des cellules cancéreuses peuvent se détacher de la tumeur et migrer dans le sang ou la lymphe pour coloniser d'autres organes/tissus (stade IV). *Schéma réalisé par Aude CHAVANTON à l'aide du logiciel Biorender.*

Les stades II, III et IV sont divisés en plusieurs stades IIA/B/C, IIIA/B/C et IVA/B/C principalement définis selon le degré d'invasion des tissus voisins (stades IIA/B/C), des ganglions lymphatiques (stades IIIA/B/C) et des organes à distance du côlon (stades IVA/B/C) [73].

1.4.4. Les principales classes de traitements

Selon l'OMS, il existe 5 grandes classes de traitements utilisés actuellement pour traiter le cancer colorectal : la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, les thérapies ciblées et l'immunothérapie. Chacun d'entre eux agit directement ou indirectement sur les cellules cancéreuses.

1.4.4.1. La chirurgie

La chirurgie est la principale arme thérapeutique contre le CCR, notamment à un stade précoce (stades 0 à II) [50]. La chirurgie a pour objectif d'enlever manuellement la ou les tumeurs présentent dans le corps. Dans le cadre du CCR, la chirurgie inclut l'ablation des tumeurs, mais également le mésentère qui les entoure [49]. Différentes méthodes chirurgicales sont utilisées afin d'éliminer les tumeurs telles que la polypectomie qui permet l'exérèse des polypes, l'ablation des tumeurs par radiofréquence qui utilise une sonde insérée à travers la peau ou l'abdomen détruisant les cellules cancéreuses, ou encore la cryochirurgie qui utilise un instrument qui va détruire les tumeurs en les gelant [73]. Selon l'OMS, d'autres chirurgies peuvent avoir lieues telles que colectomie ou proctectiomie qui vise à retirer une partie du côlon ou du rectum respectivement.

1.4.4.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie est souvent la première ligne de traitement des CCR, notamment pour les stades avancés. La chimiothérapie a pour objectif de détruire les cellules en cours de division rapide, dont les cellules cancéreuses, en agissant au niveau de l'ADN ou des microtubules. Elle agit ainsi de manière non-spécifique aux cellules cancéreuses, induisant ainsi de nombreux effets secondaires tels que la perte des cheveux, les nausées/vomissements, la fatigue ou encore la perte d'appétit [74–76]. Plusieurs types de chimiothérapies sont utilisées pour traiter le CCR dont le fluorouracile (5-FU), l'irinotécan, l'oxaliplatine, la leucovorine et la capécitabine qui peuvent être utilisés en monothérapies ou en combinaison. Les principales combinaisons chimiothérapeutiques utilisées dans le cadre du CCR sont le FOLFOX (association de 5-FU/leucovorine et d'oxaliplatine), le FOXFIRI (5-FU/leucovorine et irinotécan), le CAPOX (capécitabine et oxaliplatine), le CAPIRI (capécitabine et irrinotécan), le CAPEOX (capécitabine et oxaliplatine) et le CAPIRI (capécitabine et irinotécan) [49,50,77]. Le FOLFOX et FOLFIRI sont les traitements privilégiés de première intention pour les CCR métastatiques [71,78]. L'ajout d'oxaliplatine au 5-FU/leucovorine (FOLFOX) a permis d'améliorer la survie sans progression des patients atteints de CCR en passant de 6,2 mois à 9 mois par rapport à des patients ne recevant que le 5-FU/leucovorine. Cela a également permis d'augmenter le taux de réponse des patients en passant de 22,3% à 50,7%, mais au prix d'une toxicité plus importante. Une fréquence

plus élevée de neutropénies de grade 3/4 a été observée ainsi que de diarrhées de grade 3/4 et de toxicités neurosensorielles de grade 3 pour les patients traités au FOLFOX [79]. De même pour l'ajout d'irinotécan au 5-FU/leucovorine (FOXFIRI), les taux de réponse ont augmenté chez les patients atteints de CCR par rapport aux patients ne recevant que le 5-FU/leucovorine (49% versus 31%) avec des toxicités augmentées également mais qui ont été jugées prévisibles, réversibles, non-cumulatives et gérables [80]. Des régimes contenant davantage de chimiothérapies sont également utilisés tel que le FOLFOXIRI (5-FU/leucovorine, oxalipatine et irinotécan) qui a permis d'augmenter le taux de réponse (60% versus 34%), la survie sans progression et la survie globale des patients atteints de CCR par rapport au FOLFIRI [81]. Néanmoins, le FOLFOXIRI ne semble pas apporter de bénéfice supplémentaire en termes d'activité thérapeutique par rapport au FOLFOX chez des patients atteints de CCR métastatique [82]. Il a même été mentionné un effet néfaste puisque la toxicité gastro-intestinale a augmenté sous FOLFOXIRI [82]. Malgré leur efficacité sur certains patients et leur utilisation en première ligne de traitements, les chimiothérapies restent des thérapies toxiques en raison de leur aspécificité aux cellules cancéreuses et induisent également des phénomènes de résistance chez les patients.

1.4.4.3. La radiothérapie

La radiothérapie utilise des rayons qui endommagent le matériel génétique et surtout fragmentent l'ADN des cellules, ce qui induit leur destruction. La zone à irradier est bien déterminée, c'est ainsi un traitement locorégional. Il existe différents types de radiothérapies utilisées dans le CCR : la radiothérapie externe et la radiothérapie interne [73] qui sont définis par l'irradiation des tumeurs depuis une source de rayonnement située à l'extérieur du patient ou au contact direct de la tumeur respectivement. La radiothérapie permet un contrôle local des métastases qui est associé à une meilleure survie [83]. Elle est souvent utilisée dans le CCR avancé en association avec des chimiothérapies [84–86]. La radiothérapie permet également de potentialiser les effets de thérapies ciblées et immunothérapies sur la survie sans progression et la survie globale des patients atteints de CCR métastatique [87]. Néanmoins, la radiothérapie a des limites, tout comme la chimiothérapie, elle entraîne des effets secondaires en raison de son aspécificité aux cellules cancéreuses, mais également peut être associée à des phénomènes de résistance. En effet, chez des patients atteints de CCR récurrent ayant déjà

reçu une radiothérapie, la réirradiation entraîne une mauvaise survie sans progression et survie globale à 2 ans [88]. De plus, la radiothérapie dans le CCR métastatique semble moins efficace lorsque les patients ont déjà reçu plusieurs lignes de chimiothérapies par rapport à ceux n'ayant qu'une seule chimiothérapie [85].

Afin d'affiner le ciblage des cellules cancéreuses, les thérapies ciblées et l'immunothérapie sont des pistes largement développées de nos jours.

1.4.4.4. Les thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont des traitements qui agissent sur une cible spécifique au niveau de la tumeur ou de son microenvironnement et dont cette cible est impliquée dans la croissance tumorale. Les thérapies ciblées font partie de la médecine personnalisée/de précision, puisqu'elles permettent de s'adapter au profil tumoral de chaque patient. En effet, l'analyse du profil tumoral d'un patient donné permettra d'identifier les protéines exprimées et impliquées dans la croissance tumorale et ainsi sélectionner le traitement ciblé le plus approprié pour ce patient. Trois principales classes de thérapies ciblées ont été approuvées par l'administration des aliments et des médicaments (FDA) dans le CCR métastatique [89] (**Tableau 2**) :

- ♣ Les inhibiteurs des récepteurs aux facteurs de croissance ou les inhibiteurs de BRAF. Les inhibiteurs de récepteurs aux facteurs de croissance vont cibler notamment le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2).
- ♣ Les anti-angiogéniques qui limite l'angiogenèse. Il s'agit notamment des inhibiteurs du VEGF.
- ♣ Les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase. Il s'agit notamment des inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase neurotrophique (NTRK).

Tableau 2. Les thérapies ciblées approuvées par la FDA dans le CCR métastatique. D'après Underwood et al., 2024 [89]
NTRK = Récepteur tyrosine kinase neurotrophique

Thérapie ciblée	Nom commercial	Année d'approbation	Voie
Cetuximab	Erbitux	2004	Inhibiteur EGFR
Panitumumab	Vectibix	2006	Inhibiteur EGFR
Bevacizumab	Avastin	2004	Inhibiteur VEGF
Ramucirumab	Cyramza	2015	Inhibiteur VEGF
Aflibercept	Zaltrap	2012	Inhibiteur VEGF
Fruquintinib	Fruzaqla	2023	Inhibiteur VEGF
Encorafenib	Braftovi	2020	Inhibiteur BRAF
Trastuzumab	Hercepin	2022	Inhibiteur HER2
Pertuzumab	Perjeta	2022	Inhibiteur HER2
Tucatinib	Tukysa	2023	Inhibiteur HER2
Larotrectinib	Vitrakvi	2018	Inhibiteur NTRK
Entrectinib	Rozlytrek	2019	Inhibiteur NTRK
Regorafenib	Stivarga	2012	Inhibiteur multi-kinases

Plusieurs études ont démontré l'efficacité des thérapies ciblées combinées à des chimiothérapies. En ce qui concerne les inhibiteurs EGFR, le cetuximab en association avec le FOLFOX a amélioré la durée de survie sans progression par rapport au FOLFOX seul chez des patients atteints de CCR métastatique avec un statut « homologue de l'oncogène viral du sarcome de rat » (RAS) sauvage, en passant de 7,4 mois à 9,2 mois [90]. De même, chez les patients atteints de CCR métastatique à statut « homologue de l'oncogène viral du sarcome du rat de Kirsten » (KRAS) sauvage, l'ajout de panitumumab au FOLFIRI améliore la survie sans progression par rapport aux patients traités uniquement avec FOLFIRI en passant de 3,9 mois à 5,9 mois. Cette combinaison thérapeutique augmente également le taux de réponse passant de 10% à 35% en présence de la combinaison thérapeutique [91].

Les anti-angiogéniques ont également démontré leur capacité de potentialisation des chimiothérapies. En effet, le bévacizumab a amélioré la durée de survie et la durée de survie sans progression des patients atteints de CCR métastatique et qui n'ont jamais été traités lorsqu'il a été couplé au FOLFIRI par rapport au FOLFIRI sans bévacizumab [92]. La durée

de survie est passée de 15,6 mois sans bévacizumab à 20,3 mois avec bévacizumab et la durée de survie sans progression de 6,2 mois sans bévacizumab à 10,6 mois avec bévacizumab [92]. La durée de réponse a également été améliorée dans le groupe de patients traités avec FOLFIRI + bévacizumab (10,4 mois) par rapport aux patients traités avec FOLFIRI uniquement (7,1 mois) [92]. De la même manière, l'aflibercept (inhibiteur VEGF) augmente la survie globale des patients atteints de CCR métastatique lorsqu'il est associé au FOLFIRI par rapport au FOLFIRI seul en passant de 12,06 mois à 13,5 mois [93]. La combinaison aflibercept + FOLFIRI augmente également la survie sans progression par rapport au FOLFIRI seul en passant de 4,67 mois à 6,90 mois. Cette combinaison améliore également le taux de réponse (19,8% de réponse contre 11,1% sans aflibercept) [93].

Les inhibiteurs du récepteur au facteur de croissance HER2 semblent également être une stratégie thérapeutique dans le CCR puisque l'association de tucatinib et trastuzumab a généré des effets anti-tumoraux chez les patients atteints de CCR non résécables ou métastatiques de type RAS sauvage, HER2 positif et réfractaire à la chimiothérapie [94]. De même, malgré que les études soient encore précoces, les inhibiteurs de récepteurs à activité tyrosine kinase ont démontré une activité intéressante dans le CCR. En effet, une étude de phase I-II sur des patients atteints de CCR métastatique ou localement avancé avec fusion NTRK (facteur oncogénique) a montré qu'un patient sur quatre (25%) a présenté une réponse à la thérapie entrectinib [95]. Une autre étude démontre que 50% (4/8) des patients atteints de cancer du côlon localement avancé ou métastatique présentant une fusion NTRK traités avec le larotrectinib, ont développé une réponse au traitement [96].

De manière générale, les thérapies ciblées sont en plein développement actuellement et les associations thérapeutiques avec les chimiothérapies semblent intéressantes. Les différentes études énoncées précédemment permettent également de cerner les patients les plus à même de répondre aux thérapies ciblées suivant les statuts qu'ils présentent (fusion NTRK, KRAS sauvage). Malgré une bonne efficacité des thérapies ciblées chez certains patients, de nombreux patients ne répondent encore pas à ces thérapies, ce qui implique que des mécanismes de résistance se mettent en place.

1.4.4.5. L'immunothérapie

L'immunothérapie anti-cancéreuse est une approche thérapeutique visant à activer le système immunitaire de façon à l'aider à mieux détruire les cellules cancéreuses. Cela signifie que cette stratégie thérapeutique ne s'attaque pas directement aux cellules cancéreuses, mais aux éléments d'origine naturelle favorisant sa destruction. Pour cela, plusieurs méthodes existent et sont basées sur l'utilisation de cytokines, d'anticorps, de cellules thérapeutiques, d'antigènes ou de virus. Nous parlons d'immunothérapie active dans le cadre de la vaccination ou de l'administration de cytokines ; et d'immunothérapie passive dans le cadre de l'utilisation d'anticorps ou de cellules thérapeutiques. Dans le CCR, plus de 24 essais cliniques basés sur l'immunothérapie ont été lancés et plus de 40 recrutent ou sont sur le point de recruter des patients [50].

Dans le cadre du CCR métastatique, trois immunothérapies pouvant également être classées comme des thérapies ciblées ont été approuvées par la FDA [89]. Il s'agit du nivolumab, pembrolizumab et ipilimumab qui ciblent la protéine de mort cellulaire programmée 1 (PD-1) ou l'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4) (**Tableau 3**). Ces anticorps seront décrits plus loin.

Tableau 3. Les immunothérapies approuvées par la FDA dans le CCR métastatique. D'après Underwood et al., 2024 [89]

Immunothérapie	Nom commercial	Année d'approbation	Voie
Nivolumab	Opdivo	2017	Inhibiteur PD-1
Pembrolizumab	Keytruda	2017	Inhibiteur PD-1
Ipilimumab	Yervoy	2018	Inhibiteur CTLA-4

L'immunothérapie a suscité l'intérêt de chercheurs à la vue de son efficacité dans le CCR, notamment chez une sous-population de patients : les patients présentant un statut à microsatellites instables (MSI) [97–99]. Les cancers à statut MSI possèdent des mutations au niveau de séquences géniques répétées appelées les microsatellites [100]. Cela s'explique par le fait que dans ces cancers, le système de réparation des mésappariements de l'ADN (système MMR) est défectueux et ne peut ainsi pas réparer les dommages causés à l'ADN.

Par opposition au statut MSI, le statut à microsatellites stable (MSS) est associé à un système MMR fonctionnel. Les cancers à statut MSI sont également appelés MMR déficient (dMMR) et les cancers à statut MSS sont également appelés MMR performants (pMMR). Le système MMR est constitué de quatre protéines majeures qui sont impliquées dans la réparation des mésappariements de l'ADN induites par l'ADN polymérase au cours de la réplication [101]. Ces quatre protéines sont l'homologue humain de MutL (MLH1), la ségrégation post-méiotique augmentée 2 (PMS2), l'homologue mutS 2 (MSH2) et l'homologue mutS 6 (MSH6). La perte de fonction d'une seule des quatre protéines induit l'inactivation du système MMR, ce qui conduit à une accumulation de mutations au niveau des microsatellites à l'origine de la formation de néoantigènes immunogènes [101,102]. Cela explique pourquoi les immunothérapies sont en général efficaces dans les cancers à statut MSI. Environ 15% des CCR sont classés en statut MSI [103].

Les patients atteints de CCR métastatique à statut MSI élevé (MSI-H) qui n'ont pas été traités auparavant ont eu une survie sans progression améliorée après traitement par pembrolizumab par rapport aux patients ayant reçu une chimiothérapie basée sur le 5-FU additionné ou non de bevacizumab ou cetuximab [97]. En effet, la médiane de survie sans progression était de 16,5 mois pour les patients traités au pembrolizumab et de seulement 8,2 mois pour les patients traités avec la chimiothérapie basée sur le 5-FU additionée ou non de bevacizumab ou cetuximab [97]. Une réponse globale (complète ou partielle) plus élevée chez les patients traités au pembrolizumab (43,8%) a également été observée par rapport au groupe chimiothérapie +/- thérapie ciblée (33,1%) [97]. Une étude de phase II chez des patients atteints de CCR métastatique ou récurrent présentant un statut MSI-H ayant progressé ou ayant été intolérant à au moins une ligne de traitement antérieur basé sur des chimiothérapies (5-FU et oxaliplatine ou irinotécan) a été mise en place pour évaluer l'effet du nivolumab. Dans cette étude, 31,1% des patients traités au nivolumab ont répondu de manière objective au traitement et 68,9% des patients ont eu un contrôle de la maladie pendant au moins 12 semaines [98]. L'association de nivolumab et ipilimumab a également permis de générer des taux de réponse objective (69%) et de contrôle de la maladie (84%) intéressants chez des patients atteints de CCR métastatique avec un statut MSI-H et n'ayant reçu aucun traitement auparavant [99].

Pour conclure, l'immunothérapie anti-cancéreuse semble être très prometteuse à la vue des taux de réponse objective des patients et de son efficacité supérieure à celle de certaines

chimiothérapies dans le CCR métastatique. L'immunothérapie est une avancée majeure dans la lutte contre le cancer, elle agit sur les propres défenses de l'organisme : le système immunitaire.

2. Le système immunitaire

Le système immunitaire a pour objectif de reconnaître les éléments étrangers de l'organisme ainsi que les cellules anormales comme les cellules cancéreuses afin de les éliminer. Lors d'une réaction immunitaire, deux types de réponses se produisent : la réponse immunitaire innée et adaptative.

2.1. La réponse immunitaire innée

La réponse immunitaire innée, aussi appelée "naturelle", est la première réaction immunitaire qui se met en place. Elle est rapide, dépourvue de mémoire et non-spécifique, ainsi elle peut reconnaître diverses molécules non-spécifiques aux cellules cancéreuses. Ces molécules non-spécifiques se nomment des motifs moléculaires associés aux dommages (DAMPs) parmi lesquels nous retrouvons la calréticuline, l'adénosine triphosphate (ATP) ou encore la protéine 1 du groupe de haute mobilité (HMGB1) [104–108]. Les DAMPs sont libérées par les cellules cancéreuses mourantes (en apoptose, nécroptose ou nécrose) [104–106] et sont reconnues par des récepteurs appelés récepteurs de reconnaissance des motifs [109–111] [107] présents sur les cellules immunitaires innées [108]. Lors de la mort cellulaire, des antigènes tumoraux sont également libérés par les cellules cancéreuses et reconnus par les cellules de l'immunité innée [112]. Les DAMPs et les antigènes tumoraux induisent l'activation des réponses immunitaires innées, ainsi la mort des cellules cancéreuses est qualifiée de mort cellulaire immunogène **(Figure 4)**. Les cellules immunitaires impliquées dans l'immunité innée sont les cellules dendritiques (DCs), monocytes, macrophages, neutrophiles, éosinophiles, basophiles, mastocytes, cellules lymphoïdes innées, cellules tueuses naturelles (NK) et lymphocytes T non-conventionnels (Tγδ et T tueur naturel (NKT)) [107,108,113]. La destruction des cellules cancéreuses par les cellules lymphoïdes innées, cellules NK, cellules Tγδ et NKT peut se faire de manière directe en sécrétant des granules cytotoxiques ou en engageant des récepteurs de mort [107,108,113,114] (**Figure 4**). Certaines d'entre elles ont également la capacité de détruire les cellules cancéreuses par le biais de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) grâce à leur récepteur Fc (FcR) (détaillée dans

la partie 2.2.2) [107]. Quant aux macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, éosinophiles, basophiles et mastocytes, ils sont davantage connus pour leur capacité de phagocytose des cellules cancéreuses [107,108,113,115,116]. Les débris phagocytés par ces cellules immunitaires sont exposés à leur surface membranaire sous forme d'antigènes associés aux tumeurs sur des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type I ou II (CMH I ou II) [117,118]. Ces cellules sont ainsi appelées des cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) et vont permettre l'activation de la réponse immunitaire adaptative.

2.2. La réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative, aussi appelée "acquise", est la seconde réaction immunitaire qui se met en place, suite à la réponse immunitaire innée. Elle est plus lente, génère une mémoire et est spécifique des cellules cancéreuses, c'est-à-dire que les cellules immunitaires impliquées dans cette réponse, majoritairement les lymphocytes B et T, reconnaissent spécifiquement les antigènes tumoraux présents à la surface des cellules cancéreuses. Deux types de réponses immunitaires adaptatives existent : la réponse cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T et humorale faisant intervenir les lymphocytes B.

2.2.1. La réponse cellulaire

Suite à la réponse immunitaire innée, les CPAs vont migrer du site tumoral vers les organes lymphoïdes secondaires, notamment les ganglions lymphatiques via la circulation lymphatique [119]. Dans les ganglions lymphatiques, les CPAs et notamment les cellules dendritiques, vont présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T naïfs et ainsi former une synapse immunologique [119]. Les CPAs qui présentent les antigènes tumoraux sur des molécules de CMH I vont activer les lymphocytes T $CD8^+$ (CD : Cluster de différenciation) tandis que les CPAs présentant des antigènes tumoraux sur des molécules de CMH II vont activer les lymphocytes T $CD4^+$ auxiliaires (**Figure 4**).

Les cellules dendritiques responsables de l'amorçage des lymphocytes T $CD8^+$ sont les cellules dendritiques conventionnelles de type 1 (cDC1) $CD103^+$ tandis que celles responsables de l'amorçage des lymphocytes T $CD4^+$ sont les cellules dendritiques

conventionnelles de type 2 (cDC2) CD11b^{+} (**Figure 4**) [120,121]. Néanmoins, certaines cellules dendritiques comme les cDC1 ont la capacité de présenter des antigènes tumoraux sur des molécules de CMH II à des lymphocytes T CD8^{+}. Nous parlons alors de présentation croisée [107,122,123]. Les lymphocytes T CD8^{+} et CD4^{+} activés vont ensuite proliférer et migrer vers le site tumoral via la circulation sanguine [119,122,124,125]. Les lymphocytes T CD8^{+} effecteurs connus pour avoir des propriétés cytotoxiques peuvent être attirés au sein de la tumeur par des cytokines particulières appelées chimiokines à motifs C-X-C (CXCL), et plus précisément les ligands 9 et 10 des CXCL (CXCL9 et CXCL10) [126]. Dans la tumeur, ils peuvent sécréter des molécules cytotoxiques telles que le granzyme B (GzB) et les perforines (**Figure 4**) [127].

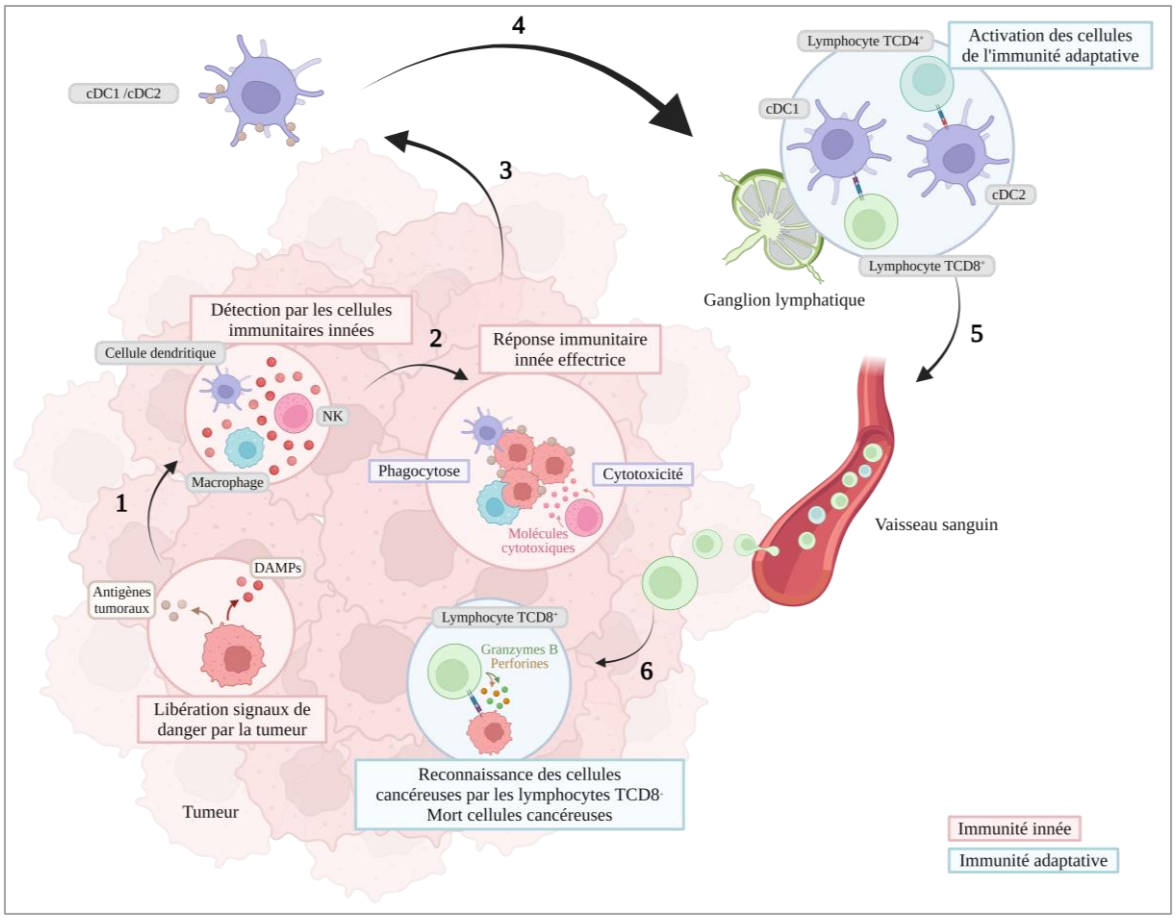


Figure 4. La réponse immunitaire innée et adaptative à médiation cellulaire au cours d'un cancer. (1) Les cellules cancéreuses libèrent des antigènes tumoraux et des molécules de danger (DAMPs) qui sont détectés par les cellules du système immunitaire inné en particulier les cellules NK, cellules dendritiques et macrophages. **(2)** Les cellules NK peuvent détruire les cellules cancéreuses en sécrétant des molécules cytotoxiques et les macrophages/cellules dendritiques peuvent phagocyter les cellules cancéreuses. **(3)** Les cellules dendritiques cDC1 et cDC2 vont exposer les antigènes tumoraux issus de la phagocytose à leur surface cellulaire et **(4)** les présenter aux lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques. Les cDC1 activent principalement les lymphocytes T $CD8^+$ tandis que les cDC2 activent principalement les lymphocytes T $CD4^+$ qui **(5)** migrent ensuite dans les tumeurs via la circulation sanguine. **(6)** Au sein des tumeurs, les lymphocytes T $CD8^+$ peuvent détruire les cellules cancéreuses en sécrétant des molécules cytotoxiques telles que le granzyme B ou les perforines. *Schéma réalisé par Demaria et al., 2019* [107] *et adapté par Aude Chavanton. Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

2.2.2. La réponse humorale

La réponse immunitaire humorale fait intervenir les lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps. En effet, les lymphocytes B peuvent être activés par reconnaissance d'un néoantigène sur le récepteur des cellules B et se différencier en plusieurs types cellulaires : plasmablastes à courte durée de vie, plasmocytes à longue durée de vie et cellules B mémoires [128]. Les anticorps sécrétés par les cellules B sont spécifiques du néoantigène [128,129]. Ces anticorps vont ainsi se fixer sur les antigènes tumoraux à la surface des cellules cancéreuses, ce qui facilite l'activation de plusieurs mécanismes impliqués dans la destruction des cellules tumorales [130] : la cytotoxicité dépendante du complément (CDC), la cytotoxicité cellulaire dépendante du complément (CDCC) et la phagocytose cellulaire dépendante du complément (CDCP), la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps et la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP).

La CDC/CDCC/CDCP font intervenir la voie classique du système du complément qui utilise le complexe protéique C1 pour générer des protéines C3b qui peuvent avoir deux actions (**Figure 5**) [131–133] :

- Elles peuvent participer à la formation de pores au sein de la membrane plasmique des cellules cancéreuses, appelés "complexe d'attaque membranaire" (CAM), ce qui facilite la lyse des cellules cancéreuses par libération du contenu cellulaire : il s'agit de la **CDC** [131–133].
- Elles peuvent se fixer à la surface des cellules cancéreuses et être reconnues par les cellules NK et macrophages qui portent le récepteur au C3b [132]. Les cellules NK vont induire la lyse des cellules cancéreuses par cytotoxicité : il s'agit de la **CDCC** ; tandis que les macrophages vont induire la destruction des cellules cancéreuses par phagocytose : il s'agit de la **CDCP** [132,134,135].

L'ADCC et l'ADCP quant à eux font intervenir les récepteurs FcγRIIIa des macrophages et cellules NK. En effet, ces derniers peuvent reconnaître la partie Fc des anticorps, ce qui leur permet de lyser les cellules tumorales soit par phagocytose (macrophages) : il s'agit de l'**ADCP** ; soit par libération de molécules cytotoxiques (cellules NK) : il s'agit de l'**ADCC** [132] (**Figure 5**).

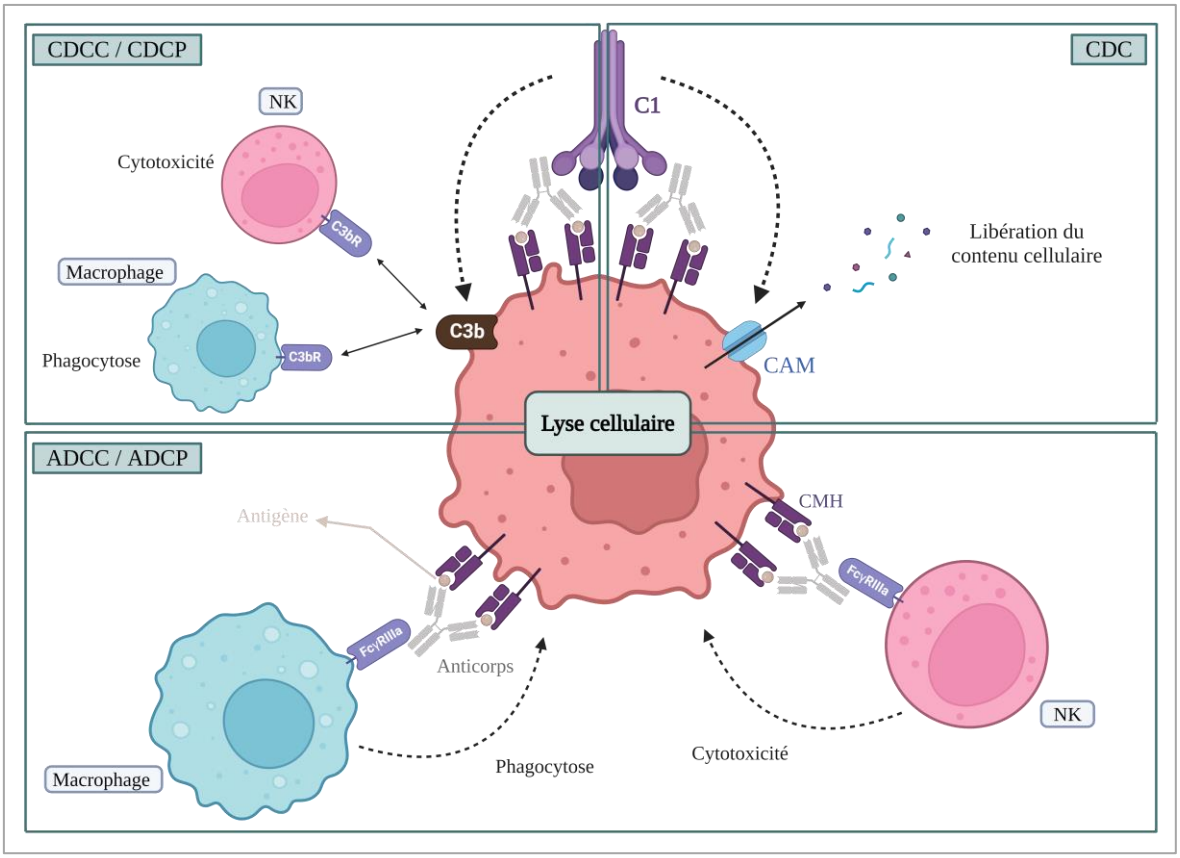


Figure 5. La lyse cellulaire dépendante des anticorps. Le complexe C1 du système du complément peut se lier à la région Fc des anticorps, eux même liés aux antigènes par leur partie Fab. Ce complexe C1 facilite la formation de protéines C3b qui conduisent à la formation d'un complexe d'attaque membranaire (CAM) qui permet aux cellules de libérer leur contenu à l'extérieur, ce qui induit leur lyse (CDC). Les protéines C3b peuvent se lier à la surface de la cellule tumorale et être reconnues par les macrophages et cellules NK porteuses du récepteur au C3b. Les macrophages peuvent ainsi phagocyter les cellules tumorales et les cellules NK, libérer des granules cytotoxiques afin de lyser les cellules tumorales (CDCC). De même, les macrophages et cellules NK peuvent reconnaître la partie Fc des anticorps grâce à leur récepteur FcγRIIIa et induire la lyse des cellules tumorales par phagocytose ou cytotoxicité respectivement. *Schéma réalisé par Aude Chavanton et inspiré par Peters.C and Brown.S, 2015* [132]*. Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

Les cellules B sont également impliquées dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T $CD4^+$ grâce à la reconnaissance de l'antigène [128]. Les cellules B sont ainsi considérées comme des cellules présentatrices d'antigènes et sont capables d'induire une réponse des cellules T [136]. L'interaction entre les cellules B et T est nécessaire à la production d'anticorps à long terme [128].

2.3. Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs)

Les macrophages associés aux tumeurs appelés TAMs sont les macrophages que nous retrouvons au sein des tumeurs ou du microenvironnement tumoral. Bien que nous associons souvent les TAMs à des macrophages ayant un phénotype pro-tumoral favorisant la croissance des tumeurs [137], il existe en réalité deux types de TAMs : les macrophages de type ou phénotype M1 et les macrophages de type ou phénotype M2 [138]. Ils sont issus de la polarisation des macrophages et ont des propriétés différentes, notamment en termes d'activité pro ou antitumorales.

2.3.1. Les macrophages de type M1

Les macrophages de type M1 sont identifiés principalement par l'expression des marqueurs « antigène leucocytaire humain-DR » (HLA-DR), CD86, CD80, récepteur 4 de type Toll (TLR4), récepteur 2 de type Toll (TLR2) chez l'homme [139–142] et CD80, l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS), le CMH II chez la souris [143–145]. Ils sont activés suite à la présence de divers facteurs présents dans leur microenvironnement tels que l'interféron γ (IFNγ), les lipopolysaccharides, le facteur stimulant les colonies de granulocytes et macrophages (GM-CSF) et le facteur de nécrose tumorale α (TNFα). Une fois activés, ces macrophages sont capables de sécréter diverses interleukines (ILs) telles que l'IL-12 et IL-23 [138,146] ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et du monoxyde d'azote (NO) (**Figure 6**). Ils sont associés à des effets antitumoraux notamment par leur capacité à favoriser l'infiltration de lymphocytes T [147], à limiter la prolifération des cellules cancéreuses [138], à favoriser la différenciation de lymphocytes T antitumoraux ainsi qu'en induisant la mort des cellules cancéreuses par l'action cytotoxique des espèces réactives de l'oxygène et du NO. Un autre mécanisme de destruction des cellules cancéreuses par ces macrophages est l'ADCC (**Figure 5**) [137]. Les macrophages de type M1 sont souvent associés à une meilleure survie chez les patients atteints de cancer [139,147–149].

2.3.2. Les macrophages de type M2

Les macrophages de type M2 ont des propriétés différentes des macrophages de type M1. Ils sont identifiés principalement par l'expression des marqueurs de surface CD163 et

CD206 chez l'homme et la souris [138–143] et sont activés suite à la présence d'IL-4 et l'IL-13 dans leur microenvironnement. Les macrophages de type M2 se distinguent des macrophages de type M1, car ils sont davantage associés à la progression de la maladie cancéreuse, notamment en favorisant la TEM, l'immunosuppression et l'angiogenèse. Les macrophages de type M2 sont divisés en quatre sous-classes : les M2a, M2b, M2c et M2d (**Figure 6**).

- M2a

Les macrophages de type M2a sont les macrophages de type M2 les plus étudiés. Ils expriment les marqueurs de surface CD206, CD209, la lectine de type C associée aux cellules dendritiques-1 (Dectin-1) [150] et sont activés par l'IL-4 et l'IL-13 [150,151]. Ils sécrètent du VEGF et un ligand de chimiokine à motif C-C (CCL) appelé CCL18 qui favorisent tout deux l'angiogenèse et la migration/invasion des cellules cancéreuses [150,152] (**Figure 6**). De plus, ils favorisent le recrutement des éosinophiles, basophiles et de lymphocytes Th2 davantage associés à des effets pro-tumoraux en favorisant l'expression des chimiokines CCL24, CCL17 et CCL22. Les macrophages M2a sont également impliqués dans la réparation et le remodelage des tissus [150,151].

- M2b

Les macrophages de type M2b expriment le marqueur de surface CD86 [153] et sont activés par les complexes immuns anticorps/antigènes, les lipopolysaccharides (LPS) et l'IL-1 [150,150,151,153] (**Figure 6**). Tandis que les complexes immuns se fixent sur les récepteurs de surface Fcγ des macrophages de type M2b, le LPS et l'IL-1 se fixent sur les récepteurs TLR4 et à l'IL-1 (IL-1R) respectivement [150]. La polarisation des macrophages en phénotype M2b nécessite au moins deux signaux : le signal induit par les complexes immuns ainsi que celui induit par le LPS ou le signal induit par les complexes immuns ainsi que celui induit par l'IL-1 [150,153] Les macrophages M2b sécrètent principalement de l'IL-10, IL-6, IL-1, le TNFα et la chimiokine CCL1 [150,153] (**Figure 6**). Seul le sous-type M2b des macrophages de type M2 produit de grandes quantités de CCL1 qui est impliqué dans le recrutement de lymphocytes Th2 et T régulateurs (Tregs) [150,154], des sous-types de lymphocytes T connus pour leurs propriétés pro-tumorales. Tout comme CCL1, l'IL-6, IL-10 et TNFα ont été identifiés comme des molécules favorisant les effets protumoraux, par exemple l'IL-6

favorise l'activation des Th2, l'IL-10 la différenciation des Treg et le TNFα la migration et la formation de métastases [150]. Les M2b sont ainsi impliqués dans l'immunorégulation [151].

♣ M2c

Les macrophages de type M2c expriment fortement les marqueurs de surface CD163, la tyrosine kinase Mer (MerTK) et la kinase 2 des cellules endothéliales de la tunique interne enrichie (Tie2). Ils sont activés par l'IL-10, le facteur de croissance transformant β (TGFβ) ainsi que les hormones glucocorticoïdes [150,151] (**Figure 6**). Les macrophages M2c sécrètent les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGFβ ainsi que les chimiokines CCL16, CCL18 et CXCL13 [150,150,155] (**Figure 6**). Les principaux mécanismes d'action des M2c sont leur capacité à limiter l'inflammation, notamment en limitant la capacité des macrophages à se polariser en macrophages de type M1, en capturant les chimiokines inflammatoires et en éliminant les cellules apoptotiques par phagocytose. L'élimination des cellules apoptotiques va favoriser la libération de cytokines anti-inflammatoires. Les M2c favorisent également la croissance tumorale, l'invasion des cellules cancéreuses, l'angiogenèse et sont impliqués dans le remodelage des tissus [150,153].

♣ M2d

Les macrophages M2d sont la dernière sous-classe de M2 à avoir été mis en évidence. Ils expriment fortement les récepteurs de surface CD14, CD163, les transcrits de type immunoglobuline 2 et 3 (ILT2, ILT3) [150,150] et sont activés principalement par l'IL-6, les ligands de TLR et les agonistes des récepteurs A2 de l'adénosine tels que le facteur inhibiteur de la leucémie (LIF) [150] (**Figure 6**). Les macrophages de type M2d sécrètent les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGFβ qui vont favoriser la prolifération et la migration des cellules cancéreuses. Ils sont également capables de produire du VEGF et la métalloprotéase matricielle (MMP) 9 qui induisent l'angiogenèse et la dégradation de la matrice extracellulaire respectivement, ce qui facilite les métastases [150,150] (**Figure 6**). Les M2d sont également impliqués dans la suppression de la prolifération des lymphocytes T [150,151].

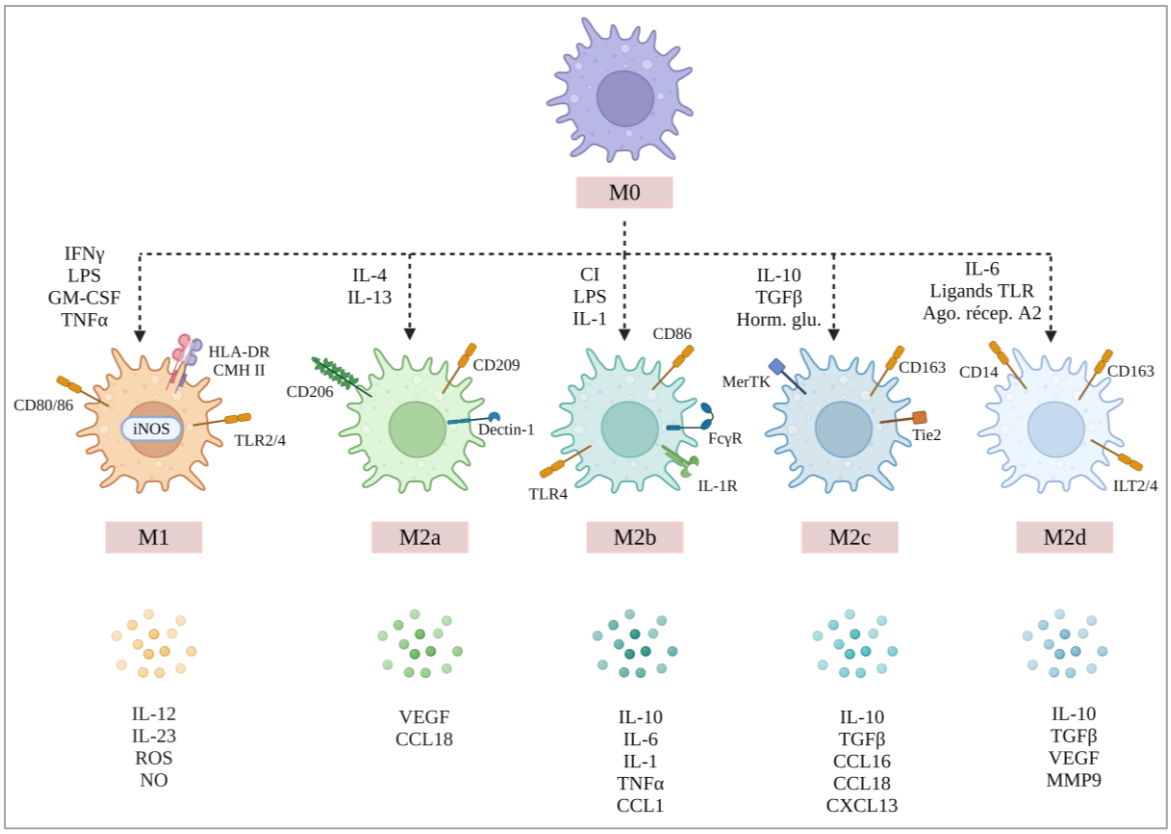


Figure 6. La polarisation des macrophages. Les macrophages de type M1 sont induits par l'IFNγ, LPS, GM-CSF et TNFα, expriment les récepteurs de surface CD80/86, HLA-DR/CMH II, TLR2/4 ainsi que l'iNOS et produisent de l'IL-12, IL-23, des ROS et du NO. Il existe quatre sous-types de macrophages de type M2 : M2a, M2b, M2c et M2d. Les M2a sont induits par l'IL-4 et IL-13, expriment le CD206, CD209, Dectin-1 et produisent du VEGF et CCL18. Les M2b sont induits par les complexes immuns (CI), le LPS et l'IL-1. Ils expriment les récepteurs de surface CD86, TLR4, FcγR et IL-1R et produisent de l'IL-10, IL-6, IL-1, TNFα et CCL1. Les M2c sont induits par l'IL-10, TGFβ et les hormones glucocorticoïdes (Horm. glu.), expriment les récepteurs de surface MerTK, CD163 et Tie2. Ils produisent de l'IL-10, du TGFβ et les chimiokines CCL16, CCL18 et CXCL13. Enfin, les M2d sont induits par l'IL-6, les ligands TLR et les agonistes des récepteurs A2 de l'adénosine (Ago. Récep. A2). Ils expriment les récepteurs de surface CD14, CD163 et ILT2/4. Ils produisent de l'IL-10, du TGFβ, du VEGF et MMP9. *Schéma réalisé par Aude Chavanton et inspiré par Wang et al., 2020* [151] *; Zhang et al., 2023* [150]*, Gao et al., 2022* [156] *et Zhang et Sioud* [150]*. Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

2.4. Les différents types de lymphocytes T

Différents types de lymphocytes T existent et ont des rôles différents dans le cancer. Ces différents lymphocytes T sont polarisés suite à l'action de cytokines produites par les CPAs.

En effet, un lymphocyte T naïf nécessite 3 signaux afin d'être activé et entraîner sa polarisation (**Figure 7**) [157,158] :

1. ***Le signal « récepteur des cellules T (TCR)/antigène/CMH »*** : il s'agit d'une interaction entre le complexe CMH/ peptide antigénique tumoral présent à la surface des CPAs et le TCR présent à la surface des lymphocytes T. Le TCR permet de reconnaître l'antigène tumoral présenté par la CPA.
2. ***Le signal de costimulation CD28*** : il s'agit d'une interaction entre les protéines de surface CD80/CD86 (nommées également B7.1/B7.2) présentes à la surface des CPAs et la protéine CD28 présente à la surface des lymphocytes T.
3. ***Le signal de polarisation*** : la CPA sécrète des cytokines qui agissent sur le lymphocyte T et entraînent sa polarisation en un sous-type de lymphocyte T.

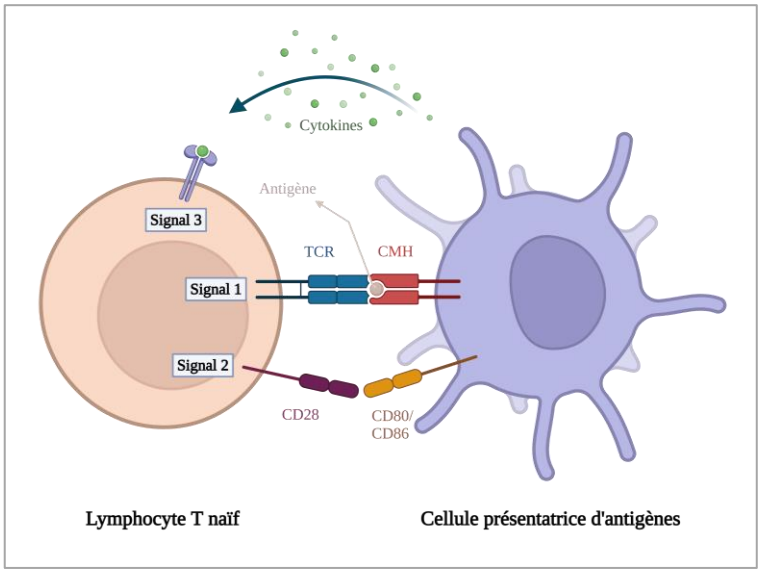


Figure 7. Les 3 signaux qui induisent l'activation et la polarisation du lymphocyte T. Un lymphocyte T naïf peut s'activer et se polariser suite à l'action de trois signaux : le signal 1 provenant de la reconnaissance du complexe CMH/antigène par le TCR ; le signal 2 de costimulation des molécules CD28 et CD80/CD86 et le signal 3 de nature cytokinique par lequel la cellule présentatrice d'antigènes sécrète des cytokines qui vont permettre la polarisation du lymphocyte T naïf. Schéma réalisé par Lee et al., 2020 [157] et adapté par Aude Chavanton avec des données issues de Thierry & Ménétrier-Caux [158]. *Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

2.4.1. Les lymphocytes T CD4$^+$

Les lymphocytes T CD4$^+$, appelés aussi T auxiliaires ou T helper en anglais, sont davantage impliqués dans le maintien de la réponse des lymphocytes T CD8$^+$ en favorisant leur amorçage [159]. Ils peuvent également favoriser la production d'anticorps par les lymphocytes B [160,161].

Les sous-types de lymphocytes T $CD4^+$ sont les T auxiliaires 1 (Th1), Th2, Th9, Th17, Th22, T auxiliaire folliculaire (Tfh) et Treg et sont différenciés suivant la présence de diverses cytokines dans leur environnement telles que l'IFNγ, IL-12, IL-2, IL-4, TGFβ, IL-6, IL-21 ou le TNFα [162,163] (**Figure 8**). Chaque sous-type de lymphocyte T $CD4^+$ est également caractérisé par l'expression de facteurs de transcription "signatures" : la protéine T-box exprimée dans les cellules T (Tbet), la protéine 3 de liaison à GATA (GATA3), le membre de la famille des facteurs de transcription Ets (PU-1), le récepteur orphelin lié au récepteur de l'acide rétinoïque γt (RORγt), la basonucline 2, protéine à doigts de zinc (BNC2), la boîte à tête de fourche O4 (FOXO4), le lymphome à cellules B-6 (BCL6) et la boîte à tête de fourche P3 (Foxp3) [162,163]. Lorsque les lymphocytes T $CD4^+$ sont différenciés en sous-type Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh et Treg, ils sécrètent à leur tour des cytokines particulières : IFNγ (Th1), IL-4, IL-5, IL-13 (Th2), IL-9, IL-21, IL-3, GzB (Th9), IL-17A, IL-17F, IL-22 (Th17), IL-22 (Th22), IL-21 (Tfh), IL-10, TGFβ (Treg) [162,164,165] (**Figure 8**).

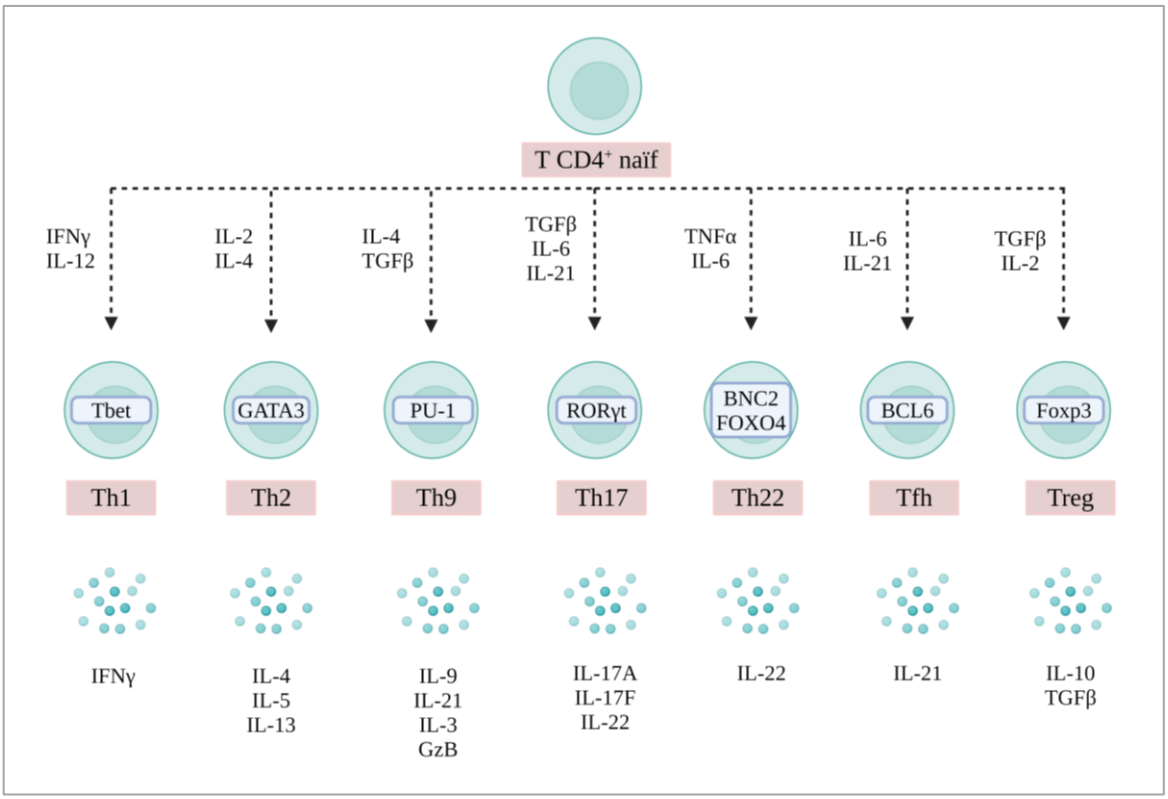


Figure 8. Les différents sous-types de lymphocytes T CD4⁺ et leur production de cytokines. Lorsqu'une cellule dendritique est activée, elle peut induire la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh et Treg. La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ dépend des cytokines IFNγ, IL-12 (Th1) ; IL-2, IL-4 (Th2) ; IL-4, TGFβ (Th9) ; TGFβ, IL-6, IL-21 (Th17) ; TNFα, IL-6 (Th22) ; IL-6, IL-21 (Tfh) ; TGFβ et IL-2 (Treg). Certains facteurs de transcription "signatures" caractérisent chaque sous-type de lymphocytes T CD4⁺ : Tbet pour les Th1, GATA3 pour les Th2, PU-1 pour les Th9, RORγt pour les Th17, BNC2 et FOXO4 pour les Th22, BCL6 pour les Tfh et Foxp3 pour les Treg. Les sous-types de lymphocytes T CD4⁺ sécrètent diverses cytokines : IFNγ (Th1), IL-4, IL-5, IL-13 (Th2), IL-9, IL-21, IL-3, GzB (Th9), IL-17A, IL-17F, IL-22 (Th17), IL-22 (Th22), IL-21 (Tfh), IL-10, TGFβ (Treg). *Schéma réalisé par Aude Chavanton et inspiré par Flamand, 2014* [162]*, Rouers et al., 2017* [163]*, Vegran et al., 2016* [164] *et Wang et al., 2023* [165]*. Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

Les lymphocytes T CD4⁺ davantage associés à des effets antitumoraux

Parmi les lymphocytes T CD4⁺ davantage associés à des effets antitumoraux, nous retrouvons les Th1, les Th9 et les Tfh. Les Th1 sont associés à un bon pronostic [166] et favorisent la production des chimiokines CXCL9 et CXCL10 par les macrophages infiltrant la tumeur [167], ces chimiokines étant impliquées dans le recrutement des lymphocytes T au sein de la tumeur [168,169]. Les Th9 sont également associés à des effets antitumoraux [170–173]. Ils favorisent la réponse des cellules T CD8⁺ [174–176] par un mécanisme dépendant de la chimiokine CCL20 et du récepteur 6 de chimiokine de type C-C (CCR6), impliqué dans le recrutement des cellules dendritiques au sein de la tumeur [175]. Par ailleurs, d'un point de vue

clinique, l'IL-9 (cytokine majeure des Th9), est corrélée à un bon pronostic en termes de survie dans le cancer du côlon [177]. Enfin, les Tfh sont des lymphocytes T retrouvés en particulier dans les structures lymphoïdes tertiaires des tumeurs et sont connus pour favoriser, par le biais de l'IL-21, la maturation des cellules B en plasmocytes et la production anticorps [178,179]. L'IL-21 participe également à la réponse antitumorale médiée par les lymphocytes T $CD8^+$ [180]. Les Tfh produisant la chimiokine CXCL13 peuvent recruter les lymphocytes T $CD8^+$, tout comme les lymphocytes B [179]. D'un point de vue clinique, la forte infiltration de Tfh dans les tumeurs est corrélée à un meilleur pronostic en termes de survie sans progression chez des patients atteints d'adénocarcinome canalaire pancréatique [179].

Les lymphocytes T $CD4^+$ davantage associés à des effets pro-tumoraux

Parmi les lymphocytes T $CD4^+$ davantage associés à des effets pro-tumoraux, nous retrouvons les Tregs et les Th22. Les Tregs peuvent agir négativement sur les lymphocytes T $CD8^+$ infiltrant les tumeurs [40,181], mais également sur les lymphocytes T $CD4^+$ principalement en inhibant leur prolifération [181]. Les Tregs agissent comme des suppresseurs de l'immunité notamment par l'action de cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, TGFβ [182] ou encore l'IL-35 qui freinent l'activation des lymphocytes T effecteurs [183]. Leur effet suppresseur peut également être dû à l'expression du CD25, la chaîne α du récepteur à l'IL-2, qui va permettre aux Tregs de capturer l'IL-2 et ainsi priver les lymphocytes T effecteurs de cette cytokine [183], qui est nécessaire à leur prolifération [184,185]. Les Tregs peuvent également exprimer le point de contrôle immunitaire CTLA-4 qui va se lier avec une plus forte affinité à CD80/86 que le CD28, bloquant ainsi la costimulation des lymphocytes T [183]. Enfin, d'autres molécules peuvent favoriser l'effet immunosuppresseur des Tregs telles que l'adénosine ou encore de la protéine associée au oui (YAP) [186,187]. Quant aux Th22, ils sont associés à l'interleukine IL-22 qui favorise la prolifération et la migration des cellules tumorales [188,188,189]. D'un point de vue moléculaire, l'IL-22 semble agir sur la voie de signalisation kinase janus (JAK)/transducteur et activateur de signaux de transcription (STAT)3 /protéine kinase activée par les mitogènes (MAPK)/protéine kinase B (AKT) dans le cancer du sein triple négatif et dans le cancer du poumon [188,190]. L'IL-22 peut également inhiber l'arrêt du cycle cellulaire induit par le cisplatine dans le cancer du poumon [188]. Dans le myélome multiple, les cellules T $IL22^+$ $IL17^-$ $IL\text{-}23^+$ apparentées aux

Th22 sont associées à un mauvais pronostic [191]. Il en est de même dans le cancer gastrique ou encore le carcinome hépatocellulaire, où les Th22 sont davantage présents chez les patients au stade III ou IV de la maladie par rapport aux patients au stade I ou II [192,193].

Les lymphocytes T $CD4^+$ associés à des effets pro et anti-tumoraux

Tandis que les Th1, Th9, Tfh, Tregs et Th22 sont des sous-types de lymphocytes T $CD4^+$ que nous arrivons à classer dans une catégorie plutôt pro ou antitumorale, en ce qui concerne les Th2 et Th17 le classement semble beaucoup plus difficile. En effet, les Th2 semblent davantage connues pour leurs propriétés pro-tumorales où nous observons souvent qu'un faible ratio Th1/Th2 ainsi qu'une infiltration de Th2 au sein des tumeurs sont associés à un mauvais pronostic [194–196]. Toutefois, d'autres études indiquent un effet plutôt antitumoral des Th2 [197–199], par exemple en sécrétant de l'IL-3, IL-5 et GM-CSF qui vont agir sur leurs récepteurs à la surface des cellules cancéreuses et induire la différenciation terminale de ces cellules [199]. Quant aux Th17, elles semblent également davantage connues pour leurs propriétés pro-tumorales. En effet, il a été rapporté que les Th17 sont associés à une faible survie [166,200], favorisent la progression tumorale [201–203] et sécrètent les interleukines IL-17 et IL-22, qui peuvent privilégier l'invasivité des cellules cancéreuses [204,205]. L'effet des Th17 sur la destruction tumorale dépend de la production d'IFNγ [206], et l'IL-22 peut favoriser la production d'IL-10 et TGF-β1 qui limitent la cytotoxicité sur les cellules cancéreuses [207]. De plus, les Th17 semblent limiter l'infiltration des lymphocytes T $CD8^+$ [208]. Néanmoins, au moins une étude démontre un effet antitumoral des Th17. En effet, les Th17 semblent favoriser le recrutement des Th1 au site tumoral [209].

2.4.2. Les lymphocytes T CD8$^+$

Les lymphocytes T CD8$^+$ sont majoritairement connus pour leur activité antitumorale grâce à leurs propriétés cytotoxiques. En effet, ils sont capables d'induire la mort des cellules cancéreuses par différents mécanismes [210–213] :

- ♣ En libérant des molécules cytotoxiques telles le Granzyme A (GzA), B ou la perforine.
- ♣ En agissant sur la voie « antigène de surface cellulaire associé à FS7 » (Fas) / ligand de Fas (FasL). Fas est un membre de la famille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale et FasL son ligand. FasL est connu pour interagir avec Fas et induire l'apoptose des cellules [214]. Fas ligand peut être présent sur les lymphocytes T CD8$^+$ et Fas sur les cellules cancéreuses [213].
- ♣ En sécrétant des cytokines telles que l'IFNγ et le TNFα.
- ♣ Par pyroptose (mort cellulaire entraînant le clivage des protéines gasdermines) ou ferroptose (mort cellulaire caractérisée par la peroxydation des lipides)

Plusieurs types de lymphocytes T CD8$^+$ ont été mis en évidence : les cellules T CD8$^+$ 1 (Tc1), Tc2, Tc9, Tc17, Tc22, Tfc, T CD8$^+$ régulateurs Foxp3$^+$ et les T CD8$^+$ régulateurs restreints à Qa-1 (correspondant à l'antigène leucocytaire humain (HLA)-E, chez l'homme) [215–217]. Les lymphocytes T CD8$^+$ naïfs sont polarisés en Tc1, Tc2, Tc9, Tc17, Tc22, Tfc, T reg Foxp3$^+$ et T reg restreint à Qa-1 suivant la présence des cytokines IL-2, IL-12, IL-4, TGFβ, IL-6, IL-21, TNFα, IL-23 et IL-15 dans leur microenvironnement [215–217]. Des facteurs de transcription clef pour chaque sous-type sont connus : T-bet, eomesodermine (EOMES), STAT4 (Tc1), GATA3, STAT6 (Tc2), le facteur de régulation de l'interféron 4 (IRF4), STAT6 (Tc9), RORγt, IRF4, STAT3 (Tc17), le récepteur d'hydrocarbures aryliques (AhR), STAT1, STAT3, STAT5 (Tc22), BCL-6, le facteur 1 des cellules T (TCF-1), E2A, le facteur de transcription 3 lié à Runt (Runx3) (Tfc), Foxp3 (T CD8$^+$ reg Foxp3$^+$) et Eomes (T CD8$^+$ reg restreint à Qa-1) [215,217]. Les Tc1, Tc2, Tc9, Tc17 et Tc22 sécrètent des cytokines particulières : GzB, perforine, IFNγ, TNFα (Tc1), IL-4, IL-5, IL-13 (Tc2), IL-9 (Tc9), IL-17, IL-21, IL-22 (Tc17), IL-22, IL-2, TNFα (Tc22), IL-4, IL-21, IFNγ (Tfc), IL-10, TGFβ (T CD8$^+$ reg Foxp3$^+$) et perforine, TGFβ (T CD8$^+$ reg restreint à Qa-1) (**Figure 9**) [215–217].

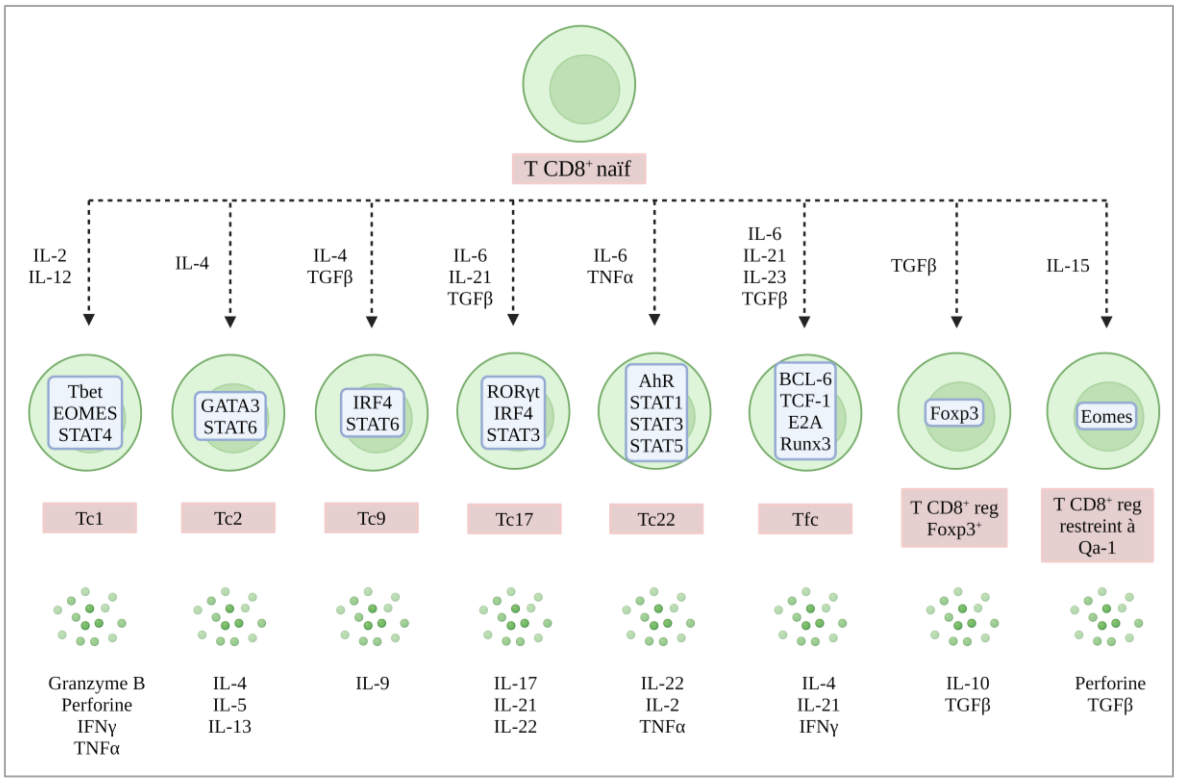


Figure 9. Les différents sous-types de lymphocytes T CD8⁺ et leur production de cytokines. Les T CD8⁺ peuvent se polariser en Tc1, Tc2, Tc9, Tc17, Tc22, Tfc, T CD8⁺ régulateurs Foxp3⁺ou restreint à Qa-1 selon la présence des cytokines IL-2, IL-12 (Tc1), IL-4 (Tc2), IL-4, TGFβ (Tc9), IL-6, IL-21, TGFβ (Tc17), IL-6, TNFα (Tc22), IL-6, IL-21, IL-23, TGFβ (Tfc), TGFβ (T CD8⁺ régulateurs Foxp3⁺) et IL-15 (T CD8⁺ régulateur restreint à Qa-1). Ces sous-types de lymphocytes sécrètent du GzB, perforine, IFNγ, TNFα (Tc1), IL-4, IL-5, IL-13 (Tc2), IL-9 (Tc9), IL-17, IL-21, IL-22 (Tc17) et IL-22, IL-2, TNFα (Tc22), IL-4, IL-21, IFNγ (Tfc), IL-10, TGFβ (T CD8⁺ régulateurs Foxp3⁺) et perforine, TGFβ (T CD8⁺ régulateur restreint à Qa-1). Ils expriment également des facteurs de transcription clefs : T-bet, EOMES, STAT4 (Tc1), GATA3, STAT6 (Tc2), IRF4, STAT6 (Tc9), RORγt, IRF4, STAT3 (Tc17), AhR, STAT1, STAT3, STAT5 (Tc22), BCL-6, TCF-1, E2A, Runx3 (Tfc), Foxp3 (T CD8⁺ régulateurs Foxp3⁺) et Eomes (T CD8⁺ régulateur restreint à Qa-1). *Schéma réalisé par Koh et al., 2023* [217] *et adapté par Aude Chavanton avec des données issues de Mittrücker et al., 2014* [216] *et St Paul and Ohashi, 2020* [215]. *Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender*.

Tandis que les Tc1, Tc2 et Tc22 ont une activité cytotoxique notable, les Tc9 et Tc17 ont quant à eux une activité cytotoxique réduite [215,216,218]. Ainsi, le fait que tous les sous-types de lymphocytes T CD8⁺ n'aient pas les mêmes propriétés cytotoxiques, nous laisse supposer que leur efficacité de lyse tumorale n'est pas la même.

Actuellement, peu de données sont disponibles sur le rôle des différents sous-types de lymphocytes T CD8⁺ dans le cancer, des études supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer leur implication exacte dans l'immunité antitumorale. Néanmoins, nous savons

de nos jours que les Tc1 sont les lymphocytes T CD8$^+$ cytotoxiques par excellence, associés à des niveaux élevés de GzB, perforine, IFNγ et TNFα [215]. Les Tc1 sont par exemple plus efficaces que les Tc2 pour induire une cytotoxicité des cellules cancéreuses médiée par la perforine [219] et sont associés à un pronostic favorable [217]. Malgré tout, les Tc1 et Tc2 potentialisent les réponses antitumorales [220]. Dans le cancer du côlon, les Tc1 peuvent avoir une forte activité cytotoxique [221], et les Th1 peuvent favoriser la survie des Tc1 par contact direct entre les deux types cellulaires [221]. Dans le mélanome, les cellules Tc1 induisent une régression à long terme de la tumeur qui peut s'expliquer en partie par l'effet direct de l'IFNγ sur les cellules cancéreuses [222]. Les Tc9 sont également impliqués dans l'immunité antitumorale puisqu'ils génèrent des effets antitumoraux qui peuvent être médiés par l'IL-33 [223], mais probablement également par leur capacité à se différencier en cellules de type Tc1 productrices d'IFNγ et de GzB [224]. Par ailleurs, les Tc9 peuvent également résister aux cellules cancéreuses grâce à l'IL-9 qui limite la peroxydation des lipides et ainsi la ferroptose de ces cellules induite par la tumeur [225]. Les Tc22 peuvent être présents de manière importante dans certaines tumeurs comme les tumeurs ovariennes, où ils représentent environ 30% des lymphocytes CD8$^+$ infiltrant les tumeurs [226]. Ils peuvent également favoriser la régression tumorale [226]. Quant aux Tc17, leur rôle dans le cancer est complexe. En effet, les Tc17 peuvent se convertir en cellules productrices d'IFNγ sous l'influence de l'IL-4 [227], mais une étude laisse penser qu'ils peuvent également favoriser l'épuisement des Tc1 [218].

Par ailleurs, nous savons que les lymphocytes T CD8$^+$ ont des sous-types régulateurs (T CD8$^+$ régulateurs Foxp3$^+$ ou restreint à Qa-1) ayant des fonctions suppressives [217]. Les lymphocytes T CD8$^+$ restreints à Qa-1 sont des lymphocytes capables de reconnaître spécifiquement Qa-1, une molécule CMH de classe I non-classique. Ces lymphocytes sont impliqués dans la régulation des cellules Tfh Qa-1$^+$ et l'inhibition de la production d'anticorps de haute affinité et d'auto-anticorps [228]. Néanmoins, leur effet dans le cadre du cancer n'est pas encore tellement établi.

2.4.3. Les lymphocytes NKT

Il existe d'autres types de lymphocytes T, nommés NKT. Les NKT sont des cellules T présentant un TCR, mais ne reconnaissant pas les antigènes présentés sur des molécules de CMH, mais des antigènes lipidiques présentés sur les molécules « cluster de différenciation 1-d » (CD1d) [229,230]. Les cellules NKT sont divisées en deux sous-types, les NKT de type I (aussi appelées NKT invariant, iNKT) et de type II.

Les NKT de type I peuvent reconnaître des glycolipides, dont l'α-Galactosyl céramide (un glycolipide bactérien) mais aussi d'autres glycolipides pouvant dériver de cellules tumorales, présentés sur les molécules CD1d des cellules dendritiques. Cette interaction induit la production d'IFNγ par les NKT. Les NKT de type I peuvent également établir une liaison avec les cellules dendritiques immatures par le biais des protéines CD40/ligand de CD40 (CD40L) [231]. Cette interaction, associée à la production d'IFNγ par les NKT, permet la maturation des cellules dendritiques qui vont à leur tour produire de l'IL-12. Cela augmente la production d'IFNγ et d'IL-2 par les NKT. Ces cytokines permettent l'activation des lymphocytes TCD8$^+$, NK et macrophages [231]. Les cellules NKT de type I sont ainsi plutôt associées à un bon pronostic [232,233] et favorisent une réponse antitumorale [234–236].

Les NKT de type II, reconnaissent également des glycolipides dérivés de la tumeur présentés sur les molécules CD1d des CPAs, mais sont davantage associés à des effets pro-tumoraux [231,237–240]. En effet, les NKT de type II peuvent supprimer ou réguler à la baisse l'immunosurveillance et favoriser l'immunosuppression avec les Tregs [238–240]. De plus, ils sécrètent de l'IL-13 qui agit sur les macrophages de type M2 qui vont favoriser l'inhibition des lymphocytes T CD8$^+$. L'IL-13 peut également, avec le TNF-α du microenvironnement, induire une cascade de signalisation dans les cellules myéloïdes conduisant à la production de TGF-β par ces dernières qui inhibe les lymphocytes T CD8$^+$ [231]. Les NKT de type II peuvent également induire l'anergie des NKT de type I en passant par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) [231].

2.4.4. Les lymphocytes Tγδ

Un autre type de lymphocytes T, appelé Tγδ, exprime le récepteur TCR γδ [241], formé par une chaîne γ et une chaîne δ, contrairement aux lymphocytes T conventionnels qui expriment un TCR αβ (comprenant une chaîne α et une chaîne β). Les lymphocytes Tγδ font le lien entre l'immunité innée et adaptative, ils peuvent reconnaître des lipides, des phospho-antigènes ou encore des peptides de manière dépendante ou indépendante du CMH [242]. Ils migrent vers les tissus périphériques plutôt que dans les organes lymphoïdes [241], et leur présence dans les tumeurs est associée à un bon pronostic [243]. En effet, ils sont plutôt connus pour leur action cytotoxique ou antitumorale, notamment par le biais du granzyme, de la perforine, de l'ADCC ou encore des ligands de récepteurs de mort, FasL et le ligand induisant l'apoptose lié au TNF (TRAIL). L'action cytotoxique ou antitumorale des lymphocytes Tγδ peut également être favorisée par les récepteurs NK tel que le récepteur du groupe 2D des NK (NKG2D) qui peuvent reconnaître les molécules induites par le stress [241].

Ils sont également capables d'agir sur les cellules B pour favoriser la production d'anticorps [241]. Ils sécrètent les cytokines pro-inflammatoires TNFα et IFNγ, ainsi que de l'IL-17 et leurs propriétés cytotoxiques sont induites majoritairement par l'IL-2 et IL-15 [244,245]. Par ailleurs, il est à noter que les cellules Tγδ produisant de l'IL-17 sont plutôt associées à des effets protumoraux en favorisant l'angiogenèse [246]. Ainsi, il semblerait que suivant le contexte cytokinique, les lymphocytes Tγδ peuvent avoir un rôle antitumoral ou protumoral.

2.5. Les points de contrôles immunitaires

Les cellules cancéreuses peuvent échapper au système immunitaire en utilisant les « points de contrôle » du système immunitaire appelés « immune checkpoints ». Ces derniers sont des récepteurs activateurs ou inhibiteurs présents à la surface des cellules immunitaires, en particulier des lymphocytes T [247,248]. Ces récepteurs se lient à des protéines ligands qui sont présentes à la surface des cellules tumorales ou de cellules immunitaires

[249,250]. L'interaction entre les récepteurs et les ligands permet de réguler l'activation des lymphocytes T : un récepteur activateur se liant à son ligand conduit à l'activation du lymphocyte T tandis qu'un récepteur inhibiteur se liant à son ligand conduit à l'inhibition du lymphocyte T. Il existe une variété de récepteurs activateurs et inhibiteurs présents à la surface membranaire des lymphocytes T tels que CD28, OX40 (appelé aussi CD134), le récepteur du TNF induit par les glucocorticoïdes (GITR), CD137, CD27, le médiateur d'entrée du virus de l'herpès (HVEM), CTLA-4, PD-1, l'immunoglobuline des cellules T et domaine contenant de la mucine-3 (Tim-3), l'atténuateur de lymphocytes B et T (BTLA), l'immunoglobuline à domaine V suppresseur de l'activation des cellules T (VISTA) ou LAG-3 [251] **(Figure 10)**.

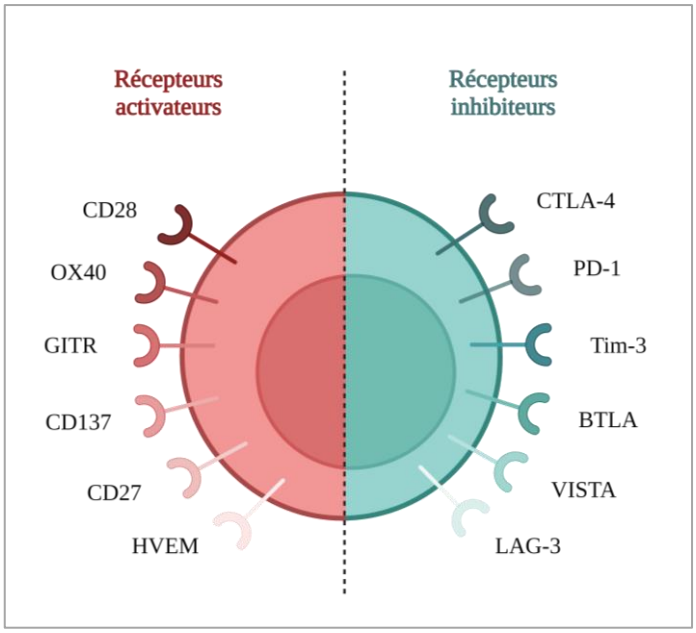


Figure 10. Les principaux points de contrôle immunitaire activateurs et inhibiteurs sur les lymphocytes T. Les principaux récepteurs activateurs sont CD28, OX40, GITR, CD137, CD27 et HVEM et les principaux récepteurs inhibiteurs sont CTLA-4, PD-1, TIM-3, BTLA, VISTA et LAG-3. *Schéma réalisé par Mellman et al., 2011 [251] et adapté par Aude Chavanton. Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

Les points de contrôle immunitaire sont ainsi des régulateurs importants de l'activation des lymphocytes T et peuvent favoriser ou non l'échappement immunitaire des tumeurs. Parmi eux, deux puissants points de contrôles de nature inhibitrice présents à la surface des lymphocytes T ont été mis en lumière par James Allison et Tasuko Honjo : CTLA-4 et PD-1 [252,253]. Cette découverte a été distinguée par le prix Nobel de Physiologie et Médecine en 2018. Le récepteur CTLA-4 induit l'inhibition des lymphocytes T par son interaction avec ses ligands CD80/CD86 [254] présents dans les cellules immunitaires [255–257]. Quant au

récepteur PD-1 (aussi appelé CD279), il est présent à la surface des lymphocytes T activés et interagit avec ses ligands 1-2, PD-L1/PD-L2 (aussi nommés B7-H1/B7-DC ou CD274/CD273) présents dans les cellules immunitaires ou tumorales [258–261]. L'interaction ligand/récepteur induit l'inhibition du lymphocyte T [262,263] et favorise l'échappement immunitaire des tumeurs [264]. Alors que CTLA-4 est plutôt impliqué dans la régulation de l'activation des lymphocytes T et notamment leur amorçage par les CPAs au niveau des tissus lymphoïdes, PD-1 quant à lui est davantage impliqué dans les tissus périphériques et le microenvironnement tumoral au moment où les lymphocytes T sont effecteurs [265,266].

Mon projet de recherche se focalisant sur la voie PD-1/PD-L1 et plus précisément l'immunothérapie anti-PD-L1, nous nous focaliserons sur cet axe thérapeutique par la suite.

3. L’immunothérapie anti-PD-1/PD-L1

3.1. La voie PD-1/PD-L1

Le récepteur PD-1 est transmembranaire et est composé d’une partie extracellulaire, avec un domaine N-terminal de type immunoglobuline V (IgV) qui contient une séquence signal et une région contenant 20 acides aminés (aa). Il est également composé d’un domaine transmembranaire et d’un domaine intracellulaire, composé de deux motifs de signalisation : un motif d’inhibition des immunorécepteurs basés sur la tyrosine (ITIM) et un motif de commutation des immunorécepteurs basés sur la tyrosine (ITSM) [267] (**Figure 11**). Le ligand PD-L1 est transmembranaire et est composé d’une partie extracellulaire, avec une structure d’Ig ; d’une partie transmembranaire hydrophobe et d’une partie intracellulaire, avec trois motifs RMLDVEKC, DTSSK et QFEET, qui correspondent à des séquences d’acides aminés. Le motif DTSSK a un rôle de régulateur négatif du motif RMLDVEKC, qui lui est nécessaire pour inhiber la phosphorylation de STAT3 ce qui empêche l’apoptose [268] (**Figure 11**). PD-L1 est le ligand de PD-1 le plus étudié. PD-L2 est un autre ligand de PD-1 ayant une affinité trois fois plus forte pour PD-1 que PD-L1, ce qui pourrait être dû en partie à un résidu tryptophane et une boucle C-D unique à PD-L2 [269].

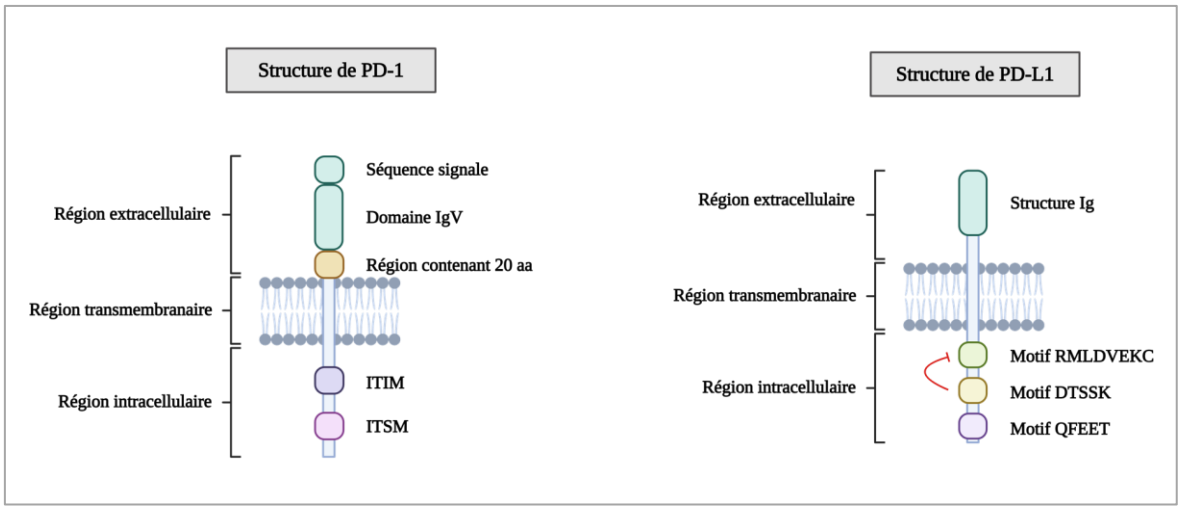


Figure 11. Structure de PD-1 et PD-L1. PD-1 est constitué d'une région extracellulaire contenant un domaine IgV avec une séquence signal ainsi qu'une région contenant 20 acides aminés (aa) ; d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire contenant les motifs ITIM et ITSM. La structure de PD-L1 comporte quant à elle une région extracellulaire avec une structure d'immunoglobuline (Ig) ; une région transmembranaire ainsi qu'une région intracellulaire contenant trois motifs (RMLDVEKC, DTSSK et QFEET) dont le motif DTSSK peut réguler négativement le motif RMLDVEKC impliqué dans la phosphorylation de STAT3 qui favorise l'apoptose. *Schéma réalisé par Aude Chavanton et inspiré par Khan et al., 2020* [267] *et Escors et al., 2018* [268]. *Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

L'interaction de PD-1 avec PD-L1 va permettre le recrutement des protéines tyrosine phosphatases 1/2 contenant l'homologie src-2 (SHP-1/SHP-2) au niveau des motifs ITIM et ITSM de PD-1 qui sont phosphorylés. Elles induisent la déphosphorylation de la sous-unité ζ de CD3, la protéine associée à zeta (ZAP70) ainsi que CD28, ce qui induit l'inhibition des voies TCR et CD28 nécessaire à l'activation des lymphocytes T [270–272]. De plus, il a été rapporté que la sécrétion d'IFNγ par les lymphocytes T induit une surexpression de PD-L1 par les cellules tumorales, ce qui favorise le développement tumoral [273] (**Figure 12**).

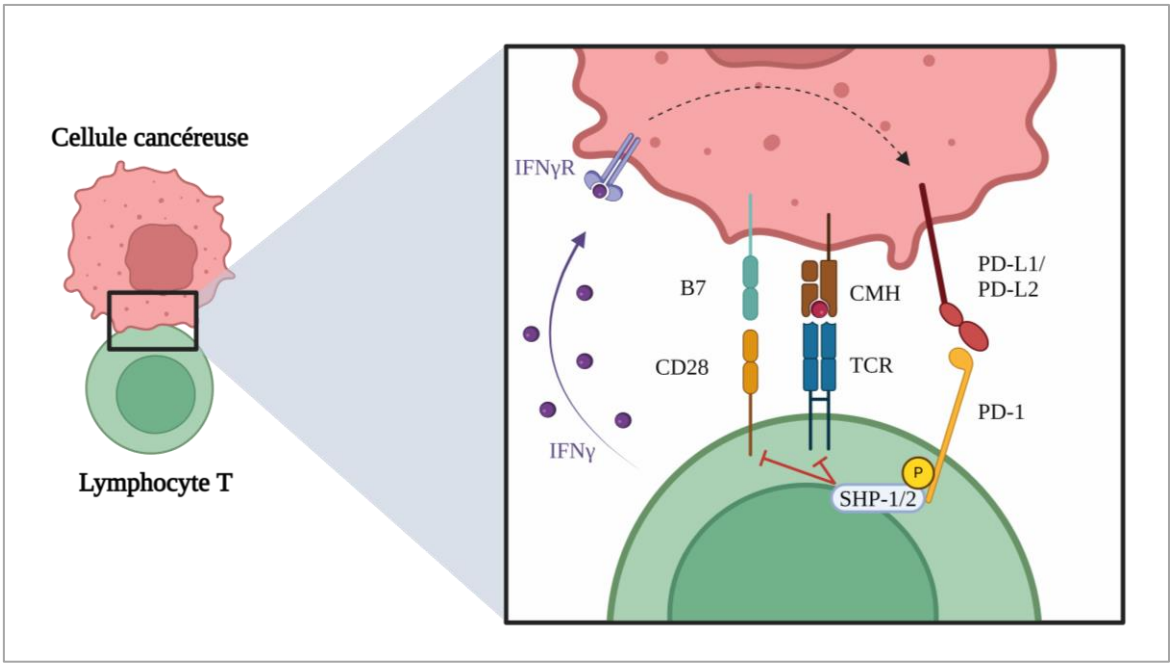


Figure 12. La voie PD-1/PD-L1. L'interaction entre PD-1 et PD-L1 induit l'inhibition des réponses TCR et CD28 nécessaire à l'activation du lymphocyte T. De plus, la sécrétion d'IFNγ par le lymphocyte T induit une surexpression de PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses. *Schéma réalisé par Aude Chavanton et inspiré par Dieu-Nosjean and Caux, 2019* [272]*, Waldman et al., 2020* [270] *et Zhou et al., 2022* [271]*. Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

Dans ce contexte, de nombreux inhibiteurs de PD-1 et PD-L1, des anticorps monoclonaux, ont été développés dans le but d'empêcher l'interaction entre PD-1 et PD-L1 et ainsi restaurer la réponse immunitaire antitumorale médiée par les lymphocytes T.

3.2. Les anticorps monoclonaux anti-PD-1/PD-L1

Les anticorps monoclonaux anti-PD-1 approuvés par la FDA sont le nivolumab (Opdivo), le pembrolizumab (Keytruda), le cemiplimab (Libtayo), le dostarlimab (JEMPERLI), le toripalimab-tpzi (LOQTORZI) et le tislelizumab (Tevimbra) (**Tableau 4**).

Le **nivolumab** a été approuvé en 2014 pour le traitement du mélanome avancé [274]. Il a ensuite été approuvé dans divers types de cancer entre 2015 et 2020 : cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC), mélanome métastatique ou non résécable avec mutation de BRAF, carcinome rénal (2015), mélanome métastatique ou non résécable quel que soit le statut de BRAF, lymphome de hodgkin, cancer de la tête et du cou (2016), carcinome

urothélial, cancer colorectal, carcinome hépatocellulaire (2017), cancer du poumon à petites cellules (CBPC) (2018), CPNPC métastatique, carcinome épidermoïde de l'œsophage [275] et le mésothéliome (2020). Enfin, il a été approuvé dans le cancer gastrique en 2021.

Le **pembrolizumab** a été approuvé en 2014 pour le traitement du mélanome non résécable ou métastatique dont la maladie a progressé suite à un traitement par ipilimumab (anti-CTLA-4) ou après un traitement par un inhibiteur de BRAF [274,276]. Le pembrolizumab a ensuite été approuvé dans le CPNPC et dans le mélanome avancé non muté pour BRAF en 2015 puis dans le carcinome épidermoïde de la tête et du cou en 2016. Entre 2017 et 2020, l'approbation du nivolumab par la FDA s'est étendue à une multitude de cancers : lymphome de hodgkin, CPNPC non squameux, carcinome urothélial, tumeurs solides métastatiques ou non résécables, cancer de l'estomac ou de la jonction gastro-oesophagienne (2017), cancer du col de l'utérus, lymphome médiastinal primaire à grandes cellules B, CPNPC squameux, carcinome hépatocellulaire, carcinome à cellules de Merkel (2018), carcinome rénal, cancer du poumon à petites cellules, carcinome épidermoïde de l'œsophage, carcinome de l'endomètre, mélanome avancé avec atteinte des ganglions lymphatiques (2019), cancer de la vessie non invasif sur le plan musculaire, carcinome épidermoïde cutané, cancer colorectal (2020) [275]. Il a également été approuvé en 2020 dans les cancers ayant une charge mutationnelle élevée dans les tumeurs en seconde ligne de traitement. En 2021, il est approuvé dans le cancer du sein. Enfin, il a été approuvé en 2023 dans le cancer des voies biliaires.

Le **cemiplimab** a été approuvé par la FDA en 2018. Cet anticorps a été approuvé dans le cadre du traitement de patients atteints de carcinome épidermoïde cutané métastatique ou localement avancé qui ne sont pas éligibles à une chirurgie ou radiothérapie [274]. Enfin, il a été approuvé en 2021 dans le CPNPC et le carcinome basocellulaire.

Le **dostarlimab**, **toripalimab-tpzi** et **tislelizumab** sont les derniers anti-PD-1 à avoir été approuvés par la FDA. Le **dostarlimab** a été approuvé pour la première fois en 2021 dans les cancers solides dMMR et dans le carcinome endométrial. Quant aux **toripalimab-tpzi** et **tislelizumab**, ils ont été approuvés en 2023 et 2024 dans le carcinome nasopharyngé et cancer de l'œsophage respectivement.

Tableau 4. Les anti-PD-1 approuvés par la FDA et utilisés actuellement en clinique. *Tableau réalisé par Aude Chavanton.*
CPNPC : Cancer du poumon non à petites cellules ; CBPC : Cancer du poumon à petites cellules ; IgG : Immunoglobuline de type G

	Type	Isotype	Date de la 1ère approbation	Types de cancers	Laboratoire
Nivolumab	Anticorps monoclonal	IgG4	2014	Mélanome CPNPC Carcinome rénal Lymphome de hodgkin Cancer de la ête et du cou Carcinome urothélial Cancer colorectal Carcinome hépatocellulaire CBPC Carcinome épidermoïde de l'oesophage Mésothéliome Cancer gastrique	Bristol-Myers
Pembrolizumab	Anticorps monoclonal	IgG4κ	2014	Mélanome CPNPC CBPC Carcinome épidermoïde de la tête et du cou Lymphome de hodgkin Carcinome urothélial Cancer de l'estomac Cancer de la jonction gastro-oesophagienne Cancer du col de l'utérus Lymphome médiastinal primaire à grandes cellules B Carcinome hépatocellulaire Carcinome à cellules de Merkel Carcinome rénal Carcinome épidermoïde de l'oesophage Carcinome de l'endomètre Carcinome épidermoïde cutané Cancer colorectal Cancer TMB-H Cancer du sein Cancer des voies biliaires	Merck
Cemiplimab	Anticorps monoclonal	IgG4	2018	Carcinome épidermoïde cutané CPNPC Carcinome basocellulaire	Sanofi Regeneron
Dostarlimab	Anticorps monoclonal	IgG4κ	2021	Cancers solides dMMR Carcinome endométrial	GlaxoSmithKline
Toripalimab-tpzi	Anticorps monoclonal	IgG4	2023	Carcinome nasopharyngé	Coherus Bioscience
Tislelizumab	Anticorps monoclonal	IgG4	2024	Cancer de l'oesophage	BeiGene

En ce qui concerne les anticorps monoclonaux anti-PD-L1 approuvés par la FDA et utilisés actuellement en clinique, il en existe trois : l'atézolizumab (Tecentriq), le durvalumab (Imfinzi) et l'avelumab (Bavencio) (**Tableau 5**).

L'**atézolizumab** (Tecentriq, MPDL3280A) a été approuvé en 2016, dans le cadre du traitement de patients atteints de carcinome urothélial avancé ou métastatique [274]. Il s'en est suivi une approbation de l'atézolizumab dans le CPNPC la même année puis dans le cancer

de la vessie en 2017, dans le cancer du sein triple négatif en 2019, dans le carcinome hépatocellulaire non résécable [275] et le mélanome en 2020. En 2022, il a été approuvé dans le sarcome des parties molles alvéolaires en première ligne de traitement.

Le **durvalumab** (Imfinzi, MEDI4736) a été approuvé en 2017 pour le traitement de patients atteints de carcinome urothélial localement avancé ou métastatique [274]. Il a ensuite été approuvé dans le CPNPC en 2018 puis dans le CBPC en 2020 [275]. En 2022, il a été approuvé dans le carcinome hépatocellulaire et le cancer des voies biliaires.

L'**avelumab** (Bavencio, MSB0010718C) a été approuvé en 2017 pour le traitement de patients atteints de carcinome à cellules de Merkel métastatique [274]. Il a ensuite été approuvé dans le carcinome urothélial la même année puis dans le carcinome rénal en 2019 [275].

Tableau 5. Les anti-PD-L1 approuvés par la FDA et utilisés actuellement en clinique. *Tableau réalisé par Aude Chavanton.*
CPNPC : Cancer du poumon non à petites cellules ; CBPC : Cancer du poumon à petites cellules ; TNBC : Cancer du sein triple négatif.

	Type	Isotype	Date de la 1ère d'approbation	Types de cancers	Laboratoire
Atézolizumab	Anticorps monoclonal	IgG1κ	2016	Carcinome urothélial CPNPC Cancer de la vessie TNBC Carcinome hépatocellulaire Mélanome Sarcome des parties molles alvéolaires	Roche
Durvalumab	Anticorps monoclonal	IgG1κ	2017	Carcinome urothélial CPNPC CBPC Carcinome hépatocellulaire Cancer des voies biliaires	AstraZeneca AB
Avelumab	Anticorps monoclonal	IgG1	2017	Carcinome à cellules de Merkel métastatique Carcinome urothélial Carcinome rénal	Merck Serono Pfizer

3.3. La toxicité et l'efficacité des anti-PD-1/PD-L1

Plusieurs études ont démontré une tolérance acceptable des anticorps anti-PD-1/PD-L1 chez l'homme [277–285]. Une méta-analyse sur 125 essais cliniques incluant 20128 patients a rapporté que les effets indésirables les plus fréquents induits par les thérapies anti-PD-1/PD-L1 sont la fatigue (18,26% des patients), le prurit (10,61%) et la diarrhée (9,47%) [286]. Les anti-PD-1/PD-L1 agissant sur l'immunité, les effets indésirables liés à l'immunité sont particulièrement étudiés et contrôlés. Parmi les plus fortement représentés dans le cadre des thérapies anti-PD-1/PD-L1, nous retrouvons la diarrhée, suivie de l'augmentation du taux d'aspartate amino-transférase (3,39%), le vitiligo (3,26%), l'augmentation du taux d'alanine aminotransférase (3,14%), la pneumonie (2,79%) et les colites (1,24%) [286]. Enfin, parmi les dysfonctionnements endocriniens, l'hypothyroïdie (6,07%) et l'hyperthyroïdie (2,82%) sont les principaux effets secondaires [286].

Malgré une efficacité prouvée des anti-PD-1/PD-L1 sur un certain nombre de cancers, seul un faible nombre de patients répondent objectivement à ces monothérapies dans de multiples types de cancer [287–290]. Nous pouvons estimer ce taux de réponse entre 20 et 40% tout cancers confondus (**Figure 13**). Les cancers où l'on enregistre les meilleurs taux de réponse sont par exemple le lymphome de hodgkin (66 à 69% de réponse objective), le carcinome épidermoïde de la peau (52% de réponse objective), le mélanome (33 à 40% de réponse objective) ou encore le cancer colorectal à statut MSI [288]. Les cancers colorectaux avancés à statut MSI élevé sont plus sensibles à l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 que les cancers colorectaux à statut MSS où nous observons 37% de réponse objective pour les patients présentant un statut MSI élevé et 11% pour les patients présentant un statut MSS [289].

Concernant les cancers où l'on enregistre le plus faible taux de réponse, nous pouvons citer par exemple le cancer du col de l'utérus, le cancer de l'ovaire ou encore le carcinome hépatocellulaire où les taux de réponse objective sont entre 10 et 20% (**Figure 13**) [288].

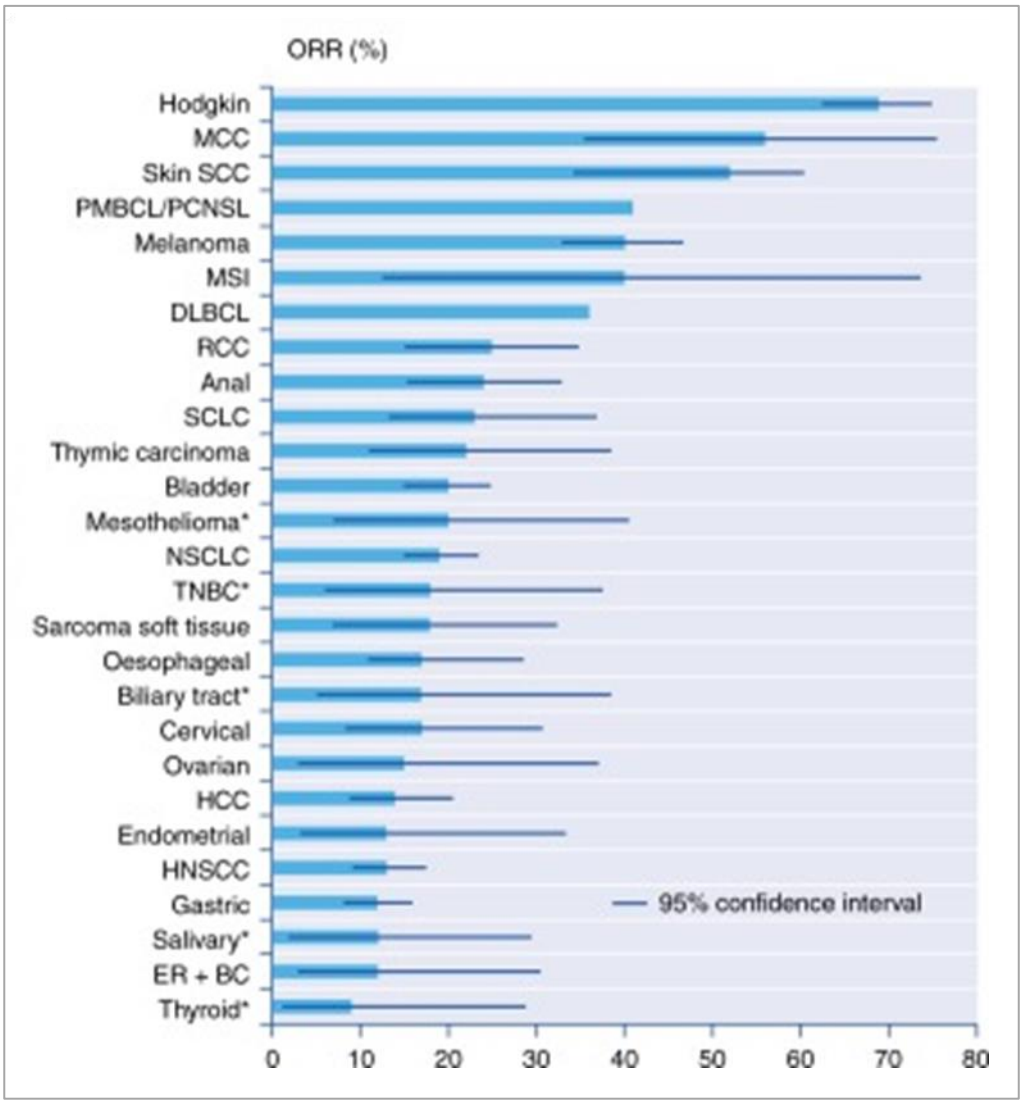


Figure 13. Les taux de réponse objective des patients aux monothérapies anti-PD-1/PD-L1 dans divers cancers. MCC : carcinome à cellules de Merkel ; SCC : carcinome épidermoïde ; PMBCL : lymphome primaire médiastinal à cellules B ; PCNSL : lymphome primaire du système nerveux central ; MSI CRC : cancer colorectal à haute instabilité des microsatellites ; DLBCL : lymphome diffus à grandes cellules B ; RCC : carcinome à cellules rénales ; SCLC : cancer du poumon à petites cellules ; NSCLC : cancer du poumon non à petites cellules ; TNBC : cancer du sein triple négatif ; HCC : carcinome hépatocellulaire ; HNSCC : carcinome épidermoïde de la tête et du cou ; ER+BC : cancer du sein à récepteurs d'œstrogènes positifs ; ORR : taux de réponse objective. *Données issues de Hirsch et al., 2019* [288].

De nos jours, il est important de comprendre quels sont les mécanismes de résistance développés chez les patients non-répondeurs à ces thérapies afin d'améliorer l'efficacité des anti-PD-1/PD-L1 et d'augmenter le taux de réponse des patients.

3.4. Les mécanismes de résistance aux anti-PD-1/PD-L1

Il existe deux types de résistances : la résistance primaire, qui correspond aux patients pour lesquels aucune réponse clinique n'est observée, et la résistance acquise, correspondant aux patients pour lesquelles une réponse clinique est observée, mais qui va s'affaiblir ou disparaître au cours du temps [264]. Différents mécanismes biologiques pourraient expliquer ces phénomènes de résistance aux anti-PD-1/PD-L1 dont les principaux sont décrits ci-dessous.

3.4.1. La faible reconnaissance d'antigènes tumoraux

Les cellules cancéreuses peuvent empêcher le système immunitaire de les reconnaître, en altérant l'expression de leur CMH ou en ne présentant pas d'antigènes tumoraux [291–293], ce qui limite les réactions immunitaires antitumorales. Chez l'homme, les molécules de CMH sont codées par des gènes appelés HLA. La molécule de CMH I est constituée d'une chaîne lourde α codée par les gènes HLA-A, HLA-B et HLA-C et d'une petite chaîne légère invariable, nommée β2-microglobuline (β2M) [294]. Dans une cohorte de patients atteints de mélanome et traités avec des anti-PD-1, l'activation de la voie de présentation antigénique par le CMH I a été associée à une survie globale et sans progression plus élevée [295], ce qui suggère que la présentation antigénique est nécessaire à l'efficacité thérapeutique des anti-PD-1. Les molécules de CMH I peuvent être altérées à plusieurs niveaux, soit au niveau des locus HLA (A, B ou C), soit au niveau de la β2M. Dans une cohorte de patients atteints de divers types de cancers dont le mélanome avancé et le CPNPC traités avec des anti-PD-1, il a été démontré que l'homozygotie d'au moins un locus HLA (HLA-A, B ou C) est associée à une survie plus courte par rapport aux patients possédant une hétérozygotie HLA sur tous les loci [296]. Par ailleurs, dans le mélanome, 29,4% des patients traités avec des anti-PD-1 et dont la maladie progresse ont des mutations ponctuelles, des délétions ou des pertes d'hétérozygotie dans le β2M au sein des tumeurs [297]. La perte d'hétérozygotie de la β2M est bien plus importante chez les patients non-répondeurs que chez les répondeurs (30% contre 10%) et est associée à une survie globale plus faible [297]. Ainsi, la perte ou faible capacité de présentation antigénique contribue à l'échappement immunitaire des tumeurs et pourrait en partie expliquer la résistance des patients aux anti-PD-1/PD-L1.

3.4.2. Le dysfonctionnement des lymphocytes T

Les patients résistants à la thérapie anti-PD-1 peuvent surexprimer des marqueurs d'épuisement des lymphocytes T tel que Tim-3 [298,299]. L'épuisement lymphocytaire est caractérisé en partie par une perte progressive des fonctions effectrices des lymphocytes (altération des capacités de prolifération, de production de cytokines et d'élimination des cellules cibles) [300,301]. Un lymphocyte T passe ainsi d'un phénotype de cellule effectrice à un phénotype de cellule précurseur épuisée puis de cellule terminale épuisée [301]. Plus le lymphocyte T tend vers un phénotype terminal épuisé, plus l'expression des points de contrôle immunitaire PD-1, Tim-3 et LAG-3 sont présents de manière importante ainsi que l'expression du facteur de transcription TOX [301]. En revanche, plus le lymphocyte T tend vers un phénotype terminal épuisé, plus l'expression du facteur de transcription TCF-1 diminue ainsi que l'expression du costimulateur inductible (ICOS) et le récepteur 3 de chimiokines à motif C-X-C (CXCR3) [301,302] (**Figure 14**).

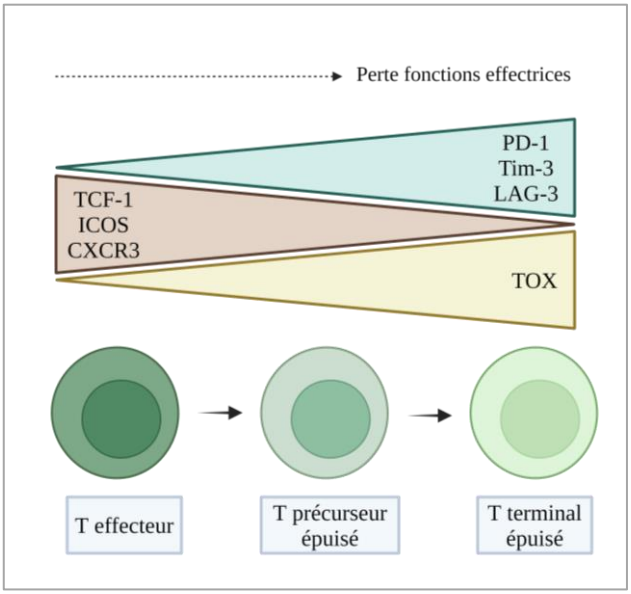


Figure 14. Les phases d'épuisement d'un lymphocyte T. Un lymphocyte T effecteur ayant des fonctions effectrices va acquérir avec le temps un phénotype précurseur épuisé puis un phénotype terminal épuisé. Le passage d'un phénotype effecteur à terminal épuisé implique une augmentation de l'expression du facteur de transcription TOX et des points de contrôle immunitaire PD-1, Tim-3 et LAG-3, ainsi qu'une diminution de l'expression du facteur de transcription TCF-1 et des protéines ICOS et CXCR3. Cela implique également une perte progressive des fonctions effectrices des lymphocytes T. *Schéma réalisé par Aude CHAVANTON et inspiré par Chow et al., 2022 [302] et Zhu et al., 2023 [301].*

Plus précisément, PD-1 présent à la surface des lymphocytes T est d'abord considéré comme un marqueur d'activation des lymphocytes T puisqu'il est exprimé rapidement à la suite de l'activation du TCR [303]. Néanmoins, lorsqu'il est associé à LAG-3 ou Tim-3, les lymphocytes T spécifiques des tumeurs sont considérés comme dysfonctionnels [304,305]. Par ailleurs, une expérience *in vitro* sur des cellules T régulatrices issus de cellules mononucléées du sang périphérique (PBMCs) a montré que le blocage de ces cellules avec des anti-PD-1 induisait une plus grande capacité de sécrétion des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGFβ par ces cellules [306], qui sont des cytokines favorisant l'échappement tumoral en limitant les réponses immunitaires. Par ailleurs, des approches autour du blocage de PD-1 associé au blocage de Tim-3 ou LAG-3 ont confirmé que la présence de ces points de contrôle immunitaire est un facteur de résistance à la thérapie anti-PD-1. En effet, le double blocage de PD-1 et Tim-3 a induit une augmentation de la capacité de sécrétion d'IFNγ et de TNFα par les PBMCs de patients atteints de CPNPC comparativement au blocage de PD-1 ou Tim-3 seul [299]. De même, le blocage de PD-1 couplé à celui de LAG-3 a généré une survie sans progression remarquablement meilleure que lorsque PD-1 seul est bloqué (passage de 4,6 mois à 10,1 mois) chez des patients atteints de mélanome [307]. Le VEGF-A pourrait être une cause de la co-expression de PD-1/Tim-3 ou PD-1/LAG-3 à la surface des lymphocytes T $CD8^+$ infiltrant les tumeurs [308] et donc de l'épuisement de ces lymphocytes T. L'association d'anti-VEGF-A avec des anti-PD-1 a d'ailleurs montré une réduction de la croissance tumorale dans un modèle murin de cancer colorectal par rapport aux monothérapies anti-VEGF-A ou anti-PD-1 [308], confirmant ainsi son implication dans l'inhibition de la réponse antitumorale.

3.4.3. Le microenvironnement tumoral immunosuppresseur

Le microenvironnement tumoral joue un rôle dans la résistance aux anti-PD-1/PD-L1, notamment par le biais de cellules immunitaires immunosuppressives telles que les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs), les lymphocytes T régulateurs ou encore les TAMs. Les MDSC sont une population myéloïde impliquée dans l'immunosuppression, notamment par la sécrétion de diverses molécules telles que le monoxyde d'azote, l'IL-10, espèces réactives de l'oxygène ou encore l'induction d'ectoenzymes CD39 et CD73 qui sont impliqués dans la formation de l'adénosine qui est néfaste pour les lymphocytes T [309]. Les MDSCs peuvent

être de nature granulocytique ou monocytique et peuvent être attirées dans le microenvironnement tumoral par des chimiokines, des cytokines ayant un pouvoir chimio-attractant [310]. Dans un modèle murin de rhabdomyosarcome, l'absence de CXCR2, un récepteur de chimiokine impliquée dans le recrutement des MDSC, dans les cellules de la moelle osseuse, a permis d'améliorer la réponse des souris aux anti-PD-1 en réduisant la croissance tumorale. De plus, cela a été associé à une augmentation de l'infiltration de lymphocytes T $CD8^+$ au sein des tumeurs et une augmentation d'IFNγ dans le sérum [311]. Cela suggère un rôle néfaste des MDSCs dans la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1. De même, chez des patients atteints de CPBPC avancé traités au nivolumab (anti-PD-1), le taux de MDSC monocytiques augmente au moment de la progression chez les patients initialement répondeurs, confirmant que les MDSC sont impliqués dans la résistance à la thérapie anti-PD-1 [299].

Par ailleurs, les cellules T régulatrices semblent également impliquées dans la résistance aux anti-PD-1 dans divers types de cancers [312,313]. En effet, dans un modèle murin de fibrosarcome, la déplétion de cellules T régulatrices a permis d'améliorer l'efficacité des anti-PD-1, en conduisant à une éradication complète des tumeurs dans 78,6% des cas comparativement aux anti-PD-1 sans déplétion de cellules T régulatrices (0% d'éradication tumorale) [313]. Non seulement certaines cellules immunitaires tels que les MDSC ou T régulateurs peuvent jouer un rôle dans l'immunosuppression et la résistance aux anti-PD-1/PD-L1, mais certaines cytokines peuvent également être impliquées dans ces processus telle que le TGFβ [314,315]. En effet, dans un modèle murin de cancer du sein, l'association d'anti-PD-L1 avec des anti-TGFβ permet d'induire une régression complète des tumeurs chez 70% des souris contre seulement 10% et 0% pour anti-PD-L1 et anti-TGFβ seul respectivement [315], suggérant un rôle pro-tumoral du TGFβ et impliqué dans la résistance aux anti-PD-L1. Enfin, les macrophages associés aux tumeurs semblent également jouer un rôle dans la résistance aux anti-PD-1/PD-L1, probablement en agissant sur la voie du facteur 1 stimulateur de colonie (CSF1) et de son récepteur CSF1R qui facilite l'infiltration des TAMs et notamment de macrophages de type M2 dans le cancer du pancréas [316].

3.4.4. Les mutations JAK1/2, EGFR et de l'homologue de la phosphatase et de la tensine (PTEN)

L'IFNγ est une cytokine qui favorise l'augmentation de l'expression de PD-L1 sur les cellules cancéreuses, mais également peut jouer un rôle néfaste sur les cellules cancéreuses. Des mutations de protéines impliquées dans la signalisation de l'IFNγ telles que JAK1 ou JAK2 ont été identifiées dans le mélanome et contribuent à une faible expression de PD-L1 [317,318], ce qui limite l'utilité des anti-PD-L1. De plus, ces mutations semblent également être une voie de résistance à la thérapie anti-PD-1 en empêchant les cellules cancéreuses de répondre à l'IFNγ [317,319]. Par ailleurs, les patients atteints de CPNPC présentant des mutations de l'EGFR ou des réarrangements de la kinase du lymphome anaplasique (ALK) sont davantage associés à une résistance aux anti-PD-1/PD-L1 qui peut s'expliquer par une faible expression de PD-L1 et de lymphocytes T $CD8^+$ infiltrant les tumeurs dans le microenvironnement tumoral [320]. Des patients atteints de mélanome métastatique présentant la mutation PTEN dans les tumeurs répondent mieux aux anti-PD-1 que les patients ne présentant pas de mutation PTEN, ce qui se manifeste par une réduction de la taille des tumeurs [321]. Enfin, certains acteurs de la voie des MAPK, tels que BRAF et MEK, peuvent également être une source de résistance à la thérapie anti-PD-1 dans le mélanome $BRAF^{V600E}$ [322].

3.4.5. Le microbiote intestinal

Le microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans la résistance à l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 [323,324]. En effet, selon la composition du microbiote intestinal, certains patients seraient probablement plus à même de répondre à ces immunothérapies. Il a été mis en évidence dans le carcinome hépatocellulaire que les patients non-répondeurs à la thérapie anti-PD-1 ont un microbiote enrichi en protéobactéries par rapport aux patients répondeurs chez lesquels le taux de protéobactéries reste relativement stable au cours du temps après traitement par anti-PD-1 [323]. L'enrichissement en protéobactéries chez les patients non-répondeurs serait principalement attribué à l'abondance de la bactérie *Escherichia coli* tandis que le membre des protéobactéries le plus représenté est la bactérie *Klebsiella pneumoniae* chez les répondeurs [323]. Chez les patients atteints de mélanome traités avec des anti-PD-1, le

microbiome intestinal des patients répondeurs à la thérapie est plus diversifié que celui des patients non-répondeurs. De plus, au niveau du microbiome fécal, les patients ayant la diversité la plus importante ont la survie sans progression la plus élevée. Le microbiome fécal des patients répondeurs à la thérapie est enrichi en bactéries de la famille des Ruminococcaceae ainsi que l'ordre des Clostridiales tandis que l'ordre des Bacteroidales est enrichi chez les non-répondeurs. L'espèce *Faecalibacterium* est enrichie chez les répondeurs et les espèces *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Escherichia coli*, et *Anaerotruncus colihominis* chez les non-répondeurs [325]. Par ailleurs, dans un modèle préclinique de mélanome, l'association de la bactérie Bifidobacterium avec des anti-PD-L1 a presque aboli la croissance tumorale par rapport à l'utilisation de Bifidobacterium ou anti-PD-L1 seul [324]. Ainsi, le microbiome pourrait jouer un rôle majeur dans la résistance aux anti-PD-1/PD-L1 qui serait favorisée par la présence de certains types bactériens.

3.5. Les principaux biomarqueurs prédictifs de la réponse aux anti-PD-1/PD-L1

Afin d'évaluer les patients les plus à même de répondre aux anti-PD-1/PD-L1, il est nécessaire de définir des biomarqueurs efficaces de réponse au traitement. Les trois principaux biomarqueurs actuellement utilisés sont décrits ci-dessous.

3.5.1. L'analyse de l'expression de PD-L1 dans les tumeurs

Les tumeurs fortement infiltrées par des lymphocytes T et à forte expression de PD-L1 dans le microenvironnement tumoral sont considérées comme des tumeurs chaudes, tandis que les tumeurs faiblement infiltrées par des lymphocytes T et exprimant faiblement PD-L1 dans le microenvironnement tumoral sont considérées comme des tumeurs froides [326]. De manière générale, dans divers types de cancers, les patients présentant une expression de PD-L1 élevée dans leur tumeur sont plus à même de répondre à la thérapie anti-PD-L1, notamment lorsque PD-L1 est présent sur les cellules immunitaires infiltrant la tumeur [327]. Par exemple, chez les patients atteints de CPNPC traités avec de l'atézolizumab (ou du nivolumab), une amélioration de la survie globale a été associée à une expression de PD-L1 élevée [328–330]. En effet, dans le CPNPC traités avec de l'atézolizumab comme première ligne de traitement, les patients présentant une forte expression de PD-L1 (≥50% sur les cellules

tumorales ou ≥10% sur les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs) ont une médiane de survie globale de 20,2 mois tandis que les patients présentant une expression de PD-L1 ≥5% ou ≥1% sur les cellules tumorales ou cellules immunitaires infiltrant les tumeurs ont une médiane de survie globale de 18,2 et 17,5 mois respectivement [330]. L'expression de PD-L1 est également associée à une meilleure efficacité du nivolumab (anti-PD-1) dans le CPNPC avancé en termes de taux de réponse objective, notamment chez les patients dont l'expression de base de PD-L1 est supérieure ou égale à 5% dans les tumeurs par rapport aux patients avec une expression de base de PD-L1 < 5% [329]. La corrélation entre l'expression de PD-L1 et l'efficacité de la thérapie a également été analysée dans d'autres types de cancers, dont le carcinome urothélial métastatique [331]. En effet, dans ce type de cancer traité avec de l'atézolizumab, les patients présentant les niveaux les plus élevés de PD-L1 dans les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs (≥5%) ont également le taux de réponse objective le plus élevé (28%) ainsi que la médiane de survie sans progression la plus élevée (4,1 mois) [331].

Néanmoins, malgré le fait que l'expression de PD-L1 soit généralement associée à des taux de réponse objective plus élevé, des études rapportent que la monothérapie anti-PD-1 peut être bénéfique aux patients quel que soit leur statut de PD-L1 dans plusieurs types de cancer [332,333]. De plus, bien que l'expression de PD-L1 soit un potentiel biomarqueur prédictif de la réponse à la thérapie anti-PD-1/PD-L1, ce biomarqueur reste difficile à utiliser en pratique comme unique marqueur de réponse à la thérapie pour cause d'hétérogénéité de l'expression PD-L1 au sein des tumeurs au cours du temps. En effet, certains patients peuvent exprimer faiblement PD-L1 dans leurs tumeurs à un instant T, mais chez qui la thérapie anti-PD-L1 va induire une réponse [334]. Ainsi, l'expression de PD-L1 seul n'étant pas un biomarqueur d'une extrême qualité, il est souvent étudié en association avec d'autres marqueurs comme la charge mutationnelle de la tumeur [335].

3.5.2. La charge mutationnelle tumorale élevée (TMB-H)

La charge mutationnelle de la tumeur est rapportée à la quantité de mutations dans l'ADN des cellules tumorales et est associée à la formation de néoantigènes capables de générer une réponse immunitaire [336]. La TMB-H peut être un biomarqueur prédictif de la réponse aux thérapies de blocage des points de contrôle PD-1 et PD-L1 dans divers types de cancers [337].

Par exemple, il a été rapporté dans le cancer du poumon non à petites cellules, qu'une TMB-H est associée à une amélioration du taux de réponse objective et de la survie des patients par rapport à un TMB faible [338]. De même, une étude sur de nombreux types de tumeurs solides avancées incurables (anal, biliaire, cervical, endométrial, mésothéliome, neuroendocrinien, salivaire, pulmonaire à petites cellules, thyroïdien et vulvaire) a démontré que le taux de réponse objective au pembrolizumab (anti-PD-1) était de 29% chez les patients ayant une TMB-H et de seulement 6% chez les patients n'ayant pas de TMB-H [339]. Néanmoins, la TMB en tant que biomarqueur présente des limites comme pour l'expression de PD-L1. En effet, le seuil permettant d'identifier un TMB élevé et un TMB faible n'a pas clairement été établi, et la quantité de tissu tumoral nécessaire pour évaluer le TMB est importante, ce qui peut compliquer ou empêcher cette analyse [264].

3.5.3. Le statut dMMR/MSI-H

La déficience dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN est un autre biomarqueur de la réponse aux thérapies anti-PD-1/PD-L1 et notamment de la thérapie anti-PD-1. En effet, plusieurs études ont démontré des effets bénéfiques du nivolumab ou pembrolizumab chez des patients atteints de cancers à statut dMMR/MSI-H [98,340,341]. C'est par exemple le cas dans le cancer colorectal où le taux de réponse objective au nivolumab est de 31,1% sur un suivi de 12 mois et de 32-40% pour le pembrolizumab [98,340,341]. Le pembrolizumab a également été associé à un taux de survie sans progression de 78% à 20 semaines chez les patients atteints par ce type de cancer et possédant un statut dMMR [340] . Le taux de survie sans progression chez des patients déficient pour le système MMR a également été favorable dans d'autres types de cancer tel que le CPNPC [342]. En effet, dans ce cancer, les patients présentant une perte d'expression dans les tumeurs des gènes du système MMR ont une survie sans progression de 8 mois contre seulement 4 mois pour les patients dont les tumeurs ont une expression préservée des gènes du système MMR [342]. Une autre étude regroupant plusieurs types de tumeurs a indiqué un taux de réponse objective au pembrolizumab chez des patients ayant un statut dMMR ou MSI-H de 39,6% avec 7% de taux de réponse complète. Parmi les patients répondeurs, 78% d'entre eux ont eu une durée de réponse de 6 mois ou plus [343].

3.6. Nouvelles stratégies thérapeutiques

Dans la stratégie de potentialisation des effets des anti-PD-1/PD-L1, il est question désormais de combiner ces thérapies à d'autres molécules. Plusieurs associations thérapeutiques à base d'anti-PD-1 ou anti-PD-L1 ont déjà fait l'objet d'une approbation par la FDA. Ces associations peuvent être des combinaisons d'immunothérapies telles que la combinaison du nivolumab et ipilimimab (anti-CTLA-4) pour le traitement du mésothéliome pleural malin non résécable [344] ou encore du durvalumab et tremelimumab (anti-CTLA-4) pour le traitement du carcinome hépatocellulaire non résécable [345]. Cela peut également être des combinaisons d'anti-PD-1/PD-L1 avec des chimiothérapies telles que l'atézolizumab et le paclitaxel pour le traitement du cancer du sein triple négatif [346], l'atézolizumab associé à l'étoposide et au carboplatine pour le traitement du cancer du poumon à petites cellules [347,348] ou encore le nivolumab avec le cisplatine et le gemcitabine pour le traitement du carcinome urothélial métastatique ou non résécable, une association récemment approuvée par la FDA [349]. D'autres associations thérapeutiques à base d'anti-PD-1/PD-L1 sont en cours d'essais cliniques [346,350–357].

Dans le cadre de la médecine personnalisée, il est nécessaire de développer divers types de traitements/combinaisons de traitements afin d'élargir le spectre de soins proposés en clinique et d'augmenter les chances de guérison pour chaque patient. Dans ce contexte, notre équipe s'intéresse aux protéines de choc thermique présentes dans les cellules cancéreuses, à leur potentiel rôle en tant que cible thérapeutique et potentialisateur des effets des anti-PD-L1 dans le CCR.

4. Les protéines de choc thermique

4.1. Généralités sur les HSPs

Les protéines de choc thermique, aussi appelées HSP pour « Heat Shock Protein », sont des protéines hautement conservées et leur niveau est augmenté suite à un stress [358–361]. Ce stress peut être de différentes natures :

- ♣ Stress physiologique : croissance cellulaire, développement et différenciation, oncogènes et proto-oncogènes, …
- ♣ Stress physiopathologique : fièvre/inflammation, Ischémie/reperfusion, hypertrophie, infections virales, phagocytose, …
- ♣ Stress environnemental : choc thermique, stress oxydant, analogues d'acides aminés, métaux lourds, inhibiteurs du métabolisme énergétique, …

Certains stress peuvent induire la dénaturation de protéines [362,363], mais aussi l'agrégation de protéines [364–366]. Les HPSs ont une fonction principale de chaperon moléculaire, ainsi elles favorisent le repliement correct des protéines mal conformées : nous parlons alors de renaturation [367,368]. Ces protéines sont donc impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Les HSPs peuvent également être impliquées dans la désagrégation des protéines [369], le transport de protéines [370], mais aussi la dégradation des protéines en favorisant leur ubiquitinylation et l'activation du protéasome [361], le protéasome étant un composant cellulaire impliqué dans la dégradation des protéines ubiquitinylées [371]. Par ailleurs, il est connu que certaines HSPs empêchent l'apoptose [372], protégeant ainsi les cellules de la mort cellulaire. Il existe différentes familles de HSPs, classées chacune selon leur poids moléculaire (kDa) : les grandes HSPs de haut poids moléculaire (principalement HSP110 et la protéine 170 régulée par le glucose (GRP170)), HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 (DNAJ) et les petites HSPs de bas poids moléculaire. Elles sont codées par divers gènes et peuvent être localisées à différents endroits de la cellule [373].

Il a été rapporté à plusieurs reprises que des protéines HSPs sont présentes de manière abondante dans les cellules cancéreuses et favorisent leur prolifération [374–376] et la formation de métastases [377,378]. Elles sont également souvent associées à un mauvais pronostic [379–381] et une résistance aux traitements [374,382,383]. Ce sont ainsi des cibles thérapeutiques

potentielles afin de déstabiliser les cellules cancéreuses en les empêchant de maintenir l'homéostasie cellulaire.

4.2. La synthèse des HSPs

La synthèse des HSPs est induite suite à un stress et nécessite la présence du facteur de transcription HSF1. En effet, lorsque la cellule est dans un état de repos, les protéines Hsp90 et Hsp70 bloquent le facteur de transcription « facteur de choc thermique 1 » (HSF1) dans le cytoplasme. Lors d'un stress cellulaire, HSF1 est débloqué, phosphorylé et est transloqué dans le noyau afin de se fixer sur les séquences géniques spécifiques « éléments de choc thermique » (HSEs). Les HSEs sont situées en amont des promoteurs du gène « choc thermique » et la fixation de HSF1 sur ces séquences HSEs induit la transcription des gènes HSPs, ce qui va conduire à la production de protéines de choc thermique. Lorsque les HSPs sont produites, elles peuvent rester dans le cytoplasme de la cellule et effectuer leur rôle de chaperon moléculaire, ou être sécrétées à l'extérieur de la cellule [373] (**Figure 15**). Dans les cellules cancéreuses, une hyperactivation de HSF1 peut favoriser une élévation des niveaux de HSPs et favoriser l'invasion et les métastases [373].

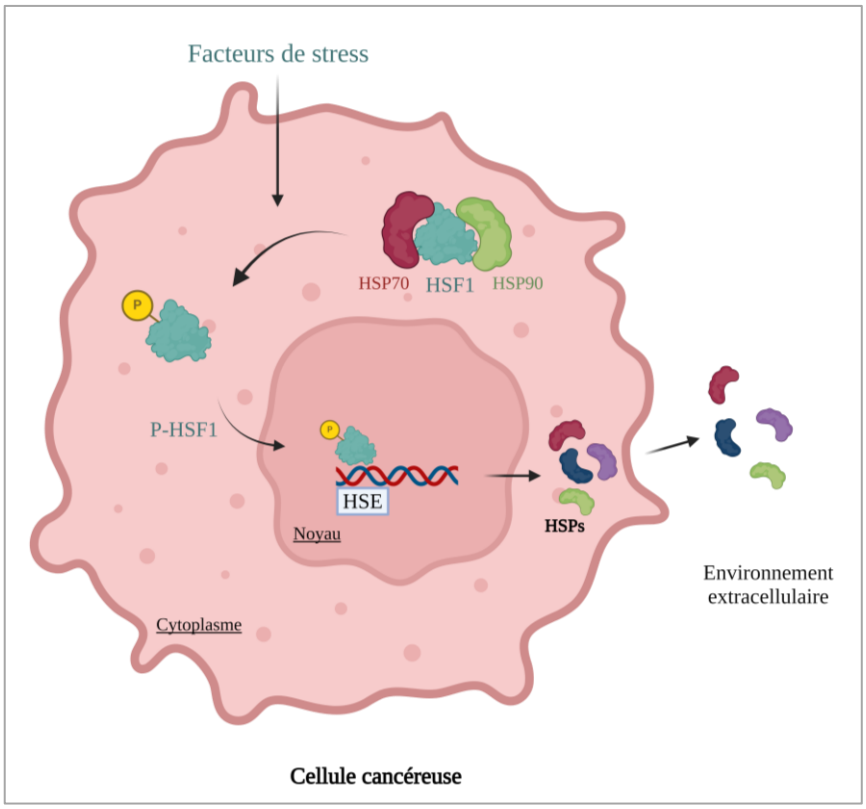


Figure 15. Synthèse des HSPs. Différents facteurs de stress peuvent induire la dissociation du facteur de transcription HSF1 aux protéines HSP70 et HSP90 ainsi que sa phosphorylation. Sa migration dans le noyau et sa fixation à l'élément de réponse HSE induit la production de protéines HPSs, qui peuvent rester dans le cytoplasme ou être sécrétées hors de la cellule. *Schéma réalisé par Das et al., 2019* [384]*, Yang et al., 2021* [385] *et Chatterjee et al., 2017* [373] *et adapté par Aude Chavanton. Schéma réalisé à l'aide du logiciel Biorender.*

Mon projet de recherche se focalisant sur la protéine de choc thermique HSP110, nous parlerons uniquement de cette protéine par la suite.

4.3. La protéine HSP110

4.3.1. Généralités

HSP110 est une protéine de choc thermique, également connue sous le nom de HSP105 ou encore le membre 1 de la famille H des protéines de choc thermique (HSPH1). Elle est présente dans le noyau et le cytoplasme des cellules [386] et est impliquée dans la thermorésistance de ces dernières [387,388]. Elle est plutôt associée à des effets pro-tumoraux et ainsi favorise l'évolution de la maladie cancéreuse. En effet, l'expression élevée de HSP110

nucléaire au sein des tumeurs est associée à une survie sans progression plus courte [374] et au niveau de la réponse immunitaire, HSP110 extracellulaire favorise le profil des macrophages pro-tumoraux, anti-inflammatoires [389]. De plus, HSP110 semble favoriser la survie et la prolifération des cellules cancéreuses puisqu'elle est capable de stabiliser le facteur de différenciation myéloïde 88 (MyD88), un adaptateur aux voies de signalisation de la plupart des récepteurs TLRs, ce qui permet d'activer la signalisation du facteur nucléaire kappa B (NF-κB) dans le lymphome B diffus à grandes cellules [390], un facteur de transcription associé à la survie et prolifération cellulaire. Enfin, HSP110 semble impliquée dans la résistance aux traitements. En effet, HSP110 peut être transloquée dans le noyau et interagir avec l'hétérodimère Ku70/Ku80 pour faciliter la réparation des cassures de l'ADN via la voie de réparation par jonction non-homologue des extrémités de l'ADN (NHEJ) et ainsi être une source de résistance à la chimiothérapie génotoxique [391]. Par ailleurs, HSP110 serait une molécule associée à des signaux de danger pour le système immunitaire et particulièrement pour les cellules dendritiques qu'elle pourrait inciter à produire des cytokines pro-inflammatoires [392].

4.3.2. Structure

La protéine HSP110 est composée de plusieurs régions (**Figure 16A**) :

- Une région contenant le domaine de liaison aux nucléotides (NBD) incluant un domaine de liaison à l'ATP. Le domaine NBD est composé de quatre sous-domaines (IA, IB, IIA, IIB) constituant deux lobes similaires I et II. Le site de liaison à l'ATP se situe à l'interface entre les quatre sous-domaines et semble être la partie la plus conservée du domaine NBD [393] (**Figure 16B**).
- Une région contenant un linker
- Une région contenant le domaine de liaison au substrat (SBDβ)
- Une région contenant une boucle insérée dans le SBDβ
- Une région contenant le domaine α-helix (SBDα) avec une extension C-terminale

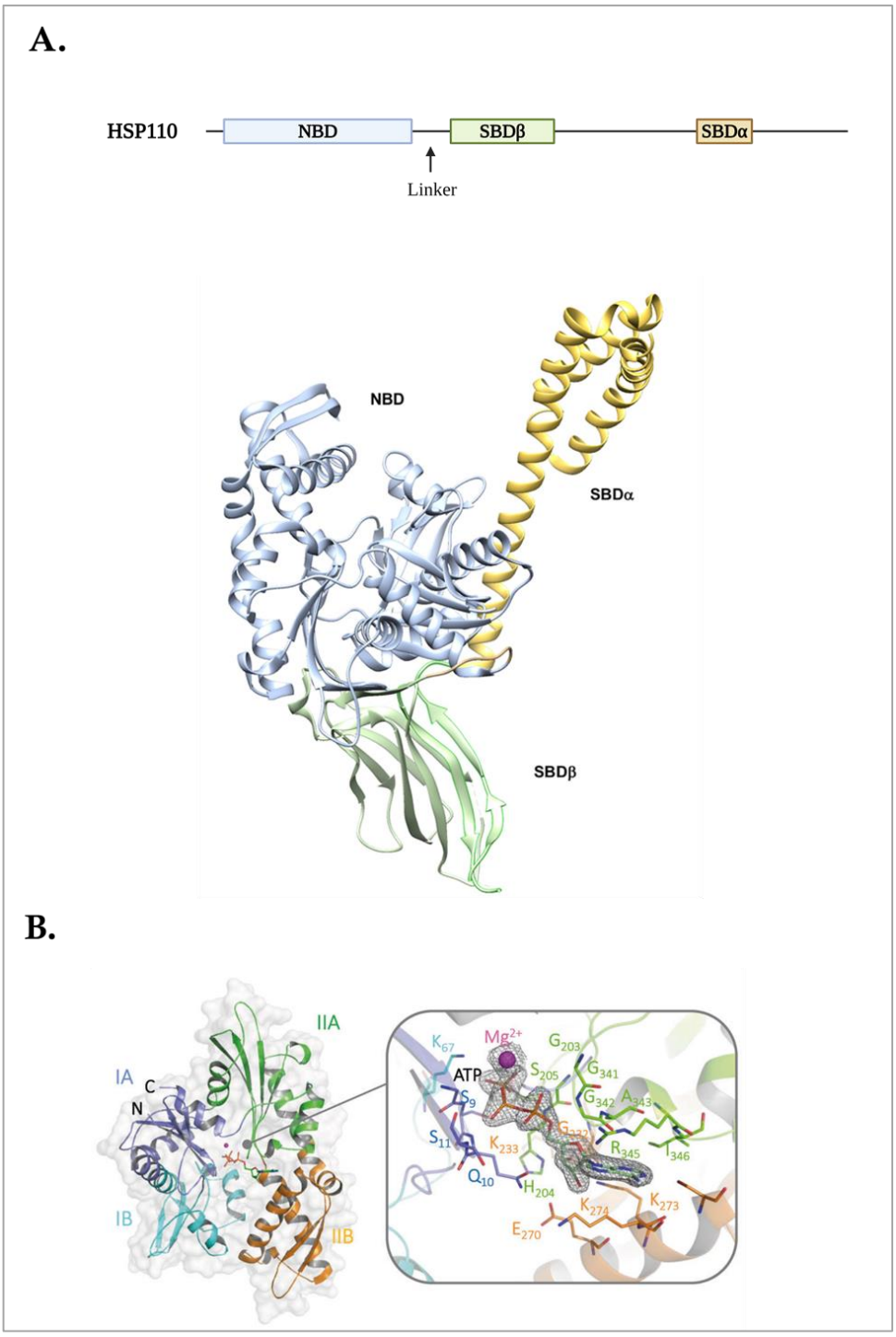


Figure 16. Structure de HSP110. (A) HSP110 est composée d'un domaine de liaisons aux nucléotides (NBD), d'un domaine de liaison au substrat (SBDβ) et d'une région contenant le domaine α-helix (SBDα). Elle contient également des éléments de liaisons des différents domaines : un linker et une boucle insérée dans le SBDβ. **(B)** Le domaine NBD est constitué de quatre sous-domaines (IA, IB, IIA, IIB) formant deux lobes I et II similaires. Le site de liaison à l'ATP se situe à l'interface entre les quatre sous-domaines. *Schémas réalisés par Gozzi et al., 2020 [393] ; Yakubu et Morano, 2018 [394] et adapté par Aude CHAVANTON.*

La fonction de chaperon de Hsp110 se fait grâce au domaine de liaison peptidique et deux domaines C-terminaux adjacents [395]. Les domaines SBDβ, SBDα et l'extension C-terminale de la protéine de stress osmotique de 94 kDa (OSp94, un membre de la famille Hsp110) sont impliqués dans la désagrégation des protéines et leur renaturation [396]. Le domaine de liaison à l'ATP est en partie important pour la fonction anti-agrégante de HSP110 et est la cible d'inhibiteurs de HSP110 [393].

4.3.3. Cycle de renaturation des protéines

La protéine Hsp110 reconnaît efficacement les protéines dénaturées et a la capacité de les renaturer [387,395]. Le repliement des protéines par Hsp110 nécessite la coopération de Hsp70 et Hsp40 (protéines à domaine J). En effet, la protéine non repliée (substrat) est reconnue et recrutée par Hsp70 avec l'aide de Hsp40. La liaison de la protéine non repliée et Hsp40 déclenche l'hydrolyse de l'ATP sur Hsp70, ce qui induit un changement conformationnel de Hsp70 qui lie étroitement la protéine non repliée (état fermé de Hsp70). Hsp110 se lie ensuite à Hsp70 sur un site différent d'Hsp40, ce qui induit la libération de l'ADP par Hsp70. La liaison ultérieure de l'ATP sur Hsp70 entraîne la dissociation du complexe Hsp70/ATP/protéine substrat de Hsp110 ainsi que la dissociation de la protéine substrat avec Hsp70, ce qui entraînerait le repliement partiel ou complet de la protéine (**Figure 17**) [397].

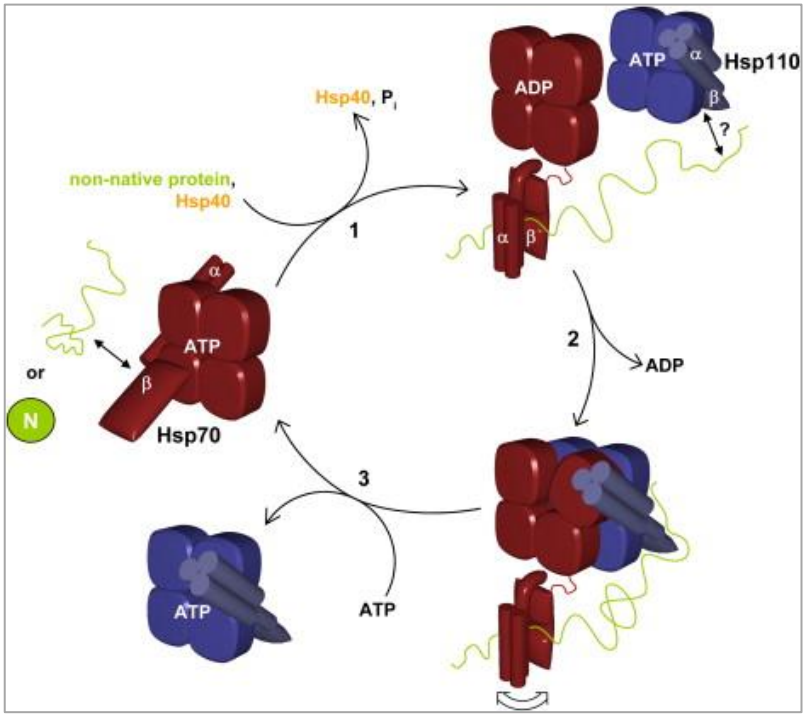


Figure 17. Le cycle de renaturation des protéines dénaturées par le complexe Hsp70/Hsp110. La protéine non repliée est reconnue et recrutée par Hsp70 avec l'aide de Hsp40. La liaison de la protéine non repliée (substrat) et Hsp40 déclenche l'hydrolyse de l'ATP sur Hsp70. Cela induit un changement conformationnel de Hsp70 qui lie étroitement la protéine non repliée. HSP110 se lie ensuite à Hsp70, ce qui libère l'ADP par Hsp70. La fixation d'ATP sur Hsp70 dissocie le complexe Hsp70/ATP/protéine substrat de Hsp110 et la protéine substrat avec Hsp70, ce qui induirait le repliement partiel ou complet de la protéine substrat. *Schéma réalisé par Polier et al., 2008* [397].

4.3.4. Son rôle dans la vaccination

HSP110 est également étudiée en tant que thérapie vaccinale dans le cadre d'essais pré-cliniques [398–404], notamment pour ses capacités à induire une réponse immunitaire, notamment médiée par les lymphocytes T [398,399], mais également les NK, la présence d'IFNγ et de GM-CSF [398].

4.3.4.1. Faciliter la présentation antigénique et la réponse immunitaire

Plus précisément, des études mettent en lumière le rôle majeur de HSP110 comme élément important pour faciliter la présentation antigénique. En effet, la protéine HSP110, grâce à ses capacités de chaperon, est capable de se lier à des peptides antigéniques et ainsi de favoriser la réponse immunitaire antitumorale. Quelques études différentes démontrant ce rôle sont décrites ci-dessous :

- Dans le cadre du carcinome rénal, la protéine HSP110 peut former un complexe avec l'anhydrase carbonique IX spécifique du carcinome rénal (CA9) et être injectée de cette façon comme substance vaccinale. Ce complexe vaccinal semble être bénéfique dans le cadre de ce type de cancer, notamment en réduisant la croissance des tumeurs [400].

- Une autre stratégie vaccinale est basée sur l'utilisation du complexe HSP110/domaine intracellulaire de HER-2/neu humain. Ce vaccin a généré une réponse immunitaire antitumorale notamment médiée par les lymphocytes T $CD8^+$ [405]. Une approche similaire utilisant un vaccin HSP110-rat neu favorise la sécrétion d'IFNγ par les $TCD8^+$ *in vitro* [401].

- Un vaccin à base d'HSP110 et d'oncoprotéines E7 (peptides antigéniques), qui sont des protéines du papillomavirus humain 16 (HPV16), exprimées par les cellules tumorales a démontré une efficacité antitumorale. Le vaccin HSP110-$E7_{49-57}$ (RAHYNIVTF) induit une réponse immunitaire médiée par les cellules T cytotoxiques, limite la croissance tumorale et améliore la survie [402].

- Un vaccin à base de HSP110 et de E2, une glycoprotéine d'enveloppe du virus de la diarrhée virale bovine, a démontré une efficacité sur la prolifération des lymphocytes T $CD4^+$ spécifiques de E2 *in vitro*. Néanmoins, cela n'a pas été confirmé *in vivo*, où au contraire l'ajout de HSP110 dans le vaccin a limité les réponses immunitaires [404].

4.3.4.2. Essais cliniques de phase I

La protéine HSP110 (HSP105) a été utilisée dans un concept vaccinal lors d'un essai clinique de phase I chez des patients atteints de cancer colorectal ou de l'œsophage. Le vaccin peptidique contenant HSP105 a entraîné chez certains patients une induction de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de HSP105 et cela était associé à une inhibition de la progression du cancer, mettant en lumière l'efficacité du vaccin [406]. Un autre essai clinique de phase I (NCT01744171) chez des patients atteints de mélanome au stade IIIB/C/IV non résécable, démontre qu'un vaccin à base du complexe HSP110/glycoprotéine 100 (gp100) injecté à faible dose induit une amélioration de la survie sans progression des patients [407].

4.3.5. Son implication dans le cancer colorectal

La protéine HSP110 est très exprimée dans le cancer colorectal [408,409]. Elle favorise la prolifération des cellules cancéreuses colorectales, notamment en agissant sur le facteur de transcription STAT3, qui est phosphorylé par la protéine JAK2, une protéine à activité tyrosine kinase [375]. De plus, l'une des particularités de HSP110 est qu'une mutation de celle-ci a été identifiée dans le cancer colorectal [386] contrairement aux autres HSPs, faisant de cette protéine un centre d'intérêt majeur.

4.3.5.1. La mutation de HSP110 : formation de protéines HSP110ΔE9

Il a été mis en évidence une mutation somatique inactivatrice de HSP110 au niveau de l'intron 8 du gène codant cette protéine [386]. Il s'agit plus précisément d'une délétion au niveau de la répétition mononucléotidique T_{17} sur cet intron 8 [386]. Cela entraîne l'apparition d'acides ribonucléiques (ARN)m HSP110 dépourvus d'exons 9, appelés HSP110ΔE9 [386]. L'absence d'exons 9 induit un décalage du cadre de lecture, faisant apparaître un codon stop prématuré au niveau de l'exon 10 de l'ARNm HSP110ΔE9 [386]. Cela donne naissance à une protéine HSP110 anormale, possédant le domaine liaison à l'ATP, mais dépourvue du domaine de liaison au substrat. Par ailleurs, elle n'a plus la capacité de se lier à HSP70 [386]. Cette protéine HSP110 anormale, appelée aussi mutant de HSP110 se nomme HSP110ΔE9.

La délétion de la répétition d'ADN mononucléotidique T_{17} de HSP110 a été observée dans les cancers gastriques avancés à haut statut MSI, et est associée à une survie globale favorable [410]. Elle est très fréquente en particulier dans les cancers colorectaux de statut MSI [386,411]. Elle est ainsi utilisé comme marqueur pour identifier le statut MSI des patients atteints de cancer colorectal [412]. Il est à noter que des petites délétions (3 ou 4 paires de bases) de T_{17} sont associées à un taux d'ARNm HSP110ΔE9 faible tandis que des délétions plus importantes de T_{17} (5 à 8 paires de bases) sont associées à un taux d'ARNm HSP110ΔE9 fort [386]. De plus, des délétions importantes dans la répétition mononucléotidique T_{17} de HSP110 sont associées à une faible expression de HSP110 de type sauvage (WT) dans les carcinomes colorectaux à haut statut MSI [413] et génèrent une bonne réponse à la chimiothérapie chez environ 25% des patients au stade II/III du CCR MSI [414].

Les protéines HSP110 mutées (HSP110ΔE9) ne sont pas fonctionnelles et inhibent les activités chaperonne, antiapoptotique et antiagrégante des protéines HSP110 normales et perturbent leur localisation cellulaire : il s'agit d'un effet dominant négatif [386]. La mutation HSP110ΔE9 a permis de sensibiliser les cellules cancéreuses au 5-FU, une chimiothérapie standard très utilisée dans le cadre des cancers gastro-intestinaux [386,415]. Les patients atteints de cancer colorectal de statut MSI ayant une faible expression de HSP110 WT ou une forte expression de HSP110ΔE9 ont une survie sans maladie améliorée [386,416] (**Figure 18A**). De plus, la survie sans maladie est meilleure chez les patients présentant une plus forte expression de HSP110ΔE9 et étant au stade III du CRC ou ayant reçu une chimiothérapie adjuvante [386] (**Figure 18B**).

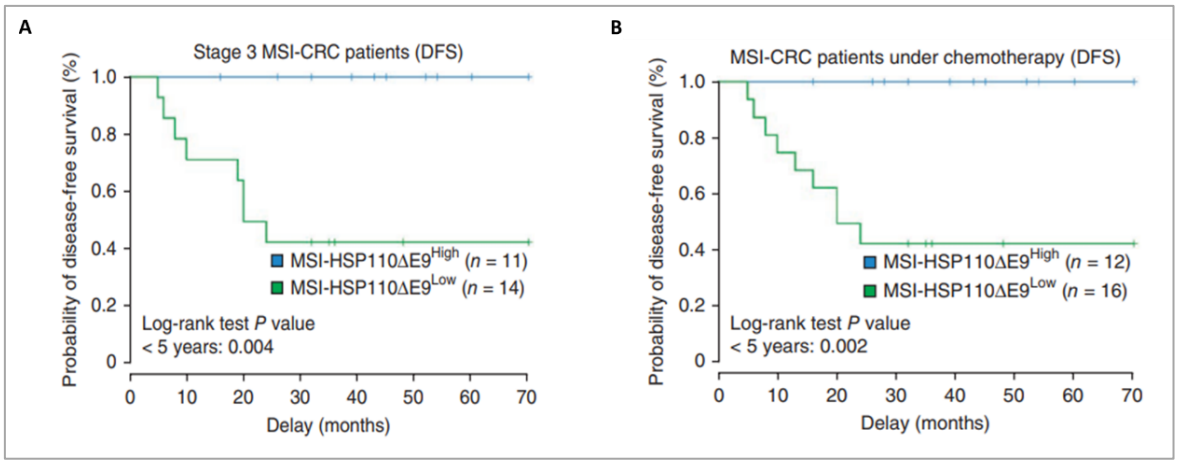


Figure 18. Survie sans maladie des patients atteints de cancer colorectal de stade III à statut MSI HSP110ΔE9Low/High. (A) Survie sans maladie des patients atteints de cancer colorectal de stade III à statut MSI suivant qu'ils expriment peu (Low) ou beaucoup (High) de mutations HSP110ΔE9 dans leur tumeur. **(B)** Survie sans maladie des patients atteints de cancer colorectal de stade III à statut MSI traités par chimiothérapie, suivant qu'ils expriment peu (Low) ou beaucoup (High) de mutations HSP110ΔE9 dans leur tumeur. CRC = cancer colorectal. *Données issues de Dorard et al., 2011* [386].

Toutes ces études démontrent qu'HSP110 WT ne semble pas être de bon pronostic et que le blocage ou l'inhibition de cette protéine serait avantageux pour déstabiliser les cellules cancéreuses et faciliter la guérison ou du moins le retard de la progression tumorale. Une étude sur l'effet de HSP110 au niveau de la réponse immunitaire a permis de mettre en avant que l'inhibition de HSP110 ou de son expression favorise le profil des macrophages antitumoraux, pro-inflammatoires, cytotoxiques [389].

4.3.5.2. Les molécules ciblant HSP110 en phase d'essais pré-cliniques

Au sein de mon laboratoire d'accueil, il a été démontré dans des projets antérieurs que des nanofitines ciblant HSP110 (A-C2, protéines d'environ 7kda) induisent une diminution de la croissance tumorale et favorisent l'infiltration au sein des tumeurs de macrophages au profil cytotoxique [417]. Par ailleurs, trois molécules chimiques ciblant HSP110 ont été développées, appelées 33, 52 et 61 (**Figure 19**). Ces molécules chimiques sont identifiées comme les inhibiteurs de HSP110 de première génération et agissent en se liant au domaine de liaison aux nucléotides de HSP110, particulièrement au niveau du site de liaison à l'ATP [393] (**Figure 19**).

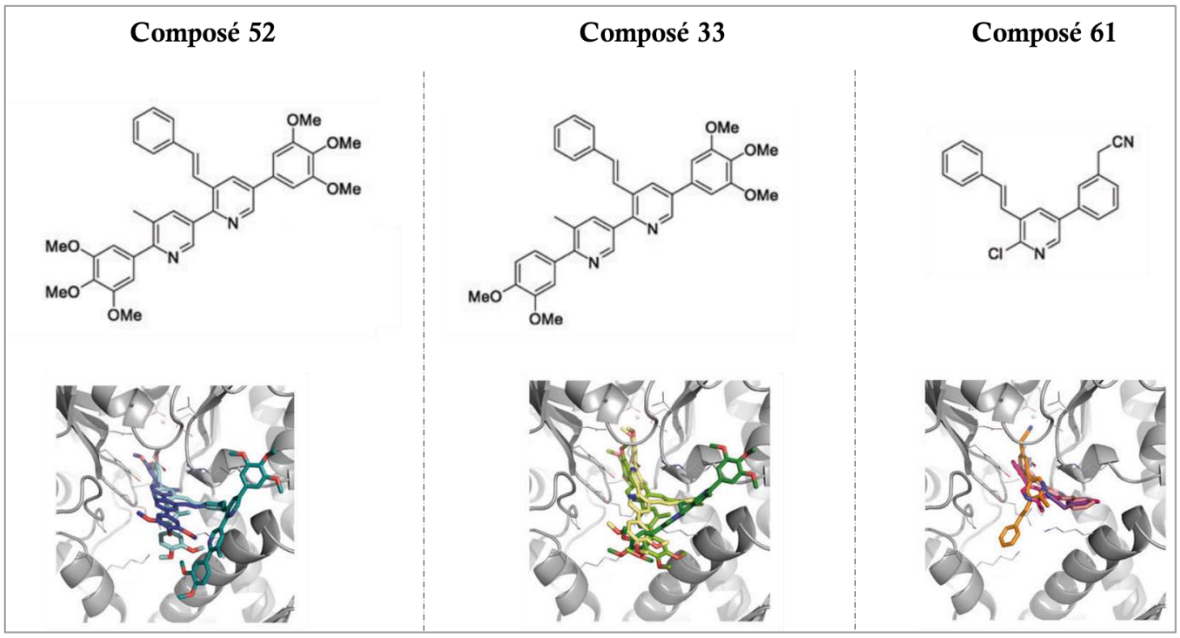


Figure 19. Les inhibiteurs chimiques de HSP110 de première génération. Trois composés chimiques ciblant HSP110 ont été développés et ont démontré une bonne efficacité en prévenant la fonction anti-agrégante de HSP110. Ces composés se nomment 52, 33 et 61 et se lient au domaine de liaison des nucléotides de HSP110, particulièrement au niveau du site de liaison à l'ATP. *Schéma réalisé par Gozzi et al., 2020* [393]

Les inhibiteurs 33, 52 et 61 ont démontré une bonne efficacité en empêchant la fonction anti-agrégante de HSP110 [393]. Néanmoins, seuls les composés 33 et 52 préviennent l'interaction de HSP110 avec STAT3, empêchant ainsi sa phosphorylation et son activité pro-tumorale. Ces deux composés ont donc davantage attiré l'attention. Enfin, parmi ces deux inhibiteurs de première génération, le composé 33 a été retenu pour son absence de toxicité *in vitro* aux doses testées [393]. Le composé 33 a par ailleurs démontré un effet antitumoral en favorisant le ralentissement de la croissance tumorale *in vivo* sur deux modèles de cancer colorectal, le modèle SW480 et le modèle murin de carcinome du côlon CT26 [393] (**Figure 20**).

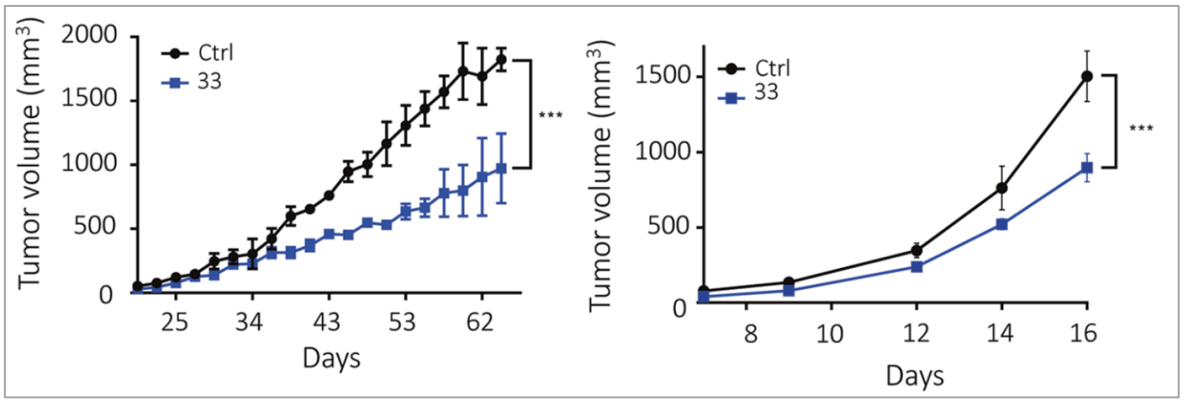


Figure 20. Effet de la molécule chimique 33 sur la croissance tumorale. (A)1 x 10^6 cellules CT26 ou **(B)** 10 x 10^6 cellules SW480 ont été injectées en sous-cutanée dans le flanc droit de souris BALB/c ou diabétiques non-obèses avec une déficience immunitaire combinée sévère (NOD/SCID) respectivement. Les souris ont ensuite été traitées (i.p) tous les trois jours avec le composé 33 (5mg/kg) ou le véhicule (n=6 à 10). Les volumes tumoraux ont été mesurés au cours du temps. Les écarts-types représentent la moyenne ±SD. *Données issues de Gozzi et al., 2020* [393]

De façon à améliorer davantage l'efficacité, l'affinité et réduire la toxicité des inhibiteurs de HSP110 et particulièrement celui de 33 qui a attiré l'attention, des modifications chimiques ont été réalisées sur le composé 33 afin de générer une molécule chimique inhibitrice de HSP110 de deuxième génération [418]. Cette molécule chimique se nomme 007 et correspond au composé 33 auquel ont été enlevés deux motifs lipophiles (méthyl-pyridyle et trans-styrène) pour les remplacer par des groupes hétérocycliques et le groupe CN [418] (**Figure 21**). Cette stratégie a été mise en place afin de limiter la lipophilie de la molécule, car les molécules hautement lipophiles ont tendance à interagir avec plusieurs cibles ce qui augmente la toxicité de la molécule [418].

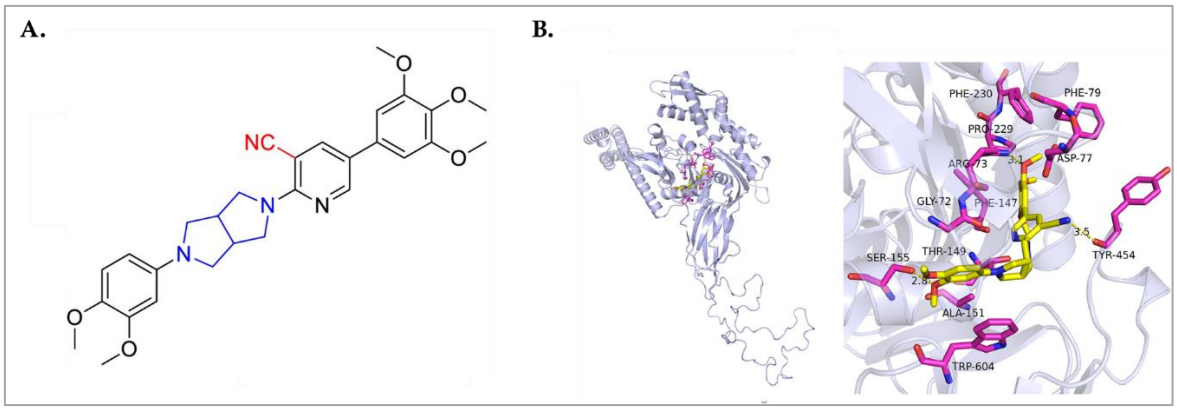


Figure 21. Structure chimique de 007 et son site de liaison à HSP110. (A) Structure chimique de 007. La molécule chimique 007 provient du composé 33 auquel ont été enlevés deux groupements lipophiles remplacés par des hétérocycles (bleu) et un groupement NC (rouge). **(B) Site de liaison de 007**. La molécule 007 (en jaune) se lie au domaine de liaison à l'ATP de la protéine HSP110. *Schéma réalisé par Xu et al., 2023* [418].

Une première étude montre que 007 est beaucoup plus puissant que 33 sur deux lignées cellulaires humaines de cancer du côlon (HCT116 et SW480) avec des valeurs d'IC50 nettement plus faible pour 007 que 33 : 11,59µM (HCT116) et 6,046µM (SW480) pour 007 comparé à 129,3µM (HCT116) et 146,18µM (SW480) pour 33 [418]. Par ailleurs, il a été démontré que 007 permet de limiter la prolifération des cellules cancéreuses colorectales *in vitro*, inhibe l'activité de STAT3 et l'expression des gènes VEGF, MMP7 et MMP9 qui sont impliqués en aval de STAT3 [418]. Le VEGF étant un facteur angiogénique favorisant la vascularisation des tumeurs et les protéines MMP7 et MMP9, des métalloprotéinases impliquées dans le processus d'invasion des cellules cancéreuses [419,420], ces résultats indique que 007 limite la progression tumorale. La molécule 007 semble limiter également la transition épithélio-mésenchymateuse induite par l'IL-6 en diminuant les niveaux protéiques de la N-cadhérine et Snail, des marqueurs mésenchymateux, et en augmentant les niveaux protéiques de la E-cadhérine, un marqueur épithélial [418]. De plus, le composé 007 semble ralentir la croissance tumorale de façon plus importante que 33 dans un modèle de souris xénogreffées avec des cellules humaines de cancer colorectal HCT116 [418] (**Figure 22**).

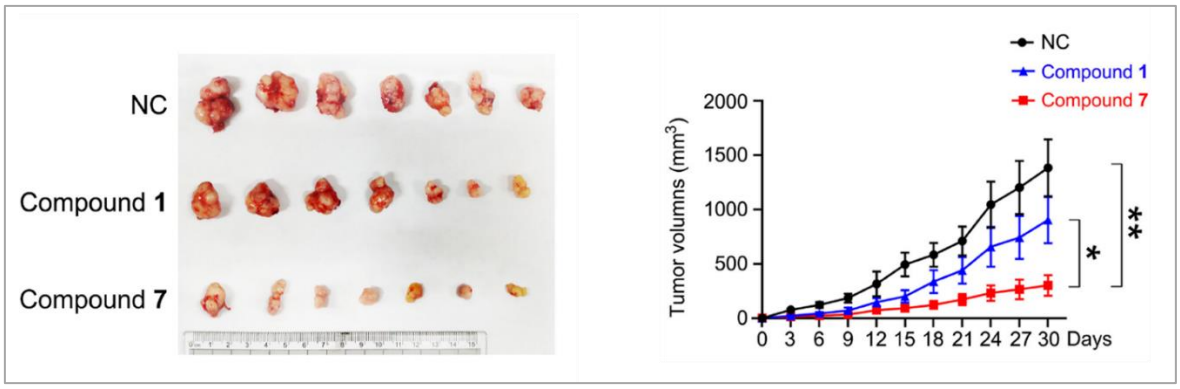


Figure 22. Effet de 33 (composé 1) et 007 (composé 7) sur la croissance tumorale dans un modèle de souris xénogreffées avec des cellules cancéreuses colorectales humaines HCT116. $5x10^6$ cellules HCT116 ont été injectées à des souris BALB/c ayant un système immunitaire déficient (nude) (4-6 semaines) dans le flanc droit. Lorsque les tumeurs ont atteint $100mm^3$, les souris ont été randomisées puis traitées tous les 3 jours avec 200µL d'une solution physiologique saline, 33 (5mg/kg) ou 007 (5mg/kg) par voie intrapéritonéale. La taille des tumeurs a été mesurée tous les trois jours. NC = contrôle négatif ; souris traitées avec une solution physiologique saline. *Données issues de Xu et al., 2023* [418].

II. Projet de recherche

II. Projet de recherche

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus meurtriers avec 900 000 décès enregistrés en 2022, ce qui en fait la deuxième cause de décès par cancer dans le monde selon l'*Organisation Mondiale de la Santé*. Les cancers colorectaux avancés à statut MSI élevé sont plus sensibles à l'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 que les cancers colorectaux à statut MSS où nous observons 37% de réponse objective pour les patients présentant un statut MSI élevé et 11% pour les patients présentant un statut MSS [289]. Néanmoins, le taux de réponse objective reste faible. L'objectif de ce projet de thèse est ainsi d'améliorer l'efficacité des anti-PD-L1 dans le cancer colorectal.

L'équipe de recherche dans laquelle j'ai réalisé mon doctorat s'intéresse aux protéines de chocs thermiques et à leur potentiel rôle en tant que cible thérapeutique dans le cancer. Il a été démontré au sein de cette équipe que la protéine HSP110 favorise la prolifération des cellules cancéreuses colorectales, mais également le profil des macrophages de type M2 pro-tumoraux [375,389]. Plusieurs molécules chimiques de première génération ciblant HSP110 ont été développées et ont démontré un effet antitumoral intéressant dans le cadre du cancer colorectal [393]. De façon à améliorer l'efficacité, l'affinité et réduire la toxicité des inhibiteurs de première génération, une molécule chimique de deuxième génération, appelée 007, a été développée [418].

Au cours de ce doctorat, l'efficacité de la combinaison thérapeutique de 007 avec des anti-PD-L1 dans un modèle murin de cancer colorectal a été étudiée. Tout d'abord, l'effet de 007 seul, appelé i007 par la suite pour « inhibiteur 007 », sur l'expression de PD-L1 dans deux lignées de carcinome du côlon CT26 et MC38 et dans les macrophages a été évalué. Ensuite, l'effet de la double thérapie anti-PD-L1/i007 a été analysé au niveau de la croissance tumorale et de l'infiltration macrophagique et lymphocytaire au sein des tumeurs dans le modèle murin CT26 résistant à l'immunothérapie. Des expériences avec des cellules cancéreuses ayant des niveaux de protéines HSP110 faibles (sh110) ont également été réalisées en association avec des anti-PD-L1.

Une ouverture sur un éventuel nouveau projet de recherche visant à combiner des anti-PD-L1 et des anti-LAG-3 sera également présentée par la suite.

Les résultats de recherche qui seront présentés ci-dessous sont issus d'un travail de collaboration entre la chercheuse Jimena ABREY-RECALDE et Aude CHAVANTON.

III. Matériels et méthodes

III. Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires CT26 WT, préalablement infectées avec un virus contrôle (shCtl) ou un virus induisant la déplétion de HSP110 (sh110) ainsi que la lignée MC38 WT ont été cultivées dans du milieu de culture « Institut mémorial roswell park » (RPMI) 1640 ou « Milieu de eagle modifié par dulbecco » (DMEM) respectivement supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cultures ont été réalisées à 37°C et 5% CO_2. Le milieu de culture a été changé tous les deux à trois jours et les cellules ont été passées à l'aide de la Trypsine - acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) 10X (*#MS01W9100V, Dominique Dutscher*) dilués dans de la solution saline équilibrée de Hanks (HBSS) (*#MS01W9100V, Dominique Dutscher*).

1.1. Détermination du nombre de cellules à ensemencer pour une confluence optimale à 72h des cellules CT26 WT et MC38 WT *in vitro*

Les cellules CT26 WT et MC38 WT ont été ensemencées en plaque 96 puits dans du milieu RPMI 1640 + 10% SVF et DMEM + 10% SVF respectivement selon la gamme suivante : 500, 1000, 2000, 4000, 6000, 8000 et 10 000 cellules/puits. Six réplicats techniques pour chaque quantité de cellules et chaque type cellulaire a été réalisé. 24h après ensemencement, le milieu de culture a été enlevé et remplacé par du milieu neuf. 72h plus tard, un test de viabilité cellulaire en utilisant le kit Cell Titer glo 2.0 (*#G9242, Promega*) a été réalisé.

1.2. Détermination de la concentration inhibitrice semi-maximale (IC50) de i007 sur les lignées CT26 WT et MC38 WT *in vitro*

Les cellules CT26 WT et MC38 WT ont été ensemencées en plaque 96 puits à raison de 4000 cellules/puits et 2000 cellules/puits dans du milieu RPMI 1640 + 10% SVF ou DMEM + 10% SVF respectivement. 24h plus tard, le milieu de culture a été enlevé et i007 dilué dans du milieu RPMI + 10% SVF (CT26) ou DMEM + 10% SVF (MC38) a été ajouté

selon la gamme de concentration suivante : 0,5,10,20,30,40,50,60µM (CT26) et 0,10,20,30,40,50,60,70,80µM (MC38). Trois réplicats techniques par concentration de i007 et pour chaque type cellulaire a été réalisé. Un contrôle positif contenant 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) (*Sigma Aldrich*) a été réalisé. L'IC50 a été déterminé à l'aide du logiciel GraphPad Prism.

1.3. Mesure de l'expression de HSP110 et PD-L1 dans les lignées CT26 WT et MC38 WT en présence de i007 *in vitro*

60 000 ou 120 000 cellules CT26 WT ou MC38 WT ont été ensemencées dans une plaque 6 puits avec du milieu RPMI 1640 + 10% SVF ou DMEM + 10% SVF respectivement. 24h après ensemencement, le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été traitées avec 40µM (CT26) ou 50µM (MC38) de i007 dans du milieu RPMI 1640 + 10% SVF ou DMEM + 10% SVF respectivement. 24h, 48h et/ou 72h après traitement, les cellules ont été récupérées, centrifugées à 300g pendant 5 minutes, lavées avec du tampon phosphate salin (PBS) 1X, puis centrifugées à nouveau à 300g pendant 5 minutes. Les cellules ont ensuite été lysées avec du tampon de lyse 10X (*#9803S, Cell Signaling Technology*) en présence d'inhibiteurs de protéases 5X (*#11697498001, Roche*) additionné ou non de fluorure de phénylméthanesulfonyle (PMSF) 100X, d'inhibiteurs de phosphatases 2 100X (*#P5726, Sigma Aldrich)* et 3 100X (*#P0044, Sigma Aldrich*), fluorure de sodium (NaF) 1000X, qsp eau distillée, pendant 20 minutes dans la glace. Le lysat cellulaire a ensuite été soniqué (réglage du sonicateur : continu, amplitude 20%, 10 secondes, micro-mode activé (Branson Digital Sonifier SFX 150, Emerson)) et enfin centrifugé à 21130g pendant 15minutes à 4°C. Le surnageant a été récupéré pour des analyses protéiques par western blotting.

2. Western blotting

2.1. Dosage de protéines

Les protéines présentes dans les lysats cellulaires ont été dosées par un test colorimétrique à l'aide du kit DCTM Protein Assay Kit I (#5000111, Biorad). Les concentrations protéiques ont été déterminées à l'aide d'une gamme étalon d'albumine de

sérum bovin (BSA, Promega) allant de 0,125µg/µL à 7,5µg/µL. Les mesures d'absorbances ont été réalisées à 750 nm avec un lecteur de plaque.

2.2. Migration des protéines, transfert sur membrane de nitrocellulose ou de fluorure de polyvinylidène (PVDF), saturation et incubation avec les anticorps primaires et secondaires

20µg de protéines cellulaires ont été dilués dans de l'eau et du tampon Laemmli 5X, un tampon dénaturant (Tris 250,6 mM, Dodécyl sulfate de sodium (SDS) 8 %, Glycérol 40 %, βmercaptoéthanol 400 mM (20%), bleu de bromophénol 0,04%, qsp eau, pH ajusté à 6,8 avec de l'acide chlorhydrique (HCl)). Les protéines ont ensuite été dénaturées à 95°C pendant 5 minutes, déposées sur un gel de polyacrylamide contenant du sodium dodécylsulfate à 10% (SDS-PAGE) et ont migré (15 minutes à 80V puis 1h30 à 110V) dans du tampon de migration (1L Tris/Glycine (30.3g Tris/144.1g Glycine/qsp 1L d'eau), 50mL SDS 20%, qsp 10L d'eau). Le transfert protéique a été réalisé sur une membrane de nitrocellulose ou de PVDF (préalablement activée dans de l'éthanol 96%) dans du tampon de transfert (Tris base 20mM, 0,2M Glycine, 20% Ethanol) pendant 1 heure à 100V. La membrane a été saturée dans une solution tampon-tris (TBS)-Tween 0,1% + 5% de BSA pendant 1 heure à température ambiante (RT). Elle a ensuite été incubée toute la nuit à 4°C avec une solution d'anticorps primaires dilués dans une solution de TBS-Tween 0,1% + 5% de BSA ou de Lait (Régilait) : anti-PD-L1, anti-protéine cognitive de choc thermique (Hsc70), anti-lectine de type C des cellules sinusoïdales du foie et des ganglions lymphatiques (LSECTin), anti-HSP110 et anti-glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) (**Tableau 6**). Les membranes ont ensuite été lavées dans du TBS-Tween 0,1% (3 x 5 minutes). Elles ont ensuite été incubées 45 minutes à RT avec une solution d'anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort dans une solution de TBS-Tween 0,1% + 5% BSA (**Tableau 6**). Les membranes ont été lavées dans du TBS-Tween 0,1% (3 x 5 minutes). Les protéines ont été révélées par ajout du substrat de la peroxydase (Clarity Western ECL Substrate, #1705061 BioRad, ou SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate, #10095983 Thermo Scientific™). La chimiluminescence générée a été détectée à l'aide d'un système Chemidoc MP. Les images capturées par l'appareil ont été analysées avec le logiciel ImageLab (Biorad).

Tableau 6. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés pour le western-blotting

	Anticorps	Dilution	Isotype	Réactivité	Espèce hôte	Référence	Fournisseur
Anticorps Iaire	Anti-PD-L1	1/1000ème	IgG	Souris	Lapin	ab213480	Abcam
	Anti-Hsc70	1/1000ème	IgG2a	Souris, rat, humain	Souris	sc-7298	Santa Cruz Biotechnology
	Anti-LSECTin	1/1000ème	IgG	Souris, humain	Lapin	ab181196	Abcam
	Anti-HSP110	1/1000ème	IgG1	Souris, rat, humain	Souris	sc-74550	Santa Cruz Biotechnology
	Anti-GAPDH	1/1000ème	IgG1κ	Humain	Souris	sc-47724	Santa Cruz Biotechnology
Anticorps IIaire	Anti-souris	1/10000ème	IgG	Souris	Cheval	7076S	Cell Signaling Technology
	Anti-lapin	1/10000ème	IgG	Lapin	Chèvre	7074S	Cell Signaling Technology

3. Expérimentation animale

3.1. Provenance des souris et condition d'élevage

Les souris utilisées provenaient du laboratoire Charles River, étaient des femelles BALB/c âgées de 7 semaines et ont été soumises à une semaine d'acclimatation au sein de l'animalerie de mon laboratoire d'accueil avant toute expérience et manipulation des animaux. Les souris étaient hébergées et nourries dans des conditions standards.

3.2. Préparation et injection des cellules tumorales CT26

Les cellules CT26 WT ou sh110 en culture ont été passées la veille de l'injection aux souris de sorte à ce qu'elles ne soient pas trop confluentes et en pleine croissance. Le jour de l'injection, les cellules ont été lavées avec 10mL de HBSS puis trypsinées pendant 5 minutes à 37°C avec de la Trypsine-EDTA 10X dilué au 1X dans du HBSS. La trypsine a ensuite été inactivée par du milieu RPMI 1640 + 10% SVF et les cellules ont été centrifugées à 300g pendant 5 minutes. Après resuspension des cellules dans du milieu RPMI 1640 + 10% SVF, les cellules ont été comptées à l'aide d'une lame de KOVA et de bleu trypan (marquage des cellules mortes). Les cellules ont ensuite été centrifugées à nouveau et resuspendues dans du milieu RPMI 1640 sans SVF. 500 000 cellules CT26 WT ou sh110 ont ensuite été injectées en sous-cutanées.

3.3. Randomisation, traitements des souris et mesure de la taille des tumeurs

Au jour 5-6 après injection des cellules cancéreuses, les souris ont été randomisées puis traitées avec des anti-PD-L1 (*#BX-BE0101, Clone 10F.9G2, Bioxcell*), et/ou i007 et/ou des anti-LAG-3 (*#BX-BE0174, Clone C9B7W, Bioxcell*). Selon les groupes, les souris ont reçu trois fois par semaine 200µg d'anti-PD-L1 et/ou 200µg d'anti-LAG-3 (dilués dans du PBS 1X stérile) et/ou 0,1mg de i007 (poudre diluée dans 10% de DMSO, qsp huile (*#C8267, Sigma Aldrich*). Les anti-PD-L1, anti-LAG-3 et i007 ont été injectés par voie intrapéritonéale. Un isotype IgG1 *(#BX-BE0088, Clone HRPN, Bioxcell*) a été utilisé comme contrôle des anti-PD-L1 et anti-LAG-3 pour les groupes non traités par ces anticorps. Une solution contrôle contenant 10% de DMSO qsp huile a été utilisée comme contrôle du i007 dans les groupes non traités par ce dernier. Le poids des souris et la taille des tumeurs ont été mesurés trois fois par semaine. Le volume des tumeurs a été calculé selon la formule mathématique 1/2 x (longueur x $(\text{largeur})^2$).

3.4. Euthanasie et stockage des tumeurs

Au jour 12 après injection des cellules cancéreuses, les souris ont été anesthésiées à l'aide d'isoflurane puis euthanasiées par dislocation cervicale. Les tumeurs ont été prélevées puis stockées à 4°C dans du tampon MACS ® Tissue Storage Solution (*#130-100-008, Miltenyi Biotec*) au maximum 24h.

4. Cytométrie en flux

4.1. Digestion des tumeurs et isolation des cellules $CD45^+$

Les tumeurs ont été disséquées en petits morceaux puis mises dans des tubes C (*#130-093-237, Miltenyi Biotec*). Les tumeurs ont ensuite été digérées à l'aide d'un mix d'enzymes de digestion (*#130-096-730, Miltenyi Biotec*) et d'un dissociateur avec chauffage gentleMACS™ (*#130-096-427, Miltenyi Biotec*) selon le programme 37C_m_TDK_1. Du milieu RPMI 1640 sans SVF a été ajouté dans les tubes C à la fin du programme pour inactiver les enzymes de digestion. Les suspensions cellulaires ont ensuite été filtrées à 70µm (*#2515151, UGAP*), puis du milieu RPMI 1640 a été ajouté pour laver les filtres. Après

centrifugation à 350g pendant 5minutes, les cellules ont été lavées par resuspension dans du tampon MACS (2mM EDTA, 0,5% BSA, qsp PBS 1X), PBS 1X ou du milieu RPMI 1640. Les cellules ont ensuite été centrifugées à 350g pendant 5minutes puis resuspendues dans du tampon MACS ou PBS 1X pour être comptées à l'aide d'un cellometer mini (*#14830482, Nexcelom*) et d'une lame de comptage (*#CHT4-PD100-002, Nexelom*). Après centrifugation des suspensions cellulaires à 350g pendant 5minutes puis resuspension dans du tampon MACS ou PBS 1X, entre 1 000 000 et 2 000 000 de cellules ont été déposées/puits d'une plaque 96 puits.

Pour certaines expériences, les cellules $CD45^+$ ont été préalablement isolées avant leur mise en plaque à l'aide de colonnes LS (*#130-042-401, Miltenyi Biotec*), de microbilles sélectionnant les cellules $CD45^+$ (*#130-052-301, Miltenyi Biotec*) et d'un séparateur magnétique Quadro MACS™ (*#130-091-051, Miltenyi Biotec*). Pour cela, les cellules ont été resuspendues dans du tampon MACS additionné de microbilles et laissées 15 minutes à 4°C dans le noir. Après ajout de tampon MACS, les suspensions cellulaires ont été centrifugées à 350g pendant 5 minutes pour éliminer l'excès de microbilles puis resuspendues dans du tampon MACS. Après lavage des colonnes LS avec du tampon MACS, les suspensions cellulaires ont été filtrées à 30µm (*#130-101-812, Miltenyi Biotec*) puis passées dans les colonnes LS. Les colonnes ont ensuite été lavées deux fois avec du tampon MACS puis les cellules $CD45^+$ ont été éluées. Entre 100 000 et 200 000 cellules $CD45^+$ ont ensuite été déposées/puits.

4.2. Marquages des cellules immunitaires pour une analyse cytométrique

Pour la détection de cytokines produites par les lymphocytes T, un cocktail de stimulation cellulaire à base de phorbol myristate acétate (PMA) et d'ionomycine (*#00-4970-93, Invitrogen*) qui favorise la production de cytokines par les cellules a été dilué au 1X dans du milieu RPMI 1640 + 10% SVF puis mis en contact avec les cellules pendant 3-4 heures à 37°C. Cette étape n'a pas été réalisée pour l'étude des macrophages, car aucune cytokine n'a été analysée pour ces types cellulaires.

Les suspensions cellulaires ont été centrifugées puis resuspendues dans du tampon PBS 1X/0,5% BSA +/- EDTA 2mM additionné de 5µL de réactif de blocage des FcR (*#130-092-575, Miltenyi Biotec*) puis laissées à 4°C pendant 10 minutes. Cette étape permet de bloquer

les récepteurs Fc sur les cellules immunitaires et empêcher que les anticorps de cytométrie qui seront ajoutés par la suite ne se fixent de manière aspécifique aux cellules. Après ajout de PBS 1X, les suspensions cellulaires ont été centrifugées à 350g pendant 5minutes puis resupendues dans une solution de coloration de la viabilité fixable (FVS) 780 (*#565388, BD Biosciences*) dilué au 5000ème dans du PBS 1X et laissées 15 minutes dans le noir à RT. Le FVS est une sonde fluorescence capable de se fixer sur les groupements amines. Etant donné que les cellules mourantes ont des pores dans leurs membranes cellulaires, la sonde peut à la fois marquer les groupements amines présents sur la membrane cellulaire, mais aussi ceux présents dans les cellules. Cela n'est pas le cas pour les cellules vivantes, qui n'ont pas de pores dans leurs membranes, la sonde fluorescente ne fixe ainsi que les groupements amines présents à la surface cellulaire. La fluorescence émise est ainsi plus faible dans les cellules vivantes que dans les cellules mortes, ce qui permet de différencier ces deux types de populations cellulaires par cytométrie en flux.

Marquage membranaire

Une fois les cellules marquées au FVS, du PBS 1X a été ajouté aux suspensions cellulaires puis celles-ci ont été centrifugées à 350g pendant 5 minutes. 50µL d'anticorps anti-CD45, CD3, CD8, CD4, Tim-3, LAG-3 et PD-1 dilués dans du tampon « Brillant Stain » (*#563794, BD Biosciences*) lui-même dilué au 1X dans du tampon de marquage contenant de la BSA (*#554657, BD Biosciences*) ont été ajoutés aux cellules pour le panel lymphocytes T (**Tableau 7**). Pour le panel macrophages, ce sont les anticorps anti-CD45, Cd11b, CD206, CD80, F4/80, PD-L1 et CMH II qui ont été ajoutés (**Tableau 7**). Les suspensions cellulaires ont ensuite été laissées 20 minutes à 4°C, lavées une fois avec du tampon de marquage contenant de la BSA puis centrifugées à 350g pendant 5 minutes.

Pour l'analyse des macrophages, les cellules ont ensuite été resuspendues dans du paraformaldéhyde 4% puis laissées 5 minutes à RT de façon à fixer les cellules. Du tampon contenant de la BSA a ensuite été ajouté pour laver les cellules, puis celles-ci ont été centrifugées à 350g pendant 5 minutes avant d'être resuspendues dans du tampon contenant de la BSA et passées au cytomètre Cytek Aurora.

Tableau 7. Liste des anticorps murins utilisés pour la cytométrie en flux

	Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Clone	Référence	Fournisseur
Panel lymphocytes T	Anti-CD45	BUV395	600ème	30-F11	564279	BD Biosciences
	Anti-CD3	BUV805	600ème	17A2	741982	BD Biosciences
	Anti-CD3	BUV805	600ème	145-2C11	749276	BD Biosciences
	Anti-CD8b.2	PE-Cy7	600ème	53-5.8	140416	Biolegend
	Anti-CD4	PerCP Vio 700	600ème	GK1.5	130-123-905	Miltenyi Biotec
	Anti-CD4	PerCP Vio 700	600ème	REA604	130-118-852	Miltenyi Biotec
	Anti-Tim-3	BV421	200ème	B8.2C12	134019	Biolegend
	Anti-LAG-3	PE	200ème	C9B7W	125208	Biolegend
	Anti-PD-1	APC	200ème	29F.1A12	135210	Biolegend
	Anti-GzB	PE Dazzle 594	200ème	QA16A02	372216	Biolegend
	Anti-IFNγ	BV605	200ème	XMG1.2	505840	Biolegend
	Anti-TNFα	BV510	200ème	MP6-XT22	506339	Biolegend
Panel macrophages	Anti-CD45	BUV395	200ème	30-F11	564279	BD Biosciences
	Anti-Cd11b	BUV805	200ème	M1/70	741934	BD Biosciences
	Anti-Cd11b	BUV805	200ème	M1/70	568345	BD Biosciences
	Anti-CD206	FITC	100ème	MR5D3	MA5-16870	Invitrogen
	Anti-CD80	APC	100ème	16-10A1	560016	BD Biosciences
	Anti-F4/80	Pe-Cy7	100ème	BM8	123114	Biolegend
	PD-L1	PE	100ème	10F.9G2	124308	Biolegend
	CMH II	Vioblue	100ème	REA813	130-112-237	Miltenyi Biotec

Perméabilisation des membranes plasmiques

Pour le marquage des cytokines intracellulaires dans les lymphocytes T, les cellules ont été resuspendues dans une solution de fixation/perméabilisation des membranes (*#554714, BD Biosciences*), laissées 20 minutes à 4°C. Une solution de lavage (*#554714, BD Biosciences*) a ensuite été ajoutée puis les cellules ont été centrifugées à 350g pendant 5 minutes.

Marquage intracellulaire

Les cellules ont été resuspendues dans 50µL d'anticorps anti-GzB, IFNγ, IL-2 et TNFα dilués dans du tampon de fixation/perméabilisation (*#00-5523-00, Invitrogen*) préalablement dilué au 1X avec un diluant contenu dans le kit suivant (*#00-5523-00, Invitrogen*). Les cellules ont ensuite été laissées 30 minutes à 4°C puis lavées dans du tampon de perméabilisation également contenu dans le kit suivant (*#00-5523-00, Invitrogen*). Enfin,

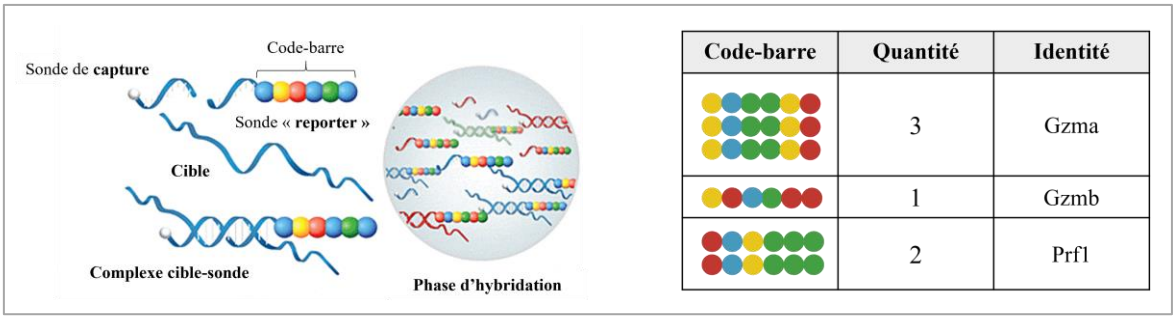
les cellules ont été centrifugées à 350g pendant 5 minutes puis resuspendues dans le tampon de marquage contenant de la BSA. Les cellules ont ensuite été passées au cytomètre Cytek Aurora. Les données obtenues à l'aide du cytomètre ont été analysées sur le logiciel FlowJo version 10.

5. Extraction d'ARNs à partir de tissus tumoraux (pour une analyse par technologie nanostring)

Les suspensions cellulaires obtenues suite à la digestion des tumeurs (partie 4.1) ont été centrifugées à 350g pendant 5min puis l'extraction d'ARN a été réalisée à l'aide du kit RNeasy® Plus Mini (*#74134, Qiagen*). Il est à noter que le lysat cellulaire obtenu suite à la première étape du protocole de ce kit, a été passé dans une colonne QIAshredder (*#79654, Qiagen*) avant de réaliser la suite du protocole, de sorte à éliminer les débris insolubles, réduire la viscosité et la perte d'échantillons pour augmenter la qualité des échantillons ARN. La concentration des ARN totaux (ng/µL) a été évaluée sur 1µL d'échantillon à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop 2000 (*#ND-2000, ThermoFisher Scientific*) en utilisant de l'eau dépourvue de nucléases comme contrôle négatif.

6. Analyse nanostring

La technologie nanostring permet de quantifier l'expression d'une multitude de gènes dans un même échantillon à l'aide de deux sondes spécifiques de la cible. La première sonde, appelée sonde de capture, est complémentaire de la séquence cible et est couplée à la biotine de façon à capturer la molécule cible sur le support (cartouche). La deuxième sonde, appelée sonde « reporter » est également complémentaire à la cible, mais possède un « code-barres » propre à la molécule cible qui permet son identification. Ce code-barres est composé de séquences d'ARN successives, chacune couplée à un fluorophore particulier. Le code pour chaque molécule cible est différent et est défini par la combinaison des fluorophores (**Figure 23**). Dans notre cas, nous étudions les ARN, ainsi la cible est un ARN.



Code-barre	Quantité	Identité
	3	Gzma
	1	Gzmb
	2	Prf1

Figure 23. Principe de fonctionnement de la technologie nanostring. La cible étudiée (ici un ARN) est hybridée avec une sonde de capture permettant la fixation de l'ARN sur le support (cartouche), et une sonde « reporter » couplée à un code-barre constitué de différents fluorophores permettant l'identification de la cible et sa quantification. Ainsi, suivant la quantité de codes-barres détectés, la quantité d'une cible donnée est déterminée. *Schéma issu de [421,422] et adapté par Aude Chavanton.*

Les ARNs isolés des tissus tumoraux (partie 5) ont été dilués dans de l'eau ultra-pure pour une concentration finale de 10ng/µL. L'étape d'hybridation des sondes aux molécules cibles a ensuite été réalisée en mélangeant 5µL de chaque échantillon avec 8µL de master mix (*#NAA-AKIT-012, Nanostring*) et 2µL de sonde de capture, le tout placé à 65°C pendant 16 heures dans un thermocycleur. Les ARNs couplés aux sondes de capture ont ensuite été dilués dans 10µL d'eau ultra-pure et le tout a été déposé dans une cartouche (*#NAA-AKIT-012, Nanostring*) et analysé par l'appareil « nCounter Analysis System » (*Nanostring*). Les données ont été analysées à l'aide du logiciel nSOLVER et le z-score pour chaque échantillon a été déterminé à l'aide de la formule $(x-\mu)/\sigma$, où x est la quantité d'ARN détecté pour un gène donné, µ est la moyenne des x de tous les échantillons pour un gène donné et σ est l'écart-type des x de tous les échantillons pour un gène donné. Le ratio de la moyenne des x entre deux groupes de traitement a été réalisé afin d'identifier les taux d'ARNs les plus élevés et les plus faibles dans les tumeurs d'un groupe de traitement par rapport à un autre.

7. Isolation des macrophages des PBMCs humain et traitement avec i007

Le sang humain a été dilué au demi dans du PBS 1X afin de mieux séparer les populations sanguines par la suite. Cette solution de sang dilué a ensuite été déposée sur du milieu de séparation des lymphocytes (*#CMSMSL01-01, Eurobio Scientific*) avec un ratio de 7:3 (35mL de sang dilué : 15mL de milieu de séparation des lymphocytes). Après

centrifugation à 700g à 20°C pendant 20 minutes, les cellules mononucléées du sang périphérique ont été isolées (anneau blanc, **Figure 24**).

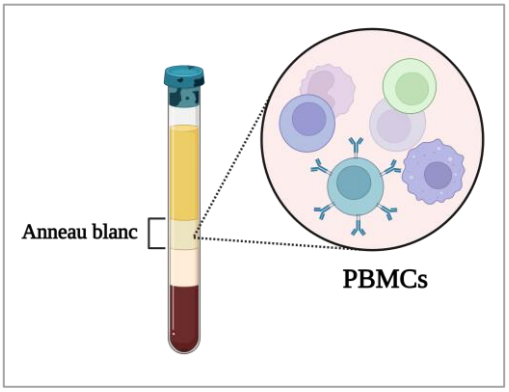


Figure 24. Anneau blanc contenant les PBMCs après centrifugation du sang humain dilué dans du PBS 1X et du milieu de séparation des lymphocytes. *Schéma réalisé par Aude Chavanton à l'aide du logiciel Biorender.*

Les PBMCs ont ensuite été diluées dans du PBS 1X puis centrifugées à 400g à 20°C pendant 5 minutes. Après élimination du surnageant, le culot cellulaire contenant les PBMCs a été resuspendu dans du tampon de lyse des globules rouges (EDTA 0,1mM, Chlorure d'ammonium (NH_4Cl) 150 mM, Bicarbonate de potassium ($KHCO_3$) 10mM) et incubé 5 minutes à RT afin de détruire les globules rouges. Après centrifugation à 400g à 20°C pendant 5 minutes, les cellules ont été resuspendues dans du PBS 1X puis centrifugées à 400g à 20°C pendant 5 minutes afin d'éliminer les restes de tampon de lyse. Après resuspension des cellules dans du milieu sans sérum, les cellules ont été comptées puis ensemencées à raison de 4 millions de cellules/mL en plaque 6 puits ou 12 puits. Les cellules ensemencées en plaque ont ensuite été incubées 2 heures à 37°C et 5% de CO_2 afin de permettre aux monocytes d'adhérer au fond des puits. Le milieu de culture RPMI sans sérum a ensuite été éliminé et les puits ont été lavés avec du milieu RPMI sans sérum neuf afin d'éliminer les cellules non adhérées qui seraient encore dans les puits. Les monocytes ont ensuite été pré-différenciés en macrophages de type M1 et M2 avec du GM-CSF (*#130-093-866, Miltenyi Biotec*) et du facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF) (*#130-096-492, Miltenyi Biotec*) respectivement à la concentration de 0,1µg/mL. Après 5 à 7 jours de prédifférenciation, les macrophages ont été activés en macrophages de type M1 avec du LPS et de l'IFNγ à la concentration de 100ng/ml et 20ng/mL respectivement, et en macrophages de type M2 avec de l'IL-4 à la concentration de 20ng/mL. A cette étape, le

traitement i007 a également été ajouté dans les puits à la concentration de 40µM. 48h plus tard, les macrophages ont été collectés et l'analyse des marqueurs CD80, HLA-DR, CD206, Dectin-1 et PD-L1 a été réalisée par cytométrie en flux (principe du marquage de cytométrie expliquée plus haut partie 4.2) (**Tableau 8**).

Tableau 8. Liste des anticorps humains utilisés pour la cytométrie en flux

Anticorps	Fluorochrome	Dilution	Clone	Référence	Fournisseur
Anti-Dectin-1	PE	100ème	15E2	564471	BD Biosciences
Anti-PD-L1	BV785	100ème	29E.2A3	329736	Biolegend
Anti-CD80	APC	100ème	2D10	305220	Biolegend
	APC	100ème	16-10A1	560016	BD Biosciences
Anti-HLA-DR	V500	200ème	G46-6	561224	BD Biosciences
Anti-CD206	FITC	100ème	19.2	551135	BD Biosciences

8. Statistiques

Les données présentées sont exprimées avec les moyennes +/- erreur standard à la moyenne (SEM) ou déviation standard (SD). Un test de normalité a été utilisé pour chaque expérience (Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov) suivi par un test T ou Mann-Whitney pour les comparaisons d'échantillons de deux groupes suivant la loi normale ou non respectivement ; d'un test one-way ANOVA ou two-way ANOVA pour les comparaisons d'échantillons de plus de deux groupes, comparant un ou plusieurs facteurs respectivement et suivant la loi normale ; et d'un test Kruskal-Wallis pour les comparaisons d'échantillons de plus de deux groupes ne suivant pas la loi normale. La significativité a été représentée par une étoile (*). Les graphiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism 8.3.0.

IV. Résultats

IV. Résultats

1. Projet principal : optimiser l'efficacité des anti-PD-L1 par l'ajout d'un inhibiteur de HSP110 dans un modèle de cancer colorectal

1.1. Identification des cibles thérapeutiques dans deux modèles de cancers colorectaux *in vitro* : une lignée plutôt résistante à l'immunothérapie (CT26) et une lignée plutôt sensible à l'immunothérapie (MC38)

Afin d'évaluer l'efficacité de la double thérapie anti-PD-L1/ i007 par rapport aux monothérapies anti-PD-L1 et i007, nous avons tout d'abord réalisé des cultures cellulaires *in vitro* des lignées CT26 WT et MC38 WT afin d'identifier si les cibles thérapeutiques PD-L1 et HSP110 sont présentes dans ces cellules cancéreuses. Pour cela, nous avons cultivé quelques jours ces cellules dans du milieu RPMI + 10% SVF et DMEM + 10% SVF respectivement puis effectué un lysat cellulaire de ces deux types cellulaires et analysé les taux de protéine de PD-L1 et HSP110 par western-blotting (**Figure 25**).

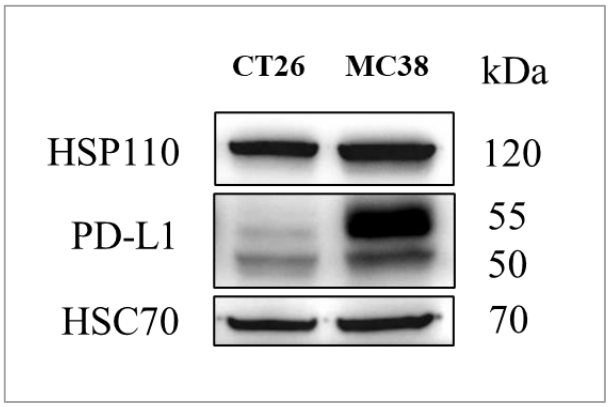


Figure 25. Identification des cibles thérapeutiques PD-L1 et HSP110 dans les modèles de cancers colorectaux CT26 WT et MC38 WT. Les lignées cellulaires de cancer du côlon CT26 WT et MC38 WT ont été cultivées dans du milieu RPMI + 10% SVF et DMEM + 10% SVF respectivement pendant quelques jours. Trois millions de cellules ont ensuite été récupérées pour chaque lignée et une lyse cellulaire a été réalisée. Les taux de protéine PD-L1 et HSP110 ont ensuite été évalués par western-blotting. La protéine HSC70 a été utilisée comme protéine de ménage. Les expériences ont été réalisées trois fois de manière indépendante. *Expériences réalisées par Aude CHAVANTON.*

D'après les résultats de la **Figure 25**, nous pouvons observer la présence des protéines HSP110 et PD-L1 dans les deux lignées étudiées de cancer colorectal, avec une présence

plus importante de la protéine PD-L1 dans la lignée MC38 WT, connue pour mieux répondre à l'immunothérapie que la lignée CT26 WT. Nous pouvons en déduire que les cibles thérapeutiques sont présentes dans le cancer colorectal et ne semblent pas restreintes à une lignée de cancer colorectal particulière. Cela indique que l'effet d'une double inhibition de PD-L1 et HSP110 peut être étudié dans ces modèles.

1.2. Effet de i007 sur le taux de protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses et dans les macrophages de type M1 et M2 *in vitro*

Afin de déterminer si i007 a une influence sur l'expression de PD-L1 et de ce fait pourrait apporter des informations sur l'intérêt de combiner des anti-PD-L1 avec i007, une analyse des taux de protéine PD-L1 dans les lignées de cancer du côlon CT26 WT et MC38 WT soumises à i007 a été réalisée. Pour cela, les cellules CT26 WT et MC38 WT ont été mises en culture puis traitées avec i007 ou du DMSO servant de contrôle (diluant de i007), à la concentration de 40µM pour la lignée CT26 WT et 50µM pour la lignée MC38 WT (**Figure 26A**). Ces concentrations ont été utilisées car elles correspondent à peu près à l'IC50 de i007 sur ces deux lignées respectivement (**Figure 36**). Après 24, 48 et 72h de traitement, les cellules ont été récupérées, lysées et le taux de protéine PD-L1 dans ces lignées a été évalué par western-blotting (**Figure 26B-C**).

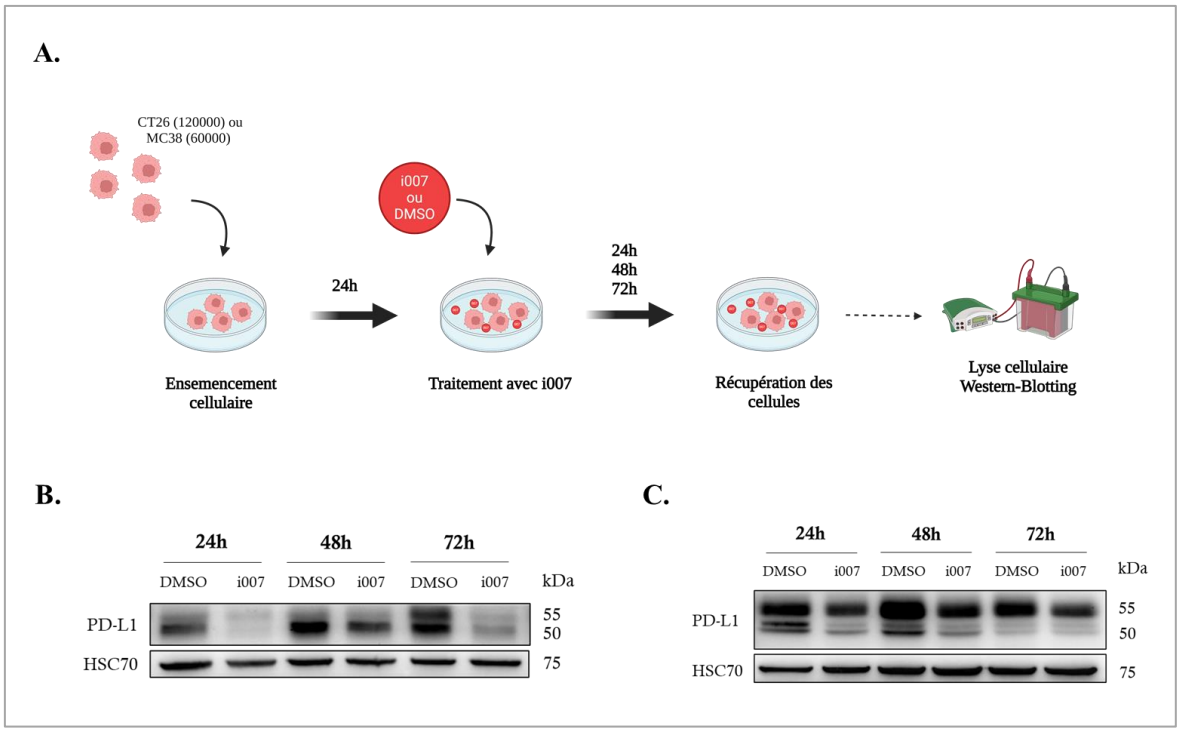


Figure 26. Effet de i007 sur l'expression de PD-L1 dans les lignées CT26 WT et MC38 WT *in vitro*. (A) 120000 cellules CT26 WT ou 60000 cellules MC38 WT ont été ensemencées en plaque 6 puits. Après 24h d'ensemencement, les cellules ont été traitées avec i007 ou du DMSO à la concentration de 40µM (CT26) ou 50µM (MC38) correspondant à l'IC50 de i007. Après 24,48 et 72h de traitement, les cellules ont été récupérées, lysées et le taux de protéine PD-L1 dans les cellules **(B)** CT26 et **(C)** MC38 a été évalué par western blotting. HSC70 a été utilisé comme protéine de ménage. Chaque expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante. *Expériences réalisées par Aude CHAVANTON.*

D'après la **Figure 26B-C**, nous pouvons observer que le taux de protéine PD-L1 semble modulé par i007 à 24h, 48h et 72h en diminuant le taux de protéine PD-L1 dans les lignées CT26 WT et MC38 WT. Il est à noter que pour un réplicat sur la lignée MC38, les taux de protéine PD-L1 dans les cellules à 72h après traitement par i007 ont légèrement augmenté et que globalement la diminution du taux de protéine PD-L1 est beaucoup moins claire dans cette lignée sur les deux autres réplicats que pour la lignée CT26 WT. Ainsi, ces résultats laissent penser qu'ajouter des anti-PD-L1 à l'inhibiteur chimique i007 pourrait ne pas être bénéfique pour limiter le développement tumoral puisque i007 seul limite déjà le taux de protéine PD-L1.

Néanmoins, bien que le taux de protéine PD-L1 soit diminué dans les cellules cancéreuses sous l'influence de i007, nous avons analysé si cela était le cas également dans d'autres types cellulaires et notamment sur les macrophages. HSP110 étant connu pour agir

sur la polarisation des macrophages dans le cadre du cancer colorectal [389], nous avons étudié l'effet de i007 sur la polarisation de ces derniers. Ainsi, les monocytes des PBMCs humains ont été isolés puis prédifférenciés en macrophages de type M1 et M2 avec du GM-CSF et du M-CSF respectivement (0,1µg/mL). Après 5 à 7 jours de prédifférenciation, les macrophages ont été activés en macrophages de type M1 avec de l'IFNγ (20ng/mL) et du LPS (100 ng/mL) et en macrophages M2 avec de l'IL-4 (20ng/mL) pendant 48h en présence ou non de i007 (40µM) (**Figure 27A**). Les marqueurs CD80, HLA-DR (plutôt associés au phénotype M1), CD206, Dectine-1 (plutôt associés au phénotype M2) et PD-L1 ont ensuite été analysés par cytométrie en flux. Les résultats sont présentés dans la **Figure 27**.

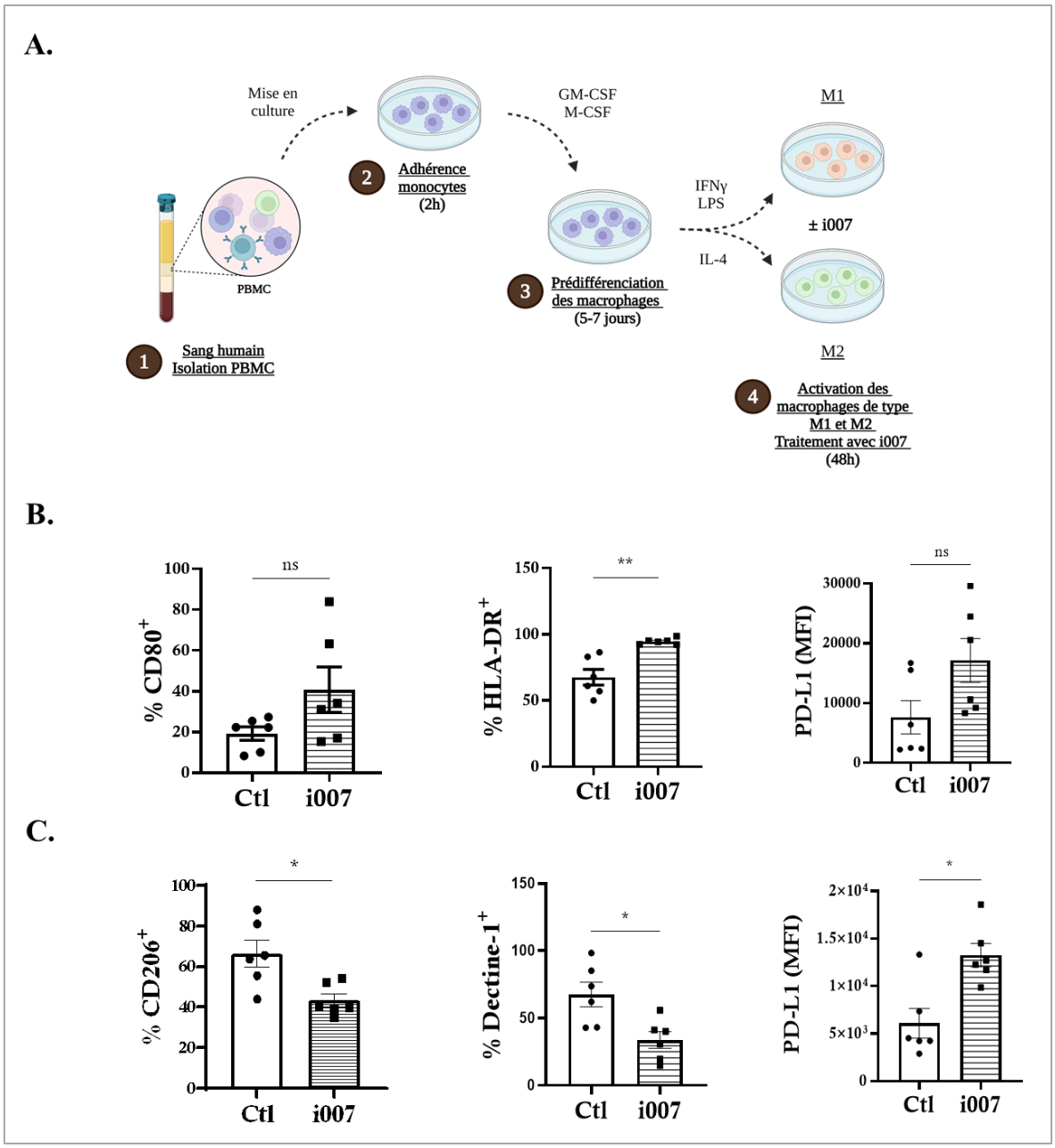


Figure 27. Effet de i007 sur la différenciation des macrophages de type M1 et M2. (A) A partir de PBMCs humain, les monocytes ont été isolés puis ensemencés en plaques et laissés 2h adhérer au fond des puits. Ils ont ensuite été prédifférenciés en macrophages de type M1 et M2 avec du GM-CSF et M-CSF (0,1µg/mL) respectivement. Après 5 à 7 jours de prédifférenciation, les macrophages ont été activés en macrophages de type M1 avec du LPS (100ng/mL) et IFNγ (20ng/mL) et en macrophages de type M2 avec de l'IL-4 (20ng/mL) pendant 48h en présence ou non de i007 (40µM). **(B-C)** Les marqueurs CD80, HLA-DR, CD206, Dectine-1 et PD-L1 ont été analysés par cytométrie en flux (n=6). Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité a été réalisé (Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov) suivi d'un test T ou Mann Whitney. **p=0,0011 (HLA-DR), *p=0,0106 (CD206), *p=0,0121 (Dectine-1), *p=0,0260 (PD-L1). ns = non-significatif. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. Ctl = Cellules non traitées ; i007 = Cellules traitées avec 007 ; % = % de cellules ; MFI = moyenne de fluorescence. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE.*

D’après la **Figure 27B**, i007 semble augmenter le pourcentage de macrophages $CD80^+$ et $HLA\text{-}DR^+$, ce qui laisse penser que i007 favorise le profil des macrophages de type M1, antitumoraux. Par ailleurs, le pourcentage de cellules exprimant CD206 et Dectine-1 est diminué en présence de i007 indiquant que ce dernier semble défavoriser le profil des macrophages de type M2, pro-tumoraux (**Figure 27C**). Pour finir, le taux de protéine PD-L1 dans les macrophages de type M2 semble statistiquement augmenter en présence de i007 (**Figure 27B**). Malgré une absence de significativité, une tendance à l’augmentation du taux de protéine PD-L1 dans les macrophages de type M1 est également observée (**Figure 27C**). Bien qu’i007 semble diminuer les taux de protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses (**Figure 26**), il semble augmenter les taux de cette protéine dans les macrophages, indiquant ici un intérêt de combiner i007 avec des anti-PD-L1.

L’objectif du projet étant d’optimiser l’efficacité de l’immunothérapie anti-PD-L1, nous nous focaliserons par la suite sur le modèle résistant à l’immunothérapie : la lignée CT26.

Nous avons évalué si les effets observés *in vitro* sur les taux de protéine PD-L1 à la surface des macrophages lors de l’inhibition de HSP110 étaient également observés *in vivo*. Pour cela, nous avons injecté des cellules CT26 WT ou sh110 à des souris BALB/c. 12 jours après injection des cellules cancéreuses, les tumeurs ont été récupérées, digérées et les taux de protéine PD-L1 à la surface des macrophages de type M1 (définis selon la présence du marqueur CMH II), M2 (définis selon la présence du marqueur CD206) ou dans les tumeurs ont été analysés par cytométrie en flux et par technologie nanostring respectivement (**Figure 28B-E**). Afin de s’assurer que la lignée CT26 sh110 est quasiment dépourvue de protéines HSP110, nous avons ensemencé des cellules CT26 WT, shCtl ou sh110. Nous avons ensuite lysé ces cellules puis analysé les taux de protéine HSP110 par western-blotting (**Figure 28A**).

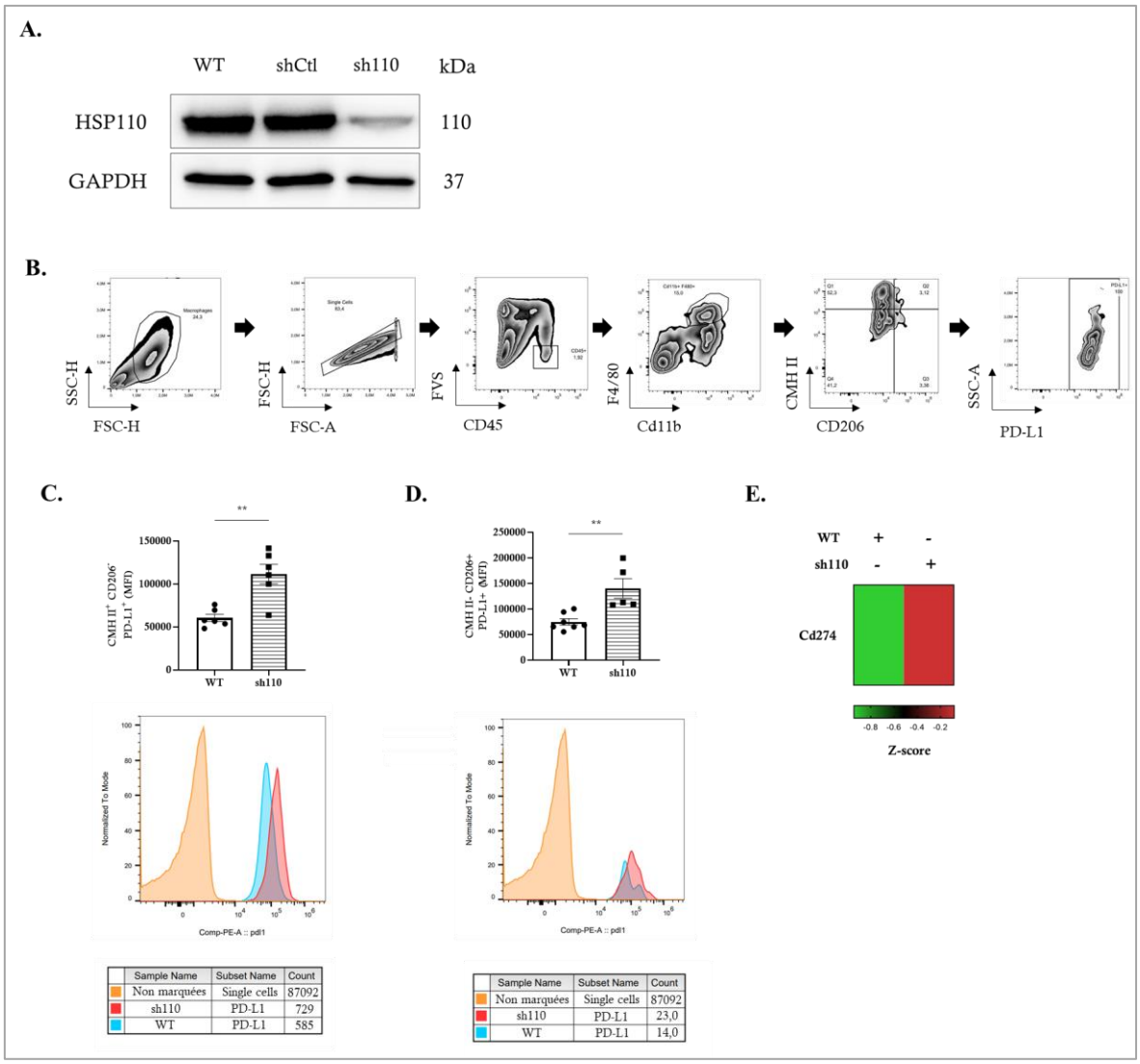


Figure 28. Effet de l'inhibition de HSP110 dans les cellules cancéreuses sur les taux protéiques de PD-L1 dans les macrophages et les tumeurs. (A) Caractérisation de la lignée CT26 sh110 quasiment dépourvue de HSP110. Les cellules CT26 WT, shCtl ou sh110 ont été cultivées dans du milieu RPMI + 10% SVF pendant quelques jours puis ont été lysées et l'expression protéique de HSP110 dans ces cellules a été analysée par western-blotting. La protéine GAPDH a été utilisée comme protéine de ménage. **(B-E)** 500 000 cellules CT26 WT ou sh110 ont été injectées à des souris BALB/c en sous-cutanée, puis les souris ont été randomisées au jour 5 après injection des cellules puis les tumeurs ont été récupérées et digérées au jour 12. **(B-D)** Les tumeurs ont été marquées avec les anticorps de cytométrie en flux anti-CD45, anti-F4/80, anti-Cd11b, anti-CMH II, anti-CD206 et anti-PD-L1 puis après **(B)** une analyse cytométrique des populations de macrophages de type M1 et M2, la médiane d'intensité de fluorescence (MFI) du marqueur PD-L1 a été analysée dans les populations **(C)** $CD45^+$ $F4/80^+$ $Cd11b^+$ CMH II^+ $CD206^-$ et **(D)** $CD45^+$ $F4/80^+$ $Cd11b^+$ CMH II^- $CD206^+$ (n=5 à 6). **(E)** Une analyse du taux d'ARN Cd274 (PD-L1) dans les tumeurs à l'aide du z-score a été réalisée par la technologie nanostring (n=3). Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité a été réalisé (Shapiro-Wilk) suivi d'un test T. **p=0,0018 (C), 0,0038 (D) ; ns = non-significatif. WT = cellules CT26 de type sauvage ; sh110 = cellules CT26 avec des niveaux très diminués de HSP110. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE, Aude CHAVANTON et Flavie MIALHE.*

D'après la **Figure 28A**, nous pouvons confirmer que le taux de protéine HSP110 est nettement diminué dans les cellules sh110 par rapport aux cellules WT et shCtl, confirmant ainsi la faible quantité de HSP110 dans la lignée CT26 sh110 par rapport aux cellules WT. L'absence de diminution du taux de protéine HSP110 dans la lignée shCtl par rapport à la lignée WT confirme que l'infection des cellules CT26 avec un virus contrôle n'a pas impacté les taux de protéine HSP110, indiquant que le virus utilisé pour induire la déplétion de HSP110 est bien spécifique de HSP110.

D'après la **Figure 28C-D**, nous pouvons observer une augmentation significative des taux de protéine PD-L1 à la surface des macrophages de type M1 et M2 dans les tumeurs de souris sh110 par rapport aux tumeurs de souris WT. De plus, une analyse du taux d'ARN Cd274 (PD-L1) dans les tumeurs indique que PD-L1 est davantage présent dans les tumeurs de souris sh110 par rapport aux souris WT (**Figure 28E**).

Pour conclure, cette première partie de résultats indique que l'inhibition de HSP110 semble favoriser la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M1 antitumoral et limiter la polarisation des macrophages vers un phénotype de type M2, mais également semble augmenter les taux de protéine PD-L1 sur ces cellules. Malgré une diminution des taux de protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses soumises à i007 *in vitro, in vivo* le taux d'ARN PD-L1 dans les tumeurs semble être augmenté lorsque les tumeurs sont quasiment dépourvues de HSP110. Cela laisse penser que le taux protéique de PD-L1 sur les cellules cancéreuses est probablement augmenté également *in vivo*. Toutes ces données suggèrent ici un double intérêt de combiner i007 avec l'immunothérapie anti-PD-L1, d'une part en favorisant le profil des macrophages de type M1 antitumoraux et en limitant le profil des macrophages de type M2 protumoraux, mais également en limitant l'action de PD-L1 sur l'inhibition des effecteurs de l'immunité antitumorale porteurs de PD-1 tels que les lymphocytes T $CD8^+$.

1.3. Effet de la double combinaison thérapeutique anti-PD-L1/i007 sur la croissance tumorale dans le modèle de cancer colorectal CT26 *in vivo*

Afin d'évaluer l'effet de la double combinaison anti-PD-L1/i007, nous avons réalisé une expérience de croissance tumorale avec des souris BALB/c porteuses de tumeurs CT26 WT

que nous avons traitées ou non avec i007 (0,1mg/souris) et/ou anti-PD-L1 (200µg/souris) trois fois par semaine (**Figure 29A**). La taille des tumeurs a été mesurée trois fois par semaine et le volume tumoral a été déterminé selon la formule ½ x longueur x (largeur)^2. Une solution contrôle (véhicule) contenant du DMSO et de l'huile, les diluants de i007, a été injectée aux souris ne recevant pas de i007. Parallèlement à cela, une expérience de croissance tumorale avec des souris BALB/c porteuses de tumeurs CT26 WT ou sh110 et traitées ou non avec des anti-PD-L1 a été réalisée (**Figure 29B**). Ces deux expériences parallèles et complémentaires permettent d'identifier si le ciblage de HSP110, en tant que thérapie antitumorale, combiné à une immunothérapie anti-PD-L1 est bénéfique par rapport à l'inhibition de HSP110 ou PD-L1 seul.

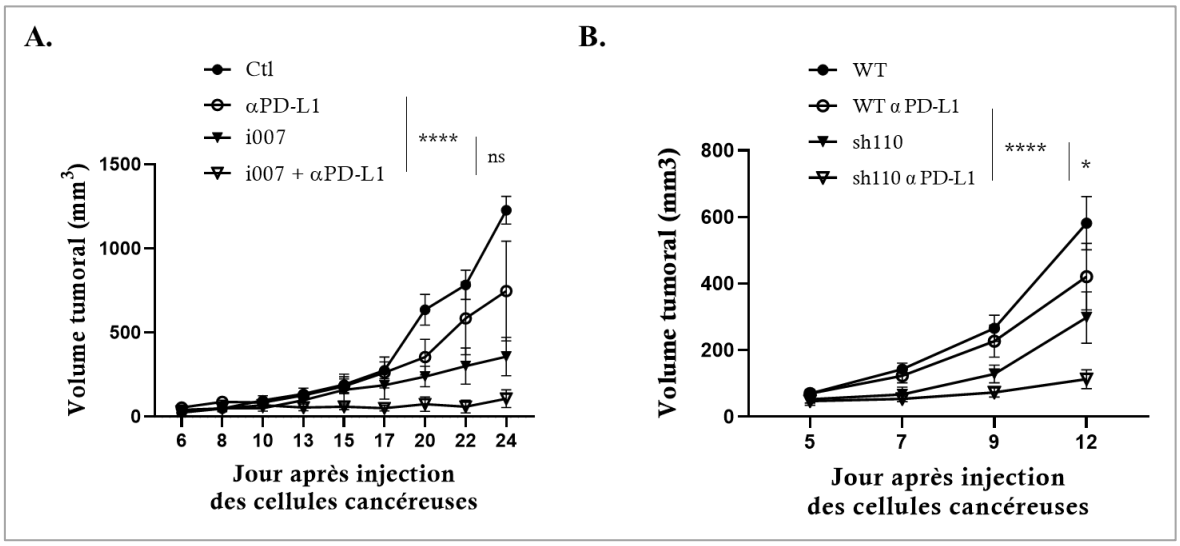


Figure 29. Effet de la double combinaison anti-PD-L1 / inhibition de HSP110 sur la croissance tumorale dans le modèle CT26. (A) Anti-PD-L1 + i007. 500 000 cellules CT26 WT ont été injectées à des souris BALB/c en sous-cutanée, puis les souris ont été randomisées au jour 6 et traitées (i.p) trois fois par semaine avec i007 (0,1mg/souris dilué dans 10% DMSO, qsp huile) ou le véhicule (10% DMSO, qsp huile) et/ou avec des anti-PD-L1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X). La croissance tumorale a été analysée (n = 4 à 7). Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Ctl = souris recevant uniquement le véhicule. **(B) Anti-PD-L1 + inhibition de HSP110 uniquement sur les cellules tumorales (sh110).** 500 000 cellules CT26 WT ou sh110 ont été injectées à des souris BALB/c en sous-cutanée, puis les souris ont été randomisées au jour 5 et traitées (i.p) trois fois par semaine avec des anti-PD-L1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X) ou des IgG1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X). La croissance tumorale a été analysée (n = 6 à 8). Les volumes tumoraux ont été calculés selon la formule ½ x longueur x (largeur)^2. Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité a été réalisé (Kolmogorov-Smirnov ou Shapiro-Wilk) suivi d'un test two-way ANOVA avec ****p< 0,0001, *p=0,0297. ns = non-significatif ; αPD-L1 = anti-PD-L1 ; sh110 = souris porteuses de cellules cancéreuses dont les taux de protéine HSP110 sont très faibles. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE.*

D'après la **Figure 29A**, la double combinaison anti-PD-L1/i007 réduit de manière significative la croissance tumorale par rapport à la monothérapie anti-PD-L1 ainsi que par rapport au contrôle de souris non traitées. Malgré une absence de significativité, nous pouvons observer un volume moyen de taille des tumeurs plus petit dans le groupe de souris double traitées par rapport aux souris traitées uniquement avec i007, suggérant un effet antitumoral plus important en présence de la double thérapie anti-PD-L1/i007. D'après la **Figure 29B**, nous pouvons observer que la croissance tumorale est davantage réduite dans le groupe de souris porteuses de cellules cancéreuses CT26 sh110 traitées avec des anti-PD-L1 que dans le groupe de souris WT traitées avec des anti-PD-L1 et dans le groupe de souris porteuses de cellules cancéreuses CT26 sh110 mais non traitées avec des anti-PD-L1. Cela indique que l'inhibition de HSP110 dans les cellules cancéreuses semble potentialiser les effets des anti-PD-L1 sur la croissance tumorale.

Les résultats de ces expériences nous ont amené à analyser l'effet de la double inhibition de HSP110 et PD-L1 au niveau de l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs afin de déterminer plus précisément comment la double inhibition peut agir sur la diminution de la croissance tumorale. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux cellules $CD8^+$, $CD4^+$, à leurs marqueurs d'épuisement PD-1, LAG-3 et Tim-3 ainsi qu'à leurs capacités cytotoxiques par l'analyse des marqueurs GzB et IFNγ. Par ailleurs, nous nous sommes également intéressés aux macrophages de type M1 et M2. Pour cela, des cellules CT26 WT ont été injectées à des souris BALB/c puis après randomisation, les souris ont été traitées avec des anti-PD-L1 (200µg/souris) et/ou i007 (0,1mg/souris) trois fois par semaine. Une solution contrôle contenant du DMSO et de l'huile a été injectée aux souris ne recevant pas de i007. 12 jours après injection des cellules cancéreuses, les tumeurs des souris ont été récupérées, digérées et l'analyse des populations $CD8^+$ $PD1^+$ $LAG\text{-}3^+$, $CD8^+$ $PD1^+$ $Tim\text{-}3^+$ (**Figure 30A-B**) et $CD8^+$ $PD1^+$ $Tim\text{-}3^+$ GzB^+, $CD8^+$ $PD1^+$ $Tim\text{-}3^+$ $IFN\gamma^+$ (**Figure 30C-D**) a été réalisée par cytométrie en flux. Une analyse de la moyenne d'intensité de fluorescence du marqueur CD206 associé aux macrophages de type M2 dans la population $CD45^+$ $F4/80^+$ $Cd11b^+$ $CD206^+$ $CD80^-$ a également été analysée (**Figure 30E**).

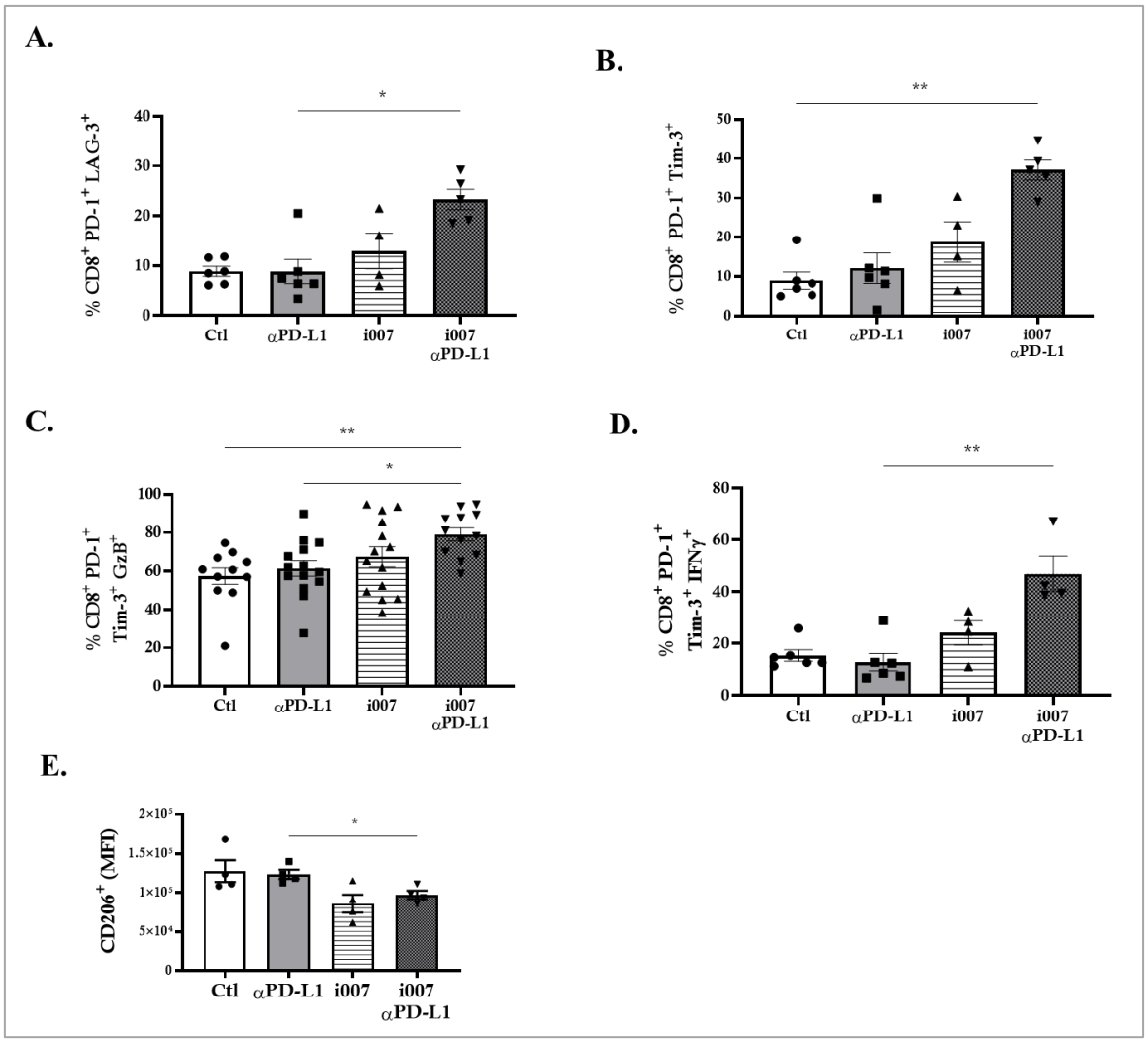


Figure 30. Effet de la double thérapie anti-PD-L1/i007 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs. 500 000 cellules CT26 WT ont été injectées à des souris BALB/c en sous-cutanée, puis les souris ont été randomisées au jour 6 et traitées (i.p) trois fois par semaine avec i007 (0,1mg/souris dilué dans 10% DMSO, qsp huile) ou le véhicule (10% DMSO, qsp huile) et/ou avec des anti-PD-L1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X). Au jour 12 après injection des cellules cancéreuses, les tumeurs des souris ont été récupérées, digérées et marquées avec des anticorps de cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules **(A)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $LAG\text{-}3^+$, **(B)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ (n=4 à 6/groupe), **(C)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+GzB^+$ (n=11 à 14), **(D)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ $IFN\gamma^+$ (n=4 à 6/groupe) et **(E)** la moyenne d'intensité de fluorescence du marqueur CD206 dans la population $CD45^+$ $F4/80^+$ $Cd11b^+$ $CD206^+$ $CD80^-$ (n=12) ont été analysés. Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité a été réalisé (Shapiro-Wilk) suivi d'un test Kruskal-Wallis avec *p=0,0302 (A), **p=0,0066 (B), 0,0064 (D) ou one-way Anova avec *p=0,0280 (C), 0,0297 (E), **p=0,0086 (C). Ctl = tumeurs de souris ayant reçues le véhicule ; αPD-L1 = anti-PD-L1. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE.*

D'après la **Figure 30**, la double thérapie anti-PD-L1/i007 semble augmenter le pourcentage de cellules épuisées $PD1^+$ $LAG\text{-}3^+$ et $PD1^+$ $Tim\text{-}3^+$ par rapport à la thérapie anti-PD-L1 et au contrôle non traité respectivement. Cette combinaison thérapeutique augmente la capacité des cellules $CD8^+$ $PD1^+$ $Tim\text{-}3^+$ à production du GzB et de l'IFNγ, des cytokines impliquées dans la cytotoxicité des cellules cancéreuses, par rapport à la monothérapie anti-PD-L1. De plus, la double thérapie diminue le niveau de protéines CD206 à la surface des macrophages comme le montre la **Figure 30E**, suggérant une possible diminution de l'infiltration de macrophages bien différenciés en phénotype de type M2. En ce qui concerne les macrophages de type M1, les résultats n'étant pas significatifs, ils ne sont pas représentés sur cette figure.

L'effet de la double inhibition de HSP110 et PD-L1 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs a également été déterminé à l'aide de souris porteuses de tumeurs CT26 WT ou sh110 et traitées ou non avec des anti-PD-L1. Pour cela, des cellules cancéreuses CT26 WT ou sh110 ont été injectées à des souris BALB/c, puis après randomisation, les souris ont été traitées avec ou non des anti-PD-L1 (200µg/souris) trois fois par semaine. 12 jours après injection des cellules cancéreuses, les tumeurs des souris ont été récupérées, digérées et les populations $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$, $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $LAG\text{-}3^+$ ainsi que leurs capacités à sécréter du GzB et de l'IFNγ ont été analysées par cytométrie en flux (**Figure 31A-E**). Le pourcentage de cellules $CD4^+$ ou $CD4^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ capables de sécréter du GzB a également été analysé (**Figure 31F-G**). Enfin, l'analyse du pourcentage de macrophages de type M1, M2 ainsi que de macrophages doubles négatifs pour les marqueurs CMH II et CD206 est présenté dans la **Figure 31H**.

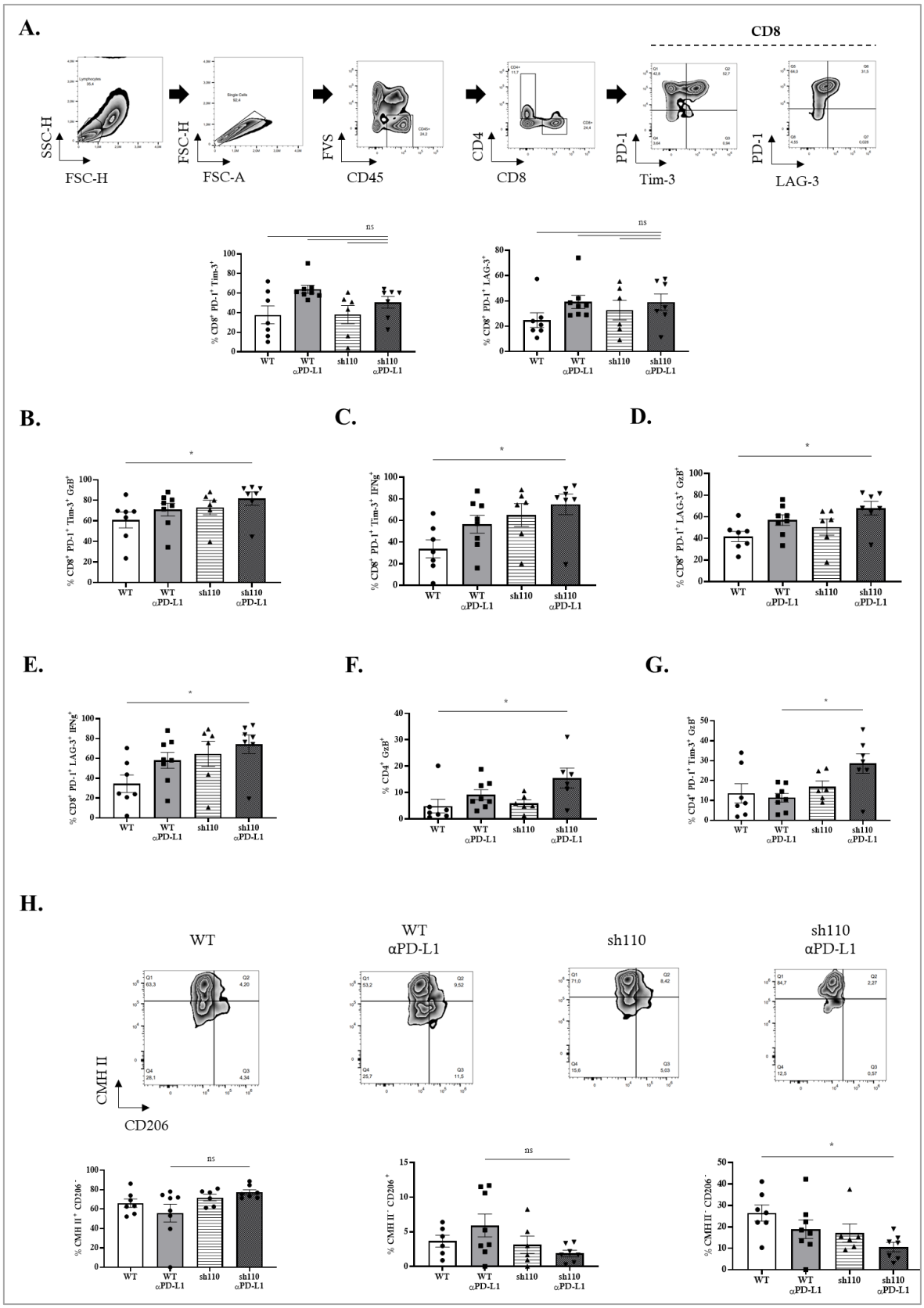

A.
CD8
SSC-H
FSC-H
FSC-H
FSC-A
FVS
CD45
CD4
CD8
PD-1
Tim-3
PD-1
LAG-3
ns
% CD8+ PD-1+ Tim-3+
ns
% CD8+ PD-1+ LAG-3+
WT
WT αPD-L1
sh110
sh110 αPD-L1
B.
C.
D.
% CD8+ PD-1+ Tim-3+ GzB+
% CD8+ PD-1+ Tim-3+ IFNg+
% CD8+ PD-1+ LAG-3+ GzB+
E.
F.
G.
% CD8+ PD-1+ LAG-3+ IFNg+
% CD4+ GzB+
% CD4+ PD-1+ Tim-3+ GzB+
H.
WT
WT αPD-L1
sh110
sh110 αPD-L1
CMH II
CD206
% CMH II+ CD206-
ns
% CMH II- CD206+
ns
% CMH II- CD206-
*

Figure 31. Effet de l'inhibition de HSP110 uniquement sur les cellules tumorales associée à des anti-PD-L1 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs. 500 000 cellules CT26 WT ou sh110 ont été injectées à des souris BALB/c en sous-cutanée, puis les souris ont été randomisées au jour 5 et traitées (i.p) trois fois par semaine avec ou non des anti-PD-L1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X). Au jour 12 après injection des cellules cancéreuses, les tumeurs des souris ont été récupérées, digérées et marquées avec des anticorps de cytométrie en flux. Le pourcentage de cellules **(A)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$, $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $LAG\text{-}3^+$, **(B)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ GzB^+, **(C)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ $IFN\gamma^+$, **(D)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $LAG\text{-}3^+$ GzB^+, **(E)** $CD45^+$ $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $LAG\text{-}3^+$ $IFN\gamma^+$, **(F)** $CD45^+$ $CD4^+$ GzB^+, **(G)** $CD45^+$ $CD4^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ GzB^+, **(H)** $CD45^+F4/80^+$ $Cd11b^+$ CMH II^+ $CD206^-$, $CD45^+F4/80^+$ $Cd11b^+$ CMH II^- $CD206^+$ et $CD45^+F4/80^+$ $Cd11b^+$ CMH II^- $CD206^-$ a été analysé (n=6 à 8/groupe). Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité (Shapiro-Wilk ou Kolmogorov-Smirnov) suivi d'un test Kruskal-Wallis avec *p=0,0345 (B), 0,0151 (C), 0,0345 (E), 0,0319 (F), 0,0345 (H) ou one-way Anova avec *p=0,0182 (D), 0,0164 (G). ns = non-significatif ; αPD-L1 = anti-PD-L1. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE et Aude CHAVANTON.*

D'après la **Figure 31A**, nous n'observons pas de changements significatifs dans les pourcentages de cellules $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ et $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $LAG\text{-}3^+$ infiltrants les tumeurs en présence de la double inhibition par rapport aux simples inhibitions de HSP110 et PD-L1. En revanche, une augmentation de l'infiltration de cellules $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ GzB^+ et $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ $IFN\gamma^+$ est observée dans les tumeurs de souris en présence de la double inhibition par rapport au groupe WT (**Figure 31B-C**). Une augmentation significative du pourcentage de cellules $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $LAG\text{-}3^+$ et $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $LAG\text{-}3^+$ capables de sécréter du GzB et de l'IFNγ est également observée (**Figure 31D-E**). Par ailleurs, nous pouvons observer une augmentation significative de l'infiltration de cellules $CD4^+$ et $CD4^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ capables de sécréter du GzB dans les tumeurs de souris sh110 traitées avec des anti-PD-L1 par rapport aux groupes WT et WT + anti-PD-L1 respectivement (**Figure 31F-G**). Cela suggère une plus grande capacité des cellules $CD8^+$ et $CD4^+$ exprimant les marqueurs d'épuisement PD-1 et Tim-3 ou LAG-3 à produire des molécules toxiques pour les cellules cancéreuses en présence de la double inhibition de HSP110 et PD-L1. Cela confirme les observations faites avec la double thérapie anti-PD-L1/i007.

En ce qui concerne les macrophages, malgré une absence de significativité, nous observons une tendance à l'augmentation du pourcentage de macrophages de type M1 par rapport aux souris WT traitées avec des anti-PD-L1 (**Figure 31H**). De plus, nous observons une tendance à la diminution du pourcentage de macrophages de type M2 infiltrants les tumeurs de souris porteuses de tumeurs sh110 traitées avec des anti-PD-L1 par rapport aux tumeurs WT traitées avec des anti-PD-L1 (**Figure 31H**). Ce résultat confirme l'effet observé

dans le cadre de la double thérapie anti-PD-L1/i007 où nous retrouvons une plus faible proportion de marqueurs CD206 à la surface des macrophages. Enfin, une diminution significative du pourcentage de macrophages doubles négatifs pour les marqueurs CD206 et CMH II dans les tumeurs sh110 traitées avec des anti-PD-L1 par rapport aux tumeurs de souris WT a été observée (**Figure 31H**). Cela pourrait suggérer une plus forte différenciation macrophagique dans les tumeurs en présence de la double inhibition de HSP110 et PD-L1. Néanmoins, la diminution du pourcentage de macrophages doubles négatifs pour CD206 et CMH II n'est statistiquement pas significative entre les tumeurs de souris sh100 traitées avec des anti-PD-L1 comparé aux tumeurs de souris sh110, ce qui ne permet pas de conclure que l'ajout d'anti-PD-L1 à l'inhibition de HSP110 favorise la différenciation macrophagique.

Afin de comprendre davantage comment la thérapie anti-PD-L1/i007 agit, nous avons récupéré, 12 jours après injection des cellules cancéreuses, les tumeurs des souris traitées avec des anti-PD-L1 seuls et traitées avec des anti-PD-L1 + i007, puis nous avons extrait les ARN des tumeurs. Nous avons ensuite réalisé une expérience par technologie nanostring permettant de quantifier les taux de divers ARNs dans les tumeurs et suggérer ainsi d'éventuels gènes régulés à la hausse et à la baisse dans le groupe de souris double traitées par rapport au groupe de souris traitées uniquement avec des anti-PD-L1. Les résultats sont présentés sur la **Figure 32**.

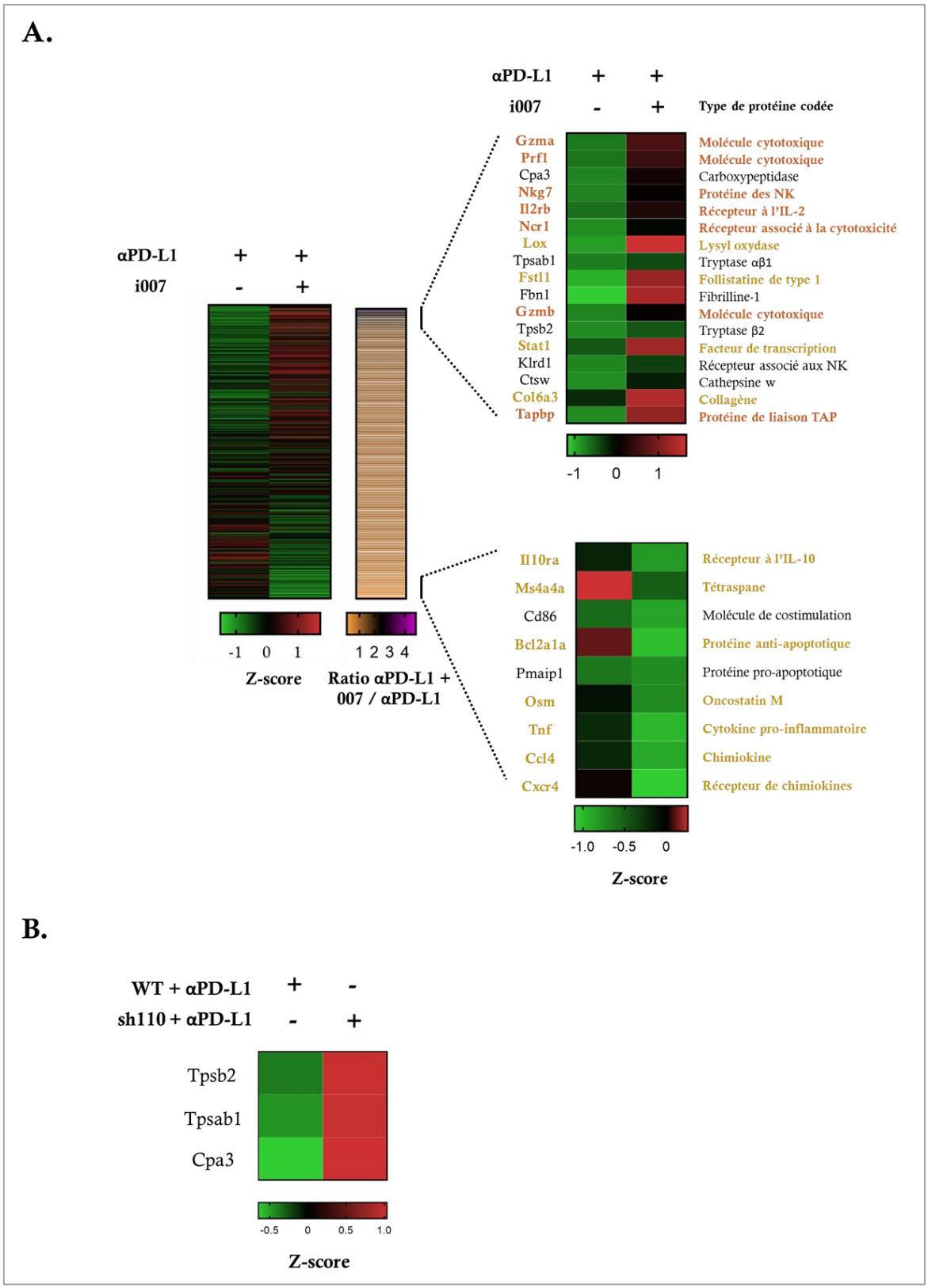

A.
αPD-L1 + +
i007 - +
Type de protéine codée
Gzma Molécule cytotoxique
Prf1 Molécule cytotoxique
Cpa3 Carboxypeptidase
Nkg7 Protéine des NK
Il2rb Récepteur à l'IL-2
Ncr1 Récepteur associé à la cytotoxicité
Lox Lysyl oxydase
Tpsab1 Tryptase αβ1
Fstl1 Follistatine de type 1
Fbn1 Fibrilline-1
Gzmb Molécule cytotoxique
Tpsb2 Tryptase β2
Stat1 Facteur de transcription
Klrd1 Récepteur associé aux NK
Ctsw Cathepsine w
Col6a3 Collagène
Tapbp Protéine de liaison TAP
-1 0 1
αPD-L1 + +
i007 - +
-1 0 1
1 2 3 4
Z-score
Ratio αPD-L1 + 007 / αPD-L1
Il10ra Récepteur à l'IL-10
Ms4a4a Tétraspane
Cd86 Molécule de costimulation
Bcl2a1a Protéine anti-apoptotique
Pmaip1 Protéine pro-apoptotique
Osm Oncostatin M
Tnf Cytokine pro-inflammatoire
Ccl4 Chimiokine
Cxcr4 Récepteur de chimiokines
-1.0 -0.5 0
Z-score
B.
WT + αPD-L1 + -
sh110 + αPD-L1 - +
Tpsb2
Tpsab1
Cpa3
-0.5 0 0.5 1.0
Z-score

Figure 32. Effet de la double thérapie anti-PD-L1/i007 sur l'expression génique au sein des tumeurs par rapport à la monothérapie anti-PD-L1. (A) 500 000 cellules CT26 WT ont été injectées à des souris BALB/c en sous-cutanée, puis les souris ont été randomisées au jour 5 et traitées (i.p) trois fois par semaine avec des anti-PD-L1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X) ± i007 (0,1mg/souris dilué dans 10% DMSO, qsp huile) ou véhicule (10% DMSO, qsp huile). Au jour 12 après injection des cellules cancéreuses, les tumeurs des souris ont été récupérées, digérées et les ARN ont été isolés. Une analyse nanostring pour quantifier l'expression génique d'une multitude de gènes dans les tumeurs a été réalisée. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel nSOLVER, le z-score pour chaque échantillon a été calculé ainsi que le ratio des moyennes des valeurs du groupe de souris traitées avec des anti-PD-L1 + i007 et du groupe de souris traitées avec des anti-PD-L1 seul (n=3). Ce ratio a permis de discerner les taux d'ARN dans le groupe anti-PD-L1 + i007 par rapport au groupe anti-PD-L1 seul. Les ARNs dont les taux sont les plus élevés dans le groupe de souris double traitées sont : Gzma, Prf1, Cpa3, Nkg7, Il2rb, Ncr1, Lox, Tpsab1, Fstl1, Fbn1, Gzmb, Tpsb2, Stat1, Klrd1, Ctsw, Col6a3, Tapbp. Les ARNs dont les taux sont les plus bas dans le groupe double traité sont : Il10ra, Ms4a4a, Cd86, Bcl2a1a, Pmaip1, Osm, Tnf, Ccl4, Cxcr4. Les protéines codées par les gènes étudiés qui sont davantage associés à des effets antitumoraux dans le CCR sont surlignées en orange et celles davantage associées à des effets protumoraux en jaune. **(B)** 500 000 cellules CT26 WT ou sh110 ont été injectées à des souris BALB/c en sous-cutanée, puis les souris ont été randomisées au jour 5 et traitées (i.p) trois fois par semaine avec des anti-PD-L1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X) ou des IgG1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X). Au jour 12 après injection des cellules cancéreuses, les tumeurs des souris ont été récupérées, digérées et les ARN ont été isolés. L'analyse des taux d'ARN Tpsb2, Tpsab1 et Cpa3 a été réalisée par technologie nanostring. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel nSOLVER, le z-score pour chaque échantillon du groupe WT + anti-PD-L1 et sh110 + anti-PD-L1 a été calculé (n=2 à 3). αPD-L1 = anti-PD-L1. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. *Expériences réalisées par Aude CHAVANTON.*

D'après la **Figure 32A**, nous pouvons observer un certain nombre d'ARNs présents en forte quantité dans les tumeurs de souris traitées avec des anti-PD-L1 et i007 par rapport aux souris traitées uniquement avec anti-PD-L1 : Gzma, perforine 1 (Prf1), carboxypeptidase A3 (Cpa3), protéine 7 des granules des NKs (Nkg7), sous-unité β du récepteur de l'IL-2 (Il2rb), récepteur 1 de déclenchement de la cytotoxicité naturelle (Ncr1), lysyl oxydase (Lox), tryptase αβ1 (Tpsab1), follistatine 1 (Fstl1), fibrilline 1 (Fbn1), Gzmb, tryptase β2 (Tpsb2), STAT1 (Stat1), récepteur D1 de type lectine des cellules tueuses (Klrd1), Cathepsine W (Ctsw), Collagène type VI α3 (Col6a3) et protéine de liaison à la TAP (Tapbp). Parmi ces ARNs, nous retrouvons plusieurs facteurs caractéristiques des réponses immunitaires antitumorales (surlignés en orange) tels que le Gzmb, Gzma et prf1 codant le GzB, GzA et la perforine respectivement, qui sont majoritairement impliqués dans la destruction tumorale grâce à leur action cytotoxique. Nkg7 est également un marqueur associé à la cytotoxicité des lymphocytes T $CD8^+$ et cellules NK [423,424]. Un autre facteur davantage associé à l'immunité antitumorale est présent : Ncr1. Ncr1 code la protéine NKp46 (CD335) qui est un récepteur activateur des cellules NK et est impliqué dans la

cytotoxicité naturelle [425]. Ainsi, tous ces facteurs permettent de mettre en évidence l'implication des lymphocytes T $CD8^+$ et des cellules NK dans la réponse immunitaire induite par la double thérapie anti-PD-L1/i007 par rapport à la monothérapie anti-PD-L1. Des ARNs associés à des marqueurs caractéristiques des mastocytes sont également présents en plus forte quantité dans les tumeurs de souris double traitées par rapport aux souris traitées uniquement avec des anti-PD-L1 comme Tpsab1, Tpsb2 et Cpa3 [426]. Cela a également été observé dans les tumeurs de souris sh110 traitées avec des anti-PD-L1 par rapport aux souris WT traitées avec des anti-PD-L1 (**Figure 32B**).

Pour conclure, la double inhibition de HSP110 et PD-L1 semble diminuer la croissance tumorale qui est positivement associée à l'infiltration de cellules $CD8^+$ exprimant des marqueurs d'épuisement PD-1 et Tim-3 ou LAG-3 et qui sont capables de produire davantage de cytokines associées à la toxicité comme le GzB et l'IFNγ. La présence de cellules NK et de mastocytes semble également être positivement corrélée à la réduction de la croissance tumorale.

D'après la **Figure 32A**, nous pouvons également observer la présence d'un certain nombre d'ARNs présents en faible quantité dans les tumeurs de souris double traitées avec des anti-PD-L1 et i007 par rapport aux souris uniquement traitées avec des anti-PD-L1 : sous-unité α du récepteur de l'IL-10 (Il10ra), 4 domaines membranaires A4A (Ms4a4a), CD86 (Cd86), protéine A1 liée à BCL2 (Bcl2a1a), protéine 1 induite par le phorbol-12-myristate-13-acétate (Pmaip1), oncostatine M (Osm), TNF (Tnf), CCL4 (Ccl4) et CXCR4 (Cxcr4). Mise à part les ARNs Cd86 et Pmaip1 qui n'ont pas été décrits comme ayant des propriétés pro-tumorales, tous les autres types d'ARNs cités ci-dessus sont associés à des effets pro-tumoraux dans le cancer colorectal, ce qui suggère que la double thérapie anti-PD-L1/i007 limite la progression tumorale. Par ailleurs, nous avons observé dans des expériences précédentes, que la thérapie i007 semblait agir sur les macrophages, notamment en favorisant le profil des macrophages de type M1 antitumoraux et en limitant le profil des macrophages M2 pro-tumoraux. D'après la **figure 29A**, nous pouvons observer que les taux d'ARNs Ms4a4a et Ccl4 sont plus bas dans les tumeurs des souris double traitées par rapport aux tumeurs des souris traitées uniquement avec des anti-PD-L1. Or, le gène Ms4a4a code la protéine MS4A4A qui est exprimée par les TAMs et est associée à un mauvais pronostic.

Elle favorise la polarisation des macrophages de type M2 [427]. De plus, le gène Ccl4 code la protéine CCL4, qui est une chimiokine impliquée dans l'attraction de divers leucocytes. Dans le cancer colorectal, CCL4 et CD163 (marqueur des macrophages de type M2 pro-tumoraux) sont positivement corrélées dans les tumeurs, ce qui laisse penser que CCL4 favorise le recrutement des macrophages pro-tumoraux [428]. Ainsi, ces résultats apportent des informations supplémentaires sur le rôle de la double thérapie dans la régulation négative de la polarisation et du recrutement des macrophages de type M2 pro-tumoraux en agissant négativement sur l'expression des gènes Ms4a4a et Ccl4.

1.4. Effet de la triple combinaison thérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3/i007 sur la croissance tumorale dans le modèle de cancer colorectal CT26 *in vivo*

D'après les résultats obtenus ci-dessus démontrant une forte infiltration de cellules $CD8^+$ possédant des marqueurs d'épuisement tels que Tim-3 et LAG-3, nous avons souhaité identifier si l'ajout d'un inhibiteur de LAG-3 pourrait améliorer davantage l'efficacité de la double thérapie anti-PD-L1/i007. Ainsi, une expérience de croissance tumorale a été réalisée sur des souris BALB/c porteuses de tumeurs CT26 WT. Pour cela, après injection des cellules cancéreuses CT26 WT aux souris, celles-ci ont été randomisées puis traitées trois fois par semaine avec des anti-PD-L1 (200µg/souris) et/ou i007 (0,1mg/souris) et/ou des anti-LAG-3 (200µg/souris) (**Figure 33A**). Une solution contrôle contenant du DMSO et de l'huile a été injectée aux souris ne recevant pas de i007 et une solution contrôle contenant des IgG1 a été injectée aux souris ne recevant pas d'anti-PD-L1 et anti-LAG-3. Le poids des souris au cours du temps a été évalué afin de donner une première indication sur l'éventuelle toxicité des thérapies, notamment lorsqu'elles sont utilisées en combinaison (**Figure 33B**).

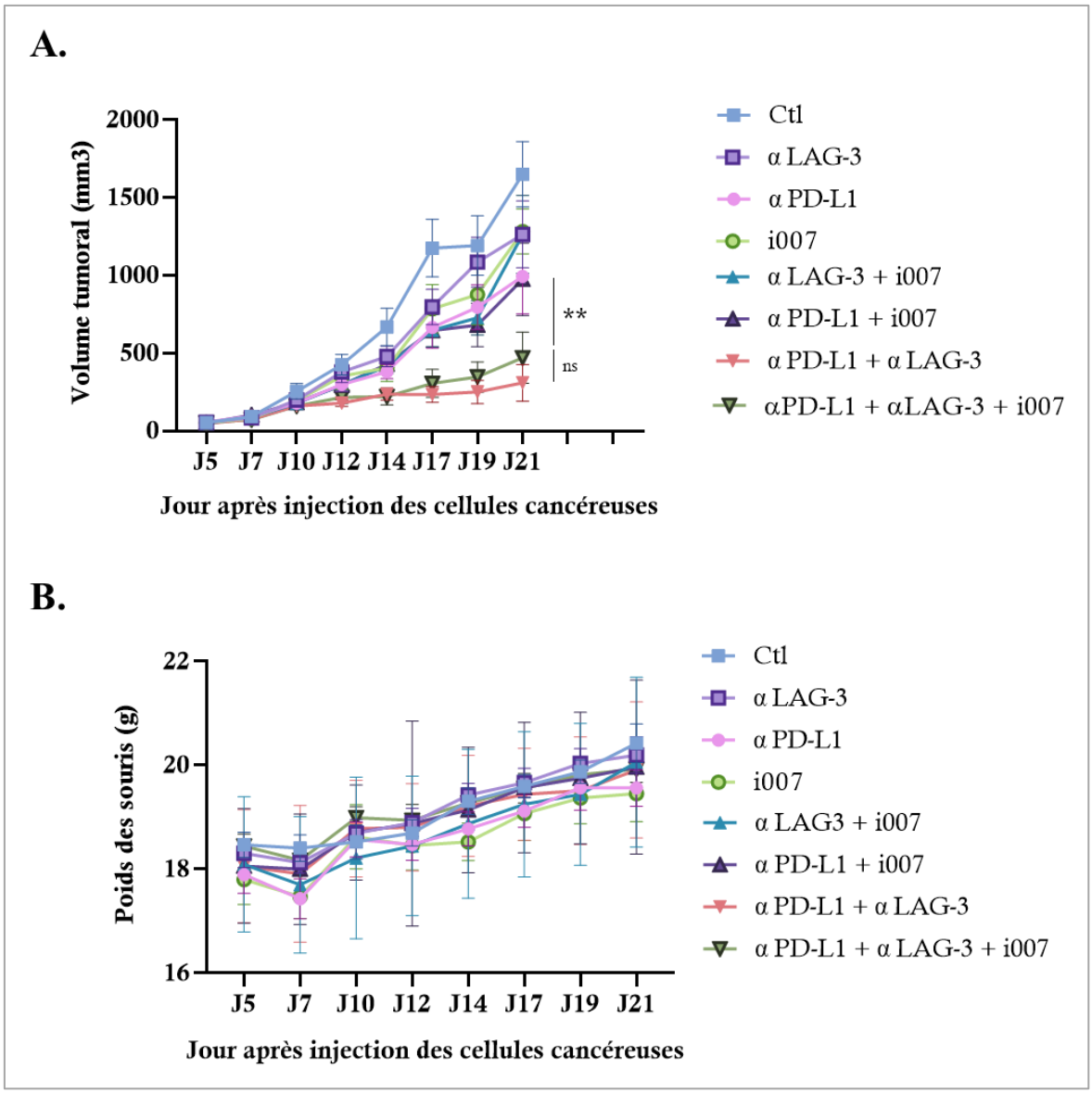


Figure 33. Effet de la triple combinaison anti-PDL1/i007/anti-LAG-3. (A) Croissance tumorale. 500 000 cellules CT26 WT ont été injectées à des souris BALB/c en sous-cutanée, puis les souris ont été randomisées au jour 5-6 et traitées (i.p) trois fois par semaine avec i007 (0,1mg/souris dilué dans 10% DMSO, qsp huile) ou le véhicule (10% DMSO, qsp huile) et/ou des anti-PD-L1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X) ou des IgG1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X) et/ou des anti-LAG-3 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X) ou des IgG1 (200µg/souris dilué dans du PBS 1X). La croissance tumorale a été analysée (n = 9 à 16). Les volumes tumoraux ont été calculés selon la formule ½ x longueur x (largeur)^2. Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité (Shapiro-Wilk) a été réalisé suivi d'un test two-way ANOVA avec **p=0,0024. **(B) Poids des souris.** Les souris ont été pesées trois fois par semaine. Les données sont représentées sur ce graphique. Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Les données représentent la compilation de trois expériences indépendantes mais il manque le groupe anti-PD-L1 seul ainsi que le groupe i007 seul pour l'expérience n=1, et le groupe Ctl pour l'expérience n=2. De plus, lors de l'expérience n=1, les cellules cancéreuses ont été injectées un jour plus tôt et par conséquent les souris ont été traitées un jour plus tard pour suivre le schéma thérapeutique des expériences n=2 et 3. Les volumes tumoraux de l'expérience n=1 ont été mesurés avec un jour de décalage également mais considérés comme étant mesurés aux mêmes jours que les expériences n=2 et 3 sur ces graphiques afin de pouvoir générer des écarts-types. Ctl = souris ayant

reçues le véhicule et les IgG1 ; αPD-L1 = anti-PD-L1 ; αLAG-3 = anti-LAG-3. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE et Aude CHAVANTON.*

D'après la **Figure 33A**, nous pouvons observer que la triple thérapie anti-PD-L1/i007/anti-LAG-3 réduit la croissance tumorale par rapport à la double thérapie anti-PD-L1/i007. Néanmoins, il semblerait que l'effet soit dû à la double thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3 puisqu'il n'y a pas de différences entre les groupes de souris traitées avec cette double combinaison thérapeutique et la triple combinaison. Par ailleurs, nous pouvons observer que le i007 n'a pas donné les résultats observés plus haut dans ces expériences, puisque nous n'observons pas de différences entre la thérapie anti-PD-L1 seule et la double thérapie anti-PD-L1/i007, ce qui pourrait expliquer l'absence de différences entre la double thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3 et la triple thérapie. Le poids des souris augmente légèrement au cours du temps, laissant penser que la triple thérapie pourrait ne pas engendrer de grandes toxicités supplémentaires par rapport aux double thérapies anti-PD-L1/i007 ou anti-PD-L1/anti-LAG-3 (**Figure 33B**). L'analyse de l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs n'ayant pas donné de réponses sur l'absence d'efficacité de la triple thérapie, aucune donnée à ce sujet n'est présentée.

Pour conclure, toutes les données intéressantes obtenues sur ce projet de recherche seront discutées dans la partie V.

Un schéma récapitulatif des principales données obtenues sur ce projet est présenté ci-dessous (**Figure 34**).

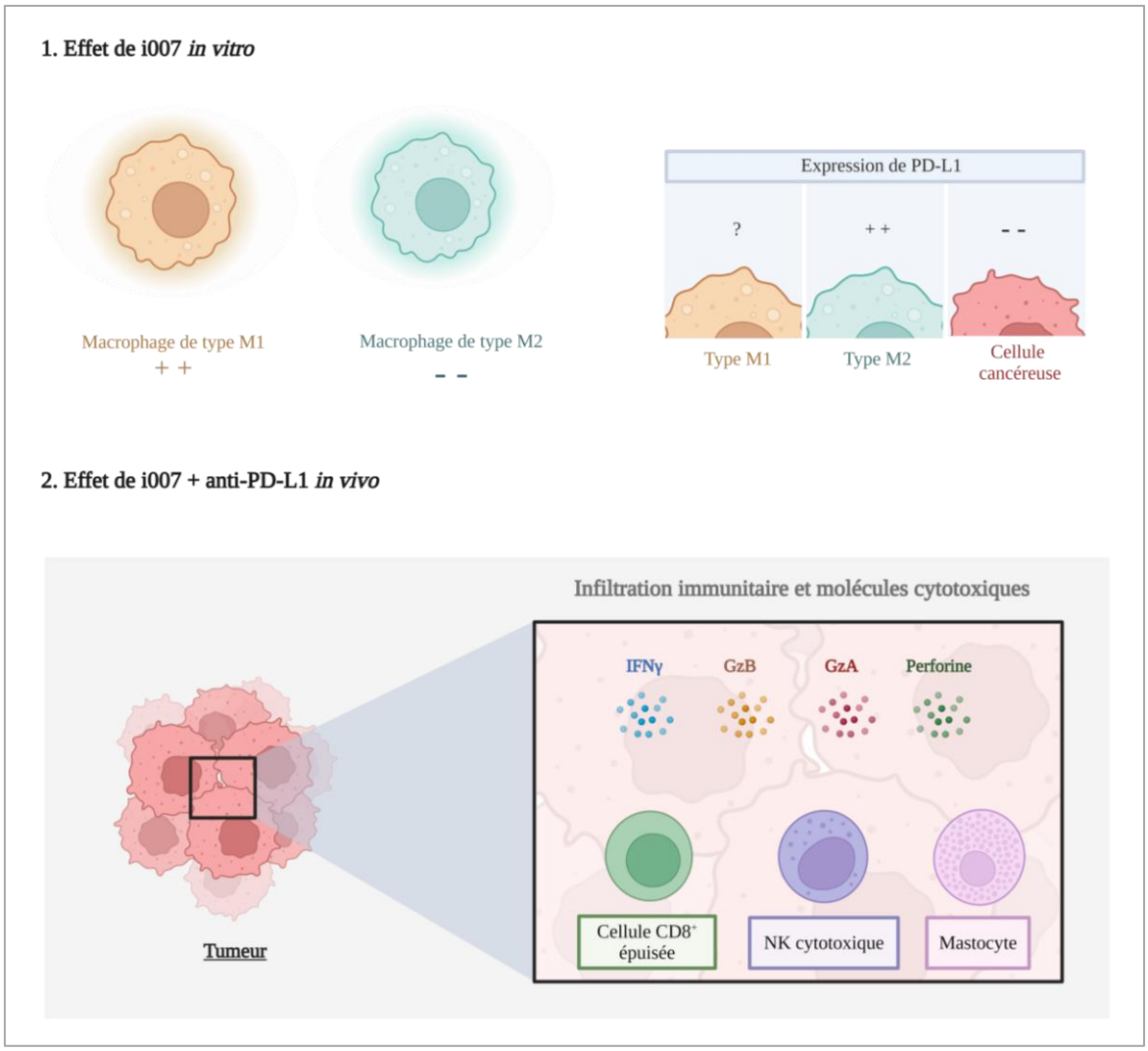


Figure 34. Résumé de l'effet observé *in vitro* de la molécule i007 et *in vivo* de la combinaison thérapeutique anti-PD-L1 + i007. (1) *In vitro*, la molécule i007 semble favoriser le profil des macrophages de type M1 anti-tumoraux et limiter le profil des macrophages de type M2 pro-tumoraux. Elle semble également agir sur le taux de protéine PD-L1 en augmentant le taux de protéine PD-L1 sur les macrophages de type M2, et en diminuant le taux de protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses. **(2)** *In vivo*, la double thérapie anti-PD-L1/i007 semble favoriser le recrutement de cellules $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ et PD-1 $LAG\text{-}3^+$ et la production de molécules cytotoxiques telles que le GzB, A, la perforine et l'IFN γ. Cette double thérapie, comparée à la monothérapie anti-PD-L1, semble également agir sur le recrutement de cellules NK cytotoxiques et de mastocytes. *Schéma réalisé par Aude Chavanton à l'aide du logiciel Biorender.*

1.5.Données supplémentaires

♣ Test d'ensemencement cellulaire

Afin de déterminer si le composé i007 est actif et joue un rôle sur la viabilité cellulaire ainsi que sur le taux de protéine PD-L1, la concentration inhibitrice semi-maximale (IC50) de i007 a été déterminée sur les deux lignées de cancers colorectaux CT26 WT et MC38 WT. Etant donné que des études préalables réalisées au sein de l'équipe ont démontré que l'efficacité des inhibiteurs de HSP110 était optimale après 72h de traitement, nous avons réalisé cette expérience à 72h. Pour une détermination idéale de l'IC50, un test d'ensemencement cellulaire pour déterminer la viabilité cellulaire optimale à 96h a été réalisé. Le temps de 96h a été choisi pour permettre aux cellules d'adhérer correctement avant mise en contact avec le i007, soit un ensemencement 24h avant traitement. Les résultats sont présentés dans la **Figure 35**.

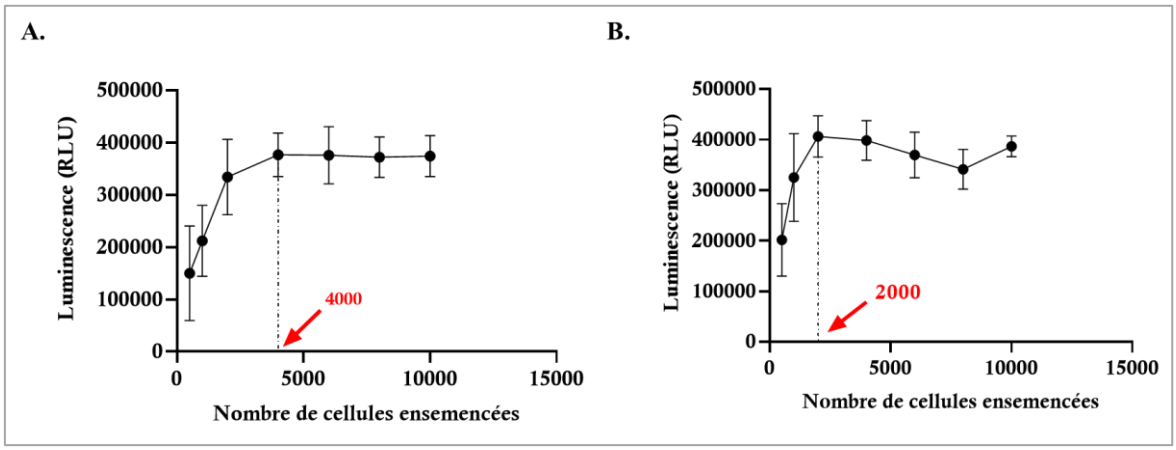


Figure 35. Test d'ensemencement pour les lignées CT26 WT et MC38 WT. 96h après ensemencement des cellules CT26 WT ou MC38 WT (gamme allant de 500 à 10 000 cellules/puits d'une plaque 96 puits), un test Cell Titer Glo 2.0 mesurant la viabilité cellulaire grâce à la luminescence a été réalisé sur la lignée **(A)** CT26 et **(B)** MC38. Plus la luminescence est élevée, plus la viabilité cellulaire est importante. L'expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante. Les écarts-types représentent la moyenne ±SD. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. RLU = Unité lumineuse relative. *Expériences réalisées par Aude CHAVANTON.*

D'après la **Figure 35**, la viabilité cellulaire maximale pour la lignée CT26 WT est obtenue à partir de 4000 cellules ensemencées et 2000 cellules ensemencées pour la lignée

MC38 WT. Nous avons donc choisi ces quantités de cellules à ensemencer en plaque 96 puits pour les expériences suivantes.

- ♣ Détermination de l'IC50 de i007 sur les lignées CT26 WT et MC38 WT

Afin de déterminer l'IC50 de i007, 4000 cellules CT26 WT ou 2000 cellules MC38 WT ont été ensemencées dans des plaques 96 puits, puis traitées avec i007 24h après ensemencement selon une gamme de concentration allant de 0 à 60µM (CT26) et 0 à 80µM (MC38). Il est à noter que le i007 se dilue dans du DMSO, ainsi des puits contrôles contenant uniquement du DMSO aux mêmes concentrations que i007 ont été réalisés afin de vérifier que le DMSO n'impacte pas la viabilité cellulaire à la même hauteur que i007. De même un contrôle positif contenant 10% de DMSO a été réalisé. Le traitement i007 a été laissé 72h en contact avec les cellules puis un test de viabilité cellulaire Cell Titer Glo 2.0 a été réalisé (**Figure 36**).

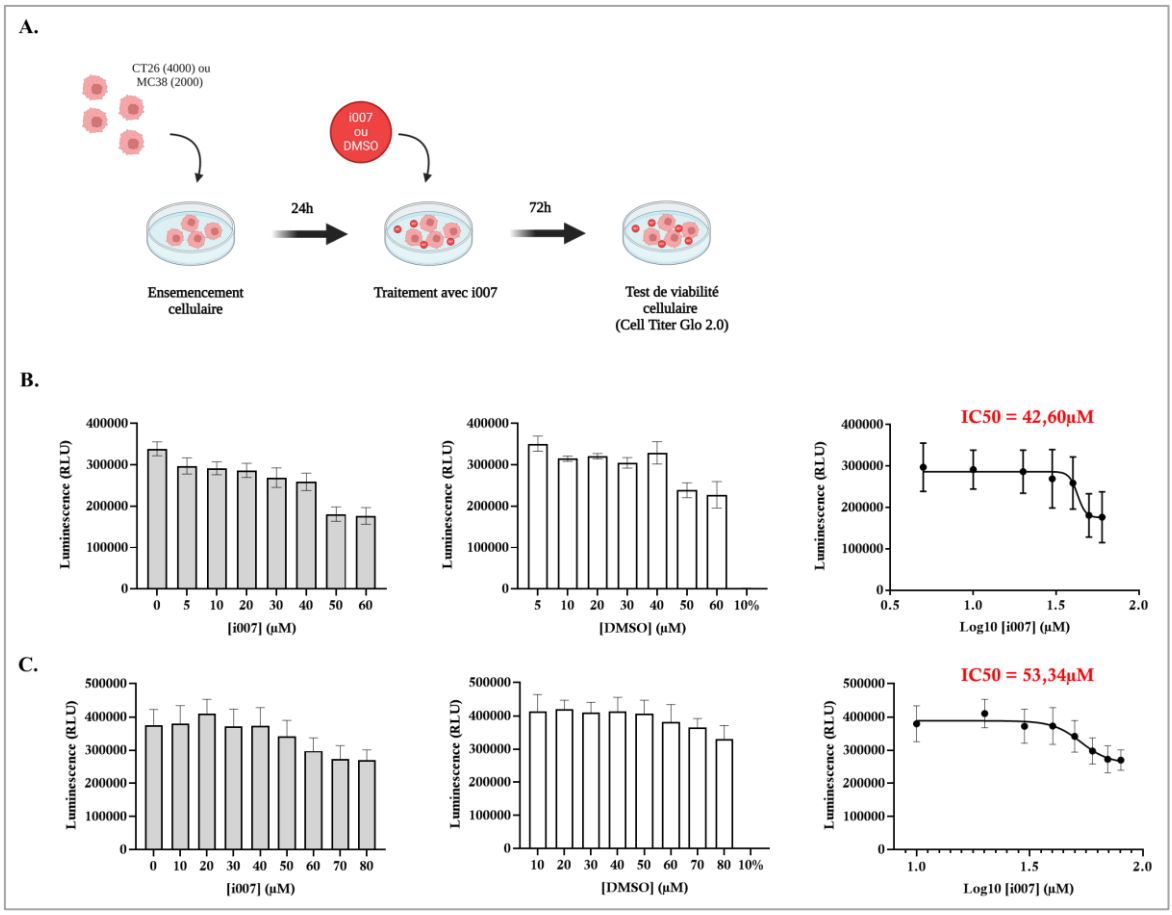


Figure 36. Détermination de l'IC50 de i007 sur les lignées CT26 WT et MC38 WT. (A) Schéma récapitulatif de l'expérience. **(B)** 4000 cellules CT26 WT ou **(C)** 2000 cellules MC38 WT ont été ensemencées en plaque 96 puits. Après 24h d'ensemencement, les cellules ont été traitées avec i007 pendant 72h selon une gamme de concentration allant de 0 à 60µM (CT26) ou 0 à 80µM (MC38) puis un test Cell Titer Glo 2.0 mesurant la viabilité cellulaire a été réalisé. Le i007 se diluant dans du DMSO, la même expérience a été réalisée avec des concentrations égales de DMSO afin de vérifier que le DMSO n'impacte pas la viabilité cellulaire à la même hauteur que i007. Un contrôle positif avec 10% de DMSO a également été réalisé. La luminescence est corrélée à la viabilité cellulaire. Chaque expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante. Les écarts-types représentent la moyenne ±SD. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. *Expériences réalisées par Aude CHAVANTON.*

A l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.3.0 et des courbes Log10 [i007] en fonction de la luminescence, nous avons pu déterminer un IC50 de 42,60µM pour la lignée CT26 WT et 53,34µM pour la lignée MC38 WT. Les contrôles DMSO semblent impacter légèrement la viabilité cellulaire à certaines concentrations, mais moins que le i007 permettant de confirmer que le i007 impacte la viabilité cellulaire. Le contrôle positif contenant du milieu de culture, les cellules et 10% de DMSO impacte grandement la viabilité cellulaire confirmant la fonctionnalité du DMSO.

2. Ouverture sur un nouveau projet : optimiser l'efficacité des anti-PD-L1 par l'ajout d'un anti-LAG-3 dans un modèle de cancer colorectal

Suite à la dernière expérience menée sur le projet anti-PD-L1/i007 (**Figure 33**), la thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3 a semblé être très efficace comparativement aux monothérapies anti-PD-L1 et anti-LAG-3 seul. Ainsi, les données collectées sur la croissance tumorale, l'analyse de l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs ainsi que quelques autres expériences seront présentées ci-dessous.

2.1.LAG-3 : structure, ligands et fonction

LAG-3, un point de contrôle immunitaire de nature inhibitrice, est présent à la surface des lymphocytes T et peut se lier à différents ligands dont le plus connu est le CMH II notamment présent à la surface des cellules dendritiques et cellules cancéreuses. Il peut se lier également à la LSECTin, présente à la membrane des cellules cancéreuses et du foie, la protéine 1 analogue au fibrinogène (FGL-1), sécrétée par les cellules cancéreuses et cellules du foie, ou encore la galactose lectine-3 (Galectine-3) présente à la surface des monocytes, cellules stromales ou encore cellules cancéreuses. L'interaction de LAG-3 avec ses ligands induit l'inhibition du lymphocyte T [429–432] (**Figure 37**).

LAG-3 est constitué de trois parties : une partie extracellulaire contenant quatre domaines de la superfamille des immunoglobulines (D1-D4), d'une boucle D1 et de sites de glycosylation ; une partie transmembranaire contenant un peptide de connexion ; une partie intracellulaire contenant un site de phosphorylation de la sérine, un motif KIEELE (6 acides aminés) et un motif EP (motif de répétition du dipeptide glutamine-proline). Les motifs KIEELE et EP pourraient être impliqués dans la fonction inhibitrice de LAG-3, mais ces conclusions sont plutôt controversées [433–435]. Par ailleurs, une forme soluble de LAG-3 est formée suite au clivage de la partie extracellulaire de LAG-3 par l'enzyme A désintégrine et métalloprotéinase (ADAM) 10/17 (**Figure 37**).

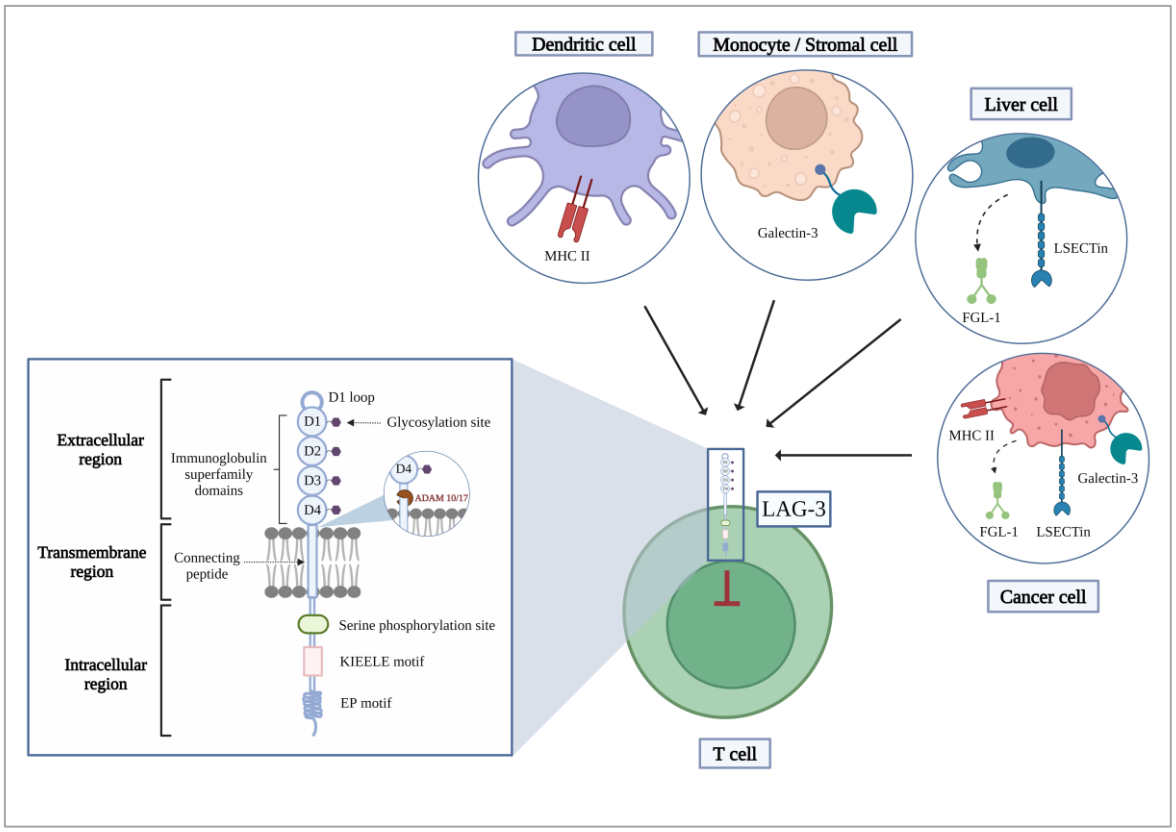


Figure 37. Les ligands de LAG-3 et leur rôle dans le cancer. LAG-3 est présent à la surface des lymphocytes T et est composé de trois parties : une partie extracellulaire contenant quatre domaines de la superfamille des immunoglobulines (D1-D4), des sites de glycosylation et une boucle D1 ; une partie transmembranaire contenant un peptide de connexion ; et une partie intracellulaire contenant un site de phosphorylation de la sérine, un motif KIEELE (correspondant à 6 acides aminés) et un motif EP (motif de répétition du dipeptide glutamine-proline). Une forme soluble de LAG-3 peut être formée suite au clivage de la partie extracellulaire par l'enzyme ADAM 10/17. LAG-3 peut interagir avec différents ligands, dont le CMH II, son ligand majeur, LSECTin, Galectine-3 et FGL-1. Ces ligands sont présents dans différents types cellulaires tels que les cellules dendritiques, monocytes, cellules stromales, cellules du foie ou cellules cancéreuses. L'interaction de ces ligands avec LAG-3 induit l'inhibition du lymphocyte T. *Schéma réalisé par Chavanton et al., 2024* [436].

Le ciblage de LAG-3 avec diverses molécules a fait l'objet de nombreuses études et actuellement 15 essais cliniques de phase III étudient l'efficacité de ces molécules en association avec d'autres thérapies (immunotherapies, chimiothérapies ou encore thérapies ciblées). La combinaison thérapeutique relatlimab (anti-LAG-3) + nivolumab (anti-PD-1) a, par ailleurs, déjà fait l'objet d'une approbation par la *FDA* [436].

Ce début de projet a permis d'étudier l'efficacité de la combinaison thérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3 dans le modèle de cancer colorectal CT26. Les premières données obtenues ont permis d'évaluer l'effet de cette double immunothérapie sur la croissance

tumorale, l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs, notamment des lymphocytes T ainsi que sur la mémoire immunitaire.

2.2. Effet de la double combinaison immunothérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur la croissance tumorale dans le modèle de cancer colorectal CT26 WT *in vivo*

Afin de vérifier que l'association thérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3 a un intérêt d'être étudié dans le modèle CT26, nous avons tout d'abord vérifié la présence de la protéine PD-L1 et des ligands de LAG-3 par western-blotting. Seul le ligand LSECTin est représenté sur la **Figure 38A** puisque les autres ligands n'ont pas pu être mis en évidence. Nous avons ensuite réalisé une expérience de croissance tumorale sur des souris BALB/c porteuses de tumeurs CT26 WT. Pour cela, après injection des cellules cancéreuses CT26 WT aux souris, celles-ci ont été randomisées puis traitées ou non avec des anti-LAG-3 (200µg/souris) et/ou anti-PD-L1 (200µg/souris) trois fois par semaine (**Figure 38B**). La taille des tumeurs a été mesurée trois fois par semaine et le volume tumoral a été déterminé selon la formule ½ x longueur x $(\text{largeur})^2$ (**Figure 38C**). Le poids des souris a également été étudié au cours du temps afin de vérifier l'innocuité de la double immunothérapie, tout du moins sur le poids (**figure 38D**).

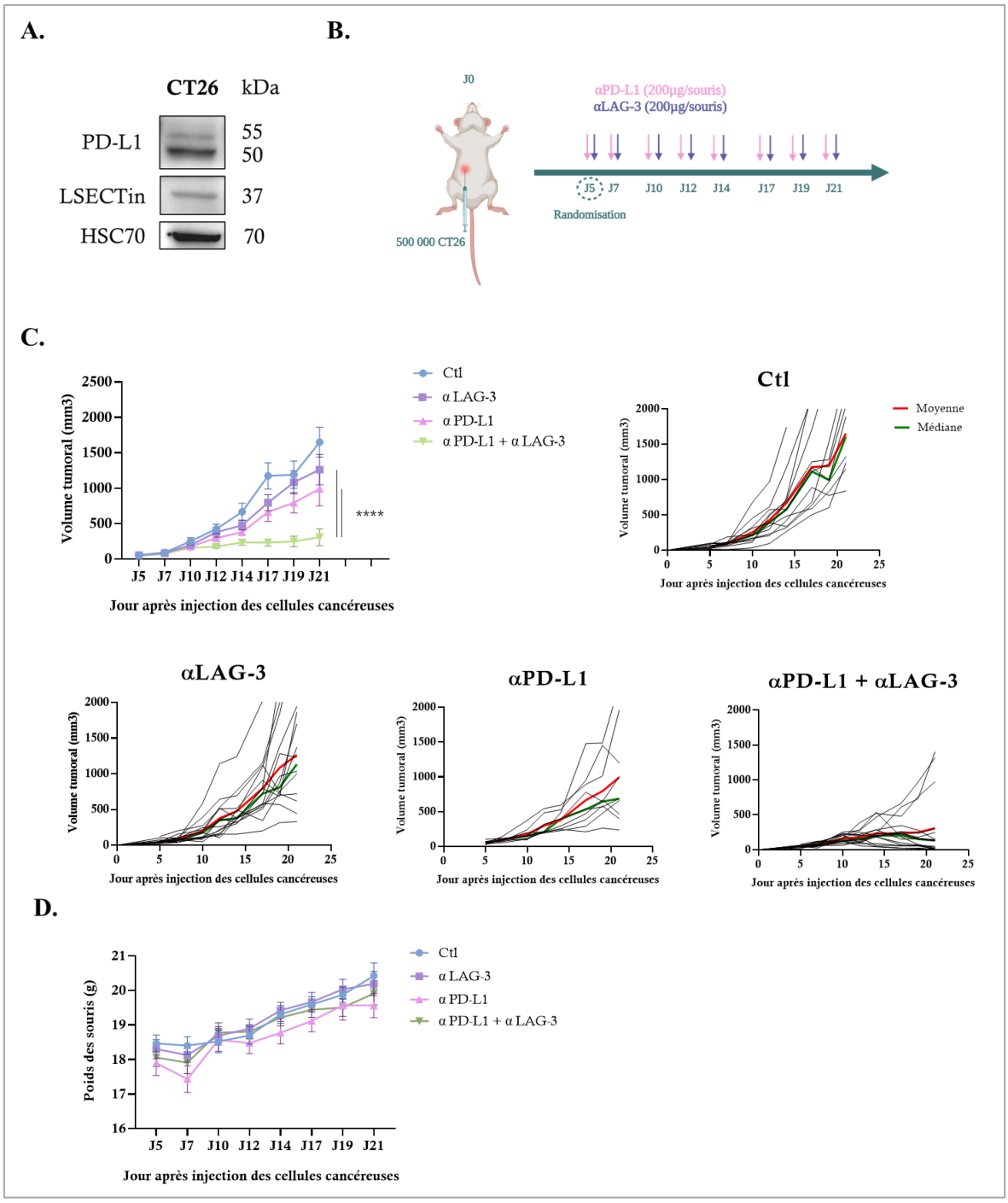


Figure 38. Effet de la double combinaison anti-LAG-3/anti-PD-L1 sur la croissance tumorale. **(A) Présence des cibles thérapeutiques dans la lignée CT26 WT.** 3 000 000 cellules CT26 WT ont été lysées puis l'expression protéique de PD-L1 et LSECTin a été analysée par western-blotting. L'expérience a été réalisée trois fois de manière indépendante. **(B) Schéma expérimental de l'expérience *in vivo*.** 500 000 cellules CT26 WT ont été injectées en sous-cutané sur le flanc droit des souris. Au jour 5-6 après injection des cellules cancéreuses, les souris ont été randomisées et traitées (i.p) avec des anti-PD-L1 (200µg/souris) et/ou anti-LAG-3 (200µg/souris) et/ou IgG1 (200µg/souris). Toutes les souris ont également reçu le véhicule (10% DMSO, qsp huile). Les traitements ont été injectés trois fois par semaine. **(C) Croissance tumorale.** Une analyse de la croissance tumorale a été réalisée (n=9 à 16/groupe). Les volumes tumoraux ont été calculés selon la formule ½ x longueur x (largeur)^2. Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité

(Shapiro-Wilk) suivi d'un test two-way ANOVA a été utilisé avec ****p<0,0001. **(D) Poids des souris.** Les souris ont été pesées trois fois par semaine. Les données sont représentées sur ce graphique. Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Les données représentent la compilation de trois expériences indépendantes mais il manque le groupe anti-PD-L1 seul pour l'expérience n=1, et le groupe Ctl pour l'expérience n=2. De plus, lors de l'expérience n=1, les cellules cancéreuses ont été injectées un jour plus tôt et par conséquent les souris ont été traitées un jour plus tard pour suivre le schéma thérapeutique des expériences n=2 et 3. Les volumes tumoraux de l'expérience n=1 ont été mesurés avec un jour de décalage également mais considérés comme étant mesurés aux mêmes jours que les expériences n=2 et 3 sur ces graphiques afin de pouvoir générer des écarts-types. Ctl = souris ayant reçues le véhicule et les IgG1 ; αPD-L1 = anti-PD-L1 ; αLAG-3 = anti-LAG-3. Les graphiques ont été réalisés sur le logiciel GraphPad Prism 8.3.0. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE et Aude CHAVANTON.*

D'après la **figure 38A**, nous pouvons observer que PD-L1 et LSECTin sont bien présents dans la lignée CT26 WT et qu'une étude de l'effet de la double immunothérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3 peut être réalisée. D'après la **figure 38C**, nous pouvons observer que la double thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3 induit un retard de la croissance tumorale très important par rapport aux monothérapies anti-PD-L1 et anti-LAG-3, indiquant une efficacité antitumorale intéressante. Le poids des souris semble légèrement augmenter au cours du temps quel que soit le groupe de traitement, ne mettant pas en évidence un problème de toxicité apparent des thérapies (**Figure 38D**).

2.3. Effet de la double combinaison immunothérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs dans le modèle de cancer colorectal CT26 *in vivo*

Au jour 12 après injection des cellules cancéreuses, les souris ont été euthanasiées et les tumeurs ont été récupérées puis digérées. Une analyse de l'infiltration immunitaire, notamment au sein des tumeurs a été réalisée par cytométrie en flux. Aucune donnée observée n'a été significativement différente entre les groupes, ce qui ne permet pas d'expliquer l'efficacité de la double thérapie. Néanmoins, il est à noter qu'une tendance à l'augmentation du pourcentage de cellules $CD45^+CD4^+$ capables de sécréter du GzB a été observée dans le cadre de la double thérapie (**Figure 39**), suggérant un éventuel rôle des cellules $CD4^+$ dans la destruction tumorale par l'intermédiaire du GzB.

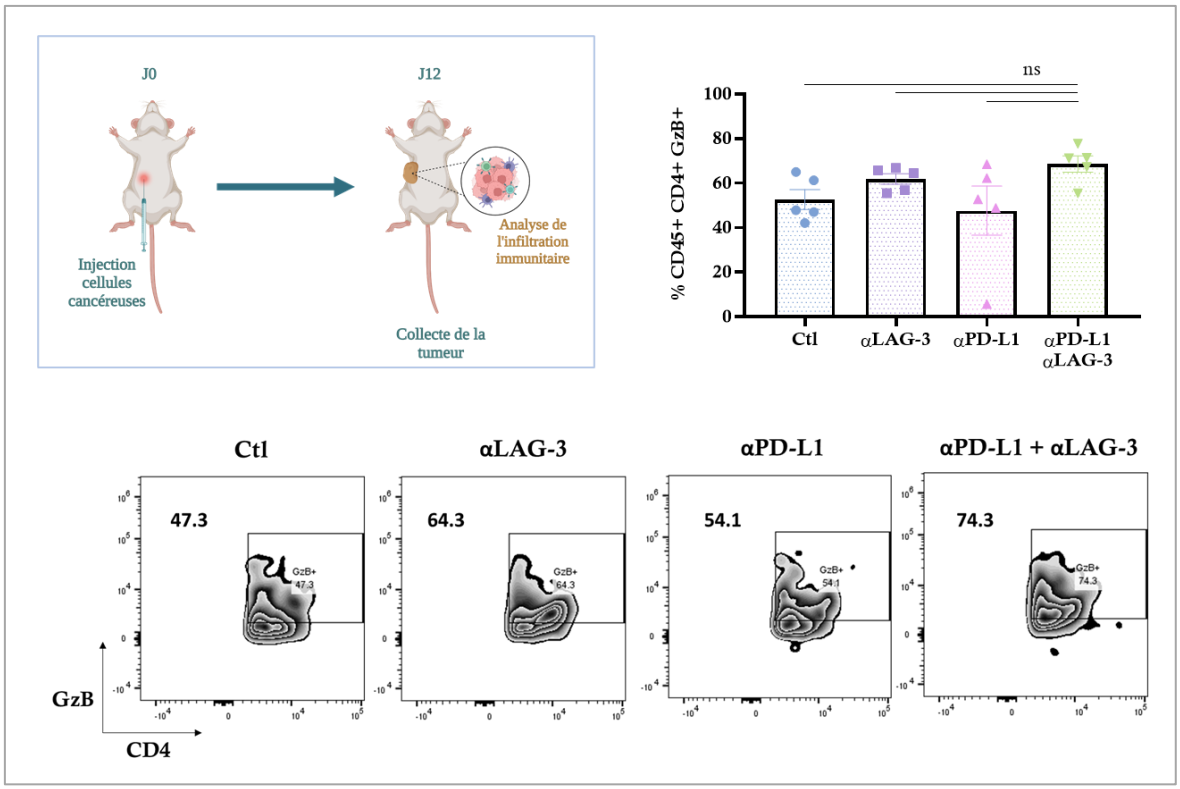


Figure 39. Effet de la double combinaison anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur l'infiltration immunitaire au sein des tumeurs. 500 000 cellules CT26 WT ont été injectées en sous-cutané sur le flanc droit des souris. Au jour 5 après injection des cellules cancéreuses, les souris ont été randomisées et traitées (i.p) avec des anti-PD-L1 (200µg/souris) et/ou anti-LAG-3 (200µg/souris) et/ou IgG1 (200µg/souris). Toutes les souris ont également reçu le véhicule (10% DMSO, qsp huile). Les traitements ont été injectés trois fois par semaine. 12 jours après injection des cellules cancéreuses, les souris ont été euthanasiées et les tumeurs récupérées pour une analyse de l'infiltration immunitaire. Le pourcentage de cellules $CD45^+CD4^+GzB^+$ a été analysé par cytométrie en flux (n=5). Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité (Shapiro-Wilk) a été réalisé suivi d'un test one way ANOVA avec ns = non-significatif. Ctl = tumeurs de souris ayant reçues le véhicule et les IgG1 ; αPD-L1 = anti-PD-L1 ; αLAG-3 = anti-LAG-3. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE et Aude CHAVANTON.*

2.4. Effet de la double combinaison immunothérapeutique anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur la survie dans le modèle de cancer colorectal CT26 *in vivo*

Au cours de l'expérience de croissance tumorale (**Figure 38C**), le volume tumoral de chaque souris a été mesuré au cours du temps jusqu'au jour 19 (dernier jour de traitement des souris) mais également du jour 21 à 53 afin de réaliser une courbe de survie (**Figure 40A**). Le poids des souris a également été mesuré du jour 25 au jour 53 (**Figure 40A**). Parmi les souris qui n'ont pas atteint le point limite en termes de taille tumorale (environ 1400mm^3)

au jour 53, une analyse de la présence ou non de tumeurs a été réalisée (**Figure 40B**). Seules des souris du groupe anti-PD-L1/anti-LAG-3 sont représentées sur cette figure, car toutes les souris des autres groupes ont dépassé le point limite avant le jour 53. Enfin, pour les souris dont les tumeurs au jour 53 n'étaient plus visibles, une réinjection de cellules cancéreuses CT26 WT en sous-cutanée sur le flanc gauche (flanc opposé à la première injection) a été effectuée et une analyse de la croissance tumorale a été réalisée (**Figure 40C**).

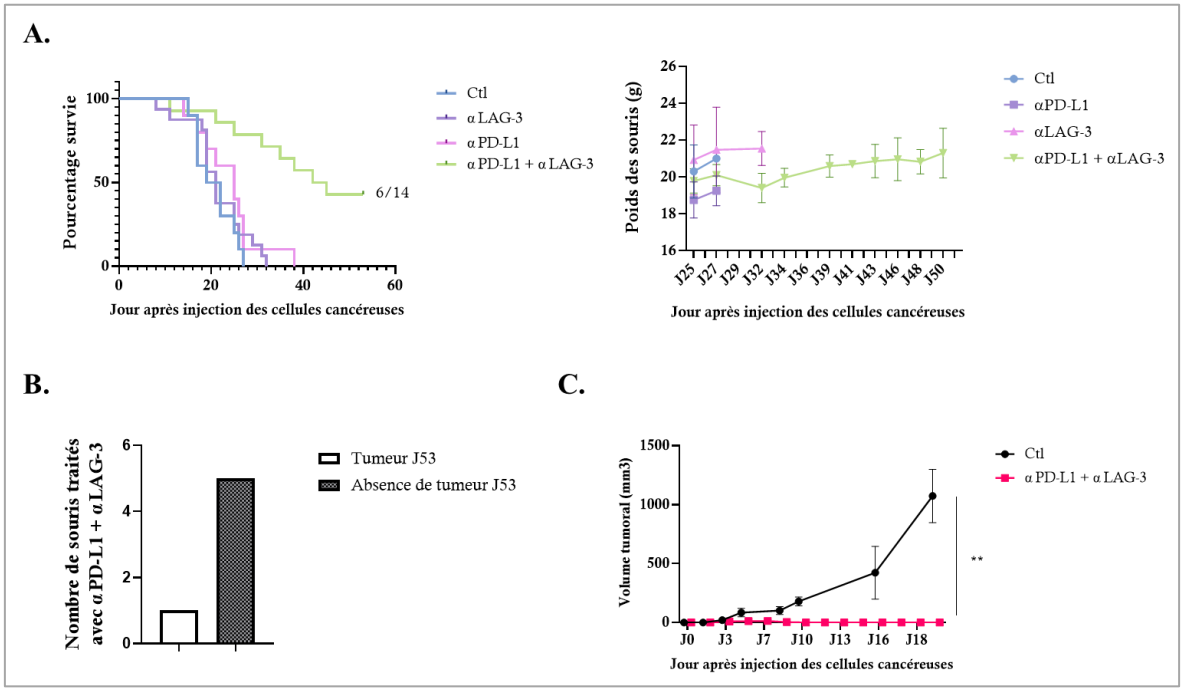


Figure 40. Effet de la double combinaison anti-PD-L1/anti-LAG-3 sur la survie (A) Survie. 500 000 cellules CT26 WT ont été injectées en sous-cutané sur le flanc droit des souris. Au jour 5-6 après injection des cellules cancéreuses, les souris ont été randomisées et traitées (i.p) avec des anti-PD-L1 (200µg/souris) et/ou anti-LAG-3 (200µg/souris) et/ou IgG1 (200µg/souris). Toutes les souris ont également reçu 200µL de véhicule (10% DMSO, qsp huile). Les traitements ont été injectés trois fois par semaine. Le volume tumoral de chaque souris a été mesuré et les souris ont été euthanasiées dès lors que le volume tumoral dépassait le point limite de 1400mm^3 environ. Une courbe de survie a ensuite été réalisée selon les groupes de traitements. Le poids des souris à partir du jour 25 après injection des cellules cancéreuses a également été mesuré trois fois par semaine. **(B) Nombre de souris sans tumeurs.** Au jour 19 après injection des cellules cancéreuses, les souris ont reçu leur dernière injection de traitements. Un suivi du volume tumoral a été réalisé jusqu'au jour 53, et sur les 6 souris encore vivantes du groupe anti-PD-L1/anti-LAG-3 au jour 53, le nombre de souris présentant ou non une tumeur a été analysé. **(C) Second challenge.** Les 5 souris du groupe anti-PD-L1/anti-LAG-3 ne possédant plus de tumeurs au jour 53 ont été soumises à nouveau à une injection de 500 000 cellules cancéreuses sur le flanc opposé (flanc gauche) en sous-cutané (n=5). La reprise tumorale a été analysée sur une vingtaine de jours. Un groupe de souris contrôle non-porteuses de tumeurs et non traitées précédemment a été réalisé (Ctl, n=3) seulement pour l'expérience n=3 où il y avait 2 souris précédemment traitées avec anti-PD-L1 et anti-LAG-3 qui ont perdu leurs tumeurs et à qui ont été réinjectées des cellules cancéreuses. Néanmoins, les 5 souris précédemment doublement traitées des expériences n=1, 2 et 3 qui ont perdu leurs tumeurs et à qui ont été réinjectées avec les cellules cancéreuses sont représentées sur ce graphique. Les volumes tumoraux ont

été calculés selon la formule ½ x longueur x (largeur)^2. Les écarts-types représentent la moyenne ±SEM. Un test de normalité (Shapiro-Wilk) a été utilisé suivi d'un test Mann-Whitney avec **p=0,0038. Ctl = souris ayant reçues le véhicule et les IgG1 ; αPD-L1 = anti-PD-L1 ; αLAG-3 = anti-LAG-3. *Expériences réalisées par Jimena ABREY-RECALDE et Aude CHAVANTON.*

D'après la **Figure 40A**, nous pouvons observer que 6 souris sur 14 du groupe anti-PD-L1/anti-LAG-3 n'ont pas atteint le point limite de survie d'environ 1400mm^3, soit 42,9% des souris. Seules des souris de ce groupe thérapeutique n'ont pas atteint le point limite au jour 53, tandis que les souris des autres groupes l'ont atteint au jour 38 maximum, ce qui suggère un effet bénéfique de la double immunothérapie pour réduire la croissance tumorale par rapport aux monothérapies anti-PD-L1 et anti-LAG-3. Parmi les souris doublement traitées qui n'ont pas atteint ce point limite, 5 souris sur 6 n'avaient plus de tumeurs au jour 53, soit 83% des souris (**Figure 40B**), ce qui indique un effet antitumoral de cette double immunothérapie. De manière globale, il y a 31,25% des souris du groupe anti-PD-L1 + anti-LAG-3 qui ont perdu leur tumeur (5 souris sur 16), soit près d'un tiers des souris. Enfin, nous pouvons constater que la réinjection de cellules cancéreuses aux souris du groupe anti-PD-L1/anti-LAG-3 dont les tumeurs ont disparu a induit une très légère reprise tumorale dans les premiers jours qui s'est rapidement estompée, suggérant ainsi qu'une mémoire immunitaire s'est très probablement développée au sein des organismes murins, empêchant le développement tumoral (**Figure 40C**).

V.Discussion et perspectives

V. Discussion et perspectives

1. Projet principal : optimiser l'efficacité des anti-PD-L1 par l'ajout d'un inhibiteur de HSP110 dans un modèle de cancer colorectal

Malgré une efficacité prouvée des immunothérapies anti-PD-1/PD-L1 dans le cancer colorectal, seulement 37% et 11% de réponse objective sont observés chez les patients présentant un statut MSI et MSS respectivement [289]. Il est donc nécessaire de comprendre les mécanismes de résistance développés chez les patients non-répondeurs afin d'optimiser l'efficacité de ces thérapies. Dans ce contexte, la protéine HSP110 a fait l'objet de plusieurs études démontrant sa forte expression dans le cancer colorectal et sa capacité à favoriser la prolifération des cellules cancéreuses colorectales [375,408,409]. Ainsi, cette protéine a été suggérée comme une potentielle cible thérapeutique et un inhibiteur de HSP110 a été développé (i007). Au cours de ce projet de recherche, le rôle de i007 dans la potentialisation de l'efficacité des anti-PD-L1 dans le cadre du cancer colorectal a été étudiée. Nous avons pu démontrer *in vitro* que l'inhibiteur i007 favorise le profil des macrophages de type M1 antitumoraux et limite le profil des macrophages M2 pro-tumoraux, indiquant ainsi un rôle antitumoral de i007. Par ailleurs, i007 semble induire une augmentation du taux de protéine PD-L1 à la surface des macrophages de type M1 antitumoraux et M2 pro-tumoraux, ce qui renforce l'idée d'utiliser des anti-PD-L1 en association avec i007. En revanche, i007 semble diminuer le taux de protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses, ce qui indique ici que les anti-PD-L1 agiraient davantage sur les macrophages que sur les cellules cancéreuses. Néanmoins, il est à noter que l'analyse du taux de protéine PD-L1 dans les cellules cancéreuses a été faite sur un lysat cellulaire total, permettant l'analyse de PD-L1 dans la cellule entière. Ainsi, il serait intéressant d'analyser le taux protéique de PD-L1 uniquement à la surface membranaire de ces cellules afin que ces résultats soient confirmés. En effet, cela serait intéressant d'autant plus que le taux d'ARN PD-L1 est augmenté dans les tumeurs entières contenant des cellules cancéreuses quasiment dépourvues de protéines HSP110 par rapport à des tumeurs contenant des cellules cancéreuses WT. Bien que cela puisse refléter les taux protéiques de PD-L1 sur les macrophages infiltrants les tumeurs et possiblement d'autres cellules immunitaires, les cellules cancéreuses étant en forte quantité dans les

tumeurs, cela pourrait également refléter une augmentation du taux de PD-L1 sur ces cellules également.

L'association thérapeutique anti-PD-L1/i007 a généré un ralentissement de la croissance tumorale plus important que la monothérapie anti-PD-L1. Malgré une absence de significativité, la réduction de la croissance tumorale dans le cadre de la double thérapie semble également plus importante que la monothérapie i007. Cela suggère que la double thérapie semble apporter un bénéfice antitumoral en limitant le développement des tumeurs. L'efficacité de cette double thérapie peut s'expliquer en partie par une infiltration plus importante de cellules $CD8^+$ $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ produisant davantage de molécules cytotoxiques GzB et IFNγ. Ces résultats sont étonnants, car les lymphocytes T dont les lymphocytes T $CD8^+$ co-exprimant PD-1 et Tim-3 sont connus pour être davantage associés à un phénotype épuisé dont les taux de sécrétion de cytokines telles que l'IFNγ, le TNF-α et l'IL-2 sont diminués [305,437–439]. Néanmoins, une étude démontre que la stimulation des cellules $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ induit une augmentation de leur sécrétion d'IFNγ et de GzB comparée aux cellules $PD\text{-}1^-$ $Tim\text{-}3^-$ [440], ce qui laisse supposer que les cellules $PD\text{-}1^+$ $Tim\text{-}3^+$ pourraient quand même avoir des capacités cytotoxiques importantes. Il serait désormais intéressant de comprendre dans quel type de contexte ces cellules pourraient garder leur potentiel cytotoxique afin d'optimiser l'efficacité thérapeutique. Nous pouvons déjà noter qu'une étude a démontré que les lymphocytes T infiltrants les tumeurs $PD\text{-}1^{high}$ $Tim\text{-}3^+$ sont associés à la population lymphocytaire Tc1 dans le mélanome [218]. Les Tc1 étant les lymphocytes T $CD8^+$ cytotoxiques par excellence, nous pouvons supposer que dans notre étude, ce sont ces cellules que nous avons observées comme étant $CD8^+$ épuisées sécrétrices de GzB et IFNγ. Malgré tout, cela nécessite d'être confirmé dans le CCR puisque les résultats ont été obtenus dans le cadre du mélanome.

Une analyse transcriptomique des ARN régulés à la hausse dans les tumeurs de souris doublement traitées avec des anti-PD-L1 et i007 a permis de mettre en évidence l'implication majeure des lymphocytes T $CD8^+$ et des cellules NK dans la réponse immunitaire ainsi que l'importance des molécules cytotoxiques GzA, GzB et perforine. Nous pouvons émettre l'hypothèse que ces molécules sont probablement produites par les lymphocytes T $CD8^+$ et cellules NK, qui sont davantage connues pour leur activité antitumorale et cytotoxique, mais une analyse plus approfondie pourrait être envisagée afin de confirmer ou non cette

hypothèse et éventuellement déterminer d'autres acteurs potentiels de la réponse immunitaire antitumorale. D'autres marqueurs plus fortement présents tels que Tapbp, Klrd1 et Ctsw (**Figure 32**), apportent un appui aux observations faites précédemment concernant l'implication des lymphocytes T $CD8^+$ et cellules NK dans le contexte de la double thérapie anti-PD-L1/i007. En effet, TAPBP est un composant impliqué dans le chargement des peptides sur les molécules de CMH de classe I [441]. Peu d'informations au sujet de ce facteur dans le cancer colorectal sont connues, mais nous pouvons supposer que cela peut aider les réponses immunitaires antitumorales grâce à la présentation antigénique renforcée, qui plus est, favorise l'activation des lymphocytes T $CD8^+$ qui sont ciblés par le CMH de classe I. Le gène Klrd1, quant à lui, code la protéine CD94 qui s'hétérodimérise avec la protéine membre A du groupe 2 des NK (NKG2A) pour former un récepteur inhibiteur présent à la surface des cellules NK. CD94 est connu pour être exprimé par les cellules NK, mais également par des lymphocytes infiltrants les tumeurs [442]. Dans le cancer colorectal, il a été rapporté que lymphocytes $CD94^+$ infiltrant les tumeurs co-expriment majoritairement NKG2A et sont principalement des lymphocytes $CD8^+$ αβ [443], ce qui confirme l'implication des lymphocytes T $CD8^+$ dans le contexte thérapeutique étudié. Enfin, la Cathepsin W (CTSW) est une cystéine protéase qui a été identifiée comme ayant un double rôle, à la fois dans le développement du cancer colorectal en étant associée aux métastases, mais également un rôle dans l'activation des réponses immunitaires. Elle est également associée aux cellules NK et cellules T cytotoxiques [444]. Ainsi, des études plus approfondies pourraient permettre d'identifier dans le cadre de la double thérapie anti-PD-L1/i007 si elle induit plutôt l'activation de la réponse immunitaire antitumorale ou si elle agit comme un promoteur de la résistance à la double thérapie. Par ailleurs, l'implication de cellules $CD4^+$ capables de sécréter du GzB a été mis en lumière dans une expérience *in vivo* avec des souris porteuses de cellules cancéreuses sh110 et traitées avec des anti-PD-L1. Etant donné qu'il existe une variété de cellules $CD4^+$ ayant chacune des propriétés particulières et des effets parfois opposés, il serait intéressant d'étudier plus précisément le rôle des cellules $CD4^+$ infiltrants les tumeurs dans le cadre de la double thérapie. Les Th9 étant connus comme ayant la capacité de sécréter du GzB [164], nous pouvons émettre l'hypothèse que ces cellules pourraient être impliquées dans le cadre de la double thérapie et pourraient favoriser la réponse immunitaire antitumorale.

La double thérapie anti-PD-L1/i007 semble également agir sur le profil des macrophages, notamment des macrophages de type M2, et nous pouvons suggérer que cet effet est induit par la molécule i007 puisque celle-ci a généré le même effet *in vitro*. *In vivo*, l'analyse transcriptomique des ARNs présents dans les tumeurs de souris a permis d'identifier une diminution des taux d'ARNs Ms4a4a et Ccl4 dans les tumeurs des souris traitées avec la double thérapie par rapport à la monothérapie anti-PD-L1. Les protéines MS4A4A et CCL4 étant impliquées dans la polarisation des macrophages de type M2 ou leur recrutement dans les tumeurs [427,428], ces données suggère que la double thérapie anti-PD-L1/i007 limite la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur.

Par ailleurs, nous pouvons observer une diminution du taux d'ARN Cd86 dans les tumeurs de souris doublement traitées par rapport aux tumeurs de souris traitées uniquement avec des anti-PD-L1 (**Figure 32**). Cd86 code la protéine CD86 qui est une molécule de costimulation pouvant être exprimée par les cellules dendritiques, mais qui peut également être un marqueur des macrophages de type M1. Etant donné que nous avons plutôt observé une tendance à l'augmentation de l'infiltration de macrophages de type M1 dans les tumeurs en présence de la double inhibition de HSP110 et PD-L1, nous pouvons suggérer que la diminution du taux d'ARN Cd86 pourrait refléter une diminution de l'infiltration des cellules dendritiques au sein des tumeurs. Les cellules dendritiques étant impliquées dans l'immunité antitumorale, il serait intéressant de comprendre plus précisément le rôle des cellules dendritiques dans le contexte de la double thérapie. Des études démontrent que la forte présence de cellules dendritiques matures dans les tumeurs de patients atteints de CCR est associée à l'invasion des cellules cancéreuses dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques et à une survie globale plus courte [445,446]. Etant donné que CD86 est un marqueur des cellules dendritiques matures [447], nous pouvons suggérer que dans le contexte de la double thérapie, la quantité de cellules dendritiques mature diminue, ce qui est pourrait être associé à une meilleure réponse.

L'analyse transcriptomique a également permis de suggérer l'implication de mastocytes dans la réponse immunitaire. Les mastocytes sont un type de cellules immunitaires principalement connues pour être impliquées dans les allergies et l'inflammation chronique [448,449]. Le rôle des mastocytes dans le cancer colorectal étant controversé, parfois associé à un pronostic favorable [450] et parfois associé à des effets pro-tumoraux tel que l'angiogenèse [451], il serait intéressant de savoir dans le contexte de la double thérapie le rôle exact des

mastocytes. Quelle que soit l'implication des mastocytes, cette étude serait intéressante puisqu'elle pourrait permettre d'une part de renforcer par la suite l'action des mastocytes si leur rôle est antitumoral, d'autre part de limiter l'activation des mastocytes si leur rôle est protumoral, afin d'améliorer davantage l'efficacité de la thérapie anti-PD-L1/i007.

L'analyse transcriptomique permet également de suggérer que la double thérapie anti-PD-L1/i007 semble limiter davantage la formation de métastases que la monothérapie anti-PD-L1 comme en témoigne la diminution des taux d'ARNs Cxcr4, Osm et Tnf (**Figure 32**). En effet, le gène Cxcr4 code la protéine CXCR4, un récepteur à la chimiokine CXCL12. Dans le cancer colorectal, l'expression élevée de CXCR4 dans les tumeurs primaires est associée à une mauvaise survie globale et à un risque de métastases [452]. Concernant le gène Osm, il code pour la protéine oncostatine M, un membre de la famille des cytokines IL-6. Sa concentration élevée dans le sérum des patients atteints de cancer colorectal est associée positivement à l'invasion et aux métastases [453]. Enfin, le gène Tnf code la protéine TNFα, une cytokine pro-inflammatoire principalement sécrétée par les macrophages. Dans le cancer colorectal, elle augmente la phosphorylation de STAT3 dans les cellules cancéreuses et l'expression des gènes cibles de STAT3 impliqués dans la prolifération cellulaire, la survie et les métastases. Elle réduit également l'apoptose des cellules cancéreuses et agit sur l'activation STAT3 par le biais de l'IL-6 [454]. Néanmoins, nous pouvons noter que certains ARNs fortement représentés dans le cadre de la double thérapie par rapport à la monothérapie anti-PD-L1 peuvent également être associés à l'invasion et aux métastases comme Fstl1 et Col6a3 dans le cancer colorectal [455,456], ce qui nécessite d'investiguer plus en détail les gènes impliqués dans la formation des métastases dans le cadre de la double thérapie anti-PD-L1/i007. Malgré tout, la proportion de marqueurs fortement exprimés et associés à des effets pro-tumoraux est nettement inférieur à la proportion de marqueurs fortement exprimés associés à des effets antitumoraux dans le cadre de la double thérapie.

Les biomarqueurs de réponse aux traitements étant très recherchés de nos jours, nous pouvons supposer que l'Il2rb serait un potentiel biomarqueur de réponse à la double thérapie puisque le taux d'ARN Il2rb dans les tumeurs soumises à la double thérapie est élevé (**Figure 32**). Il a, en effet, déjà été démontré que cet ARN dans les tissus cancéreux était un potentiel biomarqueur de réponse aux thérapies par blocage des points de contrôle immunitaire dans le cancer colorectal [457].

Dans la perspective d'améliorer l'efficacité de la double thérapie anti-PD-L1/i007, nous pouvons noter l'augmentation du taux d'ARNs de certains marqueurs impliqués dans des processus pro-tumoraux, tels que Lox et stat1 (**Figure 32**). En effet, Lox est un gène qui code un membre de la famille des lysyl oxidases (une amine oxydase dépendante du cuivre). Dans le cancer colorectal, l'expression de LOX dans les tissus tumoraux est associée à la progression du cancer [458]. Quant à STAT1, il favorise l'angiogenèse dans le cancer colorectal [459]. Ces données intéressantes peuvent apporter des réponses supplémentaires pour tenter d'améliorer davantage l'efficacité de la double combinaison thérapeutique anti-PD-L1/i007 en tentant d'agir sur les mécanismes et voies de signalisation impliqués dans la progression tumorale. De plus, de manière plus large, nous pouvons noter que les protéines HSPs sont impliquées dans la progression tumorale, mais certaines HSPs (HSP70 et HSP90) sont également impliquées dans l'initiation de la réponse immunitaire anti-tumorale [460,461]. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'il y aurait une balance entre les effets pro-tumoraux et antitumoraux des protéines HSPs et que selon le contexte, certains effets pourraient davantage être mis en avant. Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la protéine HSP110 pourrait avoir ce double rôle dans le cancer. Par ailleurs, la triple thérapie anti-PD-L1/i007/anti-LAG-3 n'a pas ralenti la croissance tumorale de manière plus importante que la double thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3 lors de nos expériences, mais cela pourrait s'expliquer par une absence d'activité de i007. En effet, il serait intéressant d'évaluer si la molécule i007 se dégrade au cours du temps, ce qui pourrait expliquer son absence d'efficacité à ce moment-là. Une erreur de manipulation pourrait également expliquer ces résultats. De plus, le ralentissement de la croissance tumorale induit par la double thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3 étant déjà très important, l'effet apporté par l'ajout d'une troisième molécule serait difficile à voir. Ainsi, il serait intéressant d'étudier l'effet de la triple thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3/i007 sur un modèle de cancer plus avancé. La balance entre les effets pro-tumoraux et antitumoraux éventuellement générés par HSP110 que nous avons exposé plus haut pourrait également expliquer l'absence d'effets antitumoraux à certains moments.

Enfin, bien que nous n'ayons pas mis en évidence de toxicités éventuelles de i007 lors de nos expériences, seule l'analyse du poids des souris au cours du temps a été réalisée. Des analyses de toxicités plus développées pourraient être entreprises afin d'évaluer la sécurité de la molécule. Pour pallier les éventuels effets indésirables, très souvent retrouvés

pour de nombreux traitements anti-cancéreux, il pourrait être intéressant de développer des nanoparticules contenant i007 afin que la molécule d'intérêt soit délivrée uniquement aux cellules cancéreuses.

Pour conclure, ce projet de recherche a permis de mettre en évidence que l'efficacité de la thérapie anti-PD-L1 peut être améliorée par l'ajout d'un inhibiteur de HSP110 en favorisant la mise en place d'un microenvironnement tumoral propice à la destruction des cellules cancéreuses. Néanmoins, ces résultats sont préliminaires et d'autres expériences sont nécessaires afin de confirmer ces effets et d'aller plus loin en identifiant le rôle d'autres cellules immunitaires dans ce contexte thérapeutique.

2. Ouverture sur un nouveau projet : optimiser l'efficacité des anti-PD-L1 par l'ajout d'un anti-LAG-3 dans un modèle de cancer colorectal

Au cours de cette thèse, nous avons pu observer que la double thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3 a réduit de manière importante la croissance tumorale comparée aux monothérapies anti-PD-L1 et anti-LAG-3. Très peu d'expériences ont pu être réalisées sur ce projet, ne permettant pas d'expliquer clairement comment agit la double thérapie. Néanmoins, les résultats obtenus permettent de confirmer un intérêt d'étudier cette combinaison thérapeutique dans le cancer colorectal. En effet, en plus d'un ralentissement de la croissance tumorale chez de nombreuses souris, la double thérapie a permis une régression complète des tumeurs chez 31% des souris (5/16). De plus, cette double thérapie semble avoir permis à ces souris de développer une mémoire immunitaire efficace puisque la réinjection des mêmes cellules cancéreuses n'a pas induit de reprise tumorale (ou très faiblement et qui s'est estompée au cours du temps). Un premier élément probablement lié à l'efficacité de la double thérapie pourrait être la sécrétion de GzB par les cellules $CD4^+$. En effet, malgré une absence de significativité qui vient du fait qu'une souris du groupe anti-PD-L1 a une valeur nettement différente des autres, une tendance à l'augmentation du nombre de cellules $CD4^+$ infiltrant les tumeurs capables de produire du GzB a été observée par rapport à tous les autres groupes et principalement le groupe non traité. Étant donné que cette analyse a été effectuée au jour 12 après injection des cellules cancéreuses et qu'à ce stade de l'expérience, la différence dans les volumes tumoraux entre les groupes était faible, il serait intéressant d'effectuer à nouveau cette analyse au jour 17 ou 19, où les différences au niveau de la croissance tumorale se voient davantage entre les groupes (**Figure 38C**). Par ailleurs, comme pour le projet anti-PD-L1/i007, il serait intéressant d'analyser plus précisément quel type de cellules $CD4^+$ sont impliquées dans la sécrétion du GzB.

Ces résultats étant préliminaires, de nombreuses autres expériences sont nécessaires afin de comprendre les types cellulaires impliqués dans la réponse immunitaire antitumorale ainsi que les molécules cytotoxiques et/ou cytokines produites au cours de cette réponse. Nous pourrions envisager par exemple de réaliser une analyse transcriptomique des ARNs présents en forte ou faible quantités dans les tumeurs des souris doublement traitées par rapport aux souris traitées uniquement avec des anti-PD-L1 ou anti-LAG-3 afin d'identifier les types cellulaires ou voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire antitumorale.

Nous pourrions également développer des panels de cytométrie beaucoup plus larges, permettant l'analyse d'une variété de cellules immunitaires et de cytokines présentes dans les tumeurs. Ce projet pourrait apporter des réponses intéressantes sur les mécanismes d'action de la thérapie anti-PD-L1/anti-LAG-3, d'autant plus que de nombreux essais cliniques testant l'efficacité de la combinaison anti-PD-1/anti-LAG-3 ont démontré une toxicité acceptable et une première conclusion intéressante sur l'efficacité de cette double thérapie a été apportée dans le mélanome [307,436,462]. Il serait également intéressant d'étudier l'effet de la combinaison anti-PD-L1/anti-LAG-3 par rapport à la combinaison anti-PD-1/anti-LAG-3 pour identifier un peu mieux s'il est plus pertinent d'utiliser des anti-PD-1 ou anti-PD-L1, question à laquelle il est difficile de répondre de nos jours. Un point crucial de la recherche étant également de trouver des biomarqueurs de réponse aux traitements, il serait intéressant de développer cet axe de recherche en parallèle.

VI. Conclusion générale

VI. Conclusion générale

Ce travail de thèse aura permis d'apporter des réponses concernant les éventuelles options qui pourraient optimiser l'efficacité de l'immunothérapie anti-PD-L1 dans le cancer colorectal. La principale option développée dans le cadre de ces travaux de thèse a été de combiner les anti-PD-L1 à un inhibiteur de la protéine HSP110 (i007). La double thérapie anti-PD-L1/i007 semble favoriser la mise en place d'un microenvironnement tumoral propice à la destruction des cellules cancéreuses en favorisant l'infiltration de cellules $CD8^+$, de cellules NK et la production de molécules cytotoxiques telles que le GzA, GzB, la perforine et l'IFNγ. Elle semble également limiter l'infiltration de macrophages de type M2 protumoraux. Une deuxième option thérapeutique a été proposée, celle de combiner des anti-PD-L1 à des anti-LAG-3, qui permettrait de réduire la croissance tumorale et probablement agir sur les cellules $CD4^+$ capables de sécréter du GzB.

VII. Références bibliographiques

VII. Références bibliographiques

1. Mullangi, S. & Lekkala, M. R. Adenocarcinoma. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
2. Popovich, J. R., Kashyap, S., Gasalberti, D. P. & Cassaro, S. Sarcoma. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
3. Jamil, A. & Mukkamalla, S. K. R. Lymphoma. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
4. Juliusson, G. & Hough, R. Leukemia. (2016) doi:10.1159/000447076.
5. Chennamadhavuni, A., Lyengar, V., Mukkamalla, S. K. R. & Shimanovsky, A. Leukemia. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
6. Siddiqui, I. A., Sanna, V., Ahmad, N., Sechi, M. & Mukhtar, H. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1348**, 20–31 (2015).
7. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
8. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* **12**, 31–46 (2022).
9. Sporn, M. B. & Roberts, A. B. Autocrine growth factors and cancer. *Nature* **313**, 745–747 (1985).
10. Marek, L. *et al.* Fibroblast Growth Factor (FGF) and FGF Receptor-Mediated Autocrine Signaling in Non-Small-Cell Lung Cancer Cells. *Mol Pharmacol* **75**, 196–207 (2009).
11. Deying, W. *et al.* CAF-derived HGF promotes cell proliferation and drug resistance by up-regulating the c-Met/PI3K/Akt and GRP78 signalling in ovarian cancer cells. *Biosci Rep* **37**, BSR20160470 (2017).
12. Cantwell-Dorris, E. R., O'Leary, J. J. & Sheils, O. M. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. *Molecular Cancer Therapeutics* **10**, 385–394 (2011).
13. Liu, D., Liu, Z., Condouris, S. & Xing, M. BRAF V600E Maintains Proliferation, Transformation, and Tumorigenicity of BRAF-Mutant Papillary Thyroid Cancer Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **92**, 2264–2271 (2007).
14. Kang, H.-B. *et al.* Metabolic rewiring by oncogenic BRAF V600E links ketogenesis pathway to BRAF-MEK1 signaling. *Mol Cell* **59**, 345–358 (2015).
15. Cooper, G. M. Tumor Suppressor Genes. in *The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition* (Sinauer Associates, 2000).
16. Joyce, C., Rayi, A. & Kasi, A. Tumor-Suppressor Genes. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
17. Xu, S., Zhan, M. & Wang, J. Epithelial-to-mesenchymal transition in gallbladder cancer: from clinical evidence to cellular regulatory networks. *Cell Death Discov.* **3**, 1–11 (2017).
18. Nijkamp, M. M. *et al.* Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiotherapy and Oncology* **99**, 344–348 (2011).
19. Nguyen, P. T. *et al.* N-cadherin expression is involved in malignant behavior of head and neck cancer in relation to epithelial-mesenchymal transition. *Histol Histopathol* **26**, 147–156 (2011).

20. Dukhanina, E. A., Portseva, T. N., Kotnova, A. P., Pankratova, E. V. & Georgieva, S. G. The Expression Level of S100A4 Protein Affects the Migration Activity of Breast Cancer Cells. *Dokl Biochem Biophys* **485**, 104–106 (2019).
21. Jun, B. H. *et al.* Fibronectin-Expressing Mesenchymal Tumor Cells Promote Breast Cancer Metastasis. *Cancers (Basel)* **12**, 2553 (2020).
22. Zhang, X., Mar, V., Zhou, W., Harrington, L. & Robinson, M. O. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* **13**, 2388–2399 (1999).
23. Ouellette, M. M., Wright, W. E. & Shay, J. W. Targeting telomerase-expressing cancer cells. *J Cell Mol Med* **15**, 1433–1442 (2011).
24. Victorelli, S. & Passos, J. F. Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not. *EBioMedicine* **21**, 14–20 (2017).
25. Patel, P. L., Suram, A., Mirani, N., Bischof, O. & Herbig, U. Derepression of hTERT gene expression promotes escape from oncogene-induced cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E5024–E5033 (2016).
26. Karami, E., Sabatier, J.-M., Behdani, M., Irani, S. & Kazemi-Lomedasht, F. A nanobody-derived mimotope against VEGF inhibits cancer angiogenesis. *J Enzyme Inhib Med Chem* **35**, 1233–1239 (2020).
27. Li, X. *et al.* FOXP3 inhibits angiogenesis by downregulating VEGF in breast cancer. *Cell Death Dis* **9**, 744 (2018).
28. Chatterjee, S. *et al.* Tumor VEGF:VEGFR2 autocrine feed-forward loop triggers angiogenesis in lung cancer. *J Clin Invest* **123**, 1732–1740 (2013).
29. Blagih, J. *et al.* Cancer-Specific Loss of p53 Leads to a Modulation of Myeloid and T Cell Responses. *Cell Rep* **30**, 481-496.e6 (2020).
30. Gobé, G., Rubin, M., Williams, G., Sawczuk, I. & Buttyan, R. Apoptosis and Expression of Bcl-2, Bcl-XL, and Bax in Renal Cell Carcinomas. *Cancer Investigation* **20**, 324–332 (2002).
31. Manoochehri, M., Karbasi, A., Bandehpour, M. & Kazemi, B. Down-regulation of BAX gene during carcinogenesis and acquisition of resistance to 5-FU in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* **20**, 301–307 (2014).
32. Hou, L. *et al.* [Role of dysregulation of Bim in resistance of melanoma cells to endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **33**, 494–498 (2011).
33. Hata, A. N. *et al.* Failure to induce apoptosis via BCL-2 family proteins underlies lack of efficacy of combined MEK and PI3K inhibitors for KRAS-mutant lung cancers. *Cancer Res* **74**, 3146–3156 (2014).
34. Guo, J. Y. *et al.* Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. *Genes Dev* **30**, 1704–1717 (2016).
35. Xia, L. *et al.* The cancer metabolic reprogramming and immune response. *Mol Cancer* **20**, 28 (2021).
36. Fischer, K. *et al.* Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. *Blood* **109**, 3812–3819 (2007).
37. Wei, X. *et al.* Genomic Instability Promotes the Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma Through Influencing the Immune Microenvironment. *Front Genet* **12**, 706661 (2021).
38. Mayca Pozo, F. *et al.* MYO10 drives genomic instability and inflammation in cancer. *Sci Adv* **7**, eabg6908 (2021).

39. Cartwright, A. N. R. *et al.* Immunosuppressive Myeloid Cells Induce Nitric Oxide-dependent DNA Damage and p53 Pathway Activation in CD8+ T cells. *Cancer Immunol Res* **9**, 470–485 (2021).
40. Noyes, D. *et al.* Tumor-associated Tregs obstruct antitumor immunity by promoting T cell dysfunction and restricting clonal diversity in tumor-infiltrating CD8+ T cells. *J Immunother Cancer* **10**, e004605 (2022).
41. Lesokhin, A. M. *et al.* Monocytic CCR2+ Myeloid-Derived Suppressor Cells Promote Immune Escape by Limiting Activated CD8 T-cell Infiltration into the Tumor Microenvironment. *Cancer Research* **72**, 876–886 (2012).
42. Morales-Valencia, J., Lau, L., Martí-Nin, T., Ozerdem, U. & David, G. Therapy-induced senescence promotes breast cancer cells plasticity by inducing Lipocalin-2 expression. *Oncogene* 10.1038/s41388-022-02433–4 (2022) doi:10.1038/s41388-022-02433-4.
43. Laberge, R.-M., Awad, P., Campisi, J. & Desprez, P.-Y. Epithelial-Mesenchymal Transition Induced by Senescent Fibroblasts. *Cancer Microenviron* **5**, 39–44 (2011).
44. Fu, A. *et al.* Tumor-resident intracellular microbiota promotes metastatic colonization in breast cancer. *Cell* **185**, 1356-1372.e26 (2022).
45. Kito, H. *et al.* Hypermethylation of the CD44 gene is associated with progression and metastasis of human prostate cancer. *Prostate* **49**, 110–115 (2001).
46. Li, Y. *et al.* RAB37 Hypermethylation Regulates Metastasis and Resistance to Docetaxel-Based Induction Chemotherapy in Nasopharyngeal Carcinoma. *Clin Cancer Res* **24**, 6495–6508 (2018).
47. Lu, J. *et al.* IRX1 hypomethylation promotes osteosarcoma metastasis via induction of CXCL14/NF-κB signaling. *J Clin Invest* **125**, 1839–1856 (2015).
48. Li, J. *et al.* Hypomethylated SPANXA1/A2 promotes the metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Med Oncol* **37**, 112 (2020).
49. Adebayo, A. S., Agbaje, K., Adesina, S. K. & Olajubutu, O. Colorectal Cancer: Disease Process, Current Treatment Options, and Future Perspectives. *Pharmaceutics* **15**, 2620 (2023).
50. Hossain, M. S. *et al.* Colorectal Cancer: A Review of Carcinogenesis, Global Epidemiology, Current Challenges, Risk Factors, Preventive and Treatment Strategies. *Cancers* **14**, 1732 (2022).
51. Jung, M.-K. *et al.* Is the Location of the Tumor Another Prognostic Factor for Patients With Colon Cancer? *Ann Coloproctol* **33**, 210–218 (2017).
52. Mangone, L. *et al.* Colon cancer survival differs from right side to left side and lymph node harvest number matter. *BMC Public Health* **21**, 906 (2021).
53. Menon, G., Recio-Boiles, A., Lotfollahzadeh, S. & Cagir, B. Colon Cancer. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
54. Lewandowska, A., Rudzki, G., Lewandowski, T., Stryjkowska-Góra, A. & Rudzki, S. Title: Risk Factors for the Diagnosis of Colorectal Cancer. *Cancer Control* **29**, 10732748211056692 (2022).
55. Fedirko, V. *et al.* Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann Oncol* **22**, 1958–1972 (2011).
56. Su, L. J. & Arab, L. Alcohol consumption and risk of colon cancer: evidence from the national health and nutrition examination survey I epidemiologic follow-up study. *Nutr Cancer* **50**, 111–119 (2004).
57. Ma, L. *et al.* Colorectal cancer risk in East Asian patients with Helicobacter pylori infection: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)* **102**, e33177 (2023).

58. Damin, D. C., Ziegelmann, P. K. & Damin, A. P. Human papillomavirus infection and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Colorectal Dis* **15**, e420-428 (2013).
59. Liu, T. *et al.* Hepatitis B virus infection and the risk of gastrointestinal cancers among Chinese population: A prospective cohort study. *Int J Cancer* **150**, 1018–1028 (2022).
60. Low, E. E. *et al.* Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **159**, 492-501.e7 (2020).
61. Singh, S., Singh, P. P., Murad, M. H., Singh, H. & Samadder, J. N. Prevalence, Risk Factors, and Outcomes of Interval Colorectal Cancers: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Official journal of the American College of Gastroenterology | ACG* **109**, 1375 (2014).
62. Sifaki-Pistolla, D. *et al.* Significant Rise of Colorectal Cancer Incidence in Younger Adults and Strong Determinants: 30 Years Longitudinal Differences between under and over 50s. *Cancers (Basel)* **14**, 4799 (2022).
63. Lui, R. N. *et al.* Global Increasing Incidence of Young-Onset Colorectal Cancer Across 5 Continents: A Joinpoint Regression Analysis of 1,922,167 Cases. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **28**, 1275–1282 (2019).
64. Lei, X., Song, S., Li, X., Geng, C. & Wang, C. Excessive Body Fat at a Young Age Increases the Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutr Cancer* **73**, 1601–1612 (2021).
65. Slattery, M. L. *et al.* Family history and colorectal cancer: predictors of risk. *Cancer Causes Control* **14**, 879–887 (2003).
66. Lowery, J. T. *et al.* Understanding the Contribution of Family History to Colorectal Cancer Risk and Its Clinical Implications: A State-of-the-Science Review. *Cancer* **122**, 2633–2645 (2016).
67. Bucksch, K. *et al.* Adenoma and colorectal cancer risks in Lynch syndrome, Lynch-like syndrome and familial colorectal cancer type X. *Int J Cancer* **150**, 56–66 (2022).
68. Olén, O. *et al.* Colorectal cancer in Crohn's disease: a Scandinavian population-based cohort study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **5**, 475–484 (2020).
69. Yang, T. *et al.* Work stress and the risk of cancer: A meta-analysis of observational studies. *Int J Cancer* **144**, 2390–2400 (2019).
70. Rosen, R. D. & Sapra, A. TNM Classification. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).
71. Gmeiner, W. H. Recent Advances in Therapeutic Strategies to Improve Colorectal Cancer Treatment. *Cancers (Basel)* **16**, 1029 (2024).
72. Lackman, M. J. & Wilkinson, A. N. Le cancer du côlon en soins primaires. *Can Fam Physician* **70**, e14–e19 (2024).
73. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version. in *PDQ Cancer Information Summaries* (National Cancer Institute (US), Bethesda (MD), 2024).
74. Wiela-Hojeńska, A., Kowalska, T., Filipczyk-Cisarż, E., Łapiński, Ł. & Nartowski, K. Evaluation of the Toxicity of AnticancerChemotherapy in Patients with Colon Cancer. *Adv Clin Exp Med* **24**, 103–111 (2015).
75. Börjeson, S., Starkhammar, H., Unosson, M. & Berterö, C. Common Symptoms and Distress Experienced Among Patients with Colorectal Cancer: A Qualitative part of Mixed Method Design. *Open Nurs J* **6**, 100–107 (2012).
76. Negarandeh, R. *et al.* Evaluation of adverse effects of chemotherapy regimens of 5-fluoropyrimidines derivatives and their association with DPYD polymorphisms in colorectal cancer patients. *BMC Cancer* **20**, 560 (2020).

77. Hernandez Dominguez, O., Yilmaz, S. & Steele, S. R. Stage IV Colorectal Cancer Management and Treatment. *J Clin Med* **12**, 2072 (2023).
78. Leowattana, W., Leowattana, P. & Leowattana, T. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* **29**, 1569–1588 (2023).
79. de Gramont, A. *et al.* Leucovorin and Fluorouracil With or Without Oxaliplatin as First-Line Treatment in Advanced Colorectal Cancer. *JCO* **18**, 2938–2947 (2000).
80. Douillard, J. Y. *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomised trial. *The Lancet* **355**, 1041–1047 (2000).
81. Falcone, A. *et al.* Phase III Trial of Infusional Fluorouracil, Leucovorin, Oxaliplatin, and Irinotecan (FOLFOXIRI) Compared With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) As First-Line Treatment for Metastatic Colorectal Cancer: The Gruppo Oncologico Nord Ovest. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 1670–6 (2007).
82. Cremolini, C. *et al.* Modified FOLFOXIRI plus panitumumab (mFOLFOXIRI/PAN) versus mFOLFOX6/PAN as initial treatment of patients with unresectable RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer (mCRC): Results of the phase III randomized TRIPLETE study by GONO. *JCO* **40**, LBA3505–LBA3505 (2022).
83. Jung, J. *et al.* Clinical efficacy of stereotactic ablative radiotherapy for lung metastases arising from colorectal cancer. *Radiation Oncology* **10**, 238 (2015).
84. Krasteva, N. & Georgieva, M. Promising Therapeutic Strategies for Colorectal Cancer Treatment Based on Nanomaterials. *Pharmaceutics* **14**, 1213 (2022).
85. Cortesi, E. *et al.* Efficacy and Tolerability of Selective Internal Radiotherapy With Yttrium-90 as Consolidation Treatment After Chemotherapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Clin Colorectal Cancer* **19**, e272–e276 (2020).
86. Li, X., Shen, J., Xia, F. & Zhu, J. Efficacy and safety of radiotherapy combined with raltitrexed and irinotecan for treating unresectable recurrent colorectal cancer: a single-arm phase II trial. *J Gastrointest Oncol* **13**, 1112–1120 (2022).
87. Zhai, M. *et al.* Efficacy and safety of radiotherapy combined with anti-angiogenic therapy and immune checkpoint inhibitors in MSS/pMMR metastatic colorectal cancer. *Cancer Med* **13**, e6820 (2023).
88. Jo, S. *et al.* Efficacy of Dose-Escalated Radiotherapy for Recurrent Colorectal Cancer. *Ann Coloproctol* **32**, 66–72 (2016).
89. Underwood, P. W., Ruff, S. M. & Pawlik, T. M. Update on Targeted Therapy and Immunotherapy for Metastatic Colorectal Cancer. *Cells* **13**, 245 (2024).
90. Qin, S. *et al.* Efficacy and Tolerability of First-Line Cetuximab Plus Leucovorin, Fluorouracil, and Oxaliplatin (FOLFOX-4) Versus FOLFOX-4 in Patients With RAS Wild-Type Metastatic Colorectal Cancer: The Open-Label, Randomized, Phase III TAILOR Trial. *Journal of Clinical Oncology* **36**, 3031 (2018).
91. Peeters, M. *et al.* Randomized Phase III Study of Panitumumab With Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan (FOLFIRI) Compared With FOLFIRI Alone As Second-Line Treatment in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *JCO* **28**, 4706–4713 (2010).
92. Hurwitz Herbert *et al.* Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* **350**, 2335–2342 (2004).

93. Van Cutsem, E. *et al.* Addition of Aflibercept to Fluorouracil, Leucovorin, and Irinotecan Improves Survival in a Phase III Randomized Trial in Patients With Metastatic Colorectal Cancer Previously Treated With an Oxaliplatin-Based Regimen. *JCO* **30**, 3499–3506 (2012).
94. Strickler, J. H. *et al.* Tucatinib plus trastuzumab for chemotherapy-refractory, HER2-positive, RAS wild-type unresectable or metastatic colorectal cancer (MOUNTAINEER): a multicentre, open-label, phase 2 study. *The Lancet Oncology* **24**, 496–508 (2023).
95. Doebele, R. C. *et al.* Entrectinib in patients with advanced or metastatic NTRK fusion-positive solid tumours: integrated analysis of three phase 1–2 trials. *Lancet Oncol* **21**, 271–282 (2020).
96. Hong, D. S. *et al.* Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. *Lancet Oncol* **21**, 531–540 (2020).
97. André Thierry *et al.* Pembrolizumab in Microsatellite-Instability–High Advanced Colorectal Cancer. *New England Journal of Medicine* **383**, 2207–2218 (2020).
98. Overman, M. J. *et al.* Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair deficient/microsatellite instability–high colorectal cancer (CheckMate 142): results of an open-label, multicentre, phase 2 study. *Lancet Oncol* **18**, 1182–1191 (2017).
99. Lenz, H.-J. *et al.* First-Line Nivolumab Plus Low-Dose Ipilimumab for Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: The Phase II CheckMate 142 Study. *Journal of Clinical Oncology* **40**, 161–170 (2022).
100. Collura, A. *et al.* Instabilité des microsatellites et cancer - De l'instabilité du génome à la médecine personnalisée. *Med Sci (Paris)* **35**, 535–543 (2019).
101. Evrard, C., Tachon, G., Randrian, V., Karayan-Tapon, L. & Tougeron, D. Microsatellite Instability: Diagnosis, Heterogeneity, Discordance, and Clinical Impact in Colorectal Cancer. *Cancers* **11**, 1567 (2019).
102. Evrard, C. *et al.* Heterogeneity of Mismatch Repair Status and Microsatellite Instability between Primary Tumour and Metastasis and Its Implications for Immunotherapy in Colorectal Cancers. *Int J Mol Sci* **23**, 4427 (2022).
103. Vilar, E. & Gruber, S. B. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 153–162 (2010).
104. Hernandez, C., Huebener, P. & Schwabe, R. F. Damage-associated molecular patterns in cancer: A double-edged sword. *Oncogene* **35**, 5931–5941 (2016).
105. Hayashi, K. *et al.* Tipping the immunostimulatory and inhibitory DAMP balance to harness immunogenic cell death. *Nat Commun* **11**, 6299 (2020).
106. Garg, A. D. *et al.* A novel pathway combining calreticulin exposure and ATP secretion in immunogenic cancer cell death. *EMBO J* **31**, 1062–1079 (2012).
107. Demaria, O. *et al.* Harnessing innate immunity in cancer therapy. *Nature* **574**, 45–56 (2019).
108. Maiorino, L., Daßler-Plenker, J., Sun, L. & Egeblad, M. Innate Immunity and Cancer Pathophysiology. *Annual review of pathology* **17**, 425 (2022).
109. Man, S. M. & Jenkins, B. J. Context-dependent functions of pattern recognition receptors in cancer. *Nat Rev Cancer* **22**, 397–413 (2022).
110. Fang, H. *et al.* TLR4 is essential for dendritic cell activation and anti-tumor T-cell response enhancement by DAMPs released from chemically stressed cancer cells. *Cell Mol Immunol* **11**, 150–159 (2014).
111. Sosa Cuevas, E. *et al.* Unique CLR expression patterns on circulating and tumor-infiltrating DC subsets correlated with clinical outcome in melanoma patients. *Front Immunol* **13**, 1040600 (2022).

112. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
113. Aristizábal, B. & González, Á. Innate immune system. in *Autoimmunity: From Bench to Bedside [Internet]* (El Rosario University Press, 2013).
114. Kim, S.-H. *et al.* Enhancement of the Anticancer Ability of Natural Killer Cells through Allogeneic Mitochondrial Transfer. *Cancers (Basel)* **15**, 3225 (2023).
115. Nouri-Shirazi, M. *et al.* Dendritic Cells Capture Killed Tumor Cells and Present Their Antigens to Elicit Tumor-Specific Immune Responses1. *The Journal of Immunology* **165**, 3797–3803 (2000).
116. Moriya, T. *et al.* Immunogenic tumor cell death promotes dendritic cell migration and inhibits tumor growth via enhanced T cell immunity. *iScience* **24**, 102424 (2021).
117. Spurrell, E. L. & Lockley, M. Adaptive immunity in cancer immunology and therapeutics. *Ecancermedicalscience* **8**, 441 (2014).
118. Sloan, J. M. *et al.* MHC class I and class II Presentation of Tumor Antigen in Retrovirally and Adenovirally Transduced Dendritic Cells. *Cancer Gene Ther* **9**, 946–950 (2002).
119. Kanda, Y., Okazaki, T. & Katakai, T. Motility Dynamics of T Cells in Tumor-Draining Lymph Nodes: A Rational Indicator of Antitumor Response and Immune Checkpoint Blockade. *Cancers (Basel)* **13**, 4616 (2021).
120. Binnewies, M. *et al.* Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T cell Immunity. *Cell* **177**, 556-571.e16 (2019).
121. Chang, R. B. & Beatty, G. L. The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *J Leukoc Biol* **108**, 363–376 (2020).
122. Corrales, L., Matson, V., Flood, B., Spranger, S. & Gajewski, T. F. Innate immune signaling and regulation in cancer immunotherapy. *Cell Res* **27**, 96–108 (2017).
123. Viana, I. M. de O. *et al.* Innate and adaptive immune responses toward nanomedicines. *Acta Pharm Sin B* **11**, 852–870 (2021).
124. Corthay, A. *et al.* Primary Antitumor Immune Response Mediated by CD4+ T Cells. *Immunity* **22**, 371–383 (2005).
125. Celli, S., Lemaître, F. & Bousso, P. Real-Time Manipulation of T Cell-Dendritic Cell Interactions In Vivo Reveals the Importance of Prolonged Contacts for CD4+ T Cell Activation. *Immunity* **27**, 625–634 (2007).
126. Mikucki, M. *et al.* Non-redundant Requirement for CXCR3 Signaling during Tumoricidal T Cell Trafficking across Tumor Vascular Checkpoints. *Nat Commun* **6**, 7458 (2015).
127. Zhang, G., Zheng, G., Jiang, F., Wu, T. & Wu, L. Granzyme B and perforin produced by SEC2 mutant-activated human CD4+ T cells and CD8+ T cells induce apoptosis of K562 leukemic cells by the mitochondrial apoptotic pathway. *International Journal of Biological Macromolecules* **190**, 284–290 (2021).
128. Tan, R., Nie, M. & Long, W. The role of B cells in cancer development. *Frontiers in Oncology* **12**, (2022).
129. Pavoni, E. *et al.* Tumor-infiltrating B lymphocytes as an efficient source of highly specific immunoglobulins recognizing tumor cells. *BMC Biotechnol* **7**, 70 (2007).
130. Lebegge, E. *et al.* Innate Immune Defense Mechanisms by Myeloid Cells That Hamper Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
131. Daugan, M., Noe, R., Herman Fridman, W., Sautes-Fridman, C. & Roumenina, L. T. Le système du complément: Une épée à double tranchant dans la progression tumorale. *Med Sci (Paris)* **33**, 871–877 (2017).

132. Peters, C. & Brown, S. Antibody–drug conjugates as novel anti-cancer chemotherapeutics. *Biosci Rep* **35**, e00225 (2015).
133. Ain, D., Shaikh, T., Manimala, S. & Ghebrehiwet, B. The role of complement in the tumor microenvironment. *Faculty Reviews* **10**, (2021).
134. Golay, J. & Taylor, R. P. The Role of Complement in the Mechanism of Action of Therapeutic Anti-Cancer mAbs. *Antibodies (Basel)* **9**, 58 (2020).
135. Lee, C.-H. *et al.* IgG Fc domains that bind C1q but not effector Fcγ receptors delineate the importance of complement-mediated effector functions. *Nat Immunol* **18**, 889–898 (2017).
136. Wennhold, K. *et al.* CD86+ Antigen-Presenting B Cells Are Increased in Cancer, Localize in Tertiary Lymphoid Structures, and Induce Specific T-cell Responses. *Cancer Immunology Research* **9**, 1098–1108 (2021).
137. Pan, Y., Yu, Y., Wang, X. & Zhang, T. Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity. *Front Immunol* **11**, 583084 (2020).
138. Yuan, A. *et al.* Opposite Effects of M1 and M2 Macrophage Subtypes on Lung Cancer Progression. *Sci Rep* **5**, 14273 (2015).
139. Ma, J. *et al.* The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* **10**, 112 (2010).
140. Soldano, S. *et al.* Increase in circulating cells coexpressing M1 and M2 macrophage surface markers in patients with systemic sclerosis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **77**, 1842–1845 (2018).
141. Liu, B., Zhang, M., Zhao, J., Zheng, M. & Yang, H. Imbalance of M1/M2 macrophages is linked to severity level of knee osteoarthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine* **16**, 5009–5014 (2018).
142. Helm, O. *et al.* Tumor-associated macrophages exhibit pro- and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *International Journal of Cancer* **135**, 843–861 (2014).
143. Feito, M. J. *et al.* Characterization of M1 and M2 polarization phenotypes in peritoneal macrophages after treatment with graphene oxide nanosheets. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **176**, 96–105 (2019).
144. Haloul, M. *et al.* mTORC1-mediated polarization of M1 macrophages and their accumulation in the liver correlate with immunopathology in fatal ehrlichiosis. *Sci Rep* **9**, 14050 (2019).
145. Olsson, A. *et al.* Tasquinimod triggers an early change in the polarization of tumor associated macrophages in the tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* **3**, 53 (2015).
146. Verreck, F. A. W. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4560–4565 (2004).
147. Garrido-Martin, E. M. *et al.* M1hot tumor-associated macrophages boost tissue-resident memory T cells infiltration and survival in human lung cancer. *J Immunother Cancer* **8**, e000778 (2020).
148. Ohri, C. M., Shikotra, A., Green, R. H., Waller, D. A. & Bradding, P. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *European Respiratory Journal* **33**, 118–126 (2009).
149. Macciò, A. *et al.* Role of M1-polarized tumor-associated macrophages in the prognosis of advanced ovarian cancer patients. *Sci Rep* **10**, 6096 (2020).
150. Zhang, Q. & Sioud, M. Tumor-Associated Macrophage Subsets: Shaping Polarization and Targeting. *International Journal of Molecular Sciences* **24**, 7493 (2023).

151. Wang, Y. *et al.* Macrophage-derived extracellular vesicles: diverse mediators of pathology and therapeutics in multiple diseases. *Cell Death Dis* **11**, 1–18 (2020).
152. Little, A. C. *et al.* IL-4/IL-13 Stimulated Macrophages Enhance Breast Cancer Invasion Via Rho-GTPase Regulation of Synergistic VEGF/CCL-18 Signaling. *Front Oncol* **9**, 456 (2019).
153. Wang, L., Zhang, S., Wu, H., Rong, X. & Guo, J. M2b macrophage polarization and its roles in diseases. *J Leukoc Biol* **106**, 345–358 (2019).
154. Liu, S. *et al.* CD4+CCR8+ Tregs in ovarian cancer: a potential effector Tregs for immune regulation. *J Transl Med* **21**, 803 (2023).
155. Zizzo, G., Hilliard, B. A., Monestier, M. & Cohen, P. L. Efficient clearance of early apoptotic cells by human macrophages requires "M2c" polarization and MerTK induction. *J Immunol* **189**, 3508–3520 (2012).
156. Gao, J., Liang, Y. & Wang, L. Shaping Polarization Of Tumor-Associated Macrophages In Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022).
157. Lee, H.-G., Cho, M.-J. & Choi, J.-M. Bystander CD4+ T cells: crossroads between innate and adaptive immunity. *Exp Mol Med* **52**, 1255–1263 (2020).
158. Thierry, K. & Ménétrier-Caux, C. Le rôle des lymphocytes T régulateurs dans l'activité antitumorale des anticorps anti-CTLA-4. *Med Sci (Paris)* **36**, 73–76 (2020).
159. Topalian, S. L., Taube, J. M., Anders, R. A. & Pardoll, D. M. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **16**, 275–287 (2016).
160. Swain, S. L., McKinstry, K. K. & Strutt, T. M. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol* **12**, 136–148 (2012).
161. Guy, T. V. *et al.* Collaboration between tumor-specific CD4+ T cells and B cells in anti-cancer immunity. *Oncotarget* **7**, 30211–30229 (2016).
162. Flamand, V. La tolérance néonatale aux allo-antigènes. *Neonatal tolerance to alloantigens* (2014) doi:10.1051/medsci/20143002014.
163. Rouers, A., Jeger-Madiot, R., Moris, A. & Graff-Dubois, S. Lymphocytes T folliculaires helper et VIH - Unis pour le meilleur et pour le pire. *Med Sci (Paris)* **33**, 878–886 (2017).
164. Vegran, F., Martin, F., Apetoh, L. & Ghiringhelli, F. Les lymphocytes Th9 - Une nouvelle population de lymphocytes T auxiliaires dans la lutte contre le cancer. *Med Sci (Paris)* **32**, 387–393 (2016).
165. Wang, Z.-N., Xu, T. & Liu, K.-S. Research progress on Th22 cells and related cytokines in tumors: current status and future perspectives. *Am J Cancer Res* **13**, 3315–3323 (2023).
166. 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).
167. Haabeth, O. A. W. *et al.* Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat Commun* **2**, 240 (2011).
168. Bronger, H. *et al.* CXCL9 and CXCL10 predict survival and are regulated by cyclooxygenase inhibition in advanced serous ovarian cancer. *Br J Cancer* **115**, 553–563 (2016).
169. Ma, Y. *et al.* Delivery of CXCL9/10/11 plasmid DNAs promotes the tumor-infiltration of T cells and synergizes with PD1 antibody for treating lung cancer. *Cancer Nanotechnology* **13**, 10 (2022).
170. Lu, Y. *et al.* Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4+ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* **33**, 1048-1060.e7 (2018).
171. Chauhan, S. R. *et al.* Th9 cytokines curb cervical cancer progression and immune evasion. *Human Immunology* **80**, 1020–1025 (2019).

172. Jiang, Y. *et al.* TNF-α enhances Th9 cell differentiation and antitumor immunity via TNFR2-dependent pathways. *J Immunother Cancer* **7**, 28 (2019).
173. Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin 9. *Nat Med* **18**, 1248–1253 (2012).
174. Wang, C. *et al.* Th9 cells are subjected to PD-1/PD-L1-mediated inhibition and are capable of promoting CD8 T cell expansion through IL-9R in colorectal cancer. *International Immunopharmacology* **78**, 106019 (2020).
175. Lu, Y. *et al.* Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest* **122**, 4160–4171 (2012).
176. You, F.-P. *et al.* Th9 cells promote antitumor immunity via IL-9 and IL-21 and demonstrate atypical cytokine expression in breast cancer. *Int Immunopharmacol* **52**, 163–167 (2017).
177. Wang, J. *et al.* IL-9 Exerts Antitumor Effects in Colon Cancer and Transforms the Tumor Microenvironment In Vivo. *Technol Cancer Res Treat* **18**, 1533033819857737 (2019).
178. Hou, Y. *et al.* Regulation of follicular T helper cell differentiation in antitumor immunity. *International Journal of Cancer* **153**, 265–277 (2023).
179. Lin, X. *et al.* Follicular Helper T Cells Remodel the Immune Microenvironment of Pancreatic Cancer via Secreting CXCL13 and IL-21. *Cancers (Basel)* **13**, 3678 (2021).
180. Niogret, J. *et al.* Follicular helper-T cells restore CD8+-dependent antitumor immunity and anti-PD-L1/PD-1 efficacy. *J Immunother Cancer* **9**, e002157 (2021).
181. Timperi, E. *et al.* Regulatory T cells with multiple suppressive and potentially pro-tumor activities accumulate in human colorectal cancer. *Oncoimmunology* **5**, e1175800 (2016).
182. Strauss, L. *et al.* A Unique Subset of CD4+CD25highFoxp3+ T Cells Secreting Interleukin-10 and Transforming Growth Factor-β1 Mediates Suppression in the Tumor Microenvironment. *Clinical Cancer Research* **13**, 4345–4354 (2007).
183. Ohue, Y. & Nishikawa, H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci* **110**, 2080–2089 (2019).
184. Hu, C. Y. *et al.* Interleukin-2 reverses CD8+ T cell exhaustion in clinical malignant pleural effusion of lung cancer. *Clin Exp Immunol* **186**, 106–114 (2016).
185. Aspuria, P.-J. *et al.* An orthogonal IL-2 and IL-2Rβ system drives persistence and activation of CAR T cells and clearance of bulky lymphoma. *Science Translational Medicine* **13**, eabg7565 (2021).
186. Ni, X. *et al.* YAP Is Essential for Treg-Mediated Suppression of Antitumor Immunity. *Cancer Discov* **8**, 1026–1043 (2018).
187. Shi, L. *et al.* Adenosine Generated by Regulatory T Cells Induces CD8+ T Cell Exhaustion in Gastric Cancer through A2aR Pathway. *Biomed Res Int* **2019**, 4093214 (2019).
188. Yao, Y. *et al.* Th22 Cells/IL-22 Serves as a Protumor Regulator to Drive Poor Prognosis through the JAK-STAT3/MAPK/AKT Signaling Pathway in Non-Small-Cell Lung Cancer. *J Immunol Res* **2022**, 8071234 (2022).
189. Huang, Y.-H., Cao, Y.-F., Jiang, Z.-Y., Zhang, S. & Gao, F. Th22 cell accumulation is associated with colorectal cancer development. *World J Gastroenterol* **21**, 4216–4224 (2015).
190. Wang, S., Yao, Y., Yao, M., Fu, P. & Wang, W. Interleukin-22 promotes triple negative breast cancer cells migration and paclitaxel resistance through JAK-STAT3/MAPKs/AKT signaling pathways. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **503**, 1605–1609 (2018).
191. Di Lullo, G. *et al.* Th22 cells increase in poor prognosis multiple myeloma and promote tumor cell growth and survival. *Oncoimmunology* **4**, e1005460 (2015).

192. Qin, S. *et al.* Th22 cells are associated with hepatocellular carcinoma development and progression. *Chin J Cancer Res* **26**, 135–141 (2014).
193. Liu, T. *et al.* Increased Circulating Th22 and Th17 Cells are Associated with Tumor Progression and Patient Survival in Human Gastric Cancer. *J Clin Immunol* **32**, 1332–1339 (2012).
194. Su, H. *et al.* Th2 cells infiltrating high-grade serous ovarian cancer: a feature that may account for the poor prognosis. *J Gynecol Oncol* **34**, e48 (2023).
195. Xiao, Y., Huang, Y., Jiang, J., Chen, Y. & Wei, C. Identification of the prognostic value of Th1/Th2 ratio and a novel prognostic signature in basal-like breast cancer. *Hereditas* **160**, 2 (2023).
196. Mori, T., Takada, R., Watanabe, R., Okamoto, S. & Ikeda, Y. T-helper (Th)1/Th2 imbalance in patients with previously untreated B-cell diffuse large cell lymphoma. *Cancer Immunol Immunother* **50**, 566–568 (2001).
197. Lorvik, K. B. *et al.* Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response. *Cancer Research* **76**, 6864–6876 (2016).
198. Jacenik, D., Karagiannidis, I. & Beswick, E. J. Th2 cells inhibit growth of colon and pancreas cancers by promoting anti-tumorigenic responses from macrophages and eosinophils. *Br J Cancer* **128**, 387–397 (2023).
199. Boieri, M. *et al.* CD4+ T helper 2 cells suppress breast cancer by inducing terminal differentiation. *J Exp Med* **219**, e20201963 (2022).
200. Kinoshita, M. *et al.* Heterogeneity of Treg/Th17 According to Cancer Progression and Modification in Biliary Tract Cancers via Self-Producing Cytokines. *Dig Dis Sci* **65**, 2937–2948 (2020).
201. Duan, Z. *et al.* Th17 cells promote tumor growth in an immunocompetent orthotopic mouse model of prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol* **7**, 249–261 (2019).
202. Zhang, Q. *et al.* Targeting Th17-IL-17 pathway in prevention of micro-invasive prostate cancer in a mouse model. *Prostate* **77**, 888–899 (2017).
203. Salazar, Y. *et al.* Microenvironmental Th9 and Th17 lymphocytes induce metastatic spreading in lung cancer. *The Journal of Clinical Investigation* **130**, 3560 (2020).
204. Peng, D. H. *et al.* Th17 cells contribute to combination MEK inhibitor and anti-PD-L1 therapy resistance in KRAS/p53 mutant lung cancers. *Nat Commun* **12**, 2606 (2021).
205. He, S. *et al.* Distribution and Clinical Significance of Th17 Cells in the Tumor Microenvironment and Peripheral Blood of Pancreatic Cancer Patients. *Int J Mol Sci* **12**, 7424–7437 (2011).
206. Muranski, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362–373 (2008).
207. Curd, L. M., Favors, S. E. & Gregg, R. K. Pro-tumour activity of interleukin-22 in HPAFII human pancreatic cancer cells. *Clin Exp Immunol* **168**, 192–199 (2012).
208. Wang, D. *et al.* Th17 cells inhibit CD8+ T cell migration by systematically downregulating CXCR3 expression via IL-17A/STAT3 in advanced-stage colorectal cancer patients. *J Hematol Oncol* **13**, 68 (2020).
209. Nuñez, S. *et al.* T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. *Immunology* **139**, 61–71 (2013).
210. Farhood, B., Najafi, M. & Mortezaee, K. CD8+ cytotoxic T lymphocytes in cancer immunotherapy: A review. *Journal of Cellular Physiology* **234**, 8509–8521 (2019).

211. Wang, W. *et al.* CD8+ T cells regulate tumor ferroptosis during cancer immunotherapy. *Nature* **569**, 270–274 (2019).
212. Zhang, Z. *et al.* Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity. *Nature* **579**, 415–420 (2020).
213. Xu, H.-Y. *et al.* CD8+ T cells stimulated by exosomes derived from RenCa cells mediate specific immune responses through the FasL/Fas signaling pathway and, combined with GM-CSF and IL-12, enhance the anti-renal cortical adenocarcinoma effect. *Oncology Reports* **42**, 866–879 (2019).
214. Barry, M. & Bleackley, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**, 401–409 (2002).
215. St. Paul, M. & Ohashi, P. S. The Roles of CD8+ T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends in Cell Biology* **30**, 695–704 (2020).
216. Mittrücker, H.-W., Visekruna, A. & Huber, M. Heterogeneity in the Differentiation and Function of CD8+ T Cells. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **62**, 449–458 (2014).
217. Koh, C.-H., Lee, S., Kwak, M., Kim, B.-S. & Chung, Y. CD8 T-cell subsets: heterogeneity, functions, and therapeutic potential. *Exp Mol Med* **55**, 2287–2299 (2023).
218. Kim, B.-S. *et al.* Type 17 immunity promotes the exhaustion of CD8+ T cells in cancer. *J Immunother Cancer* **9**, e002603 (2021).
219. Ye, Z. *et al.* Type 1 CD8+ T Cells are Superior to Type 2 CD8+ T Cells in Tumor Immunotherapy due to Their Efficient Cytotoxicity, Prolonged Survival and Type 1 Immune Modulation. *Molecular Immunology* **4**, (2007).
220. Dobrzanski, M. J., Reome, J. B. & Dutton, R. W. Type 1 and Type 2 CD8+ Effector T Cell Subpopulations Promote Long-Term Tumor Immunity and Protection to Progressively Growing Tumor1. *The Journal of Immunology* **164**, 916–925 (2000).
221. Sasaki, T. *et al.* Antitumor activity of chimeric immunoreceptor gene-modified Tc1 and Th1 cells against autologous carcinoembryonic antigen-expressing colon cancer cells. *Cancer Science* **97**, 920–927 (2006).
222. Yu, Y. *et al.* Adoptive transfer of Tc1 or Tc17 cells elicits anti-tumor immunity against established melanoma through distinct mechanisms. *J Immunol* **190**, 1873–1881 (2013).
223. Liu, N. *et al.* IL-33 drives the antitumor effects of dendritic cells via the induction of Tc9 cells. *Cell Mol Immunol* **16**, 644–651 (2019).
224. Lu, Y. *et al.* Tumor-specific IL-9–producing CD8+ Tc9 cells are superior effector than type-I cytotoxic Tc1 cells for adoptive immunotherapy of cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 2265–2270 (2014).
225. Xiao, L. *et al.* IL-9/STAT3/fatty acid oxidation–mediated lipid peroxidation contributes to Tc9 cell longevity and enhanced antitumor activity. *The Journal of Clinical Investigation* **132**, (2022).
226. St. Paul, M. *et al.* IL6 Induces an IL22+ CD8+ T-cell Subset with Potent Antitumor Function. *Cancer Immunology Research* **8**, 321–333 (2020).
227. Liu, C.-H. *et al.* Adoptive transfer of IL-4 reprogrammed Tc17 cells elicits anti-tumour immunity through functional plasticity. *Immunology* **166**, 310–326 (2022).
228. Kim, H.-J., Verbinnen, B., Tang, X., Lu, L. & Cantor, H. Inhibition of follicular T helper cells by CD8+ Treg is essential for self tolerance. *Nature* **467**, 328–332 (2010).
229. Gumperz, J. E. *et al.* Murine CD1d-Restricted T Cell Recognition of Cellular Lipids. *Immunity* **12**, 211–221 (2000).

230. Almeida, C. F. *et al.* Distinct CD1d docking strategies exhibited by diverse Type II NKT cell receptors. *Nat Commun* **10**, 5242 (2019).
231. Terabe, M. & Berzofsky, J. A. The Role of NKT Cells in Tumor Immunity. *Adv Cancer Res* **101**, 277–348 (2008).
232. Najera Chuc, A. E., Cervantes, L. A. M., Retiguin, F. P., Ojeda, J. V. & Maldonado, E. R. Low number of invariant NKT cells is associated with poor survival in acute myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol* **138**, 1427–1432 (2012).
233. Molling, J. W. *et al.* Low Levels of Circulating Invariant Natural Killer T Cells Predict Poor Clinical Outcome in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JCO* **25**, 862–868 (2007).
234. Scherrer, D. *et al.* Demonstration of the Antitumor Activity of the iNKT Agonist ABX196, a Novel Enhancer of Cancer Immunotherapy, in Melanoma and Hepatocarcinoma Mouse Models. *Mol Cancer Ther* **21**, 1788–1797 (2022).
235. Makita, Y. *et al.* Activated iNKT cells enhance the anti-tumor effect of antigen specific CD8 T cells on mesothelin-expressing salivary gland cancer. *BMC Cancer* **18**, (2018).
236. Aoki, T. *et al.* Activated invariant natural killer T cells directly recognize leukemia cells in a CD1d-independent manner. *Cancer Sci* **111**, 2223–2233 (2020).
237. Renukaradhya, G. J. *et al.* Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. *Blood* **111**, 5637–5645 (2008).
238. Ambrosino, E. *et al.* Cross-Regulation between Type I and Type II NKT Cells in Regulating Tumor Immunity: A New Immunoregulatory Axis1. *The Journal of Immunology* **179**, 5126–5136 (2007).
239. Izhak, L. *et al.* Delicate balance among three types of T cells in concurrent regulation of tumor immunity. *Cancer Res* **73**, 1514–1523 (2013).
240. Terabe, M. *et al.* A nonclassical non-Vα14Jα18 CD1d-restricted (type II) NKT cell is sufficient for down-regulation of tumor immunosurveillance. *J Exp Med* **202**, 1627–1633 (2005).
241. Park, J. H. & Lee, H. K. Function of γδ T cells in tumor immunology and their application to cancer therapy. *Exp Mol Med* **53**, 318–327 (2021).
242. Deng, J. & Yin, H. Gamma delta (γδ) T cells in cancer immunotherapy; where it comes from, where it will go? *European Journal of Pharmacology* **919**, 174803 (2022).
243. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* **21**, 938–945 (2015).
244. Yazdanifar, M., Barbarito, G., Bertaina, A. & Airoldi, I. γδ T Cells: The Ideal Tool for Cancer Immunotherapy. *Cells* **9**, 1305 (2020).
245. Ribot, J. C., Ribeiro, S. T., Correia, D. V., Sousa, A. E. & Silva-Santos, B. Human γδ Thymocytes Are Functionally Immature and Differentiate into Cytotoxic Type 1 Effector T Cells upon IL-2/IL-15 Signaling. *The Journal of Immunology* **192**, 2237–2243 (2014).
246. Wakita, D. *et al.* Tumor-infiltrating IL-17-producing γδ T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *European Journal of Immunology* **40**, 1927–1937 (2010).
247. Curti, B. D. *et al.* OX40 is a potent immune stimulating target in late stage cancer patients. *Cancer Res* **73**, 7189–7198 (2013).
248. Dardalhon, V. *et al.* Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *J Immunol* **185**, 1383–1392 (2010).
249. Möller, K. *et al.* Tumor cell PD-L1 expression is a strong predictor of unfavorable prognosis in immune checkpoint therapy-naive clear cell renal cell cancer. *Int Urol Nephrol* **53**, 2493–2503 (2021).

250. Sato, T. *et al.* Immunolocalization of CD80 and CD86 in Non-Small Cell Lung Carcinoma: CD80 as a Potent Prognostic Factor. *Acta Histochem Cytochem* **55**, 25–35 (2022).
251. Mellman, I., Coukos, G. & Dranoff, G. Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* **480**, 480–489 (2011).
252. Leach, D. R., Krummel, M. F. & Allison, J. P. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* **271**, 1734–1736 (1996).
253. Ishida, Y., Agata, Y., Shibahara, K. & Honjo, T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J* **11**, 3887–3895 (1992).
254. Vandenborre, K. *et al.* Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. *Immunology* **98**, 413–421 (1999).
255. Trzupek, D. *et al.* Discovery of CD80 and CD86 as recent activation markers on regulatory T cells by protein-RNA single-cell analysis. *Genome Med* **12**, 55 (2020).
256. Köchli, C. *et al.* CD80 and CD86 costimulatory molecules on circulating T cells of HIV infected individuals. *Immunol Lett* **65**, 197–201 (1999).
257. van Rijt, L. S. *et al.* Essential role of dendritic cell CD80/CD86 costimulation in the induction, but not reactivation, of TH2 effector responses in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 166–173 (2004).
258. Furuse, M. *et al.* PD-L1 and PD-L2 expression in the tumor microenvironment including peritumoral tissue in primary central nervous system lymphoma. *BMC Cancer* **20**, 277 (2020).
259. Imai, M. *et al.* Association of PD-L1 and PD-L2 expression and tumor-infiltrating lymphocytes in BRAF V600E-mutated metastatic colorectal cancer: GI-SCREEN post-hoc analysis. *ESMO Gastrointestinal Oncology* **2**, (2023).
260. Lu, C., Redd, P. S., Lee, J. R., Savage, N. & Liu, K. The expression profiles and regulation of PD-L1 in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *Oncoimmunology* **5**, e1247135 (2016).
261. Kawashima, M. *et al.* PD-L1/L2 protein levels rapidly increase on monocytes via trogocytosis from tumor cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia* **34**, 2405–2417 (2020).
262. Latchman, Y. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol* **2**, 261–268 (2001).
263. Ghiotto, M. *et al.* PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol* **22**, 651–660 (2010).
264. Wang, L. *et al.* Research progress of biomarkers in the prediction of anti-PD-1/PD-L1 immunotherapeutic efficiency in lung cancer. *Front Immunol* **14**, 1227797 (2023).
265. Buchbinder, E. I. & Desai, A. CTLA-4 and PD-1 Pathways. *Am J Clin Oncol* **39**, 98–106 (2016).
266. Adachi, K. & Tamada, K. Immune checkpoint blockade opens an avenue of cancer immunotherapy with a potent clinical efficacy. *Cancer Sci* **106**, 945–950 (2015).
267. Khan, M., Zhao, Z., Arooj, S., Fu, Y. & Liao, G. Soluble PD-1: Predictive, Prognostic, and Therapeutic Value for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
268. Escors, D. *et al.* The intracellular signalosome of PD-L1 in cancer cells. *Sig Transduct Target Ther* **3**, 1–9 (2018).
269. Philips, E. A. *et al.* The structural features that distinguish PD-L2 from PD-L1 emerged in placental mammals. *Journal of Biological Chemistry* **295**, 4372–4380 (2020).
270. Waldman, A. D., Fritz, J. M. & Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat Rev Immunol* **20**, 651–668 (2020).

271. Zhou, S. *et al.* Anti-tumour potential of PD-L1/PD-1 post-translational modifications. *Immunology* **167**, 471–481 (2022).
272. Dieu-Nosjean, M.-C. & Caux, C. La biologie des cibles PD-1 et CTLA-4 et la question des biomarqueurs. *Med Sci (Paris)* **35**, 957–965 (2019).
273. Abiko, K. *et al.* IFN-γ from lymphocytes induces PD-L1 expression and promotes progression of ovarian cancer. *Br J Cancer* **112**, 1501–1509 (2015).
274. Twomey, J. D. & Zhang, B. Cancer Immunotherapy Update: FDA-Approved Checkpoint Inhibitors and Companion Diagnostics. *AAPS J* **23**, 39 (2021).
275. Córdova-Bahena, L. & Velasco-Velázquez, M. A. Anti-PD-1 And Anti-PD-L1 Antibodies as Immunotherapy Against Cancer: A Structural Perspective. *Revista de Investigación Clínica* **73**, (2021).
276. Stenger, M. First Approval of PD-1 Inhibitor: Pembrolizumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. https://ascopost.com/issues/october-15-2014/first-approval-of-pd-1-inhibitor-pembrolizumab-in-unresectable-or-metastatic-melanoma/.
277. Massard, C. *et al.* Safety and Efficacy of Durvalumab (MEDI4736), an Anti–Programmed Cell Death Ligand-1 Immune Checkpoint Inhibitor, in Patients With Advanced Urothelial Bladder Cancer. *J Clin Oncol* **34**, 3119–3125 (2016).
278. Powles, T. *et al.* Efficacy and Safety of Durvalumab in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. *JAMA Oncol* **3**, e172411 (2017).
279. Kaufman, H. L. *et al.* Avelumab in patients with chemotherapy-refractory metastatic Merkel cell carcinoma: a multicentre, single-group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* **17**, 1374–1385 (2016).
280. Apolo, A. B. *et al.* Avelumab, an Anti–Programmed Death-Ligand 1 Antibody, In Patients With Refractory Metastatic Urothelial Carcinoma: Results From a Multicenter, Phase Ib Study. *J Clin Oncol* **35**, 2117–2124 (2017).
281. Patel, M. R. *et al.* Avelumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum failure (JAVELIN Solid Tumor): pooled results from two expansion cohorts of an open-label, phase 1 trial. *Lancet Oncol* **19**, 51–64 (2018).
282. Disis, M. L. *et al.* Efficacy and Safety of Avelumab for Patients With Recurrent or Refractory Ovarian Cancer. *JAMA Oncol* **5**, 393–401 (2019).
283. Monestier, S. *et al.* Effectiveness and safety of nivolumab in patients with advanced melanoma: A multicenter, observational study. *Int J Cancer* **148**, 2789–2798 (2021).
284. Habra, M. A. *et al.* Phase II clinical trial of pembrolizumab efficacy and safety in advanced adrenocortical carcinoma. *J Immunother Cancer* **7**, 253 (2019).
285. Migden, M. R. *et al.* Cemiplimab in locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma: results from an open-label, phase 2, single-arm trial. *Lancet Oncol* **21**, 294–305 (2020).
286. Wang, Y. *et al.* Treatment-Related Adverse Events of PD-1 and PD-L1 Inhibitors in Clinical Trials: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncology* **5**, 1008–1019 (2019).
287. Brahmer, J. R. *et al.* Safety and Activity of Anti–PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N Engl J Med* **366**, 2455–2465 (2012).
288. Hirsch, L., Zitvogel, L., Eggermont, A. & Marabelle, A. PD-Loma: a cancer entity with a shared sensitivity to the PD-1/PD-L1 pathway blockade. *Br J Cancer* **120**, 3–5 (2019).
289. Li, Y. *et al.* Efficacy and safety of anti-PD-1/PD-L1 therapy in the treatment of advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC Gastroenterol* **22**, 431 (2022).
290. Borghaei, H. *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Non-squamous Non-small Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **373**, 1627–1639 (2015).

291. Khong, H. T., Wang, Q. J. & Rosenberg, S. A. Identification of Multiple Antigens Recognized by Tumor-Infiltrating Lymphocytes From a Single Patient: Tumor Escape by Antigen Loss and Loss of MHC Expression. *J Immunother* **27**, 184–190 (2004).
292. Lin, S.-Y. *et al.* Loss of Major Histocompatibility Complex Class I, CD8 + Tumor-infiltrating Lymphocytes, and PD-L1 Expression in Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol* **47**, 124–130 (2023).
293. Tran, E. *et al.* T-Cell Transfer Therapy Targeting Mutant KRAS in Cancer. *The New England journal of medicine* **375**, 2255 (2016).
294. Wang, C., Wang, Z., Yao, T., Zhou, J. & Wang, Z. The immune-related role of beta-2-microglobulin in melanoma. *Front Oncol* **12**, 944722 (2022).
295. Yu, J. *et al.* Loss of MHC-I antigen presentation correlated with immune checkpoint blockade tolerance in MAPK inhibitor-resistant melanoma. *Front Pharmacol* **13**, 928226 (2022).
296. Chowell, D. *et al.* Patient HLA class I genotype influences cancer response to checkpoint blockade immunotherapy. *Science* **359**, 582–587 (2018).
297. Sade-Feldman, M. *et al.* Resistance to checkpoint blockade therapy through inactivation of antigen presentation. *Nat Commun* **8**, 1136 (2017).
298. Koyama, S. *et al.* Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nat Commun* **7**, 10501 (2016).
299. Limagne, E. *et al.* Tim-3/galectin-9 pathway and mMDSC control primary and secondary resistances to PD-1 blockade in lung cancer patients. *OncoImmunology* **8**, e1564505 (2019).
300. Gensous, N., White, E. & Appay, V. Les lymphocytes T CD8+ ont-ils une capacité de réplication quasi-illimitée ? *Med Sci (Paris)* **39**, 609–611 (2023).
301. Zhu, W., Li, Y., Han, M. & Jiang, J. Regulatory Mechanisms and Reversal of CD8+T Cell Exhaustion: A Literature Review. *Biology* **12**, 541 (2023).
302. Chow, A., Perica, K., Klebanoff, C. A. & Wolchok, J. D. Clinical implications of T cell exhaustion for cancer immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol* **19**, 775–790 (2022).
303. He, X. & Xu, C. PD-1: A Driver or Passenger of T Cell Exhaustion? *Molecular Cell* **77**, 930–931 (2020).
304. Matsuzaki, J. *et al.* 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* **107**, 7875–7880 (2010).
305. Fourcade, J. *et al.* Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen–specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *J Exp Med* **207**, 2175–2186 (2010).
306. Huang, L. *et al.* Targeting STAT3 Abrogates Tim-3 Upregulation of Adaptive Resistance to PD-1 Blockade on Regulatory T Cells of Melanoma. *Front. Immunol.* **12**, (2021).
307. Tawbi, H. A. *et al.* Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in Untreated Advanced Melanoma. *N Engl J Med* **386**, 24–34 (2022).
308. Voron, T. *et al.* VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors. *Journal of Experimental Medicine* **212**, 139–148 (2015).
309. Groth, C. *et al.* Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *Br J Cancer* **120**, 16–25 (2019).
310. Nagarsheth, N., Wicha, M. S. & Zou, W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **17**, 559–572 (2017).
311. Highfill, S. L. *et al.* Disruption of CXCR2-Mediated MDSC Tumor Trafficking Enhances Anti-PD1 Efficacy. *Sci Transl Med* **6**, 237ra67 (2014).

312. Ngiow, S. F. *et al.* A Threshold Level of Intratumor CD8+ T-cell PD1 Expression Dictates Therapeutic Response to Anti-PD1. *Cancer Research* **75**, 3800–3811 (2015).
313. Arce Vargas, F. *et al.* Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors. *Immunity* **46**, 577–586 (2017).
314. Tauriello, D. V. F. *et al.* TGFβ drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature* **554**, 538–543 (2018).
315. Mariathasan, S. *et al.* TGFβ attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature* **554**, 544–548 (2018).
316. Zhu, Y. *et al.* CSF1/CSF1R Blockade Reprograms Tumor-Infiltrating Macrophages and Improves Response to T-cell Checkpoint Immunotherapy in Pancreatic Cancer Models. *Cancer Research* **74**, 5057–5069 (2014).
317. Shin, D. S. *et al.* Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations. *Cancer Discov* **7**, 188–201 (2017).
318. Lei, Q., Wang, D., Sun, K., Wang, L. & Zhang, Y. Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
319. Zaretsky, J. M. *et al.* Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. *N Engl J Med* **375**, 819–829 (2016).
320. Gainor, J. F. *et al.* EGFR Mutations and ALK Rearrangements Are Associated with Low Response Rates to PD-1 Pathway Blockade in Non–Small Cell Lung Cancer: A Retrospective Analysis. *Clinical Cancer Research* **22**, 4585–4593 (2016).
321. Peng, W. *et al.* Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell–Mediated Immunotherapy. *Cancer Discovery* **6**, 202–216 (2016).
322. Hu-Lieskovan, S. *et al.* Improved antitumor activity of immunotherapy with BRAF and MEK inhibitors in BRAFV600E melanoma. *Science Translational Medicine* **7**, 279ra41-279ra41 (2015).
323. Zheng, Y. *et al.* Gut microbiome affects the response to anti-PD-1 immunotherapy in patients with hepatocellular carcinoma. *j. immunotherapy cancer* **7**, 193 (2019).
324. Sivan, A. *et al.* Commensal Bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti–PD-L1 efficacy. *Science* **350**, 1084–1089 (2015).
325. Gopalakrishnan, V. *et al.* Gut microbiome modulates response to anti–PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Science* **359**, 97–103 (2018).
326. Ren, X. *et al.* Immunological Classification of Tumor Types and Advances in Precision Combination Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* **13**, (2022).
327. Herbst, R. S. *et al.* Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* **515**, 563–567 (2014).
328. Fehrenbacher, L. *et al.* Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *The Lancet* **387**, 1837–1846 (2016).
329. Paz-Ares, L. *et al.* Phase III, randomized trial (CheckMate 057) of nivolumab (NIVO) versus docetaxel (DOC) in advanced non-squamous cell (non-SQ) non-small cell lung cancer (NSCLC). *JCO* **33**, LBA109–LBA109 (2015).
330. Herbst Roy S. *et al.* Atezolizumab for First-Line Treatment of PD-L1–Selected Patients with NSCLC. *New England Journal of Medicine* **383**, 1328–1339 (2020).

331. Balar, A. V. *et al.* Atezolizumab as first-line therapy in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet* **389**, 67–76 (2017).
332. Sharma, P. *et al.* Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. *The Lancet Oncology* **18**, 312–322 (2017).
333. Brahmer Julie *et al.* Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Squamous-Cell Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **373**, 123–135 (2015).
334. Vesely, M. D., Zhang, T. & Chen, L. Resistance Mechanisms to Anti-PD Cancer Immunotherapy. *Annu Rev Immunol* **40**, 45–74 (2022).
335. Galsky, M. D. *et al.* Nivolumab in Patients with Advanced Platinum-resistant Urothelial Carcinoma: Efficacy, Safety, and Biomarker Analyses with Extended Follow-up from CheckMate 275. *Clinical Cancer Research* **26**, 5120–5128 (2020).
336. Wang, P., Chen, Y. & Wang, C. Beyond Tumor Mutation Burden: Tumor Neoantigen Burden as a Biomarker for Immunotherapy and Other Types of Therapy. *Front Oncol* **11**, 672677 (2021).
337. Goodman, A. M. *et al.* Tumor Mutational Burden as an Independent Predictor of Response to Immunotherapy in Diverse Cancers. *Molecular Cancer Therapeutics* **16**, 2598–2608 (2017).
338. Ricciuti, B. *et al.* Association of High Tumor Mutation Burden in Non–Small Cell Lung Cancers With Increased Immune Infiltration and Improved Clinical Outcomes of PD-L1 Blockade Across PD-L1 Expression Levels. *JAMA Oncology* **8**, 1160–1168 (2022).
339. Marabelle, A. *et al.* Association of tumour mutational burden with outcomes in patients with advanced solid tumours treated with pembrolizumab: prospective biomarker analysis of the multicohort, open-label, phase 2 KEYNOTE-158 study. *The Lancet Oncology* **21**, 1353–1365 (2020).
340. Le Dung T. *et al.* PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *New England Journal of Medicine* **372**, 2509–2520 (2015).
341. Le, D. T. *et al.* KEYNOTE-164: Pembrolizumab for patients with advanced microsatellite instability high (MSI-H) colorectal cancer. *JCO* **36**, 3514–3514 (2018).
342. Olivares-Hernández, A. *et al.* Influence of DNA Mismatch Repair (MMR) System in Survival and Response to Immune Checkpoint Inhibitors (ICIs) in Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC): Retrospective Analysis. *Biomedicines* **10**, 360 (2022).
343. Marcus, L., Lemery, S. J., Keegan, P. & Pazdur, R. FDA Approval Summary: Pembrolizumab for the Treatment of Microsatellite Instability-High Solid Tumors. *Clinical Cancer Research* **25**, 3753–3758 (2019).
344. Nakajima, E. C. *et al.* FDA Approval Summary: Nivolumab in Combination with Ipilimumab for the Treatment of Unresectable Malignant Pleural Mesothelioma. *Clin Cancer Res* **28**, 446–451 (2022).
345. Patel, T. H. *et al.* FDA Approval Summary: Tremelimumab in Combination with Durvalumab for the Treatment of Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma. *Clinical Cancer Research* **30**, 269–273 (2024).
346. Schmid, P. *et al.* Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **379**, 2108–2121 (2018).
347. Horn, L. *et al.* First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine* **379**, 2220–2229 (2018).

348. Mathieu, L. *et al.* FDA Approval Summary: Atezolizumab and Durvalumab in Combination with Platinum-Based Chemotherapy in Extensive Stage Small Cell Lung Cancer. *Oncologist* **26**, 433–438 (2021).
349. Research, C. for D. E. and. FDA approves nivolumab in combination with cisplatin and gemcitabine for unresectable or metastatic urothelial carcinoma. *FDA* (2024).
350. Rudin, C. *et al.* MA15.02 Long-Term Safety and Clinical Activity Results from a Phase Ib Study of Erlotinib Plus Atezolizumab in Advanced NSCLC. *Journal of Thoracic Oncology* **13**, S407 (2018).
351. Jotte, R. *et al.* Atezolizumab in Combination With Carboplatin and Nab-Paclitaxel in Advanced Squamous NSCLC (IMpower131): Results From a Randomized Phase III Trial. *Journal of Thoracic Oncology* **15**, 1351–1360 (2020).
352. West, H. *et al.* Atezolizumab in combination with carboplatin plus nab-paclitaxel chemotherapy compared with chemotherapy alone as first-line treatment for metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer (IMpower130): a multicentre, randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **20**, 924–937 (2019).
353. Ahn, M.-J. *et al.* 136O: Osimertinib combined with durvalumab in EGFR-mutant non-small cell lung cancer: Results from the TATTON phase Ib trial. *Journal of Thoracic Oncology* **11**, S115 (2016).
354. Choueiri, T. K. *et al.* Preliminary results for avelumab plus axitinib as first-line therapy in patients with advanced clear-cell renal-cell carcinoma (JAVELIN Renal 100): an open-label, dose-finding and dose-expansion, phase 1b trial. *The Lancet Oncology* **19**, 451–460 (2018).
355. Motzer, R. J. *et al.* Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **380**, 1103–1115 (2019).
356. Lin, C.-C. *et al.* A phase 2, multicenter, open-label study of anti-LAG-3 ieramilimab in combination with anti-PD-1 spartalizumab in patients with advanced solid malignancies. *Oncoimmunology* **13**, 2290787 (2024).
357. Lenz, H.-J. *et al.* Modified FOLFOX6 plus bevacizumab with and without nivolumab for first-line treatment of metastatic colorectal cancer: phase 2 results from the CheckMate 9X8 randomized clinical trial. *J Immunother Cancer* **12**, e008409 (2024).
358. Hartl, F. U., Bracher, A. & Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**, 324–332 (2011).
359. Wagner, M., Hermanns, I., Bittinger, F. & Kirkpatrick, C. J. Induction of stress proteins in human endothelial cells by heavy metal ions and heat shock. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* **277**, L1026–L1033 (1999).
360. Almgren, C. M. & Olson, L. E. Moderate Hypoxia Increases Heat Shock Protein 90 Expression in Excised Rat Aorta. *Journal of Vascular Research* **36**, 363–371 (1999).
361. Fan, G.-H., Zhou, H.-Y., Yang, H. & Chen, S.-D. Heat shock proteins reduce α-synuclein aggregation induced by MPP+ in SK-N-SH cells. *FEBS Letters* **580**, 3091–3098 (2006).
362. Ruzza, P., Honisch, C., Hussain, R. & Siligardi, G. Free Radicals and ROS Induce Protein Denaturation by UV Photostability Assay. *Int J Mol Sci* **22**, 6512 (2021).
363. Burgman, P. W. J. J. & Konings, A. W. T. Heat induced protein denaturation in the particulate fraction of hela S3 cells: Effect of thermotolerance. *Journal of Cellular Physiology* **153**, 88–94 (1992).
364. Dubois, M. F., Hovanessian, A. G. & Bensaude, O. Heat-shock-induced denaturation of proteins. Characterization of the insolubilization of the interferon-induced p68 kinase. *Journal of Biological Chemistry* **266**, 9707–9711 (1991).

365. Weids, A. J., Ibstedt, S., Tamás, M. J. & Grant, C. M. Distinct stress conditions result in aggregation of proteins with similar properties. *Sci Rep* **6**, 24554 (2016).
366. Burkewitz, K., Choe, K. & Strange, K. Hypertonic stress induces rapid and widespread protein damage in C. elegans. *Am J Physiol Cell Physiol* **301**, C566–C576 (2011).
367. Gross, M., Hessefort, S. & Olin, A. Purification of a 38-kDa Protein from Rabbit Reticulocyte Lysate Which Promotes Protein Renaturation by Heat Shock Protein 70 and Its Identification as δ-Aminolevulinic Acid Dehydratase and as a Putative DnaJ Protein *. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 3125–3134 (1999).
368. Schumacher, R. J. *et al.* Cooperative Action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ Proteins in Protein Renaturation. *Biochemistry* **35**, 14889–14898 (1996).
369. Schneider, M. M. *et al.* The Hsc70 disaggregation machinery removes monomer units directly from α-synuclein fibril ends. *Nat Commun* **12**, 5999 (2021).
370. Shi, Y. & Thomas, J. O. The transport of proteins into the nucleus requires the 70-kilodalton heat shock protein or its cytosolic cognate. *Mol Cell Biol* **12**, 2186–2192 (1992).
371. Saeki, Y. & Tanaka, K. Assembly and Function of the Proteasome. in *Ubiquitin Family Modifiers and the Proteasome: Reviews and Protocols* (eds. Dohmen, R. J. & Scheffner, M.) 315–337 (Humana Press, Totowa, NJ, 2012). doi:10.1007/978-1-61779-474-2_22.
372. Beere, H. M. *et al.* Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* **2**, 469–475 (2000).
373. Chatterjee, S. & Burns, T. F. Targeting Heat Shock Proteins in Cancer: A Promising Therapeutic Approach. *Int J Mol Sci* **18**, 1978 (2017).
374. Kimura, A. *et al.* Nuclear heat shock protein 110 expression is associated with poor prognosis and hyperthermo-chemotherapy resistance in gastric cancer patients with peritoneal metastasis. *World J Gastroenterol* **23**, 7541–7550 (2017).
375. Berthenet, K. *et al.* HSP110 promotes colorectal cancer growth through STAT3 activation. *Oncogene* **36**, 2328–2336 (2017).
376. Zhang, S. *et al.* Heat shock protein 27 promotes cell proliferation through activator protein-1 in lung cancer. *Oncology Letters* **9**, 2572–2576 (2015).
377. Voll, E. A. *et al.* Heat shock protein 27 regulates human prostate cancer cell motility and metastatic progression. *Oncotarget* **5**, 2648–2663 (2014).
378. Xiong, G. *et al.* Hsp47 promotes cancer metastasis by enhancing collagen-dependent cancer cell-platelet interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 3748 (2020).
379. Yan, L. *et al.* Comprehensive Pan-Cancer Analysis of Heat Shock Protein 110, 90, 70, and 60 Families. *Front Mol Biosci* **8**, 726244 (2021).
380. Hrudka, J. *et al.* Heat Shock Proteins 27, 70, and 110: Expression and Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)* **13**, 4407 (2021).
381. Fan, G., Tu, Y., Wu, N. & Xiao, H. The expression profiles and prognostic values of HSPs family members in Head and neck cancer. *Cancer Cell International* **20**, 220 (2020).
382. Ciocca, D. R. *et al.* Hsp25 and Hsp70 in rodent tumors treated with doxorubicin and lovastatin. *Cell Stress Chaperones* **8**, 26–36 (2003).
383. Vargas-Roig, L. M., Gago, F. E., Tello, O., Aznar, J. C. & Ciocca, D. R. Heat shock protein expression and drug resistance in breast cancer patients treated with induction chemotherapy. *International Journal of Cancer* **79**, 468–475 (1998).
384. Das, J. K., Xiong, X., Ren, X., Yang, J.-M. & Song, J. Heat Shock Proteins in Cancer Immunotherapy. *J Oncol* **2019**, 3267207 (2019).

385. Yang, S., Xiao, H. & Cao, L. Recent advances in heat shock proteins in cancer diagnosis, prognosis, metabolism and treatment. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **142**, 112074 (2021).
386. Dorard, C. *et al.* Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* **17**, 1283–1289 (2011).
387. Oh, H. J., Chen, X. & Subjeck, J. R. hsp110 Protects Heat-denatured Proteins and Confers Cellular Thermoresistance *. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 31636–31640 (1997).
388. Kariya, A., Furusawa, Y., Yunoki, T., Kondo, T. & Tabuchi, Y. A microRNA-27a mimic sensitizes human oral squamous cell carcinoma HSC-4 cells to hyperthermia through downregulation of Hsp110 and Hsp90. *International Journal of Molecular Medicine* **34**, 334–340 (2014).
389. Berthenet, K. *et al.* Extracellular HSP110 skews macrophage polarization in colorectal cancer. *Oncoimmunology* **5**, e1170264 (2016).
390. Boudesco, C. *et al.* HSP110 sustains chronic NF-κB signaling in activated B-cell diffuse large B-cell lymphoma through MyD88 stabilization. *Blood* **132**, 510–520 (2018).
391. Causse, S. Z. *et al.* HSP110 translocates to the nucleus upon genotoxic chemotherapy and promotes DNA repair in colorectal cancer cells. *Oncogene* **38**, 2767–2777 (2019).
392. Manjili, M. H., Park, J., Facciponte, J. G. & Subjeck, J. R. HSP110 induces "danger signals" upon interaction with antigen presenting cells and mouse mammary carcinoma. *Immunobiology* **210**, 295–303 (2005).
393. Gozzi, G. J. *et al.* Selecting the first chemical molecule inhibitor of HSP110 for colorectal cancer therapy. *Cell Death Differ* **27**, 117–129 (2020).
394. Yakubu, U. M. & Morano, K. A. Roles of the nucleotide exchange factor and chaperone Hsp110 in cellular proteostasis and diseases of protein misfolding. *Biol Chem* **399**, 1215–1221 (2018).
395. Oh, H. J., Easton, D., Murawski, M., Kaneko, Y. & Subjeck, J. R. The Chaperoning Activity of hsp110: IDENTIFICATION OF FUNCTIONAL DOMAINS BY USE OF TARGETED DELETIONS *. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 15712–15718 (1999).
396. Kojima, R. *et al.* Novel function of the C-terminal region of the Hsp110 family member Osp94 in unfolded protein refolding. *Journal of Cell Science* **135**, jcs258542 (2022).
397. Polier, S., Dragovic, Z., Hartl, F. U. & Bracher, A. Structural Basis for the Cooperation of Hsp70 and Hsp110 Chaperones in Protein Folding. *Cell* **133**, 1068–1079 (2008).
398. Wang, X.-Y. *et al.* Hsp110 over-expression increases the immunogenicity of the murine CT26 colon tumor. *Cancer Immunol Immunother* **51**, 311–319 (2002).
399. Wang, X.-Y., Kazim, L., Repasky, E. A. & Subjeck, J. R. Characterization of Heat Shock Protein 110 and Glucose-Regulated Protein 170 as Cancer Vaccines and the Effect of Fever-Range Hyperthermia on Vaccine Activity1. *The Journal of Immunology* **166**, 490–497 (2001).
400. Kim, H. L., Sun, X., Subjeck, J. R. & Wang, X.-Y. Evaluation of renal cell carcinoma vaccines targeting carbonic anhydrase IX using heat shock protein 110. *Cancer Immunol Immunother* **56**, 1097–1105 (2007).
401. Facciponte, J. G., Wang, X.-Y. & Subjeck, J. R. Hsp110 and Grp170, members of the Hsp70 superfamily, bind to scavenger receptor-A and scavenger receptor expressed by endothelial cells-I. *Eur J Immunol* **37**, 2268–2279 (2007).
402. Ren, F. *et al.* Heat shock protein 110 improves the anti-tumor effects of the cytotoxic T lymphocyte epitope E7 in mice. *Cancer Biology & Therapy* **9**, 134–141 (2010).

403. Zhang, Y., Ren, F., Ni, B., Jing, T. & Tang, J. Tumor targeting nanoparticle E749-57-HSP110-RGD elicits potent anti-tumor immune response in a CD8-dependent manner in cervical cancer-bearing mouse model. *Hum Vaccin Immunother* **17**, 3529–3538 (2021).
404. McLaughlin, K. *et al.* Hsp110-Mediated Enhancement of CD4+ T Cell Responses to the Envelope Glycoprotein of Members of the Family Flaviviridae In Vitro Does Not Occur In Vivo. *Clinical and Vaccine Immunology* **18**, 311–317 (2011).
405. Manjili, M. H. *et al.* HSP110-HER2/neu Chaperone Complex Vaccine Induces Protective Immunity Against Spontaneous Mammary Tumors in HER-2/neu Transgenic Mice 1. *The Journal of Immunology* **171**, 4054–4061 (2003).
406. Shimizu, Y. *et al.* Heat shock protein 105 peptide vaccine could induce antitumor immune reactions in a phase I clinical trial. *Cancer Sci* **110**, 3049–3060 (2019).
407. Wach, M. M. *et al.* Recombinant Human Hsp110-gp100 Chaperone Complex Vaccine is Non-toxic and Induces Response in Advanced Stage Melanoma Patients. *Melanoma Res* **32**, 88–97 (2022).
408. Kai, M. *et al.* Heat shock protein 105 is overexpressed in a variety of human tumors. *Oncology Reports* **10**, 1777–1782 (2003).
409. Slaby, O. *et al.* Significant overexpression of Hsp110 gene during colorectal cancer progression. *Oncology Reports* **21**, 1235–1241 (2009).
410. Kim, K.-J. *et al.* Deletion in HSP110 T17: correlation with wild-type HSP110 expression and prognostic significance in microsatellite-unstable advanced gastric cancers. *Human Pathology* **67**, 109–118 (2017).
411. Tachon, G. *et al.* HSP110 as a Diagnostic but Not a Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer With Microsatellite Instability. *Front Genet* **12**, 769281 (2022).
412. How-Kit, A. *et al.* Major improvement in the detection of microsatellite instability in colorectal cancer using HSP110 T17 E-ice-COLD-PCR. *Human Mutation* **39**, 441–453 (2018).
413. Oh, H. J. *et al.* Dominant high expression of wild-type HSP110 defines a poor prognostic subgroup of colorectal carcinomas with microsatellite instability: a whole-section immunohistochemical analysis. *APMIS* **125**, 1076–1083 (2017).
414. Collura, A. *et al.* Patients With Colorectal Tumors With Microsatellite Instability and Large Deletions in HSP110 T17 Have Improved Response to 5-Fluorouracil–Based Chemotherapy. *Gastroenterology* **146**, 401-411.e1 (2014).
415. Noel, K. *et al.* Consequences of the Hsp110DE9 mutation in tumorigenesis and the 5-fluorouracil-based chemotherapy response in Msh2-deficient mice. *Cell. Mol. Life Sci.* **79**, 332 (2022).
416. Kim, J. H. *et al.* Expression status of wild-type HSP110 correlates with HSP110 T17 deletion size and patient prognosis in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Modern Pathology* **27**, 443–453 (2014).
417. Marcion, G. *et al.* Nanofitins targeting heat shock protein 110: An innovative immunotherapeutic modality in cancer. *Int J Cancer* **148**, 3019–3031 (2021).
418. Xu, L. *et al.* Discovery of second generation heat shock protein 110 (HSP110) inhibitors for potential treatment of colorectal cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports* **7**, 100103 (2023).
419. Xu, D. *et al.* Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1. *Cancer Res* **70**, 6988–6998 (2010).
420. Urushibara, F. *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-7 correlates with the invasion of T1 colorectal carcinoma. *Oncology Letters* **15**, 3614–3620 (2018).

421. NanoString nCounter Technology - Genomic & Transcriptomic. https://www.bioxpedia.com/nanostring-ncounter-technology/ (2020).
422. NanoString Resources for Quantitative Analysis of Gene Expression – Resource for Developmental Regulatory Genomics. https://labs.bio.cmu.edu/rdrg/research-resources/nanostring-resources-for-quantitative-analysis-of-gene-expression/.
423. Ng, S. S. *et al.* The NK cell granule protein NKG7 regulates cytotoxic granule exocytosis and inflammation. *Nat Immunol* **21**, 1205–1218 (2020).
424. Wen, T. *et al.* NKG7 Is a T-cell–Intrinsic Therapeutic Target for Improving Antitumor Cytotoxicity and Cancer Immunotherapy. *Cancer Immunol Res* **10**, 162–181 (2022).
425. Sivori, S. *et al.* NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *European Journal of Immunology* **29**, 1656–1666 (1999).
426. Xie, Z. *et al.* Single-cell analysis unveils activation of mast cells in colorectal cancer microenvironment. *Cell Biosci* **13**, 217 (2023).
427. Li, Y. *et al.* Targeting MS4A4A on tumour-associated macrophages restores CD8+ T-cell-mediated antitumour immunity. *Gut* **72**, 2307–2320 (2023).
428. De la Fuente López, M. *et al.* The relationship between chemokines CCL2, CCL3, and CCL4 with the tumor microenvironment and tumor-associated macrophage markers in colorectal cancer. *Tumour Biol.* **40**, 1010428318810059 (2018).
429. Maruhashi, T. *et al.* Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. *Immunity* **55**, 912-924.e8 (2022).
430. Xu, F. *et al.* LSECtin Expressed on Melanoma Cells Promotes Tumor Progression by Inhibiting Antitumor T-cell Responses. *Cancer Research* **74**, 3418–3428 (2014).
431. Wang, J. *et al.* Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG3. *Cell* **176**, 334-347.e12 (2019).
432. Kouo, T. *et al.* Galectin-3 Shapes Antitumor Immune Responses by Suppressing CD8+ T Cells via LAG-3 and Inhibiting Expansion of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Cancer Immunology Research* **3**, 412–423 (2015).
433. Maeda, T. K., Sugiura, D., Okazaki, I., Maruhashi, T. & Okazaki, T. Atypical motifs in the cytoplasmic region of the inhibitory immune co-receptor LAG-3 inhibit T cell activation. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 6017–6026 (2019).
434. Workman, C. J., Dugger, K. J. & Vignali, D. A. A. Cutting Edge: Molecular Analysis of the Negative Regulatory Function of Lymphocyte Activation Gene-31. *The Journal of Immunology* **169**, 5392–5395 (2002).
435. Guy, C. *et al.* LAG3 associates with TCR-CD3 complexes and suppresses signaling by driving co-receptor-Lck dissociation. *Nat Immunol* **23**, 757–767 (2022).
436. Chavanton, A., Mialhe, F., Abrey, J., Baeza Garcia, A. & Garrido, C. LAG-3 : recent developments in combinational therapies in cancer. *Cancer Science* **n/a**, (2024).
437. Zhou, Q. *et al.* Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood* **117**, 4501–4510 (2011).
438. Sakuishi, K. *et al.* Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *J Exp Med* **207**, 2187–2194 (2010).
439. Klapholz, M., Drage, M. G., Srivastava, A. & Anderson, A. C. Presence of Tim3+ and PD-1+ CD8+ T cells identifies microsatellite stable colorectal carcinomas with immune exhaustion and distinct clinicopathological features. *The Journal of Pathology* **257**, 186–197 (2022).

440. Roussel, M. *et al.* Functional characterization of PD1+TIM3+ tumor-infiltrating T cells in DLBCL and effects of PD1 or TIM3 blockade. *Blood Adv* **5**, 1816–1829 (2021).
441. Walker-Sperling, V. *et al.* Genetic variation that determines TAPBP expression levels associates with the course of malaria in an HLA allotype-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2205498119 (2022).
442. Borrego, F., Masilamani, M., Marusina, A. I., Tang, X. & Coligan, J. E. The CD94/NKG2 family of receptors. *Immunol Res* **35**, 263–277 (2006).
443. Eugène, J. *et al.* The inhibitory receptor CD94/NKG2A on CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer: a promising new druggable immune checkpoint in the context of HLAE/β2m overexpression. *Modern Pathology* **33**, 468–482 (2020).
444. Pan, B. *et al.* A novel prognostic signatures based on metastasis- and immune-related gene pairs for colorectal cancer. *Front Immunol* **14**, 1161382 (2023).
445. Pryczynicz, A. *et al.* Dysfunctions in the Mature Dendritic Cells Are Associated with the Presence of Metastases of Colorectal Cancer in the Surrounding Lymph Nodes. *Gastroenterol Res Pract* **2016**, 2405437 (2016).
446. Sandel, M. H. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells in colorectal cancer: role of maturation status and intratumoral localization. *Clin Cancer Res* **11**, 2576–2582 (2005).
447. Jin, P. *et al.* Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies. *Journal of Translational Medicine* **8**, 4 (2010).
448. Metcalfe, D. D., Baram, D. & Mekori, Y. A. Mast cells. *Physiol Rev* **77**, 1033–1079 (1997).
449. Galli, S. J., Gaudenzio, N. & Tsai, M. Mast Cells in Inflammation and Disease: Recent Progress and Ongoing Concerns. *Annu Rev Immunol* **38**, 49–77 (2020).
450. Song, F. *et al.* Mast cells inhibit colorectal cancer development by inducing ER stress through secreting Cystatin C. *Oncogene* **42**, 209–223 (2023).
451. Kim, G.-Y. *et al.* Proinflammatory Cytokine IL-1β Stimulates IL-8 Synthesis in Mast Cells via a Leukotriene B4 Receptor 2-Linked Pathway, Contributing to Angiogenesis. *The Journal of Immunology* **184**, 3946–3954 (2010).
452. Kim, J. *et al.* Chemokine Receptor CXCR4 Expression in Colorectal Cancer Patients Increases the Risk for Recurrence and for Poor Survival. *JCO* **23**, 2744–2753 (2005).
453. Gurluler, E. *et al.* Oncostatin-M as a novel biomarker in colon cancer patients and its association with clinicopathologic variables. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **18**, 2042–2047 (2014).
454. Wei, W. *et al.* Tumor necrosis factor-α induces proliferation and reduces apoptosis of colorectal cancer cells through STAT3 activation. *Immunogenetics* **75**, 161–169 (2023).
455. Gu, C. *et al.* FSTL1 interacts with VIM and promotes colorectal cancer metastasis via activating the focal adhesion signalling pathway. *Cell Death Dis* **9**, 1–14 (2018).
456. Liu, W., Li, L., Ye, H., Tao, H. & He, H. Role of COL6A3 in colorectal cancer. *Oncology Reports* **39**, 2527 (2018).
457. Alderdice, M. *et al.* Evolutionary genetic algorithm identifies IL2RB as a potential predictive biomarker for immune-checkpoint therapy in colorectal cancer. *NAR Genomics and Bioinformatics* **3**, lqab016 (2021).
458. Wei, B. *et al.* Human colorectal cancer progression correlates with LOX-induced ECM stiffening. *Int J Biol Sci* **13**, 1450–1457 (2017).
459. Chou, P.-H. *et al.* A chemical probe inhibitor targeting STAT1 restricts cancer stem cell traits and angiogenesis in colorectal cancer. *Journal of Biomedical Science* **29**, 20 (2022).

460. Chen, T., Guo, J., Han, C., Yang, M. & Cao, X. Heat Shock Protein 70, Released from Heat-Stressed Tumor Cells, Initiates Antitumor Immunity by Inducing Tumor Cell Chemokine Production and Activating Dendritic Cells via TLR4 Pathway1. *The Journal of Immunology* **182**, 1449–1459 (2009).
461. Zunino, B. *et al.* Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy leads to an anticancer immune response via exposure of cell surface heat shock protein 90. *Oncogene* **35**, 261–268 (2016).
462. Ascierto, P. A. *et al.* Initial efficacy of anti-lymphocyte activation gene-3 (anti–LAG-3; BMS-986016) in combination with nivolumab (nivo) in pts with melanoma (MEL) previously treated with anti–PD-1/PD-L1 therapy. *JCO* **35**, 9520–9520 (2017).

VIII. Annexes

VIII. Annexes

1. Participation à des congrès scientifiques

a. Congrès international **ISEV** à Lyon, *mai 2022*

Sujet de présentation : efficacité de la double thérapie anti-PD-1/inhibiteur de HSP70 et l'importance d'étudier HSP70 exosomal comme biomarqueur circulant de la résistance au traitement anti-PD-1.

Type de présentation : **poster**

b. Forum des jeunes chercheurs à Dijon, *juin 2022*

Sujet de présentation : caractérisation des exosomes et l'efficacité de la double thérapie anti-PD-L1/inhibiteur de HSP70 *in vivo* dans un modèle de mélanome.

Type de présentation : **communication orale**

c. Cancéropôle Est à Strasbourg, *novembre 2023*

Sujet de présentation : efficacité de la double thérapie anti-PD-L1/inhibiteur de HSP110 dans un modèle de cancer colorectal.

Type de présentation : **communication orale**

2. Publication d'une revue scientifique

Received: 9 February 2024 | Revised: 11 April 2024 | Accepted: 17 April 2024

DOI: 10.1111/cas.16205

REVIEW ARTICLE

Cancer Science WILEY

LAG-3 : recent developments in combinational therapies in cancer

Aude Chavanton[1,2] | Flavie Mialhe[1,2] | Jimena Abrey[1,2] | Alvaro Baeza Garcia[1,2] | Carmen Garrido[1,2,3]

[1]INSERM, UMR 1231, Laboratoire d'Excellence LipSTIC and « Equipe labellisée par la Ligue Nationale contre le Cancer », Dijon, France

[2]Faculty of Medicine, Université de Bourgogne, Dijon, France

[3]Center for Cancer Georges-François Leclerc, Dijon, France

Correspondence
Carmen Garrido, INSERM, UMR1231, Faculty of Medicine, University of Burgundy, 7 Boulevard Jeanne D'Arc, 21000 Dijon, France.
Email: carmen.garrido-fleury@u-bourgogne.fr

Funding information
FEDER; Ruban Rose Fondation; Conseil régional de Bourgogne-Franche-Comté; Institut National contre le Cancer, Grant/Award Number: PLBIO-22-093 and PLBIO21-107

Abstract

The study of anticancer immune responses and in particular the action of immune checkpoint inhibitors that overcome T cell inhibition has revolutionized metastatic patients' care. Unfortunately, many patients are resistant to these innovative immunotherapies. Over the last decade, several immune checkpoint inhibitors, currently available in the clinic, have been developed, such as anti-PD-1/PD-L1 or anti-CTLA-4. More recently, other immune checkpoints have been characterized, among them lymphocyte activation gene 3 (LAG-3). LAG-3 has been the subject of numerous therapeutic studies and may be involved in cancer-associated immune resistance phenomena. This review summarizes the latest knowledge on LAG-3 as an immunotherapeutic target, particularly in combination with standard or innovative therapies. Indeed, many studies are looking at combining LAG-3 inhibitors with chemotherapeutic, immunotherapeutic, radiotherapeutic treatments, or adoptive cell therapies to potentiate their antitumor effects and/or to overcome patients' resistance. We will particularly focus on the association therapies that are currently in phase III clinical trials and innovative combinations in preclinical phase. These new discoveries high- light the possibility of developing other types of therapeutic combinations currently unavailable in the clinic, which could broaden the therapeutic spectrum of personal- ized medicine.

KEYWORDS
anticancer immune response, combinational therapies, immunotherapy, LAG-3, TILs

Abbreviations: BCMA, B cell maturation antigen; CTLA-4, cytotoxic T lymphocyte antigen 4; FGL-1, fibrinogen-like protein 1; galectin-3, galactose lectin-3; Gsk-3, glycogen synthase kinase 3; HDAC, histone deacetylase; ICI, immune checkpoint inhibitor; LAG-3, lymphocyte activation gene 3; LSECTin, liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin; MDSC, myeloid-derived suppressor cells; NK, natural killer; PBMC, peripheral blood mononuclear cell; PD-1, programmed death 1; PI3Kδ, phosphoinositide-3-kinase δ; TIGIT, T cell immunoglobulin and ITIM domain; TIL, tumor-infiltrating lymphocyte; Tim-3, T cell immunoglobulin 3; VDC, virus-like drug conjugate.

Alvaro Baeza Garcia and Carmen Garrido equally contributed to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.
© 2024 The Authors. *Cancer Science* published by John Wiley & Sons Australia, Ltd on behalf of Japanese Cancer Association.

1 | INTRODUCTION

Cancer immunotherapy has shaped the therapeutic landscape of many metastatic patients over the past decade, notably with the discovery of the immune checkpoints, such as programmed death 1 (PD-1)[1] and cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4).[2] Immune checkpoints are activating or inhibitory receptors on the surface of immune cells and contribute to the regulation of immune cell activation.[3–5] PD-1 acts in the later phases of lymphocyte activa- tion mainly in peripheral tissues and the tumor microenvironment, while CTLA-4 acts in the early phases of T cell activation in lym- phoid organs. They are expressed on T cells and interact with their ligands, PD-L1/PD-L2 (present notably on the surface of cancer cells) and B7.1 (present on the surface of antigen-presenting cells), respectively.[6,7] In the tumor microenvironment, T cells are sub- jected to a chronic stimulation with cancer cells antigens, induc- ing expression of immune checkpoints. The interaction of these receptors with their ligands expressed by tumor and antigen- presenting cells, inhibits T cell function and therefore limits the antitumor immune response. Although the use of immune check- point inhibitors (ICIs) targeting CTLA-4 and PD-1 in various types of cancer has been beneficial in the clinic, unfortunately, many patients do not respond to these promising immunotherapies.[8–10] Resistance to these ICIs may be explained by the expression of other immune checkpoints in T cells such as lymphocyte activa- tion gene 3 (LAG-3, also known as CD223).[11,12] LAG-3 is highly ex- pressed in cancer patients,[13–15] often coexpressed with PD-1[16,17] and associated with poor prognosis.[14,18,19] LAG-3 is found within the cell, but also an extracellular form exists, following cleavage of the extracellular part by the metalloprotease ADAM 10/17[20] (Figure 1). Both forms have been reported to be increased in can- cer.[21,22] LAG-3 is also expressed in immune cells, including $CD4^+$ and $CD8^+$ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs),[18,23] natural kill- ers (NKs), invariant natural killer T (NKT) cells, activated B cells, and plasmacytoid dendritic cells.[24–28] Of note, its expression on T $CD8^+$ cytotoxic immune cells prevents them from proliferating,[18] which impedes a proper antitumor immune response and thus may limit the efficacy of treatments. Structurally, LAG3 is com- posed of an extracellular, a transmembrane, and an intracellular region. The extracellular part, where the ligands bind, comprises four domains belonging to the immunoglobulin superfamily (D1– D4) whose D1 domain has a loop domain rich in proline, and gly- cosylation sites. The transmembrane part consists of a connecting peptide, and the intracellular part comprises a serine phosphor- ylation site and two motifs named KIEELE and EP[29,30] involved in LAG-3 function (Figure 1). LAG-3 binds to several ligands, the best characterized being MHC class II present on the surface of antigen-presenting cells. LAG-3 is unique in having amino acid se- quence homology with the CD4 receptor,[24,28] and it binds to MHC class II with higher affinity than CD4.[25] Interaction of MHC class II with LAG-3 suppresses T cell activation.[31] LAG-3 can bind to other ligands such as liver and lymph node sinusoidal endothelial cell C-type lectin (LSECTin),[32] fibrinogen-like protein 1 (FGL1),[33] and galactose lectin-3 (galectin-3),[34] which can be present on different cell types such as dendritic cells, monocytes, stromal cells, liver cells, and cancer cells[32,33,35–40] (Figure 1). The interaction between LAG-3 and these ligands also induces the inhibition of T cells.[32–34] Concerning its way of action, LAG-3 inhibits T cells' an- ticancer response by reducing T cells' cytokine and granzyme pro- duction and proliferation while encouraging differentiation into T regulatory cells, thereby providing a tumor microenvironment favorable to tumor escape. In certain cancers such as renal cancer, LAG-3, compared with the immune checkpoints Tim-3 or TIGIT that have also recently come to light, might be a better target, as its expression in tumors is associated with the worst overall survival and recurrence-free survival rates.[41] Although targeting LAG-3 alone could be a possible therapeutic strategy, it is in com- binational therapies that it has proven its clinical interest to better enhance T cell activation, thereby improving the efficacy of vari- ous treatments. In this review, we will give an overview of combi- nation therapies involving targeting LAG-3, highlighting those in phase III studies.

2 | LAG-3 COMBINATIONAL THERAPIES IN ADVANCED CLINICAL EVALUATION

2.1 | Molecules targeting LAG-3 in clinical trials

Several neutralizing antibodies targeting LAG-3 have been developed as potential immunotherapeutic drugs to be used in various types of cancer.[42] They bind to human LAG-3 with high affinity and specificity to block the interaction of LAG-3 with its ligands, notably MHC II, and reverse LAG-3-mediated inhibition of T cell function in vitro.[43] Among them, three monoclonal antibodies, in combinational therapies, are currently in phase III clinical trials, which is the most advanced phase at present for molecules targeting LAG-3. Those are: relatlimab (also called BMS-986016),[44] fianlimab (also called REGN3767),[45] and favezelimab (also called MK-4280)[46] (Table 1). A bispecific antibody targeting LAG-3 and PD-1 is also in phase III clinical trials: tebotelimab (also called MGD013)[47] (Table 1). These phase III studies are described in Section 2.2.

Three other antibodies will soon enter phase III clinical tri- als (Table 1). Ab FS118 is a tetravalent bispecific antibody tar- geting LAG-3 and PD-1. A recent phase I first-in-human study (NCT03440437) has demonstrated that it was well tolerated in patients with advanced solid cancers resistant to anti-PD(L)1 therapy[48] (Table 1). The second one is Ieramilimab (LAG525), a humanized anti-LAG-3 monoclonal antibody, well tolerated in patients alone or in combination with the anti-PD-1 antibody spartalizumab. A recent phase II multicenter study (NCT02460224) including patients with different locally advanced or metastatic solid malignancies demonstrated that response to the combined immunotherapy was durable (>24 months) in some patients across all enrolled indications.[49] The

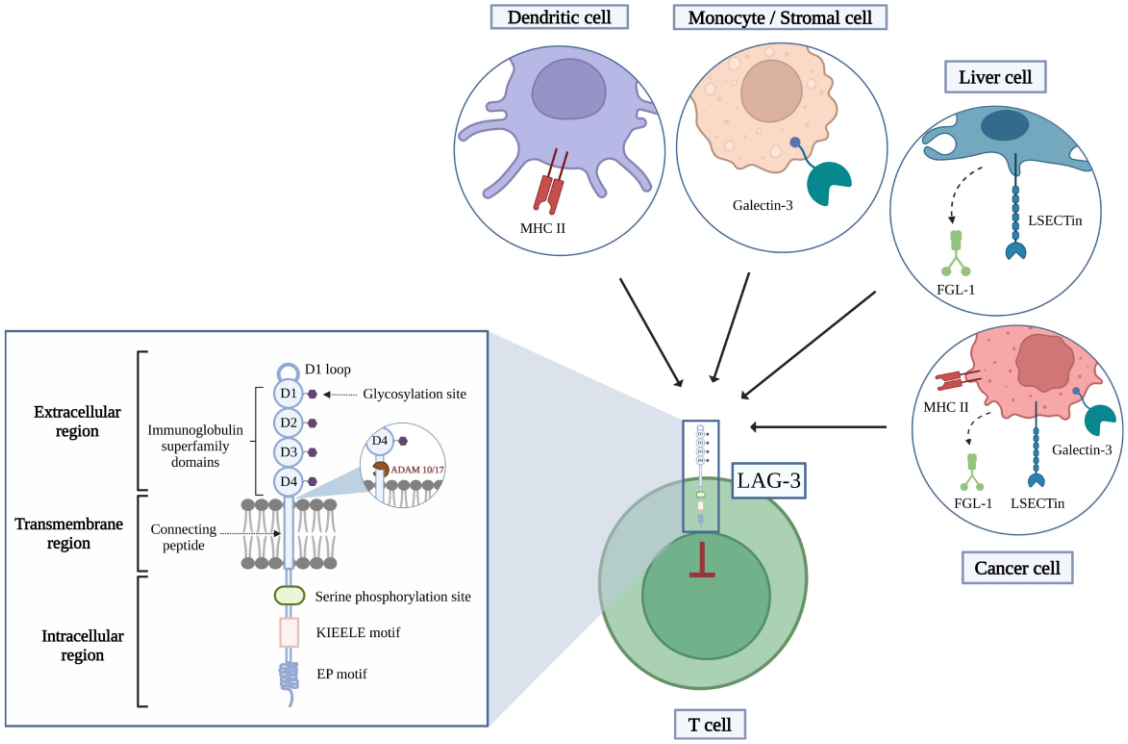


FIGURE 1 Structure of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) and its interaction with ligands. LAG-3 is present on the surface of T cells. It is composed of an extracellular, transmembrane, and intracellular region. The extracellular part comprises four domains belonging to the immunoglobulin superfamily (D1–D4), whose D1 domain has a loop domain rich in proline, and glycosylation sites. The transmembrane part consists of a connecting peptide. The intracellular part comprises a serine phosphorylation site, a KIEELE motif, and an EP motif.[29,30] A soluble form of LAG-3 exists, which appears as a result of cleavage of the extracellular part by ADAM 10/17. LAG-3 can interact with several ligands such as HMC II, FGL-1, LSECTin, or galectin-3, which are present in several cell types including cancer cells, liver cells, monocytes, stromal cells, and dendritic cells. Binding of LAG-3 to these ligands induces inhibition of T cells.

third is INCAGN02385, another anti-LAG-3 monoclonal antibody, soon to enter a phase III clinical trial, which proved to be well tolerated in a phase I study on different types of cancer such as lung, gastric, breast, ovarian, endometrial cancer, or even melanoma (NCT03538028).[50] A phase II clinical trial evaluating the combination of INCAGN02385 with retifanlimab (anti-PD-1) and INCAGN02390 (anti-Tim-3) in squamous cell carcinoma of the head and neck will end in 2024 (NCT05287113). Similarly, a phase II clinical trial testing INCAGN02385 in urothelial cancer will come to an end in 2024 (NCT04586244) (Table 1).

Finally, although still in early clinical trials, it is worth mentioning several other mono- or bispecific antibodies targeting LAG-3, such as the monoclonal antibodies Sym022 (LAG-3-inhibiting antibody),[51] GSK2831781 (LAG-3-depleting antibody),[52] and TSR-033 (LAG-3-inhibiting antibody)[53] or bispecific antibodies RO7247669 (PD-1/LAG-3-targeting antibody),[54] EMB-02 (PD-1/LAG-3-targeting antibody)[55] and pavunalimab (XmAb22841, LAG-3/CTLA-4-targeting antibody)[56] (Table 1).

1.1 | Combination treatments involving LAG-3 inhibitors in phase III clinical trials

Relatlimab was the first anti-LAG-3 antibody approved by the FDA in a phase III clinical trial (RELATIVITY-047) evaluating a dual anti-PD-1 (nivolumab) and anti-LAG-3 (relatlimab) therapy in patients with advanced melanoma (NCT03470922) (Table 2). Previous phase I/II studies demonstrated good efficacy and safety for the relatlimab–nivolumab association in melanoma (NCT01968109), with a disease control rate of 45%.[44] The phase III clinical trial showed a higher progression--free survival for melanoma patients treated with the double therapy (10.1 months) compared with patients treated with nivolumab alone (4.6 months),[57] which implied that blocking LAG-3 improved the efficacy of anti-PD-1 therapy. This promising clinical result highlights the important role of LAG-3 as a therapeutic target that potentiates the effects of other immunotherapies. In this phase III trial, the percentage of the patients presenting grade 3 or 4 side effects was 18.9% in the population treated with the dual therapy

TABLE 1 Molecules targeting lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) undergoing clinical evaluation.

Name of the drug	Type	Isotype	Laboratory	References
Relatlimab	Monoclonal antibody	IgG4κ	Bristol-Myers Squibb	44
Fianlimab	Monoclonal antibody	IgG4	Regeneron pharmaceuticals	45
Favezelimab	Monoclonal antibody	IgG4	Merck	46
Ieramilimab	Monoclonal antibody	IgG4	Novartis	49
INCAGN02385	Monoclonal antibody	IgG1κ	Incyte corporation	50
Sym022	Monoclonal antibody	IgG	Symphogen	51
GSK2831781	Monoclonal antibody	IgG1	GlaxoSmith	52
TSR-033	Monoclonal antibody	IgG4	Tesaro	53
Tebotelimab	Bispecific antibody (targeting LAG-3 and PD-1)	IgG4κ	MacroGenicx	47
FS118	Bispecific antibody (targeting LAG-3 and PD-L1)	IgG1	F-star therapeutics	48
RO7247669	Bispecific antibody (targeting LAG-3 and PD-1)	Undisclosed	Hoffmann-La Roche	54
EMB-02	Bispecific antibody (targeting LAG-3 and PD-1)	Undisclosed	EpimAb Biotherapeutics	55
Pavunalimab	Bispecific antibody (targeting LAG-3 and CTLA-4)	Undisclosed	Xencor	56

Note: The antibody type, isotype, and supplier are listed.

and 9.7% for the patients treated with nivolumab alone.[57] Four other phase III clinical trials evaluating the combination of relatlimab with nivolumab are underway in colon cancer, melanoma, and urothelial bladder cancer (NCT05328908, NCT05625399, NCT05002569, NCT05987241) (Table 2).

There are also three other phase II/III trials assessing the dual LAG-3 + PD-1 therapy, this time using fianlimab as a LAG-3 inhib- itor and cemiplimab (REGN2810) as a PD-1 inhibitor, in two types of cancer: melanoma and non-small cell lung cancer (NSCLC) (NCT05608291, NCT05352672, NCT05785767) (Table 2). Former phase I clinical trials on this dual therapy demonstrated an interesting safety profile (NCT03005782, NCT03233139),[58–61] which further supported the results obtained with nivolumab and relatlimab, confirming that dual targeting of PD-1 and LAG-3 appears to be a very promising avenue in cancer immunotherapy.

The dual immunotherapy targeting PD-1/LAG-3 is also being tested associated with chemotherapies in two different phase III clinical trials. The first one is evaluating fianlimab + cemiplimab combined with pemetrexed and cisplatin or paclitaxel and carboplatin in advanced NSCLC (NCT05800015) (Table 2). The second ongoing phase III trial aims to evaluate the bispecific PD-1 and LAG-3 antibody (tebotelimab) in combination with capecitabin + oxaliplatin or 5-fluorouracil + leucovorin + oxaliplatin (with margetuximab, anti-HER2) in metastatic or locally advanced HER2-positive gastric or gastroesophageal junction cancer (NCT04082364)[62] (Table 2). The bispecific tebotelimab is also being tested in association with another immunotherapeutic antibody called enoblituzumab (an anti-B7 homolog 3 protein, B7-H3), compared with the combination of MGA012 (an anti-PD-1, also called retifanlimab) with enoblituzumab (Table 2). B7-H3 (also known as CD276) has been described as a costimulatory molecule for T lymphocytes, promoting epithelial–mesenchymal transition and associated with poor prognosis and tumor progression.[63–65] A recent phase I clinical trial (NCT03219268) has demonstrated a tolerable safety and an interesting objective response rate of tebotelimab in patients with different cancer types including non-responders to PD-1 blockade (i.e., ovarian cancer and diffuse large B cell lymphoma),[47] which is encouraging for ongoing and future phase III clinical trials.

Finally, three phase III clinical trials are currently underway, testing the combination of favezelimab and the anti-PD-1 pembroli- zumab in colon cancer and Hodgkin lymphoma (NCT05600309, NCT05064059, NCT05508867) (Table 2).

Concerning undesirable effects, LAG-3 inhibitors alone or in combination with other ICIs are generally well tolerated with side effects such as pruritus, fatigue, and nausea in various cancers. The immune-related side effects described are mainly hypothyroidism, thyroiditis, rash, diarrhea or colitis, hyperthyroidism, hepatitis, adrenal insufficiency, pneumonitis, hypophysitis, nephritis, and renal dysfunction and/or hypersensitivity.[46,47,57,66] However, they did not warrant the arrest of the clinical assays. This highlights the need of biomarkers of toxicity or of response to LAG-3-based therapies to select the patients that would benefit from these innovating immunotherapies. Although no toxicity biomarkers have yet been validated, LAG-3 and PD-L1 levels have been studied as potential biomarkers of answer to the therapy. Indeed, LAG-3 and PD-L1 baseline expression in tumors has been demonstrated to be associated with a better response in various cancers (melanoma, epithelial ovarian cancer, triple-negative breast cancer, NSCLC), as well as with an improved progression-free survival in metastatic melanoma.[47,67]

It should be noted that LAG-3 is used and studied not only as a therapeutic target but also as a molecule of interest for the activation of immune cells presenting MHC II since MHC II is a major ligand for LAG-3. Accordingly, eftilagimod alpha (IMP321), a recombinant dimeric soluble form of LAG-3 that has been developed to activate dendritic cells via MHC II, has been approved in a phase I study in advanced renal cell carcinoma for its activity and safety.[68] A phase III clinical trial (NCT05747794) is currently evaluating IMP321

TABLE 2 Phase III clinical trials involving lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) with other molecules.

Combinational therapy	Type of cancer	NCT number	Trial starting date
Relatlimab/nivolumab	Untreated metastatic or unresectable melanoma	NCT03470922	2018-04
Relatlimab/nivolumab	Metastatic colorectal cancer	NCT05328908	2022-04
Relatlimab/nivolumab	Metastatic or unresectable melanoma	NCT05625399	2023-03
Relatlimab/nivolumab	Melanoma	NCT05002569	2021-10
Relatlimab/nivolumab	Bladder urothelial carcinoma	NCT05987241	2024-01
Fianlimab/cemiplimab/pemetrexed + cisplatin or paclitaxel + carboplatin	Advanced non-small cell lung cancer (NSCLC)	NCT05800015	2023-08
Fianlimab/cemiplimab	Melanoma	NCT05608291	2023-01
Fianlimab/cemiplimab	Locally advanced or metastatic melanoma	NCT05352672	2022-07
Fianlimab/cemiplimab	NSCLC	NCT05785767	2023-06
Favezelimab/pembrolizumab	Colorectal cancer	NCT05600309	2022-06
Favezelimab/pembrolizumab	Colorectal cancer	NCT05064059	2021-11
Favezelimab/pembrolizumab	Hodgkin lymphoma	NCT05508867	2022-10
Tebotelimab/enoblituzumab	Squamous cell carcinoma of the head and neck	NCT04129320	2019-10
Tebotelimab/margetuximab/ capecitabin + oxaliplatin or 5-Fluorouracil + leucovorin + oxaliplatin	Metastatic or locally advanced HER2-positive gastric or gastroesophageal junction cancer	NCT04082364	2019-09
IMP321/paclitaxel	Metastatic breast cancer	NCT05747794	2023-05

Note: Indicated are the immunotherapies and chemotherapies used. Relatlimab, fianlimab, favezelimab, and tebotelimab are anti-LAG-3; nivolumab, cemiplimab, and pembrolizumab are anti-PD-1; enoblituzumab is anti-B7-H3; IMP321 (eftilagimod alpha) is a dimeric soluble form of LAG-3.

in combination with the chemotherapeutic drug taxol (paclitaxel) in metastatic breast cancer (Table 2).

Altogether, these clinical studies allow us to conclude that LAG-3 holds promises in cancer therapy. Although clinical trials are providing major answers on the tolerance/efficacy of treatment combinations involving LAG-3 targeting, numerous preclinical studies have also been carried out, providing further insight into how they work at the immune level.

1 | PRECLINICAL AND TRANSLATIONAL STUDIES INVOLVING LAG-3 IN COMBINATIONAL THERAPIES

1.1 | Immunological response to anti-LAG-3 and anti-PD-1/PD-L1 association

Bridging the gap between preclinical and clinical studies, transla- tional research experiments using melanoma patients' samples have demonstrated that anti-PD-1/LAG-3 therapy increases the production of IL-12 and IL-18, which promotes IFNγ production and T cell costimulatory molecules such as CD27 and OX40, thereby promoting T cell activation.[69] It has also been reported that this dual therapy increases leukocyte chemoattraction via molecules such as CXCL9/10/11/12 and CCL3/20,[69] which could facilitate immune responses. It should be noted that this dual therapy also increases IL-10 production, which is an immunosuppressive cytokine whose role here remains elusive.[69] Dual inhibition of LAG-3 and PD-1 has an impact on regulatory T lymphocytes as well, by promoting the expansion of these cells but reducing their suppressive effect.[69] In multiple myeloma patients, dual inhibition of LAG-3 and PD-1 also has an impact on regulatory T lymphocytes, by reducing their proliferation in bone marrow mononuclear cells.[70] Analysis of tumor biopsies from patients with different solid cancers has shown that response to a bispecific anti-PD-1/LAG-3 antibody can be associ- ated with an increase in the activation of a $CD8^+$ T subtype called HLA-DR $CD25^+$ granzyme B^+ and in the proliferation of NK cells.[71] The dual anti-PD-1/LAG-3 therapy also promotes NK cells degranu- lation and production of IFNγ and TNFα.[71] Knowing that NK cells are immune cells described as having an antitumor activity,[72,73] in par- ticular by releasing cytotoxic granules,[73] we can therefore assume that the efficacy of the dual therapy also is mediated by NK cells.

In preclinical models, blocking both LAG-3 and PD-1 was also reported to enhance the inhibition of tumor growth in MC38 colorectal cancer and Sa1N fibrosarcoma,[74–76] and the activation of the immune system,[75,76] compared with the monotherapies. The immune response induced by blocking LAG-3 and PD-1 acts on the production of IFNγ, IL-2,[77] and TNFα by peripheral blood mononuclear cells (PBMCs).[76] IL-2 is a cytokine more associated with an antitumor response through its ability to stimulate T cell expansion,[78,79] while the pro- or antitumoral role of IFNγ and TNFα is still ambiguous today.[80–83] Further studies are needed to determine whether they are involved in tumor cytotoxicity or immune suppression. A bispecific antibody targeting LAG-3 and PD-1 (YG-003D3) has also demonstrated its effectiveness in in- creasing IL-6 production by PBMCs.[76] This result may seem diffi- cult to conciliate with the anticancer immune potentiation effect of the combinational therapy, IL-6 being a cytokine known for

its effects promoting cancer cell invasion and immunosuppression.[84,85] However, IL-6 has also been described as a molecule that can promote extravasation of T CD8+ lymphocytes into tumors.[86] It would therefore be interesting to identify whether IL-6, in the therapeutic context of LAG-3 and PD-1 inhibition, promotes T CD8+ recruitment within the tumor.

Concerning the blocking of PD-L1 instead of PD-1, we can note similar results. Indeed, blocking PD-L1 and LAG-3 inhibited tumor growth in colon cancer[87,88] and promoted survival in colon cancer.[87] Moreover, this dual therapy induced higher secretion of IL-2 and IFNγ by PBMCs especially when bispecific antibodies or tribodies targeting PD-L1 and LAG-3 were used[77,89,90] and limited suppression of effector T cells by Treg in melanoma essentially with the bispecific antibody ABL501.[89] This dual therapy also increased the proportion of CD8+ and CD4+ T cells in colorectal cancer or melanoma essentially with the bispecific antibodies IBI323 and ABL501, respectively,[88,89] increased cytotoxicity by CD8+ T cells in melanoma,[89] and increased TNFα expression by CD4+ TILs in MC38 colorectal cancer.[88] It also increased the proportion of CD4+ and CD8+ T cells within the tumor and in the blood in the MC38 colorectal cancer model.[88]

All in all, the high anti-tumor effect induced by targeting both LAG-3 and PD(L)-1 could be explained by reduced immunosuppres- sion and potentiation of immune responses by CD8+ and CD4+ T cells.

1.1 | LAG-3 inhibition with other immunotherapies

Targeting other immune checkpoints, such as T cell immunoglobu- lin and ITIM domain (TIGIT) and T cell immunoglobulin 3 (Tim-3), has also been tested in combination with the inhibition of LAG-3 in a model of colon cancer. Indeed, targeting LAG-3 + TIGIT or LAG-3 + PD-1 + Tim-3 lead to a decrease in tumor growth.[91,92] Of note, the targeting of LAG-3 + TIGIT induced complete tumor re- gression in a large number of mice as well as an improved survival rate.[91] As for the targeting of LAG-3 + PD-1 + Tim-3, it increased the production of B-granzyme by CD8+ TILs[92] and promoted cytotoxic effects of T lymphocytes against cancer cells.[93] These results once again demonstrate the major role played by CD8+ T lymphocytes in the antitumor response induced by anti-LAG-3.

1.2 | LAG-3 inhibition and radiation

Radiotherapy is known to destroy cancer cells and is an effective cancer treatment. Nevertheless, its effectiveness can be lim- ited in some patients because the dose required to destroy the tumor tissue can damage the surrounding healthy cells.[94,95] New technologies have been developed to overcome these drawbacks and target cancer cells more specifically. These include micro- wave ablation and nanoparticles. Indeed, the aim of microwave ablation is to specifically destroy the tumor area by inserting a needle into the tumor and generating heat. The heat emitted comes from microwaves. On the other hand, metal nanoparticle radio-enhancer activated by ionizing radiation can deliver a highly concentrated dose of radiation directly into the tumor. In a mouse model of MC38 colorectal cancer, the combination of microwave ablation with anti-LAG-3 induced a decrease in tumor growth as well as an increase in mice survival,[96] which was also observed in a mouse model of anti-PD-1-resistant lung cancer (344SQR), treated with metal nanoparticle radio-enhancer (NBTXR3), ra- diation, anti-PD-1, anti-TIGIT, and anti-LAG-3 compared with the NBTXR3 + radiation + anti-PD-1 + anti-TIGIT group.[97] This indi- cates that blocking LAG-3 can improve the effectiveness of radia- tion therapies. Moreover, the addition of anti-LAG-3 to microwave ablation increased the number of CD8+ IFNγ+ and CD8+ TNFα+ TILs,[96] indicating that the effect of anti-LAG-3 was probably medi- ated by the activation of CD8+ T cells.

1.3 | LAG-3 inhibition with adoptive cell therapies

T cell-based adoptive cell treatments are attracting attention as emerging cancer therapies. This new form of therapy involves using T lymphocytes and genetically modifying them to express a CAR receptor capable of specifically recognizing tumor cells. In a mouse model of B16 melanoma, anti-LAG-3 combined with melanoma-specific CD4+ T cells and irradiation increased mouse survival and resulted in significant tumor regression.[98] It is noteworthy that the addition of anti-PD-L1 instead of anti-LAG-3 was less efficient, resulting in fewer mice with a regressed tumor.[98] Moreover, the number of melanoma-specific TCD4+ cells increased in the presence of anti-LAG-3 compared with anti-PD-L1, supporting the notion that anti-LAG-3 could also act on CD4+ T cells.[98]

XBP1/CD138/CS1 is a multipeptide that induces multiple myeloma-specific cytotoxic T lymphocytes,[99–102] while B cell maturation antigen (BCMA) is a transmembrane receptor which belongs to the family of tumor necrosis factor receptors and contributes to the growth and survival of myeloma cells. The combination in multiple myeloma of anti-LAG-3 with cytotoxic T lymphocytes specific for XBP1/CD138/CS1 or specific for BCMA (YLMFLLRKI) induced an increase in the degranulation of CD8+ T cells and of CD45RO+ memory cells, respectively.[70,103] Furthermore, anti-LAG-3 combined with XBP1/CD138/CS1-specific cytotoxic T lymphocytes directed against multiple myeloma resulted in an increased proliferation of CD8+, central memory, effector memory, CD28+, and CD38+ CTLs and an increase in IFNγ production.[70] This again indicates that the addition of anti-LAG-3 promotes an antitumor response mediated by cytotoxic TCD8+.

Another adoptive cell therapy based on the use of CD3+CD4−CD8− double negative T cells showed in breast cancer an upregulation in the mRNA expression of Tbet (a transcription factor involved in the regulation of T cell activation), IFNγ, and perforin (in- volved in the cell death process) when combined with anti-LAG-3.[15] This demonstrates that anti-LAG-3 promoted the cytotoxicity of double-negative T cells.[15] This highlights that T cells not differen- tiated into CD4+ or CD8+ can also play a role in the antitumor re- sponse and that this can be favored by an anti-LAG-3 therapy.

1.1 | LAG-3 inhibition with targeted therapies

Various targeted therapies such as those targeting cell membrane markers (e.g., CD20), kinases, or histone deacetylases (HDACs) have been tested in combination with LAG-3 inhibition. Indeed, molecules targeting CD20, glycogen synthase kinase 3 (Gsk-3), phosphoinositide-3-kinase δ (PI3Kδ), or domatinostat (a HDAC inhibitor) have been tested in combination with LAG-3 inhibition in B16 melanoma, 4 T1 breast cancer, CT26 colon cancer, or C38 colon carcinoma.[104–107] Overall, these dual therapies demonstrated a reduction in tumor growth[104–107] or even complete tumor regression in 60% or 80% of mice for Gsk-3 inhibition + anti-LAG-3 combina- tion or domatinostat + anti-PD-1 + anti-LAG-3 combination, respectively.[104,106] Gsk-3, PI3Kδ, and HDAC are present in cancer cells and are involved in proliferation processes. We can therefore hypothesize that inhibition of these molecules prevents cancer cells from proliferating, thus facilitating their elimination by the immune system. The presence of anti-LAG-3 limits the inhibition of T cells by cancer cells resistant to Gsk-3, PI3Kδ, and HDAC inhibitors, which could explain the effects observed above. For these experiments, SB415286 was the molecule used for Gsk-3 inhibition and PI-3065 for PI3Kδ inhibition.[104,106] It should be noted that SB415286 + anti- LAG-3 combination treatments led to increasing proportion of $CD8^+$ TIL cells expressing granzyme B or IFNγ and TNFα. Therefore, inhibi- tion of LAG-3 promoted a cytotoxic immune response mediated by $CD8^+$ T cells.[104]

In addition, the combination of anti-LAG-3 with 41BB agonist antibodies (41BB, also called CD137/TNFSF9, a costimulatory recep- tor on T cells) and with a CXCR1/2 inhibitor (SX-682) already used in several phase II clinical trials (NCT04599140, NCT05570825, NCT05604560, NCT04574583) was tested in a mouse model of iKRAS pancreatic cancer. CXCR1/2 are receptors for CXCL8 chemokines and are present on several cell types including myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), which are involved in immunosuppression.[108,109] SX-682 has been shown to decrease granulocytic MDSC levels and increase $CD8^+$ T tumor infiltration. Moreover, the addition of the anti-LAG-3 + anti-41BB combination prolonged mouse survival, increased $CD4^+$ and $CD8^+$ T levels in tumors, as well as their effector and memory phenotypes. In addition, IFNγ and TNFα levels in tumor-infiltrating T cells were increased in the presence of the triple therapy.[110] Although this work did not allow to assert whether anti-LAG-3 potentiates the effect of SX-682 because it was not tested alone without the anti-41BB agonist, it clearly demonstrated that the dual anti-LAG-3/anti-41BB combination played an import- ant role in enhancing SX-682 efficacy and antitumor immunity.

1.2 | Other reported therapies associated with LAG-3

Oxysophocarpine, a bioactive alkaloid, is a traditional Chinese medicine that possesses various pharmacological functions. In a hepatocellular carcinoma model, combining it with anti-LAG-3 decreased tumor growth and the viability of cancer cells, which was associated with an increase in the cytotoxicity of $CD8^+$ T cells.[111]

Finally, combination of LAG-3 blockade with a therapeutic vaccine could be beneficial; more precisely, a vaccine based on mesenchymal stromal cells expressing the immunoproteasome complex which gives these cells an antigen cross-presentation capacity whose epitopes are very different from those of dendritic cells. In a mouse EL4 lymphoma model, adding anti-LAG-3 to the vaccine im- proved the vaccine's efficacy on mouse survival, at a 30%–50% sur- vival rate.[112] Another study showed that AU-011, a virus-like drug conjugate (VDC) which induces antitumor immune responses, when combined with anti-PD-L1 and anti-LAG-3 improved mouse survival in an MC38 colorectal cancer model.[113]

All combinational strategies involving targeting LAG-3 tested in preclinical studies discussed in this review are summarized in Figure 2.

2 | CONCLUDING REMARKS AND CHALLENGES AHE AD

Still many cancer patients either gain minimal benefit from antican- cer therapies or eventually progress, leaving an unmet need for the development of novel therapeutic agents and strategies. LAG-3 acts by inhibiting T cells' anticancer response and providing a tumor microenvironment favorable for tumor escape different from other checkpoint receptors. Molecules targeting LAG-3 prevent the interaction of LAG-3 with its ligands (mainly MHC II, LSECTin, FGL-1, and galectin-3), thus preventing T lymphocytes from being inhibited. It is in combinational therapies, notably with inhibitors of other immune checkpoints, that anti-LAG-3 has become a promising option for oncologists in precision medicine. The association of anti-LAG-3 with anti-PD-1 is particularly exciting since it shows a remarkable synergy and a decrease in the number of resistant patents. The clini- cal studies highlighted in this review show that dual therapies com- bining anti-PD-1 with anti-LAG-3 are booming and are proving to be highly effective in improving patient longevity, as demonstrated for instance in the RELATIVITY-047 phase III clinical trial. To date, at least two LAG-3-directed agents (eftilagimod alpha, relatlimab) have been approved by the FDA in combination with PD-1 inhibitors in the setting of advanced solid tumors. Dual inhibition of PD-1 and LAG-3 appears to facilitate sustained responses and disease control. It is worth mentioning that, overall, the molecules targeting LAG-3 currently in clinical trials appear to be well tolerated, whether used alone or in combination.

Preclinical studies focused on revealing the detailed cellular and molecular mechanisms by which LAG-3 inhibitors enhance tumor immunity indicate mainly the involvement of $CD8^+$ T lymphocyte activation and cytotoxicity, as well as the involvement of $CD4^+$ T cells. Numerous other preclinical studies involving LAG-3 inhibition coupled with other therapies (chemotherapies, radiotherapy, adoptive cell therapies, other immunotherapies, targeted therapies), also discussed in this review, lead to similar

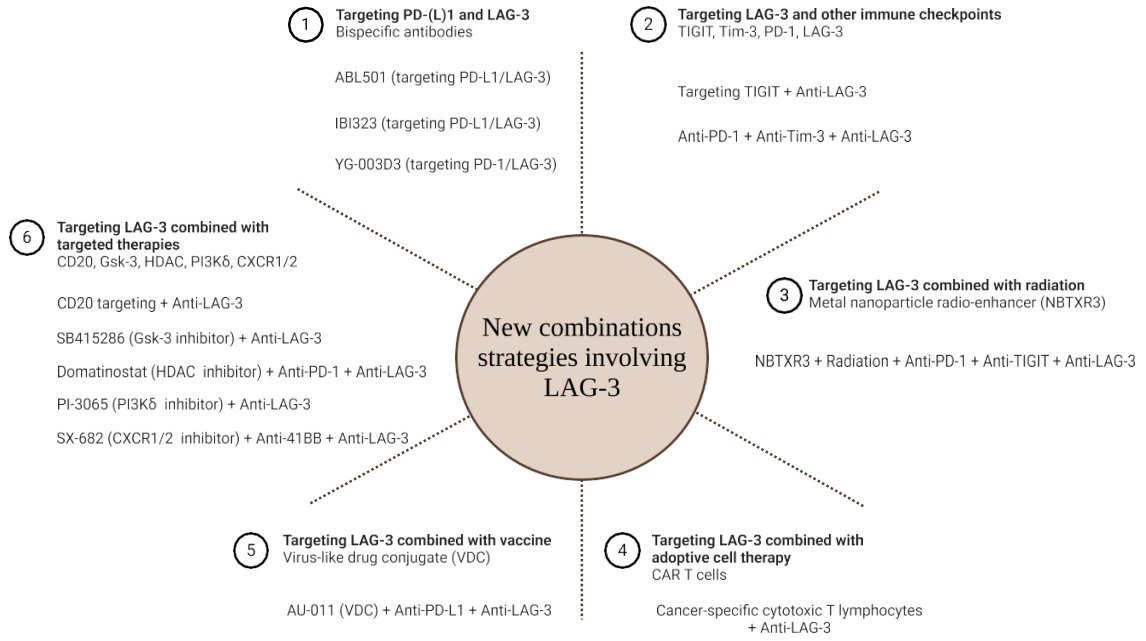


FIGURE 2 New treatment strategies that involve targeting lymphocyte activation gene 3 (LAG-3). Numerous new therapeutic combinations based on LAG-3 inhibition have been tested. These include (1) bispecific antibodies targeting LAG-3 and PD-(L)1, such as ABL501, IBI323, and YG-003D3; (2) targeting LAG-3 and other immune checkpoints such as targeting TIGIT + anti-LAG-3 or anti-PD-1 + anti-Tim-3 + anti-LAG-3; (3) radiation and immunotherapies such as NBTXR3 (metal nanoparticle radio-enhancer) + radiation + anti- PD-1 + anti-TIGIT + anti-LAG-3; (4) adoptive cell therapies based on cancer-specific T lymphocytes associated with anti-LAG-3; (5) vaccines, such as AU-011, a virus-like drug conjugate (VDC) associated with anti-LAG-3 and anti-PD-L1; (6) targeted therapies in combination with anti-LAG-3 +/− other therapy such as CD20 targeting + anti-LAG-3, SB415286 (Gsk-3 inhibitor) + anti-LAG-3, domatinostat (histone deacetylase [HDAC] inhibitor) + anti-PD-1 + anti-LAG-3, PI-3065 (PI3Kδ inhibitor) + anti-LAG-3, and SX-682 (CXCR1/2 inhibitor) + anti- 41BB + anti-LAG-3.

conclusions, amplifying the interest in LAG-3 blockade as a potentiator of cancer therapies. It would now be interesting to study in more detail the immune response, particularly in which $CD4^+$ T lymphocyte subtypes are involved in tumor regression, and what role each cytokine plays in the tumor immune response (IFNγ, TNFα, IL-10, IL-6, ...) in different therapeutic combinations in order to flesh out the immune response mechanisms further and per- haps find even more effective therapies. Some preclinical studies on new treatment combinations involving LAG-3 blockade have been completed, opening the door to further clinical trials. The diversity of molecules associated with LAG-3 highlighted here and the synergistic advantages may allow a wider choice of therapies in the clinic and, toward a more personalized medicine, to define the optimal combinational treatment for each patient. It also paves the way for developing dual-targeting drugs like the already re- ported bispecific LAG-3/PD-L1 antibodies.[88,114]

It should be noted that the anti-PD-1 (nivolumab)/anti-LAG-3 (relatlimab) combination tested in the RELATIVITY-047 clinical trial is also being tested in another phase II clinical trial as neo- adjuvant therapy (NCT02519322). The advantage of neoadjuvant treatment is not only to reduce tumor size before surgery, so as to limit the amount of healthy tissue to be removed, but also to understand the mechanisms of resistance or of response to the dual therapy and thereby to adapt the adjuvant treatment subsequently. Such studies could also provide answers concerning the immunological mechanisms of action of anti-LAG-3 therapy. In conclusion, LAG-3 inhibitors, through their ability to reinvig- orate anticancer immune responses, may provide a critical piece in assembling combination therapies capable of achieving durable responses against advanced cancers, with immune adverse events minimized.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Aude Chavanton: Conceptualization; investigation; writing – origi- nal draft. **Flavie Mialhe:** Investigation; resources; validation. **Jimena Abrey:** Investigation; resources; validation. **Alvaro Baeza Garcia:** Resources; supervision; validation. **Carmen Garrido:** Supervision; validation; writing – review and editing.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Ruban Rose Fondation, the "Institut National contre le Cancer" (INCa PLBIO-22-093 and PLBIO21-107), the "Ligue Contre le Cancer," the Regional Council of Burgundy, and the FEDER for their financial support. AC has a PhD fellowship from the Regional

Council of Burgundy and FM from the Ligue National contre le Cancer.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflict of interest.

ETHICS STATEMENT

Approval of the research protocol by an Institutional Reviewer Board: N/A.

Informed Consent: N/A.

Registry and the Registration No. of the study/trial: N/A.

Animal Studies: N/A.

ORCID

Carmen Garrido https://orcid.org/0000-0003-1368-1493

REFERENCES

1. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992;11(11):3887-3895. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x
2. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*. 1996;271(5256):1734-1736. doi:10.1126/science.271.5256.1734
3. Curti BD, Kovacsovics-Bankowski M, Morris N, et al. OX40 is a potent immune stimulating target in late stage cancer patients. *Cancer Res*. 2013;73(24):7189-7198. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-4174
4. Gordon SR, Maute RL, Dulken BW, et al. PD-1 expression by tumor-associated macrophages inhibits phagocytosis and tumor immunity. *Nature*. 2017;545(7655):495-499. doi:10.1038/nature22396
5. Dardalhon V, Anderson AC, Karman J, et al. Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *J Immunol*. 2010;185(3):1383-1392. doi:10.4049/jimmunol.0903275
6. Pentcheva-Hoang T, Egen JG, Wojnoonski K, Allison JP. B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*. 2004;21(3):401-413. doi:10.1016/j.immuni.2004.06.017
7. Podlesnykh SV, Abramova KE, Gordeeva A, Khlebnikov AI, Chapoval AI. Peptide blocking CTLA-4 and B7-1 interaction. *Molecules*. 2021;26(2):253. doi:10.3390/molecules26020253
8. Ribas A, Kefford R, Marshall MA, et al. Phase III randomized clinical trial comparing Tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J Clin Oncol*. 2013;31(5):616-622. doi:10.1200/JCO.2012.44.6112
9. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in previously untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23-34. doi:10.1056/ NEJMoa1504030
10. Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced non-squamous non-small cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015;373(17):1627-1639. doi:10.1056/NEJMoa1507643
11. Thommen DS, Schreiner J, Müller P, et al. Progression of lung cancer is associated with increased dysfunction of T cells defined by Coexpression of multiple inhibitory receptors. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(12):1344-1355. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0097
12. Shen R, Postow MA, Adamow M, et al. LAG-3 expression on peripheral blood cells identifies patients with poorer outcomes after immune checkpoint blockade. *Sci Transl Med*. 2021;13(608):eabf5107. doi:10.1126/scitranslmed.abf5107
13. Wagener-Ryczek S, Schoemmel M, Kraemer M, et al. Immune pro- file and immunosurveillance in treatment-naive and neoadjuvantly treated esophageal adenocarcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2020;69(4):523-533. doi:10.1007/s00262-019-02475-w
14. Lee CH, Jung SJ, Seo WI, et al. Coexpression of lymphocyte-activation gene 3 and programmed death ligand-1 in tumor infiltrating immune cells predicts worse outcome in renal cell carcinoma. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2022;36:3946320221125588. doi:10.1177/03946320221125588
15. Wang M, Wei Y, Li Y, et al. Targeting breast cancer with a combination of DNT and LAG3 checkpoint blockage and its mechanism. *Immun Inflamm Dis*. 2022;10(8):e626. doi:10.1002/iid3.626
16. Macek Jilkova Z, Aspord C, Kurma K, et al. Immunologic features of patients with advanced hepatocellular carcinoma before and during Sorafenib or anti-programmed Death-1/programmed death-L1 treatment. *Clin Transl Gastroenterol*. 2019;10(7):e00058. doi:10.14309/ctg.0000000000000058
17. Sobottka B, Moch H, Varga Z. Differential PD-1/LAG-3 expression and immune phenotypes in metastatic sites of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2021;23(1):4. doi:10.1186/s13058-020-01380-w
18. Somasundaram A, Cillo AR, Lampenfeld C, et al. Systemic immune dysfunction in cancer patients driven by IL6 induction of LAG3 in peripheral CD8+ T cells. *Cancer Immunol Res*. 2022;10(7):885-899. doi:10.1158/2326-6066.CIR-20-0736
19. He Y, Yu H, Rozeboom L, et al. LAG-3 protein expression in non- small cell lung cancer and its relationship with PD-1/PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes. *J Thorac Oncol*. 2017;12(5):814-823. doi:10.1016/j.jtho.2017.01.019
20. Li N, Wang Y, Forbes K, et al. Metalloproteases regulate T-cell proliferation and effector function via LAG-3. *EMBO J*. 2007;26(2):494-504. doi:10.1038/sj.emboj.7601520
21. Peng Y, Zhang C, Rui Z, et al. A comprehensive profiling of solu- ble immune checkpoints from the sera of patients with non-small cell lung cancer. *J Clin Lab Anal*. 2022;36(2):e24224. doi:10.1002/jcla.24224
22. Que Y, Fang Z, Guan Y, et al. LAG-3 expression on tumor- infiltrating T cells in soft tissue sarcoma correlates with poor survival. *Cancer Biol Med*. 2019;16(2):331-340. doi:10.20892/j. issn.2095-3941.2018.0306
23. Pedersen M, Westergaard MCW, Milne K, et al. Adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes in patients with metastatic ovarian cancer: a pilot study. *Onco Targets Ther*. 2018;7(12):e1502905. doi:10.1080/2162402X.2018.1502905
24. Kisielow M, Kisielow J, Capoferri-Sollami G, Karjalainen K. Expression of lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) on B cells is induced by T cells. *Eur J Immunol*. 2005;35(7):2081-2088. doi:10.1002/eji.200526090
25. Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, Kurschner C, Vignali DAA. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3). *Eur J Immunol*. 2002;32(8):2255-2263.
26. Workman CJ, Wang Y, El Kasmi KC, et al. LAG-3 regulates Plasmacytoid dendritic cell homeostasis. *J Immunol*. 2009;182(4):1885-1891. doi:10.4049/jimmunol.0800185
27. Juno JA, Stalker AT, Waruk JL, et al. Elevated expression of LAG-3, but not PD-1, is associated with impaired iNKT cytokine produc- tion during chronic HIV-1 infection and treatment. *Retrovirology*. 2015;12(1):17. doi:10.1186/s12977-015-0142-z
28. Merino A, Zhang B, Dougherty P, et al. Chronic stimulation drives human NK cell dysfunction and epigenetic reprograming. *J Clin Invest*. 2019;129(9):3770-3785. doi:10.1172/JCI125916
29. Shi AP, Tang XY, Xiong YL, et al. Immune checkpoint LAG3 and its ligand FGL1 in cancer. *Front Immunol*. 2022;12:785091. doi:10.3389/fimmu.2021.785091
30. Huo JL, Wang YT, Fu WJ, Lu N, Liu ZS. The promising immune checkpoint LAG-3 in cancer immunotherapy: from basic research to

clinical application. *Front Immunol*. 2022;13:956090. doi:10.3389/fimmu.2022.956090

1. Maruhashi T, Sugiura D, Okazaki IM, et al. Binding of LAG-3 to stable peptide-MHC class II limits T cell function and suppresses autoimmunity and anti-cancer immunity. *Immunity*. 2022;55(5):912-924.e8. doi:10.1016/j.immuni.2022.03.013
2. Xu F, Liu J, Liu D, et al. LSECtin expressed on melanoma cells promotes tumor progression by inhibiting antitumor T-cell responses. *Cancer Res*. 2014;74(13):3418-3428. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-2690
3. Wang J, Sanmamed MF, Datar I, et al. Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG3. *Cell*. 2019;176(1–2):334-347.e12. doi:10.1016/j.cell.2018.11.010
4. Kouo T, Huang L, Pucsek AB, et al. Galectin-3 shapes antitumor immune responses by suppressing CD8+ T cells via LAG-3 and inhibiting expansion of Plasmacytoid dendritic cells. *Cancer Immunol Res*. 2015;3(4):412-423. doi:10.1158/2326-6066.CIR-14-0150
5. Liu W, Tang L, Zhang G, et al. Characterization of a novel C-type lectin-like gene, LSECtin: demonstration of carbohydrate binding and expression in sinusoidal endothelial cells of liver and lymph node*. *J Biol Chem*. 2004;279(18):18748-18758. doi:10.1074/jbc.M311227200
6. Liang B, Workman C, Lee J, et al. Regulatory T cells inhibit den- dritic cells by lymphocyte activation Gene-3 engagement of MHC class II1. *J Immunol*. 2008;180(9):5916-5926. doi:10.4049/jimmunol.180.9.5916
7. Donia M, Andersen R, Kjeldsen JW, et al. Aberrant expression of MHC class II in melanoma attracts inflammatory tumor-specific CD4+ T- cells, which dampen CD8+ T-cell antitumor reactivity. *Cancer Res*. 2015;75(18):3747-3759. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2956
8. Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. *Am J Pathol*. 1995;147(4):1016-1028.
9. Mazurek N, Byrd JC, Sun Y, et al. Cell-surface galectin-3 confers resistance to TRAIL by impeding trafficking of death recep- tors in metastatic colon adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ*. 2012;19(3):523-533. doi:10.1038/cdd.2011.123
10. Zhu D, Bhatt S, Lu X, et al. Chlamydophila psittaci-negative oc- ular adnexal marginal zone lymphomas express self polyreactive B-cell receptors. *Leukemia*. 2015;29(7):1587-1599. doi:10.1038/leu.2015.39
11. Takamatsu K, Tanaka N, Hakozaki K, et al. Profiling the inhibitory receptors LAG-3, TIM-3, and TIGIT in renal cell carcinoma reveals malignancy. *Nat Commun*. 2021;12(1):5547. doi:10.1038/s41467-021-25865-0
12. Chocarro L, Blanco E, Arasanz H, et al. Clinical landscape of LAG- 3-targeted therapy. *Immunooncol Technol*. 2022;14:100079. doi:10.1016/j.iotech.2022.100079
13. Thudium K, Selby M, Zorn JA, et al. Preclinical characterization of Relatlimab, a human LAG-3–blocking antibody, alone or in combination with Nivolumab. *Cancer Immunol Res*. 2022;10(10):1175-1189. doi:10.1158/2326-6066.CIR-22-0057
14. Ascierto PA, Melero I, Bhatia S, et al. Initial efficacy of anti-lymphocyte activation gene-3 (anti–LAG-3; BMS-986016) in combination with nivolumab (nivo) in pts with melanoma (MEL) previously treated with anti–PD-1/PD-L1 therapy. *JCO*. 2017;35(15_suppl):9520. doi:10.1200/JCO.2017.35.15_suppl.9520
15. Hamid O, Weise A, Kim TM, et al. 400P phase I study of fianlimab, a human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) monoclonal antibody, in combination with cemiplimab in advanced melanoma (mel). *Ann Oncol*. 2022;33:S1598. doi:10.1016/j.annonc.2022.10.431
16. Garralda E, Sukari A, Lakhani NJ, et al. A first-in-human study of the anti-LAG-3 antibody favezelimab plus pembrolizumab in previously treated, advanced microsatellite stable colorectal cancer. *ESMO Open*. 2022;7(6):100639. doi:10.1016/j.esmoop.2022.100639
17. Luke JJ, Patel MR, Blumenschein GR, et al. The PD-1- and LAG-3-targeting bispecific molecule tebotelimab in solid tumors and hematologic cancers: a phase 1 trial. *Nat Med*. 2023;29(11):2814-2824. doi:10.1038/s41591-023-02593-0
18. Yap TA, LoRusso PM, Wong DJ, et al. A phase 1 first-in-human study of FS118, a tetravalent bispecific antibody targeting LAG-3 and PD-L1 in patients with advanced cancer and PD-L1 resistance. *Clin Cancer Res*. 2023;29(5):888-898. doi:10.1158/1078-0432. CCR-22-1449
19. Lin CC, Garralda E, Schöffski P, et al. A phase 2, multicenter, open-label study of anti-LAG-3 ieramilimab in combination with anti- PD-1 spartalizumab in patients with advanced solid malignancies. *Onco Targets Ther*. 2024;13(1):2290787. doi:10.1080/2162402X.2023.2290787
20. Powderly JD, Hamid O, Gutierrez ME, et al. 742P first-in-human phase I study of INCAGN02385, a LAG-3 monoclonal antibody antagonist in patients with advanced malignancies. *Ann Oncol*. 2022;33:S883. doi:10.1016/j.annonc.2022.07.868
21. Lakhani N, Spreafico A, Tolcher AW, et al. 1019O phase I studies of Sym021, an anti-PD-1 antibody, alone and in combination with Sym022 (anti-LAG-3) or Sym023 (anti-TIM-3). *Ann Oncol*. 2020;31:S704. doi:10.1016/j.annonc.2020.08.1139
22. Ellis J, J B Marks D, Srinivasan N, et al. Depletion of LAG-3+ T cells translated to pharmacology and improvement in psoriasis disease activity: a phase I randomized study of mAb GSK2831781. *Clin Pharmacol Ther*. 2021;109(5):1293-1303. doi:10.1002/cpt.2091
23. Ghosh S, Sharma G, Travers J, et al. TSR-033, a novel therapeutic antibody targeting LAG-3, enhances T-cell function and the activity of PD-1 blockade in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2019;18(3):632-641. doi:10.1158/1535-7163.MCT-18-0836
24. Rohrberg KS, Garralda E, Calvo E, et al. 745P clinical activity, safety, and PK/PD from the first in human study (NP41300) of RO7247669, a PD1-LAG3 bispecific antibody. *Ann Oncol*. 2022;33:S884-S885. doi:10.1016/j.annonc.2022.07.871
25. Day D, Ganju V, Chung K, et al. 1028P preliminary phase I results from a first-in-human study of EMB-02, a PD-1xLAG-3 bispecific antibody, in patients (pts) with advanced solid tumors. *Ann Oncol*. 2023;34:S625. doi:10.1016/j.annonc.2023.09.2167
26. Jacob S, Daud A. Phase Ib/II study of XmAb23104 (PD1 X ICOS) and XmAb22841 (CTLA-4 X LAG3) combination in metastatic melanoma refractory to prior immune checkpoint inhibitor therapy with and without CNS disease. *JCO*. 2023;41(16_suppl):TPS9595. doi:10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.TPS9595
27. Tawbi HA, Schadendorf D, Lipson EJ, et al. Relatlimab and Nivolumab versus Nivolumab in untreated advanced melanoma. *N Engl J Med*. 2022;386(1):24-34. doi:10.1056/NEJMoa2109970
28. Hamid O, Lewis K, Weise A, et al. 150P phase I study of fianlimab: a human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) monoclonal antibody, in combination with cemiplimab in advanced melanoma (mel) – subgroup analysis. *Immuno-Oncol Technol*. 2022;16:100262. doi:10.1016/j.iotech.2022.100262
29. Hamid O, Lewis KD, Weise AM, et al. Significant durable response with fianlimab (anti-LAG-3) and cemiplimab (anti-PD-1) in advanced melanoma: post adjuvant PD-1 analysis. *JCO*. 2023;41(16_suppl):9501. doi:10.1200/JCO.2023.41.16_suppl.9501
30. Cho BC, Dy G, Kim TM, et al. 127P phase I study of fianlimab: a human lymphocyte activation gene-3 (LAG-3) monoclonal antibody, in combination with cemiplimab in advanced NSCLC. *Immuno-Oncol Technol*. 2022;16:100239. doi:10.1016/j.iotech.2022.100239
31. Papadopoulos KP, Lakhani NJ, Johnson ML, et al. First-in-human study of REGN3767 (R3767), a human LAG-3 monoclonal antibody (mAb), ± cemiplimab in patients (pts) with advanced malignancies. *JCO*. 2019;37(15_suppl):2508. doi:10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2508
32. Catenacci DV, Rosales M, Chung HC, et al. MAHOGANY: margetuximab combination in HER2+ unresectable/metastatic

gastric/gastroesophageal junction adenocarcinoma. *Future Oncol*. 2021;17(10):1155-1164. doi:10.2217/fon-2020-1007

1. Jiang B, Zhang T, Liu F, et al. The co-stimulatory molecule B7-H3 promotes the epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016;7(22):31755-31771. doi:10.18632/oncotarget.9035
2. Chapoval AI, Ni J, Lau JS, et al. B7-H3: a costimulatory molecule for T cell activation and IFN-γ production. *Nat Immunol*. 2001;2(3):269-274. doi:10.1038/85339
3. Hu Y, Lv X, Wu Y, et al. Expression of costimulatory molecule B7-H3 and its prognostic implications in human acute leukemia. *Hematology*. 2015;20(4):187-195. doi:10.1179/1607845414Y.0000000186
4. Schöffski P, Tan DSW, Martín M, et al. Phase I/II study of the LAG-3 inhibitor ieramilimab (LAG525) ± anti-PD-1 spartalizumab (PDR001) in patients with advanced malignancies. *J Immunother Cancer*. 2022;10(2):e003776. doi:10.1136/jitc-2021-003776
5. Gide TN, Paver EC, Yaseen Z, et al. Lag-3 expression and clinical outcomes in metastatic melanoma patients treated with combination anti-lag-3 + anti-PD-1-based immunotherapies. *Onco Targets Ther*. 2023;12(1):2261248. doi:10.1080/2162402X.2023.2261248
6. Brignone C, Escudier B, Grygar C, Marcu M, Triebel F. A phase I pharmacokinetic and biological correlative study of IMP321, a novel MHC class II agonist, in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6225-6231. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0068
7. Huuhtanen J, Kasanen H, Peltola K, et al. Single-cell characterization of anti–LAG-3 and anti–PD-1 combination treatment in patients with melanoma. *J Clin Invest*. 2023;133(6):e164809. doi:10.1172/JCI164809
8. Bae J, Accardi F, Hideshima T, et al. Targeting LAG3/GAL-3 to overcome immunosuppression and enhance anti-tumor immune responses in multiple myeloma. *Leukemia*. 2022;36(1):138-154. doi:10.1038/s41375-021-01301-6
9. Natoli M, Hatje K, Gulati P, et al. Deciphering molecular and cellular ex vivo responses to bispecific antibodies PD1-TIM3 and PD1-LAG3 in human tumors. *J Immunother Cancer*. 2022;10(11):e005548. doi:10.1136/jitc-2022-005548
10. Ichise H, Tsukamoto S, Hirashima T, et al. Functional visualization of NK cell-mediated killing of metastatic single tumor cells. *elife*. 2022;11:e76269. doi:10.7554/eLife.76269
11. Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. Natural killer (NK) cell–mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*. 1998;188(12):2375-2380. doi:10.1084/jem.188.12.2375
12. Yu X, Huang X, Chen X, et al. Characterization of a novel anti-human lymphocyte activation gene 3 (LAG-3) antibody for cancer immunotherapy. *MAbs*. 2019;11(6):1139-1148. doi:10.1080/19420862.2019.1629239
13. Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T cell function to promote tumoral immune escape. *Cancer Res*. 2012;72(4):917-927. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1620
14. Shi N, Zhou Y, Liu Y, et al. PD-1/LAG-3 bispecific antibody potentiates T cell activation and increases antitumor efficacy. *Front Immunol*. 2022;13:1047610. doi:10.3389/fimmu.2022.1047610
15. Passariello M, Yoshioka A, Takahashi K, et al. Novel Bi-specific Immuno-modulatory Tribodies potentiate T cell activation and increase anti-tumor efficacy. *Int J Mol Sci*. 2022;23(7):3466. doi:10.3390/ijms23073466
16. Toumi R, Yuzefpolskiy Y, Vegaraju A, et al. Autocrine and para- crine IL-2 signals collaborate to regulate distinct phases of CD8 T cell memory. *Cell Rep*. 2022;39(2):110632. doi:10.1016/j.celrep.2022.110632
17. Aspuria PJ, Vivona S, Bauer M, et al. An orthogonal IL-2 and IL-2Rβ system drives persistence and activation of CAR T cells and clearance of bulky lymphoma. *Sci Transl Med*. 2021;13(625):eabg7565. doi:10.1126/scitranslmed.abg7565
18. Beziaud L, Young CM, Alonso AM, Norkin M, Minafra AR, Huelsken J. IFNγ-induced stem-like state of cancer cells as a driver of metastatic progression following immunotherapy. *Cell Stem Cell*. 2023;30(6):818-831.e6. doi:10.1016/j.stem.2023.05.007
19. Street D, Kaufmann AM, Vaughan A, et al. Interferon-γ enhances susceptibility of cervical cancer cells to lysis by tumor-specific cytotoxic T cells. *Gynecol Oncol*. 1997;65(2):265-272. doi:10.1006/gyno.1997.4667
20. Kearney CJ, Vervoort SJ, Hogg SJ, et al. Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Sci Immunol*. 2018;3(23):eaar3451. doi:10.1126/sciimmunol.aar3451
21. Bertrand F, Rochotte J, Colacios C, et al. Blocking tumor necrosis factor α enhances CD8 T-cell–dependent immunity in experimental melanoma. *Cancer Res*. 2015;75(13):2619-2628. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-2524
22. Kanazawa T, Nishino H, Hasegawa M, et al. Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. *Eur Arch Otorrinolaringol*. 2007;264(7):815-821. doi:10.1007/s00405-007-0264-6
23. Nishiwaki N, Noma K, Ohara T, et al. Overcoming cancer-associated fibroblast-induced immunosuppression by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(7):2029-2044. doi:10.1007/s00262-023-03378-7
24. Fisher DT, Chen Q, Skitzki JJ, et al. IL-6 trans-signaling licenses mouse and human tumor microvascular gateways for trafficking of cytotoxic T cells. *J Clin Invest*. 2011;121(10):3846-3859. doi:10.1172/JCI44952
25. Beyrend G, van der Gracht E, Yilmaz A, et al. PD-L1 blockade engages tumor-infiltrating lymphocytes to co-express targetable activating and inhibitory receptors. *J Immunother Cancer*. 2019;7:217. doi:10.1186/s40425-019-0700-3
26. Jiang H, Ni H, Zhang P, et al. PD-L1/LAG-3 bispecific antibody enhances tumor-specific immunity. *Onco Targets Ther*. 2021;10(1):1943180. doi:10.1080/2162402X.2021.1943180
27. Sung E, Ko M, Won JY, et al. LAG-3xPD-L1 bispecific antibody potentiates antitumor responses of T cells through dendritic cell activation. *Mol Ther*. 2022;30(8):2800-2816. doi:10.1016/j.ymthe.2022.05.003
28. Manna L, Rapuano Lembo R, Yoshioka A, Nakamura K, Passariello M, De Lorenzo C. A comparison of the antitumor efficacy of novel multi-specific Tribodies with combinations of approved immunomodulatory antibodies. *Cancers (Basel)*. 2023;15(22):5345. doi:10.3390/cancers15225345
29. Zuo S, Wei M, Xu T, et al. An engineered oncolytic vaccinia virus encoding a single-chain variable fragment against TIGIT induces effective antitumor immunity and synergizes with PD-1 or LAG-3 blockade. *J Immunother Cancer*. 2021;9(12):e002843. doi:10.1136/jitc-2021-002843
30. Yang M, Du W, Yi L, et al. Checkpoint molecules coordinately restrain hyperactivated effector T cells in the tumor microenvironment. *Onco Targets Ther*. 2020;9(1):1708064. doi:10.1080/2162402X.2019.1708064
31. Mimura K, Kua LF, Xiao JF, et al. Combined inhibition of PD-1/PD-L1, Lag-3, and Tim-3 axes augments antitumor immunity in gastric cancer–T cell coculture models. *Gastric Cancer*. 2021;24(3):611-623. doi:10.1007/s10120-020-01151-8
32. Minicucci EM, Kowalski LP, Maia MAC, et al. Cytogenetic damage in circulating lymphocytes and buccal mucosa cells of head-and-neck cancer patients undergoing radiotherapy. *JRR*. 2005;46(2):135-142. doi:10.1269/jrr.46.135
33. Sage EK, Schmid TE, Geinitz H, et al. Effects of definitive and salvage radiotherapy on the distribution of lymphocyte subpopulations in prostate cancer patients. *Strahlenther Onkol*. 2017;193(8):648-655. doi:10.1007/s00066-017-1144-7

1. Shao D, Chen Y, Huang H, et al. LAG3 blockade coordinates with microwave ablation to promote CD8+ T cell-mediated anti-tumor immunity. *J Transl Med*. 2022;20:433. doi:10.1186/ s12967-022-03646-7
2. Hu Y, Paris S, Bertolet G, et al. Combining a nanoparticle-mediated immunoradiotherapy with dual blockade of LAG3 and TIGIT improves the treatment efficacy in anti-PD1 resistant lung cancer. *J Nanobiotechnol*. 2022;20:417. doi:10.1186/s12951-022-01621-4
3. Goding SR, Wilson KA, Rosinsky C, Antony PA. PD-L1–independent mechanisms control the resistance of melanoma to CD4+ T cell adoptive immunotherapy. *J Immunol*. 2018;200(9):3304-3311. doi:10.4049/jimmunol.1701617
4. Bae J, Carrasco R, Lee AH, Tai YT, Anderson KC, Munshi NC. Identification of novel myeloma-specific XBP1 peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: a potential therapeutic application in multiple myeloma. *Leukemia*. 2011;25(10):1610-1619. doi:10.1038/leu.2011.120
5. Bae J, Tai YT, Anderson KC, Munshi NC. Novel epitope evoking CD138 antigen-specific cytotoxic T lymphocytes targeting multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Br J Haematol*. 2011;155(3):349-361. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08850.x
6. Bae J, Song W, Smith R, et al. A novel immunogenic CS1-specific peptide inducing antigen-specific cytotoxic T lymphocytes targeting multiple myeloma. *Br J Haematol*. 2012;157(6):687-701. doi:10.1111/j.1365-2141.2012.09111.x
7. Bae J, Smith R, Daley J, et al. Myeloma-specific multiple peptides able to generate cytotoxic T lymphocytes: a potential therapeutic application in multiple myeloma and other plasma cell disorders. *Clin Cancer Res*. 2012;18(17):4850-4860. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2776
8. Bae J, Samur M, Richardson P, Munshi NC, Anderson KC. Selective targeting of multiple myeloma by B cell maturation antigen (BCMA)-specific central memory CD8+ cytotoxic T lymphocytes: immunotherapeutic application in vaccination and adoptive immunotherapy. *Leukemia*. 2019;33(9):2208-2226. doi:10.1038/s41375-019-0414-z
9. Rudd CE, Chanthong K, Taylor A. Small molecule inhibition of GSK-3 specifically inhibits the transcription of inhibitory Co-receptor LAG-3 for enhanced anti-tumor immunity. *Cell Rep*. 2020;30(7):2075-2082.e4. doi:10.1016/j.celrep.2020.01.076
10. Lauder SN, Smart K, Kersemans V, et al. Enhanced antitumor immunity through sequential targeting of PI3Kδ and LAG3. *J Immunother Cancer*. 2020;8(2):e000693. doi:10.1136/jitc-2020-000693
11. Bretz AC, Parnitzke U, Kronthaler K, et al. Domatinostat favors the immunotherapy response by modulating the tumor immune microenvironment (TIME). *J Immunother Cancer*. 2019;7(1):294. doi:10.1186/s40425-019-0745-3
12. Cauwels A, Van Lint S, Garcin G, et al. A safe and highly efficient tumor-targeted type I interferon immunotherapy depends on the tumor microenvironment. *Onco Targets Ther*. 2017;7(3):e1398876. doi:10.1080/2162402X.2017.1398876
13. Cartwright ANR, Suo S, Badrinath S, et al. Immunosuppressive myeloid cells induce nitric oxide-dependent DNA damage and p53 pathway activation in CD8+ T cells. *Cancer Immunol Res*. 2021;9(4):470-485. doi:10.1158/2326-6066.CIR-20-0085
14. Sarkar OS, Donninger H, Al Rayyan N, et al. Monocytic MDSCs exhibit superior immune suppression via adenosine and depletion of adenosine improves efficacy of immunotherapy. *Sci Adv*. 2023;9(26):eadg3736. doi:10.1126/sciadv.adg3736
15. Gulhati P, Schalck A, Jiang S, et al. Targeting T cell checkpoints 41BB and LAG3 and myeloid cell CXCR1/2 results in anti-tumor immunity and durable response in pancreatic cancer. *Nat Can*. 2023;4(1):62-80. doi:10.1038/s43018-022-00500-z
16. Wang J, Wei W, Tang Q, et al. Oxysophocarpine suppresses hepatocellular carcinoma growth and sensitizes the therapeutic blockade of anti-Lag-3 via reducing FGL1 expression. *Cancer Med*. 2020;9(19):7125-7136. doi:10.1002/cam4.3151
17. Abusarah J, Khodayarian F, El-Hachem N, et al. Engineering immunoproteasome-expressing mesenchymal stromal cells: a potent cellular vaccine for lymphoma and melanoma in mice. *Cell Rep Med*. 2021;2(12):100455. doi:10.1016/j.xcrm.2021.100455
18. Huis in 't Veld RV, Ma S, Kines RC, et al. Immune checkpoint inhibition combined with targeted therapy using a novel virus-like drug conjugate induces complete responses in a murine model of local and distant tumors. *Cancer Immunol Immunother*. 2023;72(7):2405-2422. doi:10.1007/s00262-023-03425-3
19. Kraman M, Faroudi M, Allen NL, et al. FS118, a bispecific antibody targeting LAG-3 and PD-L1, enhances T-cell activation resulting in potent antitumor activity. *Clin Cancer Res*. 2020;26(13):3333-3344. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-3548

How to cite this article: Chavanton A, Mialhe F, Abrey J, Baeza Garcia A, Garrido C. LAG-3 : recent developments in combinational therapies in cancer. *Cancer Sci*. 2024;00:1-12. doi:10.1111/cas.16205

3. Réalisation d'activités complémentaires au doctorat

3.1. Diffusion de la culture scientifique

Au cours de ma dernière année de thèse, j'ai eu l'occasion de découvrir et m'investir dans la diffusion de la culture scientifique en participant à de nombreux événements. Cela consiste à faire découvrir mon travail et les objectifs de mes travaux de recherche à un public naïf (enfants ou adultes), sous forme d'un atelier ludique. Cette expérience m'a ainsi permis de transmettre mes connaissances, d'échanger avec le public, d'apprendre à adapter mon discours en fonction des catégories d'âges et de vulgariser la science. Cela m'a également permis de participer à l'organisation des événements grand public ou des journées avec des classes scolaires (accueil public, présentation des activités).

Les différents événements auxquels j'ai participé :

- Nuit des jeunes chercheurs à Dijon en septembre 2023.
- Expérimentarium itinérant de 3 jours à Auxerre en octobre 2023 (collège/lycée) et à Juif en mai 2024 (collège/lycée).
- Rencontre grand public à la médiathèque de Chenôve en décembre 2023.
- Expérimentarium à Dijon en novembre 2023, mars et juin 2024 (classes de CM2, 5ème, 4ème, 2nd, L1 en réorientation).

3.2. Enseignement

J'ai réalisé une dizaine d'heures d'enseignement auprès d'étudiants de première année de licence, sur un TP basé sur l'analyse du système digestif dans un modèle murin. J'ai appris à être pédagogue, à transmettre mes connaissances et à répondre aux problématiques des élèves. J'ai également pu participer à la correction des copies. J'ai appris à la fois la transmission de mes connaissances théoriques sous forme de présentation powerpoint et pratiques sous la forme d'un atelier de dissection de souris.

3.3. Formation de stagiaires au sein du laboratoire

J'ai eu l'occasion de former des stagiaires sur certaines techniques de laboratoire (culture cellulaire, ultracentrifugation, cytométrie, nanosight, western blotting, expérimentation animale). J'ai appris à être patiente, attentive et pédagogue.

3.4. Formation à l'expérimentation animale : niveau concepteur

J'ai acquis au cours de ma thèse le diplôme d'expérimentation animale de niveau concepteur.

École Pratique des Hautes Études | PSL

A Dijon le 26 juillet 2022.

ATTESTATION DE REUSSITE

Je soussigné Catherine PAUL, Directrice d'Etudes de l'EPHE, certifie que Mme Aude CHAVANTON a suivi la formation « Expérimentation animale de niveau concepteur de projet, spécialisation rongeurs et lagomorphes » qui a eu lieu à Dijon du 27 juin 2022 au 8 juillet 2022, et a passé avec succès l'examen final. Cette formation a reçu l'approbation n° R-21UB/EPHE-F1-11 du ministère de l'agriculture le 8 février 2022.

Laboratoire d'Immunologie et d'Immunothérapie des Cancers
E.P.H.E.
Faculté de Médecine
7 Boulevard Jeanne d'Arc
21033 DIJON CEDEX
Tél. et Fax. 80 65 39 30

Catherine PAUL
Directrice d'Etudes de l'EPHE
Responsable de la formation

Laboratoire d'Immunologie et d'Immunothérapie des Cancers
UFR des Sciences de Santé, 7 boulevard Jeanne d'Arc 21079, Dijon France
Tél. : 03 80 39 33 51, e-mail : catherine.paul@u-bourgogne.fr

ÉCOLE DOCTORALE
Environnements - Santé
Bourgogne | Franche-Comté

Titre : Optimisation de traitements immunothérapeutiques dans le cancer

Mots clés : Cancer, Immunothérapie, PD-L1, HSP110

Résumé : Le cancer est une maladie provoquée par la prolifération de cellules transformées et incontrôlables par l'organisme entraînant à terme le décès. Elle est de nos jours la première cause de mortalité en France, ce qui en fait un centre d'intérêt majeur pour la recherche. Malgré le large arsenal thérapeutique disponible actuellement en clinique pour lutter contre le cancer (chimiothérapies, radiothérapies, hormonothérapies, …), de nombreux patients ne répondent pas à ces thérapies et le taux de décès est encore très conséquent. Il y a une quizaine d'années, l'immunothérapie a fait ses premiers pas en clinique et a démontré des effets prometteurs, devenant ainsi une nouvelle arme thérapeutique prometteuse contre le cancer. L'immunothérapie est une approche thérapeutique visant à stimuler le système immunitaire de façon à l'aider à mieux détruire les cellules cancéreuses. L'immunothérapie anti-PD-1/PD-L1 a démontré des effets prometteurs dans divers types de cancers. Néanmoins, malgré une belle efficacité chez certains patients, beaucoup de patients ne répondent pas à ces thérapies dans de multiples types de cancer dont le cancer colorectal. Dans ce contexte, l'équipe de recherche dans laquelle j'ai effectué mon doctorat a mis en évidence que la protéine de choc thermique HSP110 favorise la prolifération des cellules cancéreuses colorectales et est associé à un mauvais prognostic dans le cancer colorectal. Une molécule inhibitrice de HSP110 appelée i007 a ainsi été développée. L'objectif de ces travaux de thèse repose sur l'évaluation de l'efficacité de la double thérapie anti-PD-L1/i007 dans le cancer colorectal afin d'identifier si l'inhibition de HSP110 peut améliorer l'efficacité des anti-PD-L1. Nous avons pu identifier un effet antitumoral de cette double thérapie, probablement médié par les cellules $CD8^+$ épuisés et la sécrétion de granzyme A, B, interféron γ et perforine. Les macrophages, cellules NK et mastocytes semblent également être impliquées dans la réponse immunitaire induite par la double thérapie mais leur rôle exact reste à définir. Enfin, une ouverture sur un éventuel nouveau projet cherchant à potentialiser l'effet des anti-PD-L1 a été mis en lumière, en combinant les anti-PD-L1 à des anti-LAG-3.

Title : Optimization of immunotherapeutic treatments for cancer

Keywords : Cancer, Immunotherapy, PD-L1, HSP110

Abstract : Cancer is a disease caused by the proliferation of transformed cells that cannot be controlled by the body, ultimately leading to death. Today, it is the leading cause of death in France, making it a major focus of research interest. Despite the wide range of cancer treatments currently available in clinical practice (chemotherapy, radiotherapy, hormone therapy, etc.), many patients do not respond to these therapies, and the death rate is still very high. Some fifteen years ago, immunotherapy took its first clinical steps and demonstrated promising effects, becoming a promising new therapeutic weapon against cancer. Immunotherapy is a therapeutic approach designed to stimulate the immune system to better destroy cancer cells. Anti-PD-1/PD-L1 immunotherapy has shown promising effects in various types of cancer. However, despite their efficacy in some patients, many do not respond to these therapies in multiple cancer types, including colorectal cancer. In this context, the research team in which I carried out my PhD demonstrated that the heat shock protein HSP110 promotes colorectal cancer cell proliferation and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. This led to the development of an HSP110 inhibitor molecule called i007. The aim of this thesis work is to evaluate the efficacy of anti-PD-L1/i007 dual therapy in colorectal cancer, and to identify whether HSP110 inhibition can improve the efficacy of anti-PD-L1. We were able to identify an antitumor effect of this dual therapy, probably mediated by depleted CD8+ cells and the secretion of granzyme A, B, interferon γ and perforin. Macrophages, NK cells and mast cells also appear to be involved in the immune response induced by double therapy, but their exact role remains to be defined. Finally, an opening to a possible new project seeking to potentiate the effect of anti-PD-L1 was highlighted, by combining anti-PD-L1 with anti-LAG-3.

UBFC
UNIVERSITÉ
BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ

Université Bourgogne Franche-Comté
32, avenue de l'Observatoire
25000 Besançon