Etude cinétique d'une réponse immune associée à une régression tumorale : les lymphocytes T et les cellules myéloïdes coopèrent au sein de la tumeur après vaccination

Maxime Thoreau

▶ **To cite this version:**

Maxime Thoreau. Etude cinétique d'une réponse immune associée à une régression tumorale : les lymphocytes T et les cellules myéloïdes coopèrent au sein de la tumeur après vaccination. Immunologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB049 . tel-02180608

HAL Id: tel-02180608
https://theses.hal.science/tel-02180608

Submitted on 11 Jul 2019

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

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

Université Paris Descartes

Ecole doctorale BioSPC

Institut Cochin, département 3I

Equipe E. Donnadieu / C. Randriamampita

Etude cinétique d'une réponse immune associée à une régression tumorale

Les lymphocytes T et les cellules myéloïdes coopèrent au sein de la tumeur après vaccination

Par Maxime Thoreau

Thèse de doctorat d'immunologie

Dirigée par Nadège Bercovici

Présentée et soutenue publiquement le 30 septembre 2016

Devant un jury composé de :

Pr Eric Tartour	Président
Dr Valérie Dardalhon	Rapporteur
Dr Jean-François Fonteneau	Rapporteur
Pr Pierre van der Bruggen	Examinateur
Dr Jean-Pierre Abastado	Examinateur
Dr Nadège Bercovici	Directrice de thèse

Résumé

De nombreuses études en oncoimmunologie portent sur l'échec immunitaire dans le contexte de progression tumorale, mais elles sont plus rares à porter sur un contexte de régression, lorsque le système immunitaire est efficace. De ce fait, bien souvent la littérature met en avant le rôle cytotoxique des lymphocytes T $CD8^+$, ou bien leur anergie dans le contexte de progression tumorale, causée par des cellules myéloïdes telles que les MDSC ou les macrophages de phénotypes M2, considérés comme pro-tumoraux. J'ai pour ma part étudié la réponse immunitaire dans le cadre d'une régression tumorale.

Des cellules TC1 transplantées en s.c. dans des souris C57BL6/J, donnent des tumeurs solides d'environ 6mm de diamètre 11 jours plus tard. A ce moment là (J0), les souris sont vaccinées à proximité de la tumeur (*priming*), par un vaccin contenant la sous-unité B non toxique de la Shiga toxine couplée au peptide E7 de l'HPV16 (exprimé par les TC1), combiné à de l'IFNα. Une semaine plus tard (J7), un « *boost* » est effectué. Après le *boost*, la croissance tumorale cesse puis la tumeur régresse. L'analyse cinétique par cytométrie révèle un infiltrat immunitaire important pendant, et précédant la régression tumorale. La nature de cette infiltrat varie avec le temps. A J5, un infiltrat myéloïde est observé, suivi d'un infiltrat lymphocytaire à partir de J8. Une déplétion des cellules T $CD8^+$ inhibe la régression tumorale, alors que dans les souris $CXCR3^{-/-}$, dans lesquelles les $CD8^+$ ne sont pas déplétés mais leur recrutement est fortement affecté, une régréssion tumorale est possible malgré un infiltrat T $CD8^+$ très faible. Cela laisse penser que d'autres acteurs que les LT cytotoxiques sont nécessaires à la régression tumorale, comme probablement les cellules myéloïdes qui infiltrent le tumeur avant les cellules T. L'analyse de cette population montre une activation des monocytes et macrophages (MHC II^+), avec un pic d'activation autour de J9, au début de la régression. La capacité cytotoxique de ces cellules, mesurée *in vitro* par immunofluorescence est augmentée comparée à des myéloïdes isolées de tumeurs de souris en progression. De plus, l'ajout d'un anticorps anti-TNFα inhibe partiellement cette cytotoxicité. Cela montre qu'après vaccination, les monocytes/macrophages sont capables de tuer les cellules tumorales. Une déplétion partielle des macrophages au moment de la vaccination, à l'aide du PLX3397 (inhibiteur du CSF1R), réduit l'efficacité de la vaccination. Les cellules myéloïdes, lorsqu'elles sont présentes, contribuent fortement à la régression tumorale induit par le vaccin composite, et leur action implique probablement des interactions avec les LT $CD8^+$. C'est ce que suggère l'observation de tumeurs vaccinées dans des souris $IFN\gamma^{-/-}$, dans lesquelles l'efficacité vaccinale est aussi inhibée.

Cette thèse montre qu'après une stimulation appropriée, qui peut, comme ici, mimer une infection virale, les cellules myéloïdes peuvent participer activement à la régression tumorale.

Mots clés : TIL, cellules myéloïdes, vaccin, régression tumorale, coopération

Abstract

Most oncoimmunology studies are performed in an immune failure context of progressing tumor. They rarely describe tumor regressions, when the immune response is efficient. As a result, the literature tends to highlight the cytotoxic role of $CD8^+$ T cell or their anergy in the context of tumor progression, caused by myeloid cells such as the MDSC or M2 polarized macrophages, considered as protumoral. My PhD work has been focused on the immune response in a context of tumor regression.

TC1 cells transplanted s.c. in C57 BL6 J mice, give rise to solid tumors of approximately 6 mm diameter 11 days later. At that time (day 0), mice are vaccinated peritumorally for a *priming* with a composite vaccine containing the subunit B of the Shiga toxin coupled to E7 peptide from HPV16 (present on TC1), combined with the IFNα. A week later (day 7), a boost is made. After the boost, tumor growth stops and the tumor regress. Kinetic cytometric analysis revealed a significant immune infiltrate during and prior to tumor regression. The nature of this infiltrate varies with time. On day 5, a myeloid infiltrate is observed, followed by a lymphocytic infiltrate which is conspicuous after day 8. Depletion of $CD8^+$ T cells inhibits tumor regression, while in $CXCR3^{-/-}$ mice, in which the $CD8^+$ are not depleted but their recruitment is severely affected, tumor regression is possible despite a very low $CD8^+$ T cell infiltrate. This suggests that some effectors, other than cytotoxic T cells, are required for tumor regression, including probably myeloid cells that infiltrate the tumor before T cells. The analysis of this population shows an activation of monocytes and macrophages ($MHC\ II^+$) with a peak of activation around day 9, early in the regression. The cytotoxic capacity of these cells was tested *in vitro*, by depositing $F4/80^+$ cells from vaccinated tumors or not, on a TC1 cell monolayers in culture. Only myeloid cells from vaccinated tumors appear to kill tumor cells, and adding an anti-TNFα inhibits this cytotoxicity. This shows that after immunization, monocytes/macrophages are capable of killing tumor cells. A partial depletion of macrophages at the time of vaccination, after treatment with PLX3397 (CSF1R inhibitor), reduces the vaccine efficacy. Myeloid cells contribute significantly to the observed tumor regression, and their action involves interactions with $CD8^+$ T cells. This hypothesis is consistent with the observation of tumors in vaccinated $IFN\gamma^{-/-}$ mice, in which the vaccine efficacy is also inhibited.

This thesis shows that after an appropriate stimulation, for instance, here, by mimicking a viral infection, myeloid cells can actively participate in tumor regression.

Keywords: TIL, Myeloid cells, vaccine, tumor regression, cooperation

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté mon invitation, et plus particulièrement Valérie Dardalhon et Jean-François Fonteneau pour leurs remarques et suggestions constructives suite à la lecture de cette thèse.

Je souhaite aussi remercier l'ensemble des statutaires de l'équipe pour leur accueil et pour leurs conseils bienveillants, que ce soit lors de réunions ou lors de conversations privées. L'accessibilité des statutaires, toujours ouverts à la discussion, est un réel avantage pour les étudiants, et ce fut un grand plaisir de travailler dans ces conditions.

Je souhaite adresser un grand merci à Alain, pour m'avoir si bien accompagné tout au long de cette thèse, de toujours avoir été présent pour répondre à mes interrogations et pour le partage de conseils toujours pertinents. C'était un vrai plaisir d'apprendre à tes côtés, tu aimes transmettre, ça se voit, et crois-moi, j'ai toujours porté une oreille très attentive à tes conseils. Merci aussi pour ta bonne humeur, tes blagues décalées et tes contrepèteries qui font toujours sourire.

Un très grand merci à Nadège qui m'a très bien encadré durant cette thèse. Merci également pour toute la gentillesse, la compréhension et l'attention dont tu as fait preuve envers moi tout au long de ces 5 années. J'ai eu beaucoup de chance de t'avoir en tant que directrice de thèse, et puis le binôme de choc que vous formez avec Alain est merveilleux. Merci aussi pour tous les cafés non remboursés et les chocolats partagés, pour Polo, pour les moments sympas comme les batailles d'eau des journées « ménage » et les balades à Singapour (et ton Chardonnay à Chinatown).

Merci à Fabienne de m'avoir toujours aidé et supporté pendant ces 5 années, merci pour ta patience et ta gentillesse, j'ai vraiment apprécié travailler avec toi. Merci pour ton efficacité, car le labo ne tournerait pas aussi bien sans toi.

Merci à Jeanne, sans qui cette période de thèse aurait très probablement été très différente, et oui, ça aide d'avoir une voisine du bureau qui sait tout ! Merci pour tous les coups de main, que ce soit d'ordre professionnel ou personnel, tu réponds toujours aux appels au secours. On a essayé d'élever Bob ensemble et merci de ne pas avoir tenu rigueur du fait qu'il soit mort par ma faute.

Merci à Nico, le premier homme à être arrivé à Cochin en armure médiévale, d'avoir égayé ces années de thèse. Merci pour ces 3120 cafés (+/- 200), ces goûtés, nos longues conversations et surtout d'avoir étudié longuement avec moi le perfectionnement de la bombe à carbo. Ton ouverture d'esprit et ta simplicité peuvent t'être enviées par bien des personnes, merci Kiki !

Merci à Laura pour cette merveilleuse invention qu'est le Cafébitchou… plus sérieusement, merci d'avoir organisé les sorties en dehors du labo, comme la sortie escalade, le WE post-thèse en Normandie ou les soirées raclette et wii. Et merci de m'avoir converti à la gastronomie libanaise.

Merci à Chloé de s'être portée volontaire pour l'une de nos plus belles blagues à Nico et à moi, le bicarbonate de soude sur les rondelles de bananes. Merci aussi pour cette belle balade en chariot dans le labo qui a malheureusement provoqué la mort de Barnabé la poignée.

Merci à Alex d'avoir été la victime la plus régulière dans ma quête du sursaut parfait durant 3 ans. Merci d'avoir partagé avec nous, Jeanne et moi, ton imitation exceptionnelle de Renée la taupe et ton admiration pour la nourriture.

Merci à Georges de m'avoir vendu du rêve pendant 5 ans, et oui, je l'attends toujours ce baby-foot dans la cuisine… mais merci quand même pour les conversations foot du midi et ta grande sympathie.

Merci à Quitterie qui m'a initié au pourrissage de bureau et m'a beaucoup appris à ce sujet. Je pourrais te dédicacer quelques chefs-d'œuvre.

Merci à Élisa d'avoir apporté à ce labo un peu de soleil grâce à son accent, et d'avoir supporté mes taquineries en gardant ton calme. Au fond de toi tu sais que les pâtes et les pizzas Picard sont meilleures qu'en Italie.

Merci à Houcine, le roi des mots fléchés, à qui la perruque blonde va si bien, pour ses si parfaites imitations de Michael Jackson.

Merci à Vincent, de m'avoir laissé taper dans sa collection de CD, ce qui m'a permis de découvrir des artistes dont j'apprécie beaucoup le style, comme Minor Majority. Merci aussi pour tes questions parfois agaçantes mais toujours pertinentes aux réunions de labo.

Merci à Julia qui m'a appris que manger du poivron cru à 9h du matin, ou du fenouil, c'est normal. Merci d'avoir joué le jeu et d'avoir parlé anglais avec moi pendant un certain temps.

Merci à Léne, discrète mais toujours prête à rendre service, et à préparer du café pour tout le monde.

Merci à Marion, la relève, pour les M&M's et Twix qui m'ont généreusement été offerts. Merci pour ton dynamisme qui, j'en suis sûr, te permettra d'aller au bout de tes ambitions.

Merci à Jean d'avoir été ma dernière grande victime pendant ma dernière année de thèse, et d'avoir esquivé tant de balles anti-stress, mais toujours dans la bonne humeur.

Merci à Adam, l'étoile montante de la Bouliche, d'avoir toujours accepté ses défaites avec tant de fairplay, sous les yeux d'arbitres incorruptibles. De toute façon, l'arbitre a toujours raison.

Merci à Clara pour sa bonne humeur communicative, son franc-parler, et les pâtisseries libanaises partagées.

Merci à Margaux pour la gentillesse dont elle a fait preuve, et pour son goût prononcé pour les chansons qui restent dans la tête toute la journée (et bravo pour tes talents de composition).

Merci à Manu pour tous ses commentaires « +18 » qui m'ont beaucoup fait rire. Merci aussi d'avoir répondu présent à l'occasion d'une soirée des « jeunes » du labo chez Marie et Alex, tu étais le seul statutaire présent et c'était sympa de t'avoir avec nous.

Merci à Clotilde de m'avoir permis, involontairement, de trouver ma moitié. Merci pour ta sympathie elle les petites attentions dont tu fais preuve.

Merci à Jérôme qui m'a convaincu de chercher mon 1er appartement sur Antony, tu as bien fait, même Marie a craqué. Merci pour ton calme parfois apaisant dans ce labo souvent remuant.

Merci à Céline et à son caractère corse (corsé ?). Tu as été, je pense, la première personne vivant seule que j'ai rencontré qui faisait des pâtes pour 12. Bel exploit !

Merci à Marianne pour ce rire très reconnaissable qui traverse le labo, et merci pour la génération des TC1-GFP qui m'ont beaucoup servi pour ce travail de thèse.

Merci à Chahrazade pour tous ses conseils d'ordre professionnel, et pour la bonne humeur qu'elle partage avec tout le monde.

Merci à Sarah pour sa gentillesse et ses précieux conseils sur les arbres fruitiers, j'espère pouvoir les appliquer le plus tôt possible.

Merci à Rachida de ne pas m'avoir frappé trop fort toutes les fois où j'étais dans le «P2 » sans la blouse.

Merci à nos collaborateurs pour les suggestions et expertises. Merci à Agnès Le Bon, Siew Cheng Wong, Xianne Leong Penny, Kar Wai Tan.

Je remercie également mes amis pour qui « chercheur » rime avec « blouse blanche », « tube à essai » et « symposium moléculaire ». Merci pour votre soutien et pour tout ce que vous m'apportez depuis de très nombreuses années.

Je voudrais également remercier toute de ma famille qui m'a soutenu tout au long de ces (longues) études. Je remercie plus particulièrement mes parents car c'est eux qui m'ont permis d'en arriver là aujourd'hui. Les valeurs qu'ils m'ont inculquées m'ont été nécessaires tout au long de mon parcours. Merci à eux car je leur dois beaucoup.

J'adresse un très grand merci à Marie, ma moitié rencontrée au labo, qui a supporté mon humeur très changeante et mes horaires nocturnes pendant la période d'écriture de ce manuscrit de thèse. Tu as tout fait pour que je sois dans les meilleures conditions de travail pendant cette période. Merci d'avoir pris du temps pour relire ce document, et surtout de l'avoir fait avec beaucoup d'attention. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu fais pour moi.

Table des matières

Résumé 3
Remerciements 5
Table des matières 8
Abréviations 12
Table des figures 16
INTRODUCTION 17
AVANT PROPOS 19
I. La réponse immune anti-infectieuse 20
1. La réponse innée 20
2. La réponse adaptative 23
2.1. La réponse à médiation humorale 24
2.2. La réponse à médiation cellulaire 24
3. Réponse chronique et épuisement des LT 26
3.1. CTLA-4 28
3.2. PD-1 29
3.3. LAG-3 31
3.4. Tim-3 32
II. Tumeur et immunité 33
1. Etablissement de la tumeur 33
1.1. L'oncogenèse 33
1.2. Les antigènes tumoraux 35
1.2.1. Les antigènes uniques 35
1.2.2. Les antigènes partagés 36
1.2.2.1. Les antigènes partagés « spécifiques des tumeurs » 36
1.2.2.2. Les antigènes de différenciation 36
1.2.2.3. Les antigènes surexprimés 37
1.3. Le microenvironnement tumoral 37
1.3.1. Les cellules myéloïdes 38
1.3.1.1. Les macrophages 38
1.3.1.2. Les MDSC 41
1.3.2. La matrice extracellulaire 41

1.3.2.1. Formation et entretien de la matrice 42
1.3.2.2. Désorganisation de la matrice 42
1.3.2.3. Support de la tumeur primaire et des métastases 42
1.3.3. La vascularisation 43
2. L'immunité anti-tumorale 44
2.1. L'immunosurveillance 44
2.1.1. Elimination 45
2.1.2. Equilibre 47
2.1.3. Echappement 47
2.1.3.1. L'échappement passif des cellules tumorales face aux effecteurs lytiques 48
2.1.3.2. L'immunosuppression active 48
2.2. Les rôles multiples de l'IFN de type I 49
2.3. Les mécanismes d'échappement 50
2.3.1. Le réseau matriciel 51
2.3.2. L'hypoxie du microenvironnement tumoral 51
2.3.3. Les cellules immunosuppressives 52
2.3.3.1. Les Treg 52
2.3.3.2. Les cellules myéloïdes immunosuppressives 53
2.3.3.2.1. Les MDSC 53
2.3.3.2.2. Les macrophages 54
a. Phénotype des macrophages tumoraux 54
b. Association avec la progression tumorale 55
c. Mécanismes d'immunosuppression 57
2.3.4. Mécanismes impliqués dans l'anergie T 57
2.3.4.1. TGFβ 57
2.3.4.2. Galectine 3 58
2.3.4.3. PD-1 59
2.3.4.4. Tim-3 60
2.3.4.5. CTLA-4 61
2.3.4.6. La compétition métabolique 61
III. Immunothérapie des cancers 63
1. La vaccination anti-tumorale 64
1.1. Les vaccins à ADN 65
1.2. Les vaccins à base de peptides 67

1.3. Les vaccins basés sur les spécificités des DC 69
1.3.1. Injection de DC 69
1.3.2. Ciblage des DC *in vivo* 71
1.4. Le rôle des adjuvants 73
2. Transfert adoptif de TIL et de *CAR T cells* 74
2.1. Transfert adoptif de LT naturels 74
2.2. TCR transgéniques et *CAR T cell* 77
3. Blocage des récepteurs inhibiteurs et combinaisons 79
3.1. Blocages de CTLA-4 et PD-1 79
3.2. Les combinaisons 81

RESULTATS 85

I. La régression tumorale induite par une vaccination requiert la coopération des LT et des cellules myéloïdes au sein de la tumeur 87

1. La combinaison vaccin E7 + IFNα induit une régression systématique des tumeurs 88
2. L'afflux de cellules myéloïdes coïncide avec le début de la régression tumorale et précède l'infiltration par des lymphocytes T $CD8^+$ 90
3. Les infiltrats de LT $CD8^+$ et de cellules myéloïdes sont tous deux nécessaires à la régression tumorale 93
4. Les LT CD8 et cellules myéloïdes coopèrent au sein de la tumeur 98

II. Données préliminaires sur la combinaison d'un anti-PD-1 avec l'IFNα 105

1. La combinaison anti-PD-1/IFNα prévient l'échappement post-régression 106
2. La combinaison anti-PD-1/IFNα réactive les LT et les cellules myéloïdes 108

DISCUSSION 111

I. Régression tumorale déclenchée par la stimulation d'une coopération T/cellules myéloïdes? 113

1. Récapitulatif de la réponse immune mise en évidence pendant la régression tumorale 113
2. Les traitements synergisent pour mimer une infection virale 114
3. Les LT $CD8^+$, seuls effecteurs de la réponse anti-tumorale ? 117
4. La coopération LT/cellules myéloïdes 118
5. Le rôle des monocytes/macrophages 121

II. La combinaison anti-PD-1 + IFNα évite l'échappement suite à une vaccination 125

MATERIELS ET METHODES 129

BIBLIOGRAPHIE 135

ANNEXES 173

Annexe 1 : Article **175**

Annexe 2 : Nouvelle **195**

Annexe 3 : Présentation internationale **199**

Abréviations

-A-

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
Ag : Antigène
AIM2 like receptor : Absent In Melanoma 2 like receptor
Gr1 : Granulocyte receptor-1
Ly6G : Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
APC : Antigen-Presenting Cell
Arg-1 : Arginase-1

-B-

BCG : Bacille de Calmette et Guérin
BCR : B Cell Receptor
Bcr-Abl : Breakpoint cluster region - Abelson
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
B-RAF : v-raf murine sarcoma viral oncogene homologe B
BRCA1 : BReast CAncer 1

-C-

CAR : Chimeric Antigen Receptor
CD : Cluster de Différenciation
CLR : C-type lectin-Like Receptor
CSF-1 : Colony Stimulating Factor-1
CSF1-R : Colony Stimulating Factor-1 Receptor
CTL : Cytotoxic T Lymphocyte
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Associated protein 4

-D-

DC : Dendritic Cell
DMBA/TPA : 7,12-DiMethylBenz[a]Anthracene/12-*O*-TetradecanoylPhorbol-13-Acetate
DAMP : Damage Associated Molecular Pattern

-E-

ECM : ExtraCellular Matrix
EGF : Epidermal Growth Factor
EMT : Epithelial-Mesenchymal Transition
EpCAM : Epithelial Cellular Adhesion Molecule
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

-F-

FAK : Focal Adhesion Kinase
Fas : Apoptosis Stimulating Fragment

FcR : Fragment constant Receptor
FOXP3 : FOrkhead boX P3

-G-

G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor-1
GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor-1

-H-

Her2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HIF1 : Hypoxic Inducible Factor-1
HIV : Human Immunodeficiency Virus
HLA : Human Leukocyte Antigen
HPV : Human PapillomaVirus
H-ras : Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog

-I-

IDO : Indoleamine 2,3-DiOxygénase
IFN : InterFeroN
IFNAR1 : InterFeroN Alpha/beta Receptor 1
IL : InterLeukine
ILC : Innate Lymphoid Cells
iTreg : induced T regulator

-K-

K-ras : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Kinase LCK : Lymphocyte-specific protein Tyrosine Kinase

-L-

LAG-3 : Lymphocyte-Activation Gene 3
LB : Lymphocyte B
LCMV : Lymphocytic ChorioMeningitis Virus
LOX : Lysine OXydase
LPS : LipoPolySaccharide
LPX : LipoPleX
LT : Lymphocyte T

-M-

MAGE : Melanoma Antigen Gene
M-CSF : Macrophage Colony Stimulating Factor-1
MCA : MéthylCholAnthrène
MDSC : Myeloïd Derived Suppressor Cell
MHC : Major Histocompatibility Complex
M-MDSC : Monocytic-Myeloïd Derived Suppressor Cell
MMP : Matrix MetalloProteinase

-N-

NK : Natural Killer
NKG : Natural Killer Group 2D
NKT : Lymphoyte T Natural Killer
NLR : Nucleotide oligomerization domain-Like Receptor
NO : Nitric Oxide
N-ras : Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
nTreg : natural lymphocyte T regulator
NY-ESO-1 : New York esophageal squamous cell carcinoma-1

-O-

OVA : OVAlbumin

-P-

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Pattern
PBMC : Peripheral Blood Monuclear Cell
PD-1 : Programmed cell Death-1
pDC : plasmacytoid Dendritic Cell
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PD-L : Programmed Death-Ligand
PGE : ProstaGlandin E
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PMN-MDSC : PolyMorphoNuclear-Myeloïd Derived Suppressor Cell
PRR : Pattern-Recognition Receptor
PSA : Prostate Specific Antigen
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

-R-

RAG2 : Recombination Actvating Gene 2
RANTES: Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted
RLR : Retinoic acid-induced gene-Like Receptor
ROS : Reactive Oxygen Species

-S-

SDF-1 : Super Dimension Fortress-1
SHP2 : Src Homology-2 containing Tyrosine-protein phosphatase-2
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

-T-

TAM : Tumor-Associated Macrophage
TAP1 : Transporter associated with Antigen Processing 1
TCR : T Cell Receptor
TGFβ : Transforming Growth Factor beta
Th : Lymphocyte T Helper
TILs : Tumor-Infiltrating Lymphocytes

TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TP53 : Tumor Protein 53
TRAIL : Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand
Treg : Lymphocyte T regulator

-U-

UV : Ultra-Violet

-V-

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

-Z-

ZEB : Zinc finger E-Box-binding homeobox

Table des figures

Figure 1 : Adapté de (Iwasaki and Medzhitov 2015), Effets des pathogènes sur les PRR et la réponse immune. 22
Figure 2 : Adapté de (Wherry 2011), hiérarchie de l'épuisement des LT durant une infection chronique 27
Figure 3 : Adapté de (Chikuma 2016), mécanisme d'inhibition des LTs par PD-1. 31
Figure 4 : Adapté de (Hanahan and Weinberg 2011). Schéma récapitulatif des 11 caractéristiques des cellules cancéreuses. 34
Figure 5 : Alberto Mantovani propose une classification des macrophages dépendante de leur stimulation. 39
Figure 6 : Adapté de (Ginhoux et al. 2016). Schéma récapitulatif de l'ontogénie des macrophages40
Figure 7 : Adapté de (Forbes and Rosenthal 2014) : modèle général de la réparation tissulaire. 56
Figure 8 : Adapté de (Kutzler and Weiner, 2008). Induction de la réponse cellulaire et humorale par un vaccin à ADN 66
Figure 9 : adapté de (Coffman, Sher, and Seder 2010) Les ligands de PRR induisent une réponse adaptative par leurs effets sur les APC 74
Figure 10 : Protocole expérimental 88
Figure 11 : La combinaison du vaccin E7 et de l'IFNα local permet la régression tumorale 89
Figure 12 : La disparition des cellules tumorales fait suite à une attaque multifocale 90
Figure 13 : L'infiltration de cellules T $CD8^+$ est accompagnée d'un réseau serré de cellules myéloïdes 91
Figure 14 : Les cellules myéloïdes infiltrent la tumeur avant l'arrivée massive des LT $CD8^+$ 93
Figure 15 : Les cellules $CD8^+$ sont nécessaires à la régression tumorale induite par la vaccination 95
Figure 16 : La déplétion des cellules myéloïdes bloque la régression tumorale 97
Figure 17 : La vaccination de souris CCR2KO transplantées avec les cellules TC1 et du modèle tumoral EG7 traité par PLX confirment l'importance des cellules myéloïdes lors de phase de régression 98
Figure 18 : L'activation des cellules myéloïdes dépend de la présence de LT $CD8^+$ 100
Figure 19 : Les interactions dépendantes de l'IFNγ permettent l'activation des cellules myéloïdes par les LT $CD8^+$ 101
Figure 20: La combinaison vaccin E7 + IFNα induit une augmentation de l'infiltration de cellules myéloïdes activées.... 102
Figure 21 : Les cellules myéloïdes contribuent à l'élimination des cellules tumorales par l'intermédiaire du TNFα. 104
Figure 22 : Expression de PD-1 par les LT $CD4^+$ et $CD8^+$ 105
Figure 23 : La combinaison anti-PD1 + IFNα est efficace pour éviter l'échappement de la tumeur. 107
Figure 24 : La combinaison anti-PD-1 + IFNα réactive les cellules myéloïdes et lymphoïdes.... 109
Figure 25 : Coopération lymphocytes T/cellules myéloïdes lors de la réponse immune anti-tumorale induite par la vaccination 114

INTRODUCTION

AVANT PROPOS

Le cancer est une maladie de plus en plus fréquente, provoquée par des mutations somatiques ou génétiques. La recherche s'active à optimiser les traitements, et doit innover pour contourner les mécanismes de défense des tumeurs. Parmi les traitements d'avenir, les immunothérapies sont actuellement très largement étudiées. Ces thérapies reposent sur nos connaissances des mécanismes de cancérogénèse, du sytème immunitaire, et plus précisément, de la réponse immune anti-tumorale. Cependant, pour ce dernier point, la grande majorité des études dédiées à l'analyse de la réponse immune ont été faites dans un contexte progression tumorale, alors que la croissance de la tumeur traduit une inefficacité de la réponse immune.

Durant ma thèse, je me suis intéressé à la cinétique d'une réponse immune anti-tumorale, cette fois efficace, associée à des régressions tumorales. Le modèle utilisé dans cette étude a fortement été inspiré des travaux de W.Coley, car un protocole vaccinal provoquant les régressions tumorales a été conçu pour mimer une infection virale. Dans un second temps, je me suis attaché à prolonger la réponse anti-tumorale en cherchant à agir sur la phase d'échappement des tumeurs qui suit fréquemment une phase de régression partielle.

Dans cette introduction, je vais dans un premier temps rappeler les bases de la réponse anti-infectieuse, importante dans le modèle étudié, et quelques conséquences des réponses chroniques sur les cellules T. J'évoquerai par la suite le développement des tumeurs, leurs relations avec les cellules immunes du microenvironnement et les mécanismes responsables de l'échec de la réponse immune. Enfin, j'analyserai les immunothérapies actuellement utilisées, ou qui le seront dans les prochaines années, et les réponses cliniques et immunes observées.

I. La réponse immune anti-infectieuse

L'immunité anti-infectieuse telle que nous la connaissons maintenant nous vient directement de recherches et d'hypothèses faites au début du XXe siècle, par Paul Ehrlich et Ilya Ilitch Metchnikov. Le premier défendait l'idée que la base de défense contre les infections «serait une substance présente dans le sérum », alors que le second soutenait l'importance des cellules dans cette lutte anti-infectieuse. Ces chercheurs aux théories opposées, en tant qu'humoraliste et cellulariste, furent chacun récompensé par un prix Nobel pour leurs travaux en 1908. C'est autour des années 50 que l'immunologie moderne voit le jour, intégrant ces deux visions d'immunité cellulaire et humorale, et peut prendre son envol grâce aux avancées technologiques.

La réponse immune met en jeu l'ensemble des mécanismes de défense de notre organisme lorsque son intégrité se trouve menacée par des pathogènes (bactéries, virus ou parasites). Le déroulement de cette réponse met en jeu deux types de défenses étroitement liées : la réponse innée et la réponse adaptative. Lors d'un premier contact avec un pathogène, l'immunité adaptative est retardée de quelques jours par rapport à la réponse innée, et ne joue un rôle que quand cette première réponse ne suffit pas à éliminer le pathogène.

1. La réponse innée

La réponse innée, naturelle, agit de manière très rapide, non spécifique et stéréotypée pour différents groupes de pathogènes. Elle est déclenchée dès lors qu'un microorganisme se présente, non seulement à l'intérieur, mais aussi à la surface (au contact de la peau) de notre organisme, car cette réponse innée présente plusieurs lignes de défense.

La première défense de cette réponse innée n'est autre que la barrière imposée par la peau et les muqueuses. En plus de cette barrière physique, divers mécanismes peuvent empêcher ou retarder l'entrée des microorganismes, comme les enzymes qui composent certaines sécrétions (comme les sécrétions salivaires ou sudoripares) ou encore la présence d'autres microorganismes, non pathogènes, qui forment la flore commensale.

Dans le cas où cette première ligne échouerait, d'autres acteurs du système immunitaire sont prêts à prendre le relais. Ces cellules (neutrophiles, monocytes/macrophages, ILC (*innate lymphoid cells*), cellules T invariantes) peuvent libérer des cytokines, des chimiokines permettant le recrutement d'autres acteurs, et avoir une action cytotoxique directe. Ces cellules utilisent des PRR (*Pattern-Recognition Receptor*), des récepteurs de surface qui leurs permettent de reconnaitre des groupes de

molécules retrouvés sur certains pathogènes, essentiels à leur survie, les PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Depuis l'introduction de cette notion en 1989 par Charles Janeway (Janeway, 1989), nous pouvons distinguer cinq types de PRR: les TLR (*Toll-Like Receptor*), les NLR (*NOD-Like Receptor*), les RLR (*RIG-Like Receptor*), les CLR (*C-type lectin-Like Receptor*) et *AIM-2-like receptors* (Iwasaki & Medzhitov, 2015). Ces PRR sont également présents sur les cellules dendritiques (DC, *dendritic cells*), situées à la frontière entre système immunitaire inné et adaptatif. Elles sont responsables de la présentation d'antigène à des cellules T naïves, que nous évoquerons par la suite lors de l'introduction de la réponse adaptative. Pour chaque type de germe (bactéries, virus,…), les PRR impliqués engendreront des réponses spécifiques en fonction des facteurs chimiques sécrétés qu'ils vont induire, comme illustré dans la figure1. Certains PRR comme les TLR induiront des réponses inflammatoires initiées par les macrophages résidents qui produiront des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires (TNFα, IL-6, IL-1β). Les PRR capables de reconnaitre les acides nucléiques, généralement d'origine virale mais pas uniquement, vont eux, induire la production d'interféron de type I (IFNα, IFNβ), et déclencher une réponse antivirale.

Lors de la détection d'un pathogène, macrophages et neutrophiles ont la capacité de détruire eux-mêmes ces pathogènes suite à leur reconnaissance (TLR, FcR, système du complément), sans pour autant induire de réponse adaptative par la suite. En effet, l'organisme étranger peut être phagocyté et dégradé par les macrophages, ou bien éliminé par la production de facteurs solubles microbicides produits par les neutrophiles ou les macrophages, comme le TNFα, les ROS (*reactive oxygen species*) ou du NO (*Nitric oxide*). **Ces cellules sont donc des cellules effectrices efficaces du système immunitaire inné et jouent un rôle important dans l'élimination des pathogènes malgré les dégâts collatéraux qui peuvent être causés par les ROS et le NO.**

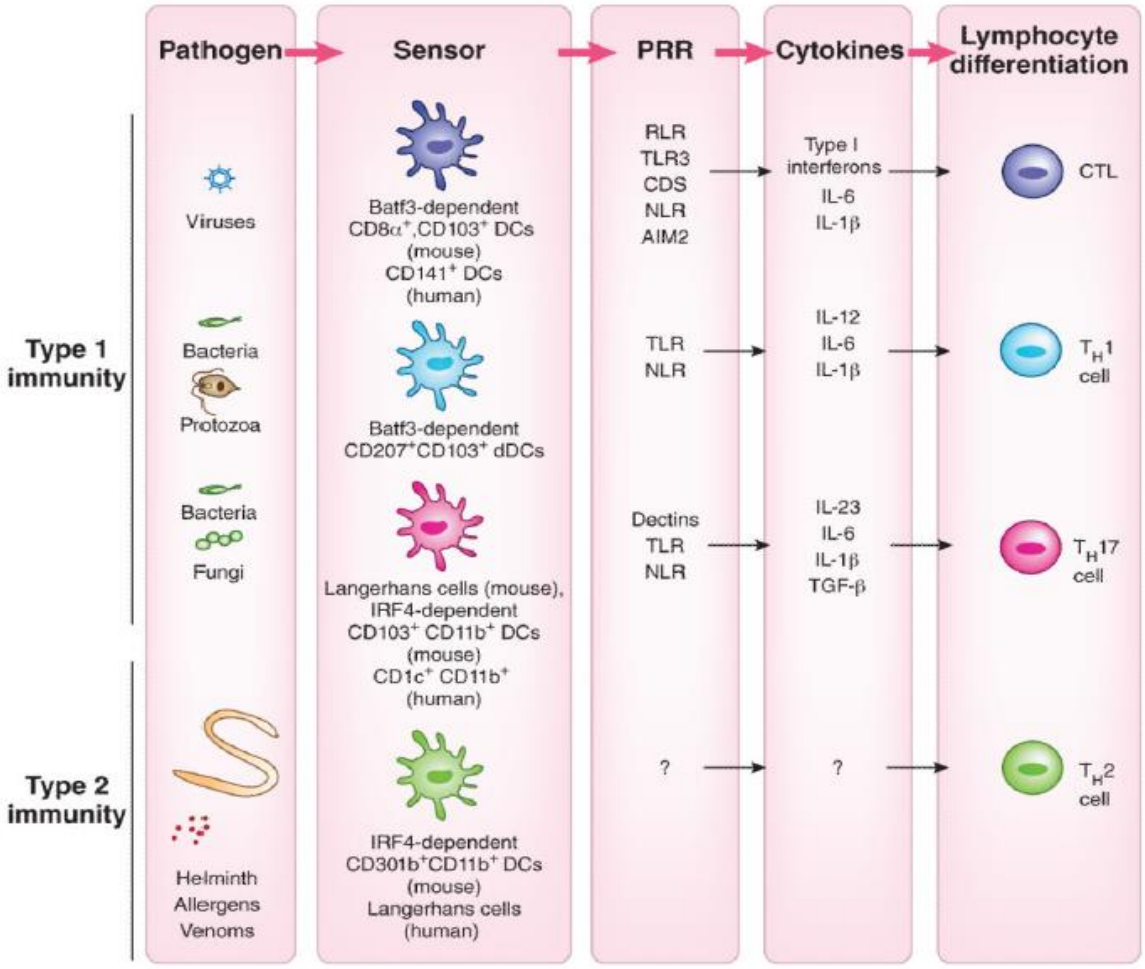


Figure 1 : Adapté de (Iwasaki & Medzhitov 2015), Effets des pathogènes sur les PRR et la réponse immune. En fonction de la nature du pathogène, les APC (ici les DC) peuvent engager des PRR différents, et cela induira une production cytokinique spécifique et, par conséquent, une différenciation T différente pour chaque type de pathogènes responsables de l'agression. Classiquement, une réponse médiée par les LT cytotoxiques est initiée par les DC CD8α+ CD103+, généralement en cas d'infection virale. La différenciation des LT de type Th1 est engendrée par les DC CD207+ CD103+ souvent au niveau de la peau, et les cellules Th17 sont, elles, induites par les DC présentes au niveau des muqueuses, ou par les cellules le Langerhans. Enfin, les cellules de type Th2 se différencient grâce aux DC CD301+, suite à la reconnaissance de pathogènes de type parasite, ou encore d'allergènes.

Pour amplifier la réponse et si besoin, assurer un lien avec la réponse immune adaptative, ces cellules peuvent sécréter des facteurs solubles qui permettent de recruter d'autres monocytes/macrophages et neutrophiles sur le site de l'infection. Il y a un élément majeur, indispensable, au bon déroulement d'une réponse immunitaire, qui est sa cinétique. Il est en effet important de rappeler qu'il ne s'agit pas simplement d'acteurs impliqués dans une réponse immune, mais qu'il est nécessaire de prendre en compte les dimensions spatiales et temporelles de cette réponse. Suite à une infection, il y a la mise en place d'une cascade d'évènements responsables de la sécrétion de chimiokines et du recrutement des différents acteurs.

Parmi les éléments indispensables à l'efficacité de la réponse, la sécrétion précoce d'interféron alpha (IFNα) joue un rôle très important, et même majeur, lors d'une infection virale. Cette cytokine produite par tous les types cellulaires permet l'arrêt de la transcription des cellules infectées, mais aussi dans les cellules voisines, ce qui freine considérablement la propagation virale (Katze, He, and Gale 2002). En plus de contrôler la réplication virale, l'IFNα induit l'apoptose de cellules en prolifération (Platanias 2005). Cette cytokine orchestre la réponse immune suite aux infections virales, car elle induit la production de chimiokines responsables des vagues de recrutement des monocytes inflammatoires (CCL2, CCL3) et des LT (CXCL10) (Goldszmid and Trinchieri 2012; Lazear et al. 2013; Salazar-Mather, Lewis, and Biron 2002). Nous verrons également que l'IFNα peut améliorer la réponse adaptative, en favorisant par exemple la production d'IL-12p70 (Gautier et al. 2005), et la présentation croisée que nous évoquerons plus loin (Agnès Le Bon and Tough 2008).

L'interféron gamma (IFNγ), malgré certaines similitudes avec l'IFN de type I, agit sur des cibles différentes (Rauch, Müller, and Decker 2013). Alors que l'IFN de type I agit sur STAT1 et STAT2, l'IFNγ n'agit que sur STAT1. Il favorise la production de chimiokines telles que CCL2, qui attire les monocytes *via* CCR2, ou encore CXCL9, 10 et 11 qui permettent le recrutement des LT *via* CXCR3. Il contribue également à l'activation et à la cytotoxicité des macrophages (Haabeth et al. 2011). L'IFNγ peut aussi être produit par d'autres cellules effectrices de la réponse innée comme les cellules NK, et permet l'inhibition des LT régulateurs (Treg) (S. Srivastava et al. 2014). **L'action de ces IFN est vaste et complémentaire et, en plus de contribuer à la réponse innée, permet de faire le lien avec la réponse adaptative que je vais maintenant développer.**

2. La réponse adaptative

Contrairement à l'immunité innée qui a un répertoire limité, d'autres cellules sont capables de déclencher une réponse après la reconnaissance de n'importe quel antigène, grâce aux récepteurs antigéniques des lymphocytes T (LT) et des lymphocytes B (LB). L'immunité spécifique est divisible en 2 types de réponses, l'une à médiation humorale, l'autre à médiation cellulaire. Je développerai surtout l'immunité cellulaire qui est au cœur de mon projet de thèse.

2.1. La réponse à médiation humorale

Les lymphocytes B immatures, *via* leurs récepteurs de surface BCR (*B Cell Receptor*), ont la capacité de reconnaitre un antigène natif (avec sa structure 3D) présent lors d'une infection. Cette reconnaissance entraine une amplification clonale B, puis une différenciation du lymphocyte B en plasmocyte, cellule spécialisée dans la production d'anticorps, ou immunoglobulines. Lorsque des immunoglobulines se fixent à leurs cibles (bactéries ou virus, par exemple), cela a pour effet de neutraliser ces virus et de bloquer l'infection des cellules, ou de faciliter l'action de phagocytes reconnaissant des bactéries hérissées d'anticorps (opsonisées). **A la différence des lymphocytes T que je vais introduire juste après, les LB peuvent agir à distance de la cible *via* la sécrétion de ces anticorps qui circulent dans le sang et diffusent dans les tissus.**

2.2. La réponse à médiation cellulaire

Les LT jouent un rôle majeur dans l'orchestration de ce type de réponse. Cela se fait grâce à la coopération des lymphocytes T avec des cellules innées comme les DC ou les macrophages. Lors du développement lymphocytaire T dans le thymus, les LT passent par la sélection thymique, processus par lequel les cellules ayant un TCR (*T-cell receptor*) trop peu affin ou au contraire trop affin sont éliminées. Les TCR trop affins sont pour la plupart ceux qui reconnaitraient des antigènes du Soi et sont donc éliminés de notre répertoire. Les LT vont en effet rencontrer des antigènes du Soi en périphérie, il est donc primordial que ceux-ci soient éliminés pour éviter de déclencher une réponse auto-immune. Cette notion est importante et permet de comprendre pourquoi dans le cas de cancer, le répertoire des LT contre les antigènes tumoraux est globalement peu affin, car les cellules tumorales présentent de nombreux antigènes du Soi, donc mal reconnus. Par conséquent, la réponse immune anti-tumorale est plus difficile à mettre en place que la réponse anti-infectieuse, contre des antigènes non tolérisants au niveau thymique. C'est en circulant dans les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) que les LT naïfs peuvent rencontrer les cellules présentatrices d'antigènes (APC, *antigen-presenting cells*) qui peuvent leur présenter ces peptides *via* le MHC de classe I. En effet, les antigènes reconnus sur les APC ont été d'abord apprêtés (par un processus de fragmentation), puis combinés à une molécule du MHC, et ce complexe est présenté à la surface de la cellule et reconnaissable par une cellule T. Classiquement, les protéines d'origine exogène, une fois phagocytées ou internalisées par une APC, peuvent engendrer une présentation antigénique de longs peptides par le MHC II, de 12 à 18 acides aminés, qui pourront être reconnues par les LT $CD4^+$, alors que les protéines endogènes sont présentées comme des peptides de 8 à 10 acides aminés par le MHC I et ces

complexes sont reconnaissables par des LT CD8$^+$. Des protéines exogènes, après internalisation et dégradation, peuvent être présentées par le MHC I des DC, ce qui s'appelle la présentation croisée. Ce dernier mécanisme de présentation est essentiel pour *primer* (stimuler une première fois) les LT CD8$^+$ au niveau des organes lymphoïdes secondaires, malgré le fait que les cibles (cellules infectées, ou cellules tumorales) ne sont pas directement accessibles aux LT CD8$^+$ naïfs. Ce sont essentiellement des DC qui sont indispensables à la présentation antigénique aux LT naïfs, et à la présentation croisée pour les CD8 naïfs. Après reconnaissance par le TCR du lymphocyte T, il s'ensuit une expansion clonale des LT devenus cytotoxiques. Pour cela, l'activation doit être complète, c'est-à-dire que 3 phénomènes sont nécessaires : (1) la présentation antigénique par le MHC I au TCR des LT CD8$^+$ ou par le MHC II pour les LT CD4$^+$, (2) l'interaction des molécules de costimulation telles que CD28, OX-40, 4-1BB, CD27 présents à la surface des LT naïfs, avec leurs ligands CD80/CD86, OX-40L, 4-1BBL, et CD70 sur les APC, ce qui permet d'amplifier les signaux d'activation, (3) et enfin, l'APC doit sécréter des cytokines qui vont permettre aux cellules T de se polariser. Ce troisième signal conditionnant le *priming* des LT CD8$^+$ par les APC est dépendant de l'état de maturation des DC. En particulier, la sécrétion d'IL-12p70 est nécessaire pour un *priming* efficace (Díaz-Montero et al. 2008; Kaiser et al. 2003). Ces LT récemment activés expriment des marqueurs d'activation comme CD69 et CD25 (IL-2Rα) à leur surface. **Ainsi, l'activation optimale des LT, et en particulier des LT CD8$^+$, acteurs importants dans mes travaux, dépend d'interactions fructueuses avec des APC et les molécules qu'elles expriment.**

Une fois *primés*, les LT naïfs se différencient en LT effecteurs. Les LT CD8$^+$ cytotoxiques peuvent exercer leur cytotoxicité soit par la sécrétion de perforine/granzyme, soit par l'interaction de leur molécule de surface FasL avec le récepteur Fas sur une cellule cible. Leurs autres caractéristiques sont la capacité transitoire à produire du TNFα, qui peut favoriser la production de radicaux libres oxygénés par les cellules telles que les phagocytes, et d'IFNγ, qui lui, entretient l'activation des T CD8$^+$ de manière autocrine mais active aussi les macrophages et engendre une augmentation l'expression du MHC I sur ces macrophages et d'autres cellules cibles. Enfin, TNFα et IFNγ participent tous deux au blocage de la synthèse de protéines et de la réplication virale dans les cellules infectées aux côtés de l'IFNα (Müller et al. 1994; Phillips et al. 2010).

L'efficacité de cette réponse dépend du ménage à trois entre les APC, les LT CD8$^+$ et les LT CD4$^+$. En effet, ces dernières que l'on appelle aussi LT auxiliaires ou *helper* sont nécessaires au maintien et au bon déroulement de la réponse T cytotoxique. Les APC leur présentent les peptides antigéniques *via* le MHC II, ce qui déclenche aussitôt l'activation des APC par

l'interaction CD40/CD40L, ou, plus tard, le relargage d'IL-2 qui permet une meilleure activation des LT cytotoxiques (Blachère et al. 2006; Melief 2013; Shi et al. 2006). **Le déclenchement d'une réponse immune dépend des interactions entre ces différents types cellulaires.**

Après leur activation, différentes sous-populations de LT $CD4^+$ peuvent être distinguées selon leurs profils cytokiniques ou par l'expression de facteurs de transcriptions spécifiques, et nous distinguons notamment les Th1, Th2, Th17, iTreg, Tfh ou encore CD4 cytolytiques (Swain, McKinstry, and Strutt 2012). Chaque sous-population peut initier ensuite des actions différentes. Il faut aussi souligner l'existence d'une autre population de DC, les pDC (*plasmacytoid dendritic cell*), qui participent fortement à la réponse anti-infectieuse par leur forte production et sécrétion d'IFN de type I (Liu 2005). Ces cellules sont circulantes à l'état inactif, et c'est suite à leur activation qu'elles migrent vers la zone infectée pour y exercer l'activité d'APC et de production d'IFNα/β.

La fin de la réponse T est marquée par la phase de contraction clonale, durant laquelle la plupart des LT $CD8^+$ meurent par apoptose, à l'exception de certaines cellules qui vont devenir les LT CD8 mémoire. En cas de nouvelle infection par le même pathogène, la survie de ces cellules va permettre la mise en place d'une réponse immune spécifique du pathogène plus rapide et plus forte.

La réponse cellulaire que nous venons de décrire brièvement est efficace lors d'une infection aigue, lorsque le pathogène est éliminé en quelques jours. Dans le cas contraire, où la réponse devient chronique et peut s'étaler sur des semaines ou des mois, certains mécanismes de régulation viennent altérer cette réponse immune.

3. Réponse chronique et épuisement des LT

Dans le cas où le pathogène persiste dans l'organisme, au-delà de plusieurs semaines, l'infection est considérée comme chronique. C'est le cas lorsque la cible peine à être éliminée, comme dans 10% d'infections par le virus de l'Hépatite B, 70% pour l'Hépatite C, ou dans la quasi-totalité des patients infectés par HIV. Ce fut lors d'infection par LCMV (variant t1b ou clone 13) chez la souris qu'ont été décrites en détail des cellules T spécifiques ne produisant pas d'IFNγ, sans rôle effecteur (Zajac et al. 1998). Des stades d'épuisement peuvent être distingués, en fonction des activités effectrices perdues, corrélées à l'apparition de marqueurs membranaires, et cela peut mener jusqu'à l'apoptose. Ce modèle a parfaitement été résumé par John Wherry, comme illustré en figure 2. Les facteurs susceptibles d'atténuer et d'épuiser la réponse immune peuvent être

divisés en trois catégories : les récepteurs inhibiteurs présents à la surface des cellules, les facteurs solubles et les cellules immunes régulatrices ou suppressives.

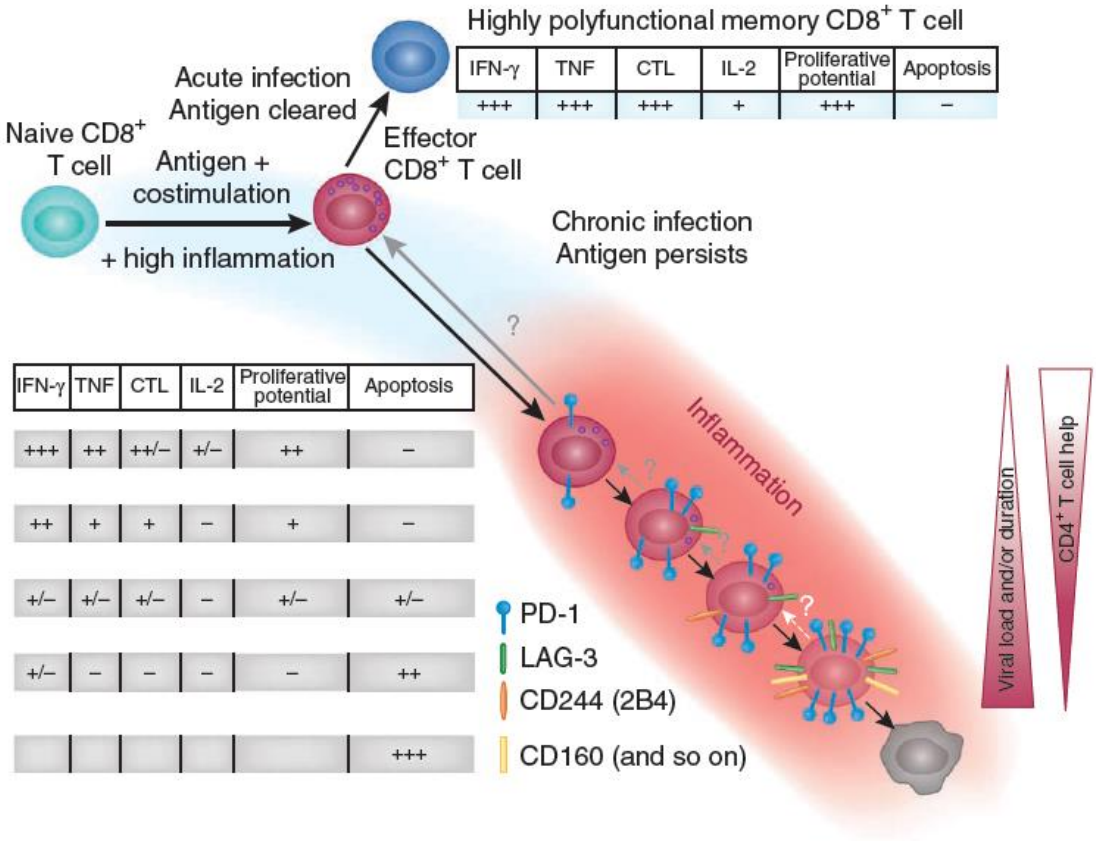


Figure 2 : Adapté de (Wherry 2011), hiérarchie de l'épuisement des LT durant une infection chronique. Pendant l'infection initiale, les LT sont activés une première fois par leur TCR, les molécules de costimulation, et l'inflammation, ce qui aboutit à une différenciation des LT naïfs en effecteurs. Suite à l'élimination de l'agent pathogène, les LT $CD8^+$ peuvent se différencier en LT $CD8^+$ mémoire, polyfonctionnels, capables de produire des cytokines telles que l'IFNγ, le TNFα ou l'IL-2, d'acquérir un fort potentiel cytotoxique (CTL), et de fortement proliférer (partie haute). Durant une infection chronique (partie basse), la persistance de l'agent pathogène mène au dysfonctionnement des LT et donc de leurs activités d'effecteurs. L'épuisement des LT s'accompagne de l'expression progressive de nombreux récepteurs inhibiteurs, pouvant entrainer la mort par apoptose des cellules. La sévérité de l'infection chronique corrèle avec l'apparition de ces récepteurs, mais aussi avec la disparition des LT $CD4^+$ et une augmentation de la charge virale.

Ces deux derniers mécanismes sont très dépendants l'un de l'autre. En effet, les LT effectrices peuvent perdre leur activité sous l'influence de cytokines telles que l'IL-10 ou le TGFβ, produites entre autres par les cellules myéloïdes et LT régulateurs (Treg). Le rôle de l'IL-10 a été démontré en 2006, lors d'infection LCMV, dans laquelle le blocage de l'IL-10 ou de son récepteur restaurait la réponse antivirale (Brooks et al. 2006; Ejrnaes et al. 2006). C'est aussi avec des souris infectées par LCMV qu'a été mise en évidence la régulation par le TGFβ de la réponse T lors d'une infection chronique (Tinoco et al. 2009). Comme je le disais plus haut, ces facteurs solubles

peuvent être produits et sécrétés par des cellules comme les MDSC (*Myeloid derived suppressor cell*), les APC ou les Treg. Ces cellules participent activement à la chronicité de la réponse par la sécrétion de cytokines immunorégulatrices, mais aussi par l'expression des ligands de récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4 (CD80 et CD86) ou PD-1 (PD-L1 et PD-L2). **Tous ces mécanismes sont étroitement liés, avec un système d'amplification du phénomène puisque des cellules suppressives peuvent engendrer la différenciation d'autres cellules régulatrices sous l'influence de cytokines immunosuppressives qu'elles produisent.**

L'expression de récepteurs inhibiteurs sur les lymphocytes T peut varier en fonction de l'environnement extracellulaire, et nous allons maintenant décrire les mécanismes de certains d'entre eux impliqués dans l'épuisement de la réponse T. Les récepteurs les plus étudiés que je vais présenter sont PD-1, CTLA-4, LAG-3 et Tim-3. Dans un contexte de réponse aigue, ces récepteurs font leur apparition ou sont surexprimés à la membrane cellulaire de manière transitoire après l'activation et jouent un rôle primordial dans la lutte contre l'auto-immunité et dans la tolérance du Soi. Or, à la suite de stimulations prolongées, l'omniprésence de ces récepteurs participe à l'épuisement cellulaire, et la perte de l'activité effectrice des cellules T.

3.1. CTLA-4

CLTA-4 joue un rôle très important dans la tolérance au Soi. En effet, la sélection thymique négative élimine une grande majorité des clones de lymphocytes T reconnaissant le Soi, mais pas tous. Ces cellules T autoréactives circulent dans l'organisme, sans pour autant causer de dégâts, grâce notamment à la balance entre récepteurs inhibiteurs et co-activateurs (CTLA-4/CD28-CD80/CD86).

Suite à une stimulation TCR, l'engagement du CD28 avec ses ligands CD80 et/ou CD86 à la surface de la cellule présentatrice est nécessaire pour une activation optimale du lymphocyte T naïf. En 1996, Linsley et al. ont montré, grâce à l'immunofluorescence et la microscopie confocale que lors de l'activation des LT, CTLA-4 habituellement intracellulaire est transporté par des vésicules à la surface membranaire de la cellule, plus précisément au niveau du site d'engagement du TCR (Linsley et al. 1996). A la membrane, CTLA-4 entre en compétition avec CD28 pour se lier à CD80 et CD86, comme l'ont montré les expériences *in vitro* de Krummel (Krummel and Allison 1995). Les liaisons CTLA-4/CD80 ou CD86 vont réguler cette activation T (Walunas et al. 1994), alors que le blocage de CTLA-4 par des anticorps favorise une expansion des T mémoires (Pedicord et al. 2011). Cette régulation négative par CTLA-4 a une importance vitale, car dans des souris CTLA-$4^{-/-}$, une expansion incontrôlée des cellules T engendre la mort

des souris 3 à 4 semaines après la naissance (Waterhouse et al. 1995). **CTLA-4 a donc un rôle clé dans la régulation de la tolérance périphérique, grâce à sa compétition avec CD28.**

Si le rôle clef de CTLA-4 dans la tolérance au Soi est assez clair, nous ne pouvons pas en dire autant de sa signalisation. En effet, la signalisation en aval de CTLA-4 reste floue, comme le montre récemment le groupe de Lucy S.K. Walker, faisant état de plusieurs travaux dont les conclusions sont apparemment contradictoires, mais dans des conditions expérimentales différentes (Walker and Sansom 2015). Cela devra être éclairci dans les prochaines années si l'on veut pouvoir optimiser les traitements qui ciblent CTLA-4, j'y reviendrai dans un chapitre dédié à l'immunothérapie des cancers.

3.2. PD-1

PD-1 a été décrit pour la première fois en 1992 comme protéine surexprimée lors de la mort cellulaire (*programmed cell death-1*). Il faudra ensuite attendre 7 ans avant que Nishimura ne découvre que ce récepteur régule négativement la réponse immune (Hiroyuki Nishimura et al. 1999). Dans la foulée, Dong et al découvrent son ligand spécifique, PD-L1 (Dong et al. 2002), et Freeman décrit alors un rôle dans la régulation de la réponse T dépendant de l'interaction entre PD-1 et son ligand (Freeman et al. 2000). Un second ligand est ensuite découvert, PD-L2, avec la même conséquence que PD-L1 sur l'activation des cellules T, c'est-à-dire l'inhibition (Latchman et al. 2001). Si la liaison de PD-1 à ses ligands engendre dans tous les cas une diminution de la prolifération ainsi qu'une diminution de sécrétion de cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4, ou l'IFNγ, ses ligands PD-L1 et PD-L2 diffèrent au niveau de leur expression. PD-L1 est relativement ubiquitaire, car on le trouve dans de nombreux organes, ainsi qu'à la surface des cellules myéloïdes et épithéliales, alors que PD-L2 n'est exprimé que par les cellules myéloïdes. **L'omniprésence de PD-1 sur les LT activés et de ses ligands sur différents types cellulaires fait de ce récepteur un frein potentiel à différentes étapes de la réponse immune.**

Citer PD-1 comme un frein à la réponse immune n'a rien de péjoratif, son expression est normale après l'activation cellulaire, et son dysfonctionnement peut être létal, comme l'a montré Nishimura, avec la mort précoce (à partir de 5 semaines seulement) de souris déficientes en PD-1, due à une auto-immunité généralisée (H. Nishimura et al. 2001). De plus, Keir et al. ont montré que l'expression de PD-L1 au niveau des cellules parenchymateuses était nécessaire pour maintenir la tolérance du Soi dans un modèle de diabète, modèle de pathologie auto-immune (Keir et al. 2006).

Mais au-delà de ce rôle physiologique dans la régulation, la persistance de l'expression de PD-1 peut poser problème, lors de stimulations chroniques non souhaitables. Heureusement cet état n'est pas irréversible. Il a en effet été décrit lors d'infection virale chronique que le blocage de PD-1 (par anticorps anti-PD-1) restaurait les fonctions des LT $CD8^+$ jusqu'alors anergiques, permettant ainsi l'élimination du virus (Barber et al. 2006), ou que l'ajout d'anticorps bloquant PD-L1 dans la culture de PBMC *(peripheral blood mononuclear cells)* de patient HIV^+ améliorait la prolifération et le potentiel cytotoxique des LT $CD8^+$ (Trautmann et al. 2006).

Il faut aussi prendre en compte le fait que PD-1 ne régule pas exclusivement les cellules lymphoïdes, et qu'il est aussi présent à la surface des cellules myéloïdes. En effet, Said et al ont observé lors d'infection par HIV que PD-1 était exprimé à la surface des monocytes et que sa liaison à PD-L1 était responsable de leur production d'IL-10, et de l'immunorégulation que cela engendre (Said et al. 2010). Il a aussi récemment été décrit que l'absence de PD-1 dans des souris engendrait une augmentation de la production d'IL-6 par les macrophages, favorisant la différenciation des lymphocytes Th17 (Rui, Honjo, and Chikuma 2013), ou encore que l'expression de PD-1 par les macrophages pouvait moduler leur réponse et l'apparition de choc septique lors d'un sepsis (X. Huang et al. 2009). **Ces données indiquent alors que PD-1 peut réguler aussi bien la réponse adaptative que la réponse innée.**

Outre les différents niveaux de régulation imposés par PD-1 lors de la réponse immune, le mécanisme d'action de ce récepteur a été largement étudié. Il est ainsi admis que la liaison de PD-1 avec un de ses ligands provoque le recrutement de la phosphatase SHP-2 (*SH2-containing protein tyrosine phosphatase-2*), qui peut par la suite déphosphoryler la chaine ζ du CD3, et ainsi bloquer l'activation de la cellule (Yokosuka et al. 2012) (Figure 3).

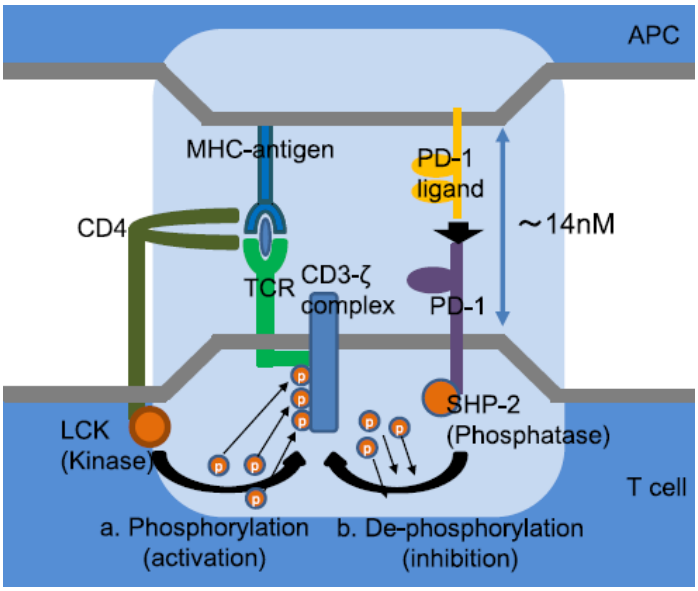


Figure 3 : Adapté de (Chikuma 2016), mécanisme d'inhibition des LT par PD-1. a. Suite à la reconnaissance du complexe antigène-MHC par le TCR et le CD4 (ou CD8), la kinase LCK phosphoryle la chaine ζ du CD3 et initie la signalisation en aval **b.** La liaison de PD-1 à son ligand rapproche PD-1 du TCR et la phosphatase SHP-2 peut déphosphoryler le complexe CD3 ζ -TCR, ce qui pourrait atténuer le signal TCR.

Qui, des agents pathogènes ou des récepteurs inhibiteurs est responsable de la chronicité ? Les deux, puisque la stimulation prolongée engendre une anergie des cellules effectrices, mais par ailleurs, ces récepteurs inhibiteurs, en freinant la réponse immune, peuvent la rendre chronique.

3.3. LAG-3

LAG-3 (*lymphocyte activation gene 3*) fait partie des molécules signatures de l'épuisement des lymphocytes T suite à leur activation. Cette molécule a des similitudes structurales avec le CD4, et comme ce dernier, se lie aussi au MHC II. Des études ont dans un premier temps montré *in vitro* que l'absence de l'activité de LAG-3 augmentait la prolifération et la production de cytokines suite à une stimulation antigénique (Huard et al. 1994), puis *in vivo* que cela engendrait une plus forte expansion de la réponse T et de la population mémoire (Workman et al. 2004). Cependant, des souris immunodéficientes pour LAG-3 ne montrent pas de différence de fonction effectrice dans un contexte d'infection LCMV. Il semble que, seul, LAG-3 ne régule pas l'activation des LT. En revanche, une synergie a été observée lors du blocage simultané de LAG-3 et de PD-1, ce qui facilite l'élimination d'une infection virale (Blackburn et al. 2009).

Malgré le fait que, contrairement à d'autres récepteurs comme PD-1 ou CTLA-4, LAG-3 seul ne joue pas de rôle majeur dans le contrôle de l'auto-immunité (Richter, Agnellini, and Oxenius

2010) et que son mécanisme d'action ne soit pas bien connu, ce récepteur est bien un acteur de l'épuisement de la réponse T par sa synergie d'action avec d'autres récepteurs inhibiteurs.

3.4. Tim-3

Tim-3 (*T cell immunoglobulin-3*) est une autre molécule exprimée sur les LT activés et qui régule négativement leur activité. Elle a plusieurs ligands connus, comme la galectine 9, Ceacam-1, HMGB-1 et la phosphatidylsérine. C'est une molécule qui joue un rôle dans la prévention de l'auto-immunité. Par exemple, des premiers travaux ont mis en évidence son implication dans l'échec de tolérisation *in vivo* sur des modèles murins, soit à la suite d'une immunisation avec un peptide de la myéline, PLP (*proteolipid protein*), couplé au CFA, soit dans un contexte de d'allogreffe (Sabatos et al. 2003 ; Sanchez-fueyo et al. 2003). Plus récemment, il s'est avéré qu'elle pouvait jouer un rôle important dans l'épuisement des LT, dans les contextes d'infections chroniques, et également dans les cancers. J'évoquerai plus loin son implication dans le cadre du cancer. Dans le cadre d'infections virales chroniques chez l'humain, comme lors d'infections par HIV ou HCV, il a été montré que Tim-3 marquait les LT périphériques spécifiques les moins fonctionnels, et que son blocage lors de stimulation *in vitro* pouvait améliorer leur état fonctionnel, notamment avec une restauration de la prolifération et de la production d'IFNγ (Jones et al. 2008 ; Golden-Mason et al. 2009).

Tous ces mécanismes sont des facteurs potentiels qui peuvent participer à l'épuisement T. Ils font partie des cibles thérapeutiques potentielles pour lutter contre l'inactivité des cellules effectrices dans certaines pathologies comme les infections chroniques, mais aussi d'autres maladies persistantes tels que les cancers.

II. Tumeur et immunité

1. Etablissement de la tumeur

1.1. L'oncogenèse

L'apparition de cancers requiert deux conditions distinctes : une altération du génome, qui va être détaillée dans cette partie, et une altération des relations de la cellule en voie de cancérisation avec ses voisines (identiques ou stromales). Cette partie sera discutée plus loin. Dans la plupart des cas, les anomalies (mutations, délétions,…) génétiques ont lieu dans des cellules somatiques, voire parfois, dans des cellules germinales, causant alors la transmission de gènes de prédisposition. Ces altérations peuvent survenir sur deux types de gènes, les oncogènes et les onco-suppresseurs (Spandidos and Anderson 1989).

Les oncogènes sont les gènes résultant en général de l'altération d'un proto-oncogène (par mutation ou surexpression), aboutissant à la création de protéines impliquées dans le processus de transformation en cellule tumorale. Les mutations de certains de ces gènes sont fréquemment observées dans les cancers, comme par exemple Her2, Bcr-Abl, ou H-ras. Cette dernière famille de protéines fonctionne en aval du récepteur à l'EGF, et permet l'augmentation de la prolifération suite à ce signal. Dans le cadre de certains cancers, la mutation du proto-oncogène H-ras, K-ras ou N-ras rend la protéine constitutivement active, et provoque ainsi une prolifération incontrôlée (Malumbres and Barbacid 2003).

Les gènes onco-suppresseurs, ou gènes suppresseurs de tumeurs, sont impliqués, lorsqu'ils sont dysfonctionnels, dans l'établissement de la tumeur. Ils incluent deux familles de gènes : (1) Les gènes impliqués dans le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaire. C'est le cas par exemple du gène TP53 codant pour la protéine p53, connu pour son rôle, lors d'un stress (dommage au DNA par exemple) dans la régulation du cycle cellulaire ou l'initiation de l'apoptose. Le dysfonctionnement de cette protéine enlève un frein au développement de tumeurs. (2) Les gènes qui maintiennent l'intégrité du génome, comme BRCA1. Cette protéine joue un rôle dans la réparation du DNA, c'est pourquoi son dysfonctionnement est aussi une cause importante de tumorigénèse. Notons que, indirectement, TP53 aussi contribue à garder un génome intact.

Ces dysfonctions peuvent être initiées par différents types d'agents, tels que des carcinogènes chimiques, des radiations ionisantes (rayons X, UV), on encore des virus (ex le Papillomavirus et son rôle dans le cancer du col de l'utérus). Un des agents qui a été beaucoup étudié est le tabac, il

favorise de manière considérable l'apparition de cancers du poumon et d'autres organes, et l'expression de néoantigènes par ces tumeurs, dont nous parlerons dans la suite de ce document.

Suite à cette première phase, appelée initiation, durant laquelle l'ADN est lésé, cette anomalie peut être stabilisée et son expression favorisée par d'autres facteurs pro-tumoraux tels que l'environnement cytokinique ou hormonal. Il s'ensuit une expansion clonale menant à la dysplasie, on parle alors de phase de promotion. Ensuite, ces cellules ayant perdu la capacité de contrôler leur multiplication et leur différenciation, peuvent envahir l'organisme, migrer et former des métastases, c'est la phase de progression. Un des processus impliqué dans la dissémination des cellules tumorales est la transition epithélio-mésenchymateuse (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*), qui peut aussi avoir lieu physiologiquement durant l'embryogénèse. Après l'EMT de cellules tumorales qui étaient épithéliales à l'origine, laquelle est dépendante de certains facteurs de transcription (ex Twist1, ZEB1, ZEB2, Snail1 (Tania, Khan, and Fu 2014), les cellules perdent certains de leurs caractères d'origine, comme l'expression de molécules impliquées dans l'adhérence intercellulaire, E-cadherine ou EpCAM (*epithelial cellular adhesion molecule*). Ces cellules acquièrent alors un phénotype de cellules mésenchymateuses exprimant la fibronectine, la vimentine et la N-cadhérine, deviennent motiles, et sécrétent des MMP (*Matrix metalloproteinases).*

Les cellules cancéreuses ont ainsi acquis de nouvelles fonctions, mais aussi de nouvelles caractéristiques qui peuvent aider à les distinguer des cellules saines. Il y a une quinzaine d'années, Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg ont fait état de 6 caractéristiques partagées par toutes les cellules tumorales (Hanahan and Weinberg, 2000). Ils sont revenus en 2011 avec 4 nouvelles caractéristiques, portant leur nombre à 10, ce qui est illustré ci-dessous (Hanahan and Weinberg 2011).

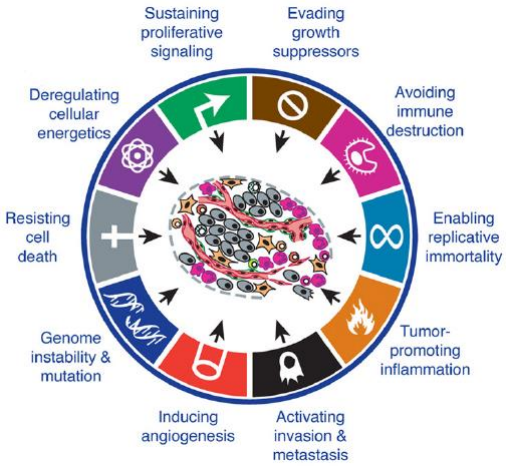


Figure 4 : Adapté de (Hanahan and Weinberg 2011). Schéma récapitulatif des 11 caractéristiques des cellules cancéreuses.

Plusieurs de ces caractéristiques résultent des mutations évoquées précédemment, car l'instabilité et les mutations du génome peuvent induire une évasion à certains mécanismes de suppression, une prolifération soutenue, la réplication illimitée de ces cellules, et leur résistance à la mort cellulaire.

1.2. Les antigènes tumoraux

Les mutations au sein de ces cellules peuvent engendrer des changements d'expressions antigéniques propres à chaque individu. Je m'attacherai ici à préciser les différentes catégories d'antigènes tumoraux qui sont potentiellement reconnus par les lymphocytes T: nous pouvons classer les antigènes tumoraux en 2 catégories bien distinctes, d'un côté les antigènes uniques, résultant de mutations, et spécifiques de chaque tumeur, et les antigènes partagés par plusieurs tumeurs (Vigneron et al. 2013) (nous parlons parfois d'antigènes privés et publics, respectivement).

1.2.1. Les antigènes uniques

Ces antigènes sont le résultat de mutations de protéines ubiquitaires, qui peuvent être uniques et propres à chaque tumeur, mais pas nécessairement. En effet, certaines mutations sont retrouvées chez de nombreux individus car elles confèrent un avantage majeur à la survie et la prolifération des cellules tumorales, comme c'est le cas pour la protéine de fusion Bcr-Abl, présente dans 95% des leucémies lymphoïdes chroniques, ou la mutation B-RAF retrouvée dans plus de 60% des mélanomes. Ces antigènes sont des cibles très intéressantes car leur ciblage thérapeutique laisse très peu de probabilité à une toxicité envers les autres tissus.

D'autres antigènes issus de mutations peuvent en revanche être propres à chaque tumeur. Cette catégorie, appelée communément des "néoantigènes", sont extrêmement intéressants car ils peuvent être reconnus par les LT, comme Ag du *non Soi*. L'expression de telles cibles est restée longtemps inexploitable, faute de technique permettant d'individualiser les analyses, mais ces dernières années les avancées technologiques comme l'utilisation du séquençage de nouvelle génération ont changé cela. Il a ainsi été possible, grâce à l'analyse du génome tumoral, d'identifier dans des modèles murins les néoantigènes les plus immunogènes (Castle et al. 2012). Dans la foulée, Ton Schumacher et son équipe ont mis en évidence, par analyse de l'exome, qu'une thérapie (Ipilimumab) contre un mélanome de stade IV avait induit une réponse T

spécifique contre des néoantigènes (van Rooij et al. 2013). L'identification de ces cibles est une avancée majeure ouvrant les portes à la thérapie personnalisée.

Leur ciblage ne sera sans doute pas suffisant, dans la mesure où, malgré l'induction de LT spécifiques d'antigènes tumoraux, différents processus d'échappement apparaissent très souvent, comme je l'évoquerai plus loin.

1.2.2. Les antigènes partagés

Les antigènes issus de ces mutations peuvent être retrouvés dans différentes tumeurs, et chez différents patients. Il existe trois grandes catégories, en fonction du niveau d'expression et de la spécificité tissulaire.

1.2.2.1. Les antigènes partagés « spécifiques des tumeurs »

Leur expression est dite spécifique à la tumeur car, ils ne sont exprimés que dans quelques rares tissus bien précis, et absents dans le reste de l'organisme. En dehors des cellules tumorales, ces antigènes sont exprimés par cellules germinales testiculaires et les trophoblastes placentaires. En revanche, le fait important qui caractérise ces antigènes est que leur expression est retrouvée dans des tumeurs d'origine tissulaire variée. Le premier antigène tumoral de ce type à avoir été identifié est MAGE-A1, découvert en 1991 (van der Bruggen et al. 1991). Il en a été identifié à ce jour plus d'une trentaine, dont MAGE-3 exprimé dans environ 47% des cancers du poumon et 36% des mélanomes, ou NY-ESO-1, aussi exprimé dans 34% des mélanomes (Scanlan et al. 2002).

1.2.2.2. Les antigènes de différenciation

Ces antigènes sont exprimés par des sous-types de cellules différenciées et spécialisées dans une fonction, et les cellules tumorales peuvent ainsi maintenir l'expression de protéines spécifiques de leur tissu d'origine. C'est notamment le cas des antigènes de différenciation mélanocytaires, comme Melan-A ou gp100, ou encore les protéines exprimées dans la prostate, comme PSA (*prostate specific antigen*). Ils sont la cible de nombreuses thérapies, mais il faut prendre en compte la balance risque/bénéfice (effet auto-immun/anti-tumoral). En effet, dans le cas des gènes mélanocytaires, le risque d'un traitement ciblé est l'apparition de vitiligo. Dans le cas d'un antigène comme PSA, les patients ont souvent déjà subi une prostatectomie. Donc le ciblage de tels antigènes est envisageable mais à risque, et il faut prendre en compte si la toxicité associée est gérable par le clinicien.

1.2.2.3. Les antigènes surexprimés

Ces antigènes sont exprimés par des cellules normales et surexprimés dans des cellules devenues tumorales. De nombreux (56) gènes sont aujourd'hui décrits, comme Her-2, qui est exprimé de manière ubiquitaire à faible niveau, mais surexprimé dans une grande partie des cancers du sein et de l'ovaire.

D'autres antigènes spécifiques de certaines tumeurs peuvent être mentionnés, comme des antigènes viraux. Certaines tumeurs sont en effet dues à une transformation provoquée par des oncogènes introduits par une infection virale, et dans ce cas, les cellules tumorales expriment un ou des antigènes viraux. Le Papillomavirus fait partie des virus à l'origine de cancers, comme le cancer du col de l'utérus.

Malgré les nombreuses distinctions de ces cellules malignes évoquées précédemment (prolifération, métabolisme,…), cela ne fait pas pour autant d'elles des cibles parfaitement reconnaissables par le système immunitaire. Comme ce dernier est cependant capable de reconnaitre certains des antigènes qu'elles expriment, ils sont activement étudiés afin d'être utilisés lors de stimulation du système immunitaire dans le cadre d'immunothérapies. Nous évoquerons cela plus en détails dans la dernière partie de cette introduction.

1.3. Le microenvironnement tumoral

Comme je l'ai indiqué plus haut, le processus de cancérisation exige non seulement des altérations génétiques mais aussi des altérations du microenvironnement cellulaire. Comme l'ont très bien montré les travaux de Mina Bissell, même avec un oncogène actif, la prolifération d'une cellule potentiellement cancéreuse peut être empêchée par le microenvironnement, en particulier par un tissu stromal normal (Bissell and Hines 2011). Cependant, après des signaux d'activation appropriés, le fonctionnement de ce stroma peut complètement basculer, d'un rôle anti-tumoral, à un rôle pro-tumoral, celui du stroma des tumeurs en croissance. Je décrirai ici le microenvironnement des tumeurs solides. Il se compose de l'ensemble des cellules non malignes enveloppant des îlots tumoraux dans le cas des carcinomes, et que l'on appelle le "stroma". Il inclut des cellules immunes, une matrice extracellulaire généralement dense (ECM pour *extracellular matrix*) produite par des fibroblastes, et enfin des vaisseaux.

1.3.1. Les cellules myéloïdes

Parmi les cellules immunes infiltrantes, les macrophages et les MDSC sont abondantes et participent fortement à l'élaboration du microenvironnement ainsi qu'à son influence pro-tumorale.

1.3.1.1. Les macrophages

Les macrophages sont une population de cellules remarquables impliquées dans des fonctions vitales, non immunes, comme le développement de l'organisme pour former les tissus, les vaisseaux mais également l'élimination des débris cellulaires au quotidien. Par ailleurs ils contribuent fortement aux réponses immunitaires. Les macrophages regroupent des populations très hétérogènes en fonction de leurs origines et de leurs localisations tissulaires (Encart n°1). Les TAM, pour *tumor-associated macrophages*, sont retrouvés en grande quantité dans les tumeurs murines et humaines, et leur densité dans des tumeurs en croissance est en général un facteur de mauvais pronostic (Lewis and Pollard 2006). Les études menées sur l'origine des TAM montrent qu'ils regroupent des macrophages résidents, mais aussi des macrophages dérivés de monocytes recrutés (Lahmar et al. 2016). Les macrophages sont des cellules qui s'adaptent à leur environnement (et qui influencent ce dernier). Deux phénotypes distincts ont été proposés: les macrophages de type M1 à activité inflammatoire et les macrophages de type M2, fréquemment retrouvés dans les tumeurs, à activité pro-tumorale (Mills et al. 2000). Cependant cette classification est considérée aujourd'hui comme trop simplificatrice en raison du continuum phénotypique de ces cellules, et plusieurs chercheurs proposent de nouvelles nomenclatures (Martinez and Gordon 2014). C'est le cas du groupe d'Alberto Mantovani qui a complexifié sa nomenclature initiale en proposant de distinguer les M1 des M2a, des M2b et M2c en fonction des facteurs d'activation, comme illustré dans la figure 5.

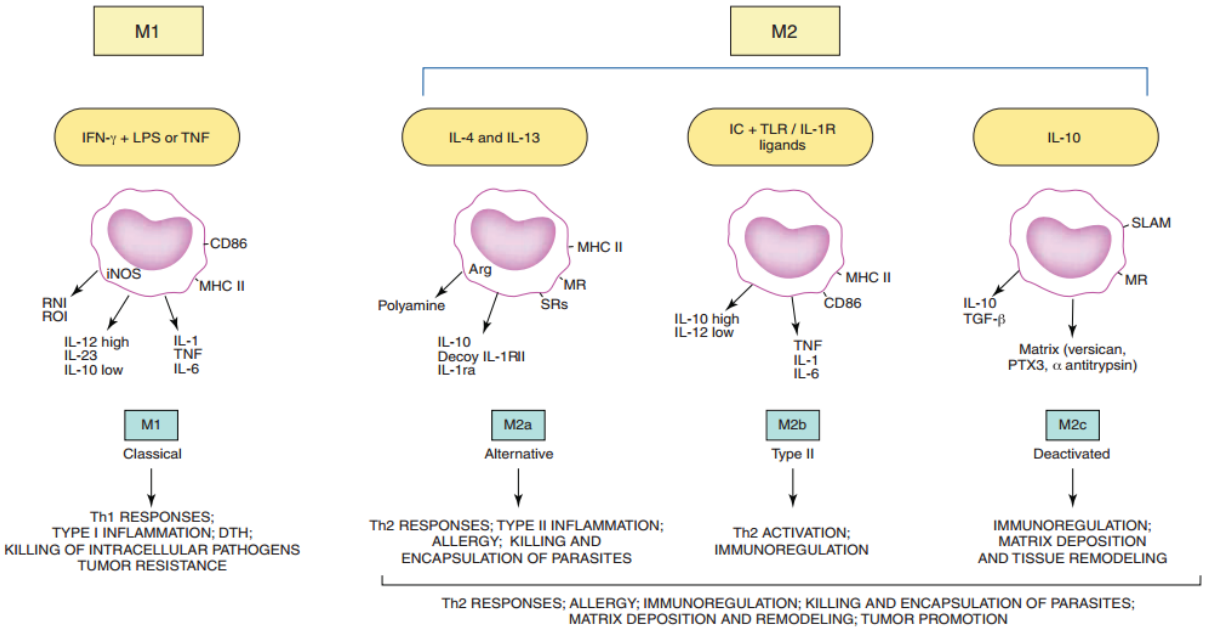


Figure 5 : Alberto Mantovani propose une classification des macrophages dépendante de leur stimulation. Les macrophages sont polarisés vers un phénotype de type M1 suite à des stimulations IFNγ+LPS ou TNFα. Les macrophages de type M2 sont eux divisés en différentes sous-populations, avec les M2a induits par l'IL-4 et l'IL-13, les M2b induits par les complexes immuns et les TLR, et enfin les M2c induits par l'IL-10 et les glucocorticoïdes. Ces distinctions ont été établies essentiellement à partir de données obtenues *in vitro*.

Dans les tumeurs en progression, l'environnement est propice à une différenciation des macrophages à activité pro-tumorale, marquée par exemple par la production d'EGF, ou de MMP 2 et 9, qui favorisent la néoangiogénèse et un remodelage de la matrice extracellulaire. **Par la production de telles molécules, les macrophages soutiennent le développement des tumeurs et participent à la formation d'un microenvironnement défavorable au rejet de la tumeur.** En parallèle de cette activité pro-tumorale, ces macrophages ont aussi une forte activité immunosuppressive que nous aborderons en détail par la suite.

Encart n°1 : origine et hétérogénéité des macrophages

Les macrophages présentent une très grande hétérogénéité cellulaire, que ce soit dans l'activité ou dans le phénotype. Ces cellules ont pour origine la moelle osseuse et dérivent des monocytes, excepté certains macrophages, résidents des tissus, qui sont originaires de l'enveloppe vitelline ou du foie foetal, et qui ont la capacité à proliférer. Les macrophages forment des sous-groupes de cellules spécialisées en fonction de leur localisation tissulaire, et donc de leur « fonction », car ce sont les signaux environnementaux qui dictent à ces cellules leurs activités. Par exemple, nous pouvons distinguer les macrophages alvéolaires dans les poumons, les cellules de Kupffer dans le foie ou encore les cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme, qui ont tous des rôles importants dans le maintien de l'homéostasie, alors que d'autres macrophages présents au niveau des organes lymphoïdes, eux, interviennent lors de la réponse immune, comme les macrophages sous-scapulaires des ganglions lymphatiques, qui vont repérer les pathogènes présents dans la lymphe et initier une réponse antivirale.

Les macrophages résidents des tissus ont initialement une activité anti-inflammatoire, mais peuvent provoquer le recrutement de monocytes inflammatoires et proliférer, suite à la rencontre d'un pathogène. Les monocytes fraichement recrutés peuvent se différencier en macrophages au sein des tissus, mais restent distincts des macrophages résidents.

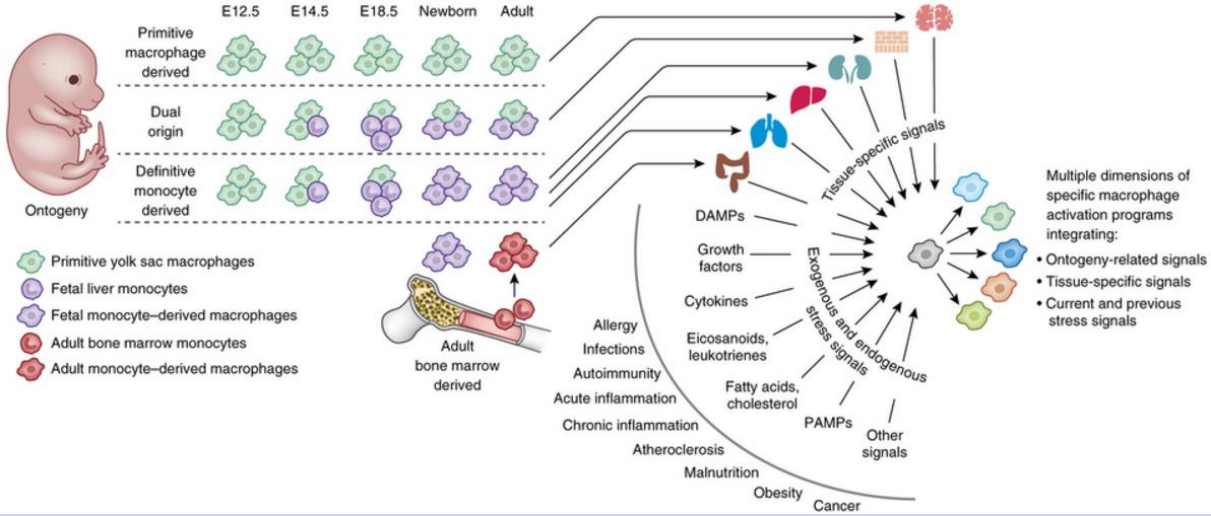


Figure 6 : Adapté de (Ginhoux et al. 2016). Schéma récapitulatif de l'ontogénie des macrophages
Cette figure montre bien que : 1) en fonction de leurs origines, les macrophages n'ont pas les mêmes tissus d'affectation 2) ils sont impliqués dans de nombreuses pathologies, notamment à cause des facteurs environnementaux qui 3) dictent la différenciation et donc les actions des macrophages.

1.3.1.2. Les MDSC

Dans un contexte tumoral, les cellules malignes envoient des signaux capables d'altérer la myélopoïèse, et de favoriser la sortie de la moelle de cellules non différenciées, appelées MDSC, que l'on retrouve d'abord dans la circulation sanguine. Ces cellules peuvent ensuite être recrutées au sein de la tumeur et de la rate, notamment grâce à la production de CCL2 et de CSF-1 par la tumeur (Priceman et al. 2010; Qian et al. 2011). En ce qui concerne les signaux altérant la myélopoïèse, il ne fait plus aucun doute que la production de GM-CSF, G-CSF et M-CSF par la tumeur permet l'expansion de MDSC et leur accumulation au niveau de la rate et du site tumoral (Dolcetti et al. 2010; Peranzoni et al. 2010; Talmadge and Gabrilovich 2013).

Comme leur nom l'indique, les MDSC sont des cellules à activité immunosuppressive. Présentes dans d'autres conditions pathologiques, elles participent aussi au développement du microenvironnement tumoral. En effet, les MDSC contribuent au développement de la tumeur par la production de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), le bFGF (*Basic fibroblast growth factor*) ou la protéase MMP9 (Tartour et al. 2011). Comme les macrophages, elles peuvent participer indirectement à l'édification de la matrice extracellulaire.

Nous verrons par la suite que ces cellules ont non seulement des activités immunosuppressives, mais peuvent en outre favoriser la dissémination métastatique. Plusieurs études montrent la corrélation entre la fréquence de MDSC et la présence de lésions métastatiques, dans le cancer du poumon (A. Huang et al. 2013) et le cancer du sein (Yu et al. 2013) par exemple. De multiples mécanismes peuvent expliquer leur implication dans cette dissémination, comme l'induction de l'EMT (Toh et al. 2011), la production de MMP (Yang et al. 2008), de TGFβ (Pang et al. 2013) ou des cytokines telle que l'IL-6, pouvant conférer au cancer un potentiel invasif (Oh et al. 2013). **Les MDSC jouent donc un rôle majeur dans la croissance de la tumeur par leur forte influence sur le microenvironnement pro-tumoral, mais aussi dans le développement des niches métastatiques.**

1.3.2. La matrice extracellulaire

Cette matrice est bien entendu présente dans les tissus sains, et y joue un rôle dans le maintien de l'architecture tissulaire, l'homéostasie et la cicatrisation tissulaire. Elle est composée de protéines fibreuses et de polysaccharides, le tout formant un réseau de fibres dont la conservation est indispensable à l'intégrité des tissus.

1.3.2.1. Formation et entretien de la matrice

Le principal composant de la matrice extracellulaire est le collagène. En association avec d'autres fibres comme la fibronectine, l'élastine ou la laminine, le collagène régule l'adhésion et la migration cellulaire, mais aussi le développement tissulaire. Cette influence de la matrice dépend de sa composition mais aussi de sa structure tridimensionnelle (Wolf et al. 2009). Ce réseau matriciel est majoritairement façonné par les fibroblastes, principaux producteurs et modeleurs de cette matrice. L'assemblage des fibres de collagène se fait en grande majorité grâce la lysine oxydase (LOX), alors que les enzymes telles que les métalloprotéinases matricielles (MMP pour *Matrix Metalloproteinase*) dégradent le collagène (Frantz, Stewart, and Weaver 2010; Xiao and Ge 2012).

Les protéoglycanes, quant à eux, forment un hydrogel qui comble la zone interstitielle, permettant le maintien de l'intégrité structurale et fonctionnelle de la matrice. Ils confèrent aux tissus une capacité d'hydratation essentielle à leur élasticité et à leur résistance aux variations de pression.

1.3.2.2. Désorganisation de la matrice

A la suite de certains évènements, la matrice peut subir des variations transitoires. C'est le cas lors du processus de cicatrisation suivant une lésion, avec l'activation de fibroblastes devenant des myofibroblastes, notamment sous l'influence du TGFβ1, plus aptes à synthétiser et remodeler le réseau de fibres (Hinz et al. 2012). Suite à la réparation tissulaire, ces myofibroblastes, en général, meurent par apoptose. Cependant, dans certains cas, leur persistance inappropriée entraine une surproduction de matrice pouvant aboutir à une fibrose, voire mener jusqu'au dysfonctionnement de l'organe atteint (fréquent dans des pathologies du foie, organe ayant une grande capacité de cicatrisation). En revanche, il faut aussi signaler l'existence d'anomalies liées à une fragilité de la matrice extracellulaire, comme c'est le cas pour les syndromes d'Ehlers-Danlos ou de Marfan. L'équilibre de la matrice est bien indispensable à l'homéostasie de l'environnement extracellulaire.

1.3.2.3. Support de la tumeur primaire et des métastases

Ces dérégulations de la matrice sont aussi observées dans un contexte de tumeurs solides, que HF.Dvorak a appelé "*wounds that do not heal*" (Dvorak 2015). C'est le cas par exemple dans le cancer du sein (Levental et al. 2009). Les fibres de collagène normalement relâchées et sans orientation précise deviennent linéaires et s'orientent de manière adjacente aux ilots tumoraux.

Cette raideur des fibres est notamment liée à une augmentation de l'activité de LOX, qui a été observée dans plusieurs types de cancers. De plus, il a été démontré dans des modèles murins qu'une surexpression de LOX augmentait la rigidité des fibres de collagène, et que cela influençait la progression tumorale. Il est bien établi que la matrice extracellulaire favorise l'obtention d'un microenvironnement propice au développement de la tumeur, on parle aussi de niche tumorale.

En plus de jouer un rôle lors de l'évolution de tumeurs primaires, la matrice extracellulaire promeut aussi l'apparition de métastases. Le développement d'une niche pré-métastatique est indispensable, et possible grâce à la sécrétion de facteurs et vésicules par la tumeur primaire (Høye and Erler 2016; Peinado, Lavotshkin, and Lyden 2011). La niche pré-métastatique subit alors une réorganisation matricielle ainsi qu'un recrutement de cellules myéloïdes, qui préparent l'arrivée de cellules tumorales et la formation du foyer métastatique.

Alors que Levental et al ont aussi montré que la surexpression de LOX ne causait pas de lésions tumorales spontanément, Sternlicht et al ont montré que la surexpression de MMP3 provoquait l'apparition de tumeurs mammaires (Sternlicht et al. 1999). Il apparait donc que, avant que les cellules tumorales aient besoin d'une densification de la matrice pour se développer et envahir l'organisme, à l'état physiologique, cette matrice peut contribuer à bloquer le développement de lésions tumorales, comme je l'ai indiqué plus haut, plus globalement, pour le stroma physiologique.

Ce « détournement » de la matrice extracellulaire est à l'image du développement tumoral, qui utilise et modifie son environnement à son avantage.

1.3.3. La vascularisation

La première mise en évidence de l'importance de la néo-angiogenèse dans la croissance tumorale a été faite par Judah Folkman à la fin des années 60 (Folkman 2006). Il a montré que la xénogreffe de cellules de mélanome murin chez le chien générait une tumeur de seulement 1 à 2 mm dépourvu de vascularisation, à l'inverse de la greffe syngénique, à partir de laquelle les tumeurs pouvaient se développer, et étaient bien vascularisées. Il a par la suite été observé que les néovaisseaux tumoraux avaient des caractéristiques particulières, avec une perméabilité augmentée, des vaisseaux dilatés, et un réseau anarchique. Cette forte perméabilité engendre un déséquilibre conséquent de la pression interstitielle, et il en résulte des phénomènes d'œdème et d'inflammation intratumorale, mais aussi une dissémination tumorale favorisée (Azzi, Hebda, and Gavard 2013).

Au départ, cette nouvelle vascularisation apporte oxygène et nutriments aux cellules tumorales, et il s'agit d'un support de poids pour le développement de la tumeur. Mais la croissance de la tumeur rend ce processus de plus en plus difficile dans les régions éloignées du réseau vasculaire. Les zones hypoxiques s'enrichissent alors en facteurs pro-angiogéniques essentiels au processus de vascularisation, comme VEGF, PDGF ou TGFα, tous induits par l'activation de HIF1α *(hypoxic indicible factor)*. **Cet excès en facteurs sécrétés par les cellules tumorales, stromales et endothéliales entraine en retour la formation de néo-vaisseaux immatures et anormaux.**

En plus d'agir sur la vascularisation, la plupart de ces facteurs sécrétés dans les conditions hypoxiques favorisent l'atmosphère immunosuppressive du microenvironnement, comme nous allons le voir maintenant.

2. L'immunité anti-tumorale

2.1. L'immunosurveillance

Paul Ehrlich fut le premier à proposer que le système immunitaire pourrait contrôler l'apparition de carcinomes (Ehrlich 1909). Mais c'est en 1957 que Macfarlane Burnet propose que de petites accumulations tumorales apparaissent fréquemment, mais leurs expressions antigéniques provoquent des réactions immunologiques efficaces, et la régression de ces amas pré-tumoraux (M. Burnet 1957). Au même moment, Lewis Thomas avance que l'immunité sert au maintien de l'homéostasie des tissus (Thomas L. 1959). C'est de ces hypothèses que va naitre la théorie de l'immunosurveillance, décrite par Burnet comme le mécanisme immunologique permettant l'élimination ou l'inactivation de cellules mutantes potentiellement dangereuses (F. M. Burnet 1970).

Il s'ensuivra de nombreux travaux, dans les années 70, visant à démontrer la véracité de cette théorie, grâce à des expériences faites sur des souris *Nude*. Les souris *Nude* sont dépourvues de thymus et donc privées de lymphocytes T conventionnels, de LTγδ ou encore de NKT, mais les cellules NK et les LB sont en revanche bien présentes. Les expériences montrent alors des croissances tumorales (non viro-induites) identiques dans les deux fonds génétiques murins. Leurs auteurs, ignorant à l'époque l'existence des cellules NK, ont conclu que la théorie de l'immunosurveillance était infondée (Outzen et al. 1975; Rygaard and Povlsen 1974; Stutman 1974). Rapidement, cette théorie est alors abandonnée, tandis que d'autres chercheurs proposent leurs propres hypothèses comme l'a fait Prehn en 1971, spéculant que le système immunitaire aurait en réalité un rôle de promotion de la croissance tumorale (Prehn 1971).

Dans les années 90, des équipes montrent que l'IFNγ permet une protection de l'hôte contre l'injection de cellules tumorales, ravivant ainsi l'idée de la surveillance immune (Dighe et al. 1994; Kaplan et al. 1998). Dans la foulée, Russell puis Shankaran montrent que l'absence de perforine rend des animaux plus sujets à la croissance tumorale, et que l'absence de réarrangement au niveau des TCR et BCR dans des souris $RAG2^{-/-}$ provoquait une croissance plus rapide de sarcomes, avec de plus grandes fréquences d'apparition de tumeurs (Russell and Ley 2002; Shankaran et al. 2001).

Finalement, les données récentes ont permis de raviver la théorie de l'immunosurveillance. R.Schreiber en 2002, en donne une version élargie, qu'il appelle «*cancer immunoediting* », processus par lequel il se fait une sélection des cellules tumorales capables d'échapper au système immunitaire (Dunn et al. 2002). Il trouve ce terme approprié pour rendre compte du fait que le système immunitaire peut non seulement protéger notre organisme de tumeurs, mais aussi façonner ces dernières. Il propose de distinguer trois étapes clés dans le développement de tumeurs, les trois E du « *cancer immunoediting* » : **Elimination, Equilibre et Echappement.**

2.1.1. Elimination

Cette première phase n'est autre que la modernisation et reformulation de la théorie de l'immunosurveillance, selon laquelle les cellules immunes vont reconnaitre et détruire les cellules transformées. Même si ce processus n'a jamais pu être observé *in vivo*, de nombreux travaux, dont certains cités précédemment, ont mis en évidence l'implication des cellules immunes innées et adaptatives ainsi que d'autres facteurs tels que des cytokines dans la limitation du nombre de cancers avérés.

Les premières études qui ont consolidé cette idée ont montré que l'incidence d'une exposition à un carcinogène tel que le methylcholanthrène (MCA) était plus élevée sur des souris immunodéficientes que sur des souris immunocompétentes. A partir de ces données, de nombreuses investigations ont utilisé la possibilité de modifier le génome des souris. C'est ainsi que les chercheurs se sont aperçus de l'importance de nombreuses cellules et molécules dans l'immunosurveillance, car leurs absences ou déficiences permettaient l'augmentation de l'incidence des carcinomes. Engel a montré en 1996 que des souris *Nude* étaient plus susceptibles de développer un carcinome (suite à des doses plus faibles de MCA que Stutman en 1974, entre autres différences expérimentales), suggérant l'importance des cellules T (Engel et al. 1996). En 2000, M.J Smyth montre de la même manière l'importance des NK et NKT dans la protection de

l'hôte, comme D.H Kaplan pour les cellules T et l'IFNγ ou encore S.E Street pour la perforine (Kaplan et al. 1998; Smyth, Thia, Street, Cretney, et al. 2000; S. E. Street, Cretney, and Smyth 2001).

Un résultat illustre parfaitement cette idée *d'immunoediting*: Lorsque des tumeurs provenant de souris RAG2$^{-/-}$, donc déficientes pour le gène RAG2 (qui est impliqué dans la recombinaison VDJ, essentielle à la génération d'un vaste répertoire de TCR ou BCR), sont implantées dans des souris « sauvages », on observe le rejet et la régression spontanée de certaines de ces tumeurs. La raison en est simple : dans les souris RAG2$^{-/-}$, l'*éditing* n'ayant pas pu se faire, les tumeurs immunogènes se sont développées. Il faut toutefois nuancer ces conclusions, car il a été mis en évidence que les cellules de l'immunité innée comme les cellules NK et les macrophages participaient à ce processus de manière indépendante. L'*immunoediting* n'est donc pas totalement absent dans les souris RAG2$^{-/-}$ car une sélection est tout de même effectuée par l'immunité innée. **Globalement, il faut considérer que dans des souris immunocompétentes, les cellules tumorales trop immunogènes sont reconnues et éliminées ; les cellules tumorales qui échappent et se développent sont les moins immunogènes**.

Ce type d'étude a aussi été fait en utilisant d'autres agents cancérigènes, comme l'association DMBA/TPA (Initiateur de processus tumorale, puis promoteur), ou les UV. Il en est ressorti qu'en fonction des modèles utilisés, la conséquence de l'immunodéficience pouvait varier. C'est par exemple le cas pour des souris TNF$^{-/-}$, dans lesquelles l'absence de TNFα engendre une plus forte incidence de sarcomes induits par MCA, tandis qu'après la combinaison DMBA/TPA, le TNFα semble avoir un rôle inverse (Moore et al. 1999; Swann et al. 2008). Cela nous rappelle la pléiotropie des molécules et cellules immunes, leur conférant des rôles différents en fonction des facteurs microenvironnementaux présents.

Toujours dans le but de confirmer cette étape d'immunosurveillance, les chercheurs ont travaillé sur d'autres modèles, cette fois spontanés, donc probablement plus pertinents. Il s'agissait d'observer l'apparition de tumeurs dans des souris âgées, immunodéficientes ou contrôles, donc ayant ou non un défaut d'*immunoediting*. Sans surprise pour les tenants de cette théorie, les souris déficientes pour RAG2, la perforine ou encore des souris IFNγ$^{-/-}$ dans lesquelles l'IFNγ est totalement absent (alors que dans les souris RAG2$^{-/-}$ les NK peuvent en produire), ont toutes développé plus de tumeurs spontanées (Shankaran et al. 2001; Smyth, Thia, Street, MacGregor, et al. 2000; S. E. A. Street et al. 2002).

L'ensemble de ces données est en faveur de l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire aurait la capacité de limiter le développement de certaines lésions tumorales.

2.1.2. Equilibre

Cette phase est décrite par R. Schreiber comme un état d'équilibre entre l'attaque de la tumeur par le système immunitaire et la prolifération tumorale. Lors de l'élimination des cellules transformées, certaines cellules tumorales ne sont pas détruites par le système immunitaire mais leur prolifération limitée. Il se crée alors une balance dynamique entre les cellules tumorales et les cellules immunes. Cet équilibre peut ainsi rester stable durant de nombreuses années.

Les premiers travaux qui ont mis clairement en évidence l'activité des cellules immunes lors de cette phase l'ont fait par l'utilisation du modèle de carcinome induit par MCA (Koebel et al. 2007). Des souris sont traitées avec une faible dose, ce qui engendre une incidence assez faible de tumeurs. Lorsque dans les souris n'ayant pas développé de tumeurs, les LT ainsi que l'IFNγ sont éliminés, des tumeurs se développent. Cette évolution tardive causée par une immunodéficience provoquée à un instant *t*, montre bien l'influence du système immunitaire sur le contrôle de l'évolution tumorale. En revanche, la suppression des cellules NK ou de certains de leurs récepteurs, n'engendre pas de croissance tumorale, laissant supposer que cette phase d'équilibre n'est pas contrôlée par les NK.

A ce moment du processus tumoral, les cellules transformées résistantes au système immunitaire qui ne sont finalement que contrôlées mais pas éliminées, sont le résultat d'une sélection intense. En effet, ces cellules font partie des rares clones à passer à travers la vigilance de notre système immunitaire, ce qui peut expliquer les difficultés à les éliminer par la suite.

2.1.3. Echappement

L'échappement tumoral apparait suite au contournement de la reconnaissance et/ou destruction des cellules tumorales par le système immunitaire. Ce dernier perd donc le contrôle de l'état d'équilibre, laissant ces cellules former une lésion maligne qui croît.

Les mécanismes de l'échappement tumoral peuvent être répartis en deux grandes catégories : (1) ceux qui permettent d'échapper aux effecteurs lytiques de manière passive, par la perte ou la

mutation d'une molécule, (2) et les mécanismes actifs, regroupant d'un côté les récepteurs et ligands inhibiteurs, et de l'autre les facteurs solubles.

2.1.3.1. L'échappement passif des cellules tumorales face aux effecteurs lytiques

Étant donné que les cellules tumorales sont issues du Soi, le répertoire de LT est constitué en sorte de ne pas réagir contre la grande majorité des antigènes qu'elles expriment. Soit les LT dirigés contre le Soi ont été éliminés lors de la selection thymique, soit ils sont maintenus tolérants en périphérie ou alors sont peu affins. De ce fait, le système immunitaire est inefficace contre ces antigènes. En plus de cela, les cellules tumorales peuvent aussi échapper à la reconnaissance par les lymphocytes T suite à la disparition d'importantes molécules telles que le MHC I, ou encore TAP1, nécessaires à la présentation antigénique (Khong, Wang, and Rosenberg 2004). Il est aussi possible que les cellules tumorales développent une insensibilité à l'IFN, perdent les ligands de NKG2D, ou présentent des récepteurs de mort mutés, comme Fas (Dunn et al. 2005; Stern-Ginossar et al. 2008; Takahashi et al. 2006). **Ces pertes ou inactivations de récepteurs vont en quelque sorte rendre les cellules tumorales moins « visibles » et plus résistantes. Lorsque ce n'est pas le cas, d'autres mécanismes peuvent prendre le relais et inhiber la réponse immune.**

2.1.3.2. L'immunosuppression active

Les cellules tumorales ne font pas que se camoufler, elles peuvent aussi être actives dans leur échappement au système immunitaire, cette fois en acquérant l'expression de nouvelles molécules. La présentation de ligands tels que PD-L1 (B7-H1) ou les molécules HLA-E et HLA-G permet d'inhiber l'activité des LT, et peut aussi induire une tolérance vis-à-vis des effecteurs de l'immunité innée, comme les cellules NK (Dong et al. 2002; Tripathi and Agrawal 2006).

Le développement de cet environnement immunosuppresseur est lié aux sécrétions cytokiniques des cellules tumorales, par exemple de TGFβ et d'IL10, ou bien à la déprivation en ressources nutritives essentielles (acides aminés, glucose,…). Les cellules avoisinantes, comprenant les cellules immunes, s'adaptent à cet environnement et contribuent à leur tour à la production de ces éléments immunosuppresseurs. La production de TGFβ ou d'IL10 par exemple, sécrétés par les cellules tumorales ou les TAM, inhibe l'activation de nombreuses cellules présentatrices (DC) ou effectrices (LT, NK), ou favorise une différenciation des LT naïfs en LT régulateurs. La production de VEGF a pour effet de promouvoir l'angiogenèse et donc la croissance tumorale,

mais associée à d'autres facteurs comme GM-CSF, IL-1β ou PGE2, peut aussi participer à l'expansion et l'accumulation des MDSC dans la tumeur (Gabrilovich and Nagaraj 2009).

Ainsi, les cellules tumorales sont en quelque sorte sélectionnées négativement par le système immunitaire et, malgré leurs traits distinctifs, peuvent lui échapper par plusieurs mécanismes. Certaines particularités, en revanche, comme l'expression de néoantigènes, ont le potentiel de déclencher une réponse immune spécifique des cellules tumorales mais pas forcément victorieuse car, comme nous allons le voir dans la prochaine partie, les cellules immunes manquent d'efficacité sous l'influence du microenvironnement immunosuppresseur de la tumeur.

2.2. Les rôles multiples de l'IFN de type I

Étant donné que l'IFNα est un élément majeur des traitements utilisés dans cette thèse, en combinaison avec la Shiga toxine ou des anticorps anti-PD-1 que j'évoquerai plus tard, je vais rappeler quels peuvent être les principaux effets de l'IFNα. Nous avons vu précédemment que l'IFNα avait un rôle absolument majeur dans l'immunité antivirale. Par ailleurs, il est également impliqué dans l'immunité anti-tumorale. En effet, lors de cette réponse, l'IFN de type I peut favoriser plusieurs phénomènes clés dans l'élimination des cellules tumorales par les LT $CD8^+$. L'IFNα peut contribuer à la maturation des DC, et en particulier favoriser la présentation croisée par les cellules dendritiques et donc la présentation d'antigènes provenant de cellules tumorales à des LT $CD8^+$ (Papewalis et al. 2008). De plus, comme montré sur des patients atteints de mélanome après administration d'IFNα, celui-ci augmente la capacité cytotoxique des LT et NK circulants (Guillot et al. 2005). L'IFNα stimule aussi la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages, comme IL-1β, mais à l'inverse, inhibe leur production d'IL10 (L. Lin et al. 2013). Enfin, il peut aussi agir sur les Treg et diminuer leurs activités suppressives (Bacher et al. 2013). Nous pouvons donc affirmer que l'IFNα a un réel effet anti-tumoral grâce notamment à son influence sur les différentes cellules immunes engagées dans la réponse anti-tumorale.

On notera que, malgré ses effets anti-tumoraux, l'IFNα ne peut pas être utilisé en traitement systémique, car les doses efficaces sont rapidement toxiques. En revanche, nous pouvons envisager de l'utiliser dans des traitements locaux, ce qui a été le cas dans le protocole de vaccination utilisé dans mon travail de thèse.

Tout au long du phénomène de l'*immunoediting*, l'IFNα prend part de près ou de loin à la réponse immune et à ses effets sur la croissance tumorale. Ainsi, un défaut de signalisation d'IFN de type I, α ou β, en utilisant des souris IFNAR1$^{-/-}$, prédispose des fibroblastes embryonnaires murins à une transformation cellulaire (H.-M. Chen et al. 2009). Dans un autre contexte, la perte du récepteur à l'IFNα par les cellules épithéliales intestinales favorise l'apparition de tumeurs dans des souris atteintes de colites et traitées à l'azoxyméthane (Tschurtschenthaler et al. 2014). Dans le cas de sarcome induit par MCA, la déficience pour les récepteurs IFNAR1 dans des souris greffées augmente l'apparition de tumeurs par rapport à des souris contrôles non déficientes pour ce récepteur (Dunn et al. 2005). Ces travaux montrent bien l'importance des IFN de type I dans l'*immunoediting* des tumeurs. Les pDC sont une source importante de production des IFNα/β dans ce contexte de réponse anti-tumorale, et les DC CD8α, elles, sont nécessaires à la présentation croisée et dépendantes de la signalisation IFNAR (Fuertes et al. 2011). Il est intéressant de noter cependant que des études récentes utilisant un stimulateur des IFN de type I a mis en évidence que les cellules endothéliales des tumeurs répondaient très rapidement par une production d'IFNβ (Demaria et al. 2015). De plus, le rôle que l'on connait à l'IFNα dans la lutte contre les infections virales participe aussi indirectement à cet *immunoediting* car certains virus, comme HPV, sont à l'origine de l'apparition de tumeurs. **Ainsi, il est clair que l'IFNα est une cytokine clef dans la défense naturelle ou induite contre des tumeurs.**

2.3. Les mécanismes d'échappement

Dans cette partie, je vais présenter certains mécanismes d'échappements liés au microenvironnement immunosuppresseur et à la perte de fonction de cellules effectrices. Certains d'entre eux sont les cibles de thérapies actuelles ou futures, comme nous le verrons dans la dernière partie de l'introduction. Je vais commencer par décrire le rôle de l'hypoxie environnementale, qui régule de manière générale la réponse immune anti-tumorale, et continuerai avec un mécanisme trop longtemps oublié, mais qui fait maintenant partie des cibles potentielles étudiées, il s'agit de la matrice extracellulaire et de la barrière physique qu'elle représente. J'aborderai ensuite les cellules à activités immunosuppressives dans la tumeur, comme les LTreg, les MDSC et TAM, puis je présenterai de manière non exhaustive certains mécanismes par lesquelles les LT sont finalement *anergisés* dans les tumeurs.

2.3.1. Le réseau matriciel

Je ne vais pas développer le rôle des protéines matricielles, comme par exemple la tenascine-C pour laquelle il a notamment été décrit un rôle de régulation de la fonction des LT (Chong et al. 2012), mais je parlerai ici plus particulièrement du rôle des fibres matricielles dans la localisation des cellules immunes infiltrantes.

Comme nous l'avons vu, les LT sont la plupart du temps efficaces dans l'élimination d'un pathogène. Dans la tumeur, les lymphocytes et autres cellules effectrices pourraient avoir de nombreuses occasions d'éliminer les cellules tumorales. Or, un contact direct est requis pour cela, ce qui est rare dans les tumeurs en progression, en particulier dans les carcinomes, où les tumeurs forment des îlots, entourés de fibres matricielles rigides et linéaires, adjacentes à ces îlots.

Hélène Salmon, lors de sa thèse réalisée avec Emmanuel Donnadieu dans notre équipe, avait étudié le rôle de cette matrice dans la localisation des LT infiltrants (Salmon et al. 2012). Grâce à un modèle d'étude de tranches de tumeurs fraiches (humaines et murines) maintenues en survie, auxquelles il est possible d'ajouter des LT, il a été montré que la matrice influençait fortement la mobilité des cellules T, et leur localisation dans la tumeur (identique pour les T endogènes et les T ajoutées). Les lymphocytes se déplacent plus vite dans les zones moins denses en fibres, et s'accumulent davantage dans ces régions. Rares sont les occasions qu'ont les LT d'aller au contact des cellules tumorales, ou même infiltrer les ilots. La densité et le tracé de ce chemin matriciel y est pour quelque chose, car la déstabilisation de ce réseau par un traitement court de la tranche à la collagénase permet une meilleure infiltration des ilôts par les LT.

Il est donc établi que la matrice limite l'accès des cellules T aux cellules tumorales dans les tumeurs en progression. Ainsi, dans une tumeur, les LT sont d'abord en contact avec les cellules stromales, et il n'est d'ailleurs pas exclu que ces interactions puissent être importantes dans le cadre de la réponse anti-tumorale.

2.3.2. L'hypoxie du microenvironnement tumoral

Dans la tumeur, l'hypoxie du microenvironnement participe à l'échec de la réponse immune anti-tumorale. En effet, malgré la formation de micro-vaisseaux dans une tumeur solide, l'apport en oxygène est limité créant un environnement hypoxique. Ce manque d'oxygène peut notamment favoriser certains types cellulaires, comme par exemple les MDSC, influencées par HIF1α qui régule leurs fonctions et différenciation (Corzo et al. 2010). Il en est de même pour les

macrophages intratumoraux dont le recrutement au niveau du site tumoral et l'activité pro-angiogénique sont influencés par les HIFs (Chaturvedi, Gilkes, Takano, & Semenza, 2014, J. S. Lewis, Landers, Underwood, Harris, & Lewis, 2000). Concernant les Treg, en conditions de stress hypoxique, HIF1α se lie au facteur de transcription FoxP3 et favorise leur apparition (Clambey et al. 2012). Il peut également participer directement au recrutement des Treg au site tumoral, comme l'a montré le groupe de G. Coukos dans des tumeurs ovariennes, avec une chimio-attraction par CCL28, dont l'expression était dépendante de l'hypoxie (Facciabene et al. 2011). **En revanche, cet environnement hypoxique nuit à l'efficacité des effecteurs immuns anti-tumoraux, comme nous y reviendrons ensuite.**

2.3.3. Les cellules immunosuppressives

Parmi les cellules immunosuppressives régulant de manière importante la réponse anti-tumorale, nous allons décrire le rôle des Treg, des MDSC et des macrophages. Bien que l'activité immunosuppressive des Treg soit physiologique la plupart du temps, ils jouent aussi un rôle dans l'échec de la réponse immune anti-tumorale.

2.3.3.1. Les Treg

Il a été montré que la présence de Treg dans les tumeurs humaines était un facteur de mauvais pronostic (Curiel et al. 2004). Ces cellules peuvent avoir différentes origines, car certaines sont issues du thymus, et appelées Treg naturels (nTreg), d'autres peuvent être induites par des signaux environnementaux, ce sont les Treg inductibles (iTreg) (Schmetterer, Neunkirchner, and Pickl 2012). Il est admis que les Treg présents dans les tumeurs sont essentiellement des iTreg, qui présentent un phénotype différent des nTreg, avec de plus faibles expressions de CD25 et FoxP3, mais une plus forte expression de CD73, une enzyme exposée à la membrane cellulaire et qui est susceptible de contribuer à inhiber les LT en dégradant l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine (Whiteside 2014).

Les Treg sont capables de supprimer l'activité des LT effecteurs, mais aussi des APC. Les cytokines sécrétées par ces cellules sont peu nombreuses, et surtout immunorégulatrices. Les Treg produisent IL-10, TGFβ et IL-35, et toutes ont été associées à l'environnement immunosuppresseur et à la progression tumorale.

Les Tregs expriment des récepteurs inhibiteurs comme CTLA-4 et LAG-3, et de ce fait peuvent inhiber l'activation des T effecteurs par contact direct, par exemple après l'engagement de CTLA-4 par CD80 ou CD86 à la surface d'une APC (Camisaschi et al. 2010; Paust et al. 2004). Les Treg peuvent aussi perturber l'activation des effecteurs, de manière indirecte : un contact avec une APC module l'activité de présentation antigénique de cette dernière par diminution d'expression des ligands CD80 et CD86, et par induction de la sécrétion d'IDO (*indoleamine-2,3-desoxygenase*), un enzyme immunorégulatrice. De plus, ce contact Treg-APC peut se traduire aussi par une compétition entre Treg et T effecteurs.

Il est aussi largement admis que les facteurs solubles tels que VEGF, SDF-1, IL-10, TGFβ, ou encore l'enzyme IDO, dont l'expression est liée à l'hypoxie des tumeurs, sont responsables de l'expansion des iTregs (Whiteside 2014a et b). Comme expliqué plus haut, d'autres facteurs liés à l'hypoxie du microenvironnement tumoral sont également impliqués dans le recrutement des Treg, comme par exemple le facteur de transcription HIF1α (Alcántara-Hernández et al. 2014; Deng et al. 2013; V. Kumar & Gabrilovich, 2014).

L'association des Treg à un mauvais pronostic s'explique donc par ses différentes activités régulatrices, directes ou indirectes, fortement initiées par le microenvironnement tumoral.

2.3.3.2. Les cellules myéloïdes immunosuppressives

Lorsque l'on parle de cellules myéloïdes qui infiltrent la tumeur, les deux grandes catégories de cellules sont les MDSC et les TAM. Je vais donner quelques évidences que les MDSC jouent un rôle dans l'immunosuppression de la réponse anti-tumorale, puis je décrirai de manière plus approfondie le rôle des macrophages.

2.3.3.2.1. Les MDSC

J'évoquerai ici les MDSC de manière générale, sans distinguer les M-MDSC (*Monocytic-Myeloïd Derived Suppressor Cell*) des PMN-MDSC (*PolyMorphoNuclear-Myeloïd Derived Suppressor Cell*), qui ont des mécanismes d'action potentiellement différents (Kumar et al. 2016). Chez la souris ces cellules sont immunosuppressives et ont un phénotype $CD11b^+$ $Gr1^+$ (les PMN et M-MDSC se distinguent par des niveaux d'expression différents de Gr1, Ly6C et Ly6G).

Il a été montré dans plusieurs types de cancers que la quantité de MDSC circulantes était corrélée au stade d'avancement de la maladie (Eruslanov et al. 2012; Goedegebuure et al. 2011). De plus, plusieurs études ont montré chez la souris que l'élimination des MDSC, par des anticorps monoclonaux anti-Gr1 ou anti-Ly6G, améliorait la réponse immune anti-tumorale, et de ce fait pouvait perturber la progression tumorale (M. K. Srivastava et al. 2012; Stromnes et al. 2014). Ces cellules ont été amplement étudiées en tant que cellules circulantes, et donc caractérisées à partir de la rate.

Les mécanismes par lesquels les MDSC peuvent exercer leur immunosuppression sont nombreux. Ils incluent notamment la production des ROS et du NO, ou de l'arginase-1 (Arg1), qui accélère le catabolisme de l'arginase, et diminue l'expression de la chaine ζ du CD3, donc la signalisation TCR (Raber et al. 2014; Rigamonti et al. 2011; Rodriguez et al. 2002). Ces mécanismes sont aussi régulés par l'hypoxie du microenvironnement. De plus, comme il a été mentionné plus tôt, les MDSC sont des cellules sécrétrices de TGFβ et d'IL-10, ce qui accroit leurs capacités immunosuppressives. En plus de ces voies sécrétrices, les MDSC expriment à leur surface des ligands de récepteurs inhibiteurs, tel que PD-L1, dont l'expression est corrélée à celle de Arg1 (Kumar et al. 2016).

Par ces différents mécanismes, les MDSC peuvent, au sein de la tumeur ou en dehors, en plus de soutenir le développement de tumeurs, freiner l'immunité anti-tumorale.

2.3.3.2.2. Les macrophages

a. Phénotype des macrophages tumoraux

Les macrophages sont des cellules très plastiques. Cette caractéristique fait leur force dans de nombreuses situations, car ils peuvent jouer un rôle d'effecteurs lors de la réponse innée, mais aussi réguler l'inflammation, comme lors de la cicatrisation. Ces activités des macrophages sont profondément influencées par les signaux environnementaux, ce qui rend les macrophages tissu-spécifiques.

Chez la souris les macrophages expriment le CD11b, F4/80 et le CSF1-R. Quand ces macrophages sont activés, en réponse à de l'IFNγ ou *via* un PRR, ils expriment le MHC II, CD80 et CD86, et peuvent produire de l'IL-12, du TNFα, des ROS et du NO. En réponse à d'autres facteurs environnementaux tels que l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13, ces macrophages se polarisent différemment et expriment plutôt CD206 (*mannose receptor*) et CD163 (*scavenger receptor*) impliqués

dans la résolution de l'inflammation, et peuvent produire de l'IL-10 et du TGFβ. C'est vers ce dernier phénotype que se polarisent la plupart des macrophages intratumoraux, leur conférant des activités pro-tumorales et immunosuppressives, un profil qui, dans d'autres contextes, serait indispensable au maintien de l'homéostasie tissulaire, sa réparation et sa régénération (Encart n°2).

b. Association avec la progression tumorale

Plusieurs travaux portant sur la fréquence des macrophages dans les tumeurs montrent une corrélation entre leur présence et un mauvais pronostic (J. J. W. Chen et al. 2005; Ryder et al. 2008). CSF-1, le principal facteur de croissance impliqué dans la prolifération, la différenciation et la survie des macrophages (et qui influe aussi sur leur recrutement), se trouve aussi corrélé à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers, comme les cancers du sein (Kacinski 1995) ou du foie (Zhu et al. 2008). Un autre facteur soluble responsable du recrutement des monocytes/macrophages est CCL2, (notamment pour la sortie des monocytes de la moelle osseuse), a aussi été mis en cause dans la progression de cancer du côlon (Bailey et al. 2007), ou encore du sein (Saji et al. 2001). **L'abondance de ces cellules ainsi que l'expression des molécules chargées de les recruter font partie des marqueurs de mauvais pronostic dans la plupart des cancers.**

Les charges pesant sur ces cellules se confirment au regard d'autres études, comme celle de Lin et al. montrant dans un modèle transgénique de tumeurs mammaires que l'absence de CSF-1 réduisait significativement l'apparition de métastases pulmonaires, phénomène corrélé à une diminution des macrophages au sein de la tumeur primaire (Lin et al. 2001). Il en fut de même dans un modèle transgénique de cancer du côlon dans lequel l'absence de CSF-1 provoquait la diminution de son incidence (Oguma et al. 2008), ainsi que dans de très nombreux travaux, utilisant d'autres mécanismes d'inhibition des macrophages tels que des anticorps anti-CSF-1 ou des liposomes contenant du clodronate. Il faut tout de même rester prudent quant au rôle des macrophages dans les tumeurs, car si le type de cancer, donc son microenvironnement, entre en jeu dans la polarisation et donc l'activité des macrophages, d'autres études montrent, notamment pour des lésions hépatiques, que la déplétion des macrophages peut aggraver la maladie et précipiter la mort des souris (Heuff et al. 1993; Oosterling et al. 2005). **L'association des macrophages à la progression tumorale est donc indéniable, mais il faut garder à l'esprit que ce n'est pas forcément le cas dans tous les types de cancer.**

Encart n°2 : homéostasie tissulaire et cicatrisation

Les macrophages résidents jouent un rôle important dans l'élimination des débris présents dans les tissus (corps nécrotiques ou apoptotiques) qu'ils peuvent directement phagocyter (Erwig and Henson 2007). Ces macrophages résidents peuvent effectuer cette activité seuls, sans initier de réponse immune, et peuvent limiter l'activité de phagocytose des macrophages inflammatoires (Uderhardt et al. 2012). Cette activité est importante pour le maintien de l'homéostasie et la tolérance dans les tissus. En plus de la surveillance dans les tissus, les macrophages résidents éliminent d'autres débris, les érythrocytes âgés, au niveau de la rate. Ces macrophages sont donc importants à de nombreux niveaux, ils ont un phénotype anti-inflammatoire et expriment la plupart du temps CD206, CD163 et même la Galectine-3, qui sont des marqueurs associés à une polarisation de type M2. Cette activité de phagocytose et d'élimination des débris entre aussi en jeu au moment de la résolution de l'inflammation.

En parallèle, ces macrophages orchestrent le processus de réparation tissulaire, par leur rôle dans la formation de néovaisseaux, leur support à la formation de fibres et le remplacement des cellules du tissu lésé (Lucas et al. 2010). La figure 7 ci-dessous résume les actions des macrophages lors de cicatrisation et montre à quel point ces cellules y ont un rôle central. Ces macrophages ont aussi une polarisation de type M2, dont les actions immunosuppressives, en quantité raisonnable, sont nécessaires tout au long de la réparation tissulaire.

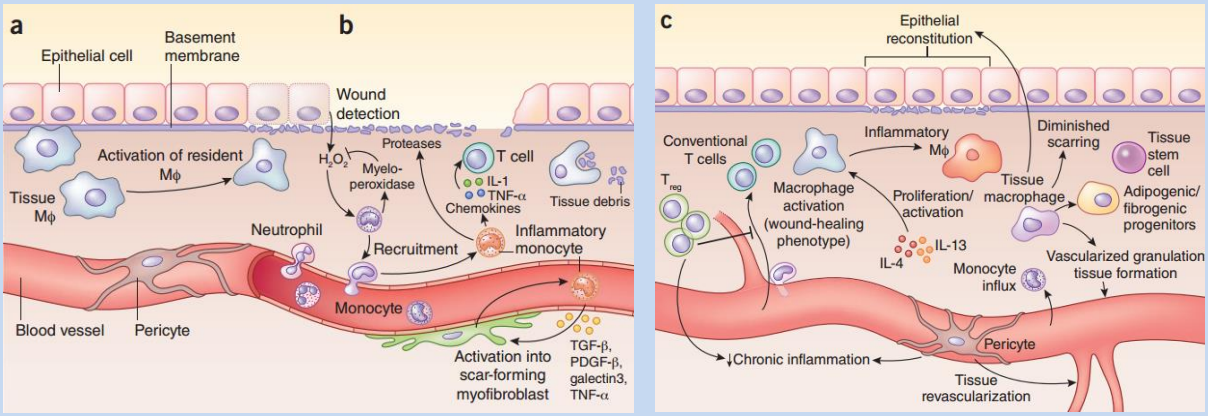


Figure 7 : Adapté de (Forbes and Rosenthal 2014) : modèle général de la réparation tissulaire. a) Dans un tissu sain, les macrophages résidents ont une activité réduite, principalement pour l'élimination de cellules mortes, et très peu de neutrophiles et monocytes inflammatoires infiltrent ces tissus. **b)** Suite à une lésion tissulaire, les macrophages résidents sont activés, les monocytes inflammatoires et neutrophiles sont massivement recrutés, et de nombreuses cytokines pro-inflammatoires sont sécrétées. **c)** durant la phase de régénération du tissu, les macrophages ont un phénotype M2 anti-inflammatoire, et participent à la reconstruction de la matrice. D'autres cellules telles que les Treg participent également aussi à la résolution de l'inflammation.

c. Mécanismes d'immunosuppression

En plus de leur rôle dans le développement des lésions tumorales, les macrophages régulent négativement la réponse immune anti-tumorale dans ces tumeurs en progression. En effet, bien qu'ils aient la capacité de présenter des antigènes, notamment aux LT $CD4^+$ par le biais des MHC II, les macrophages infiltrants sécrètent fréquemment des cytokines immunorégulatrices comme l'IL-10 ou le TGFβ, expriment Arg-1, mais aussi inhibent l'activation des cellules T par contact direct, par la liaison de leurs ligands avec les récepteurs inhibiteurs présents à la surface membranaire des LT, PD-1 ou CTLA-4 étant les plus connus. **En plus d'avoir un rôle de support lors de la progression tumorale, les macrophages peuvent aussi avoir un rôle d'immunosuppresseurs.**

2.3.4. Mécanismes impliqués dans l'anergie T

L'immunosuppression des LT dans les tumeurs passe par les récepteurs inhibiteurs évoqués précédemment, en plus des facteurs immunosuppresseurs solubles. Ils ont pour effet de provoquer une hypo-réactivité des lymphocytes, on dit alors qu'ils sont anergiques. Il a été montré à partir de tumeurs humaines que les TIL, malgré leur spécificité envers les cellules tumorales (ex Melan-A), ne produisaient pas de perforine, granzyme B et IFNγ (Appay et al. 2006; Zippelius et al. 2004). Dans des tumeurs utérines, Sheu et al ont aussi montré que les TIL étaient moins fonctionnels, à cause notamment de l'expression de récepteurs tels que CD94/NKG2A, qui confèrent à ces cellules T une perte de cytotoxicité (Sheu et al. 2005).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette hypo-réactivité des TIL. Je vais évoquer certains de ces mécanismes et je m'attarderai un peu plus sur PD-1, que nous retrouverons dans les résultats de cette thèse.

2.3.4.1. TGFβ

Le TGFβ est une molécule ayant une activité immunosuppressive, sécrétée par les cellules du stroma (cellules myéloïdes, fibroblastes, LT régulateurs) et par les cellules tumorales. Son expression a été retrouvée à haut niveau dans de nombreux cancers, comme le poumon, le colon, le mélanome et d'autres (Teicher 2001).

S'il est maintenant largement admis que le TGFβ joue un rôle majeur dans l'immunosuppression au sein de la tumeur c'est parce qu'il a été mis en évidence, aux stades tardifs de l'évolution de la maladie, que son expression corrèle à un mauvais pronostic. Il faut néanmoins rappeler qu'à un stade précoce de la maladie, son expression est liée à un diagnostic favorable, car il freine le développement de la tumeur grâce à l'inhibition du cycle cellulaire, et l'induction de l'apoptose (Padua & Massagué 2009).

Cette molécule soluble peut avoir pour effet de bloquer la prolifération des cellules T, notamment en supprimant la production d'IL-2 (Kehrl et al. 2014). En plus de cela, le TGFβ peut supprimer la production de molécules par lesquelles les LT exercent leurs activités effectrices, comme l'IFNγ (Bönig et al. 1999) ou la perforine (Smyth et al. 1991). Une autre étude a aussi montré que lors de l'immunosuppression des cellules T par les LTreg, le TGFβ causait l'inhibition de l'exocytose des granules cytotoxiques (Mempel et al. 2006). En parallèle de son immunorégulation directe envers les cellules effectrices, le TGFβ favorise aussi la génération de LTreg, sécréteurs de TGFβ (Wrzesinski, Wan, and Flavell 2007). **Donc, comme beaucoup d'autres mécanismes, l'activité de cette molécule dépend du microenvironnement. Dans une tumeur naissante, le TGFβ est anti-tumoral par son action inhibitrice sur le cycle cellulaire des cellules tumorales. Mais ultérieurement, l'inhibition de la prolifération des cellules immunes confère un rôle pro-tumoral à cette molécule. Le TGFβ fait partie des facteurs de mauvais pronostic lorsque la maladie est avancée.**

2.3.4.2. Galectine 3

La galectine-3 est une lectine impliquée dans l'immunorégulation par de nombreux mécanismes. Cette glycoprotéine est sécrétée par divers types cellulaires (Hughes 1999). Parmi ses modes d'action, il a notamment été mis en évidence que des pentamères extracellulaires de galectine-3 pouvaient limiter la mobilité latérale des TCR dans la membrane des LT CD8, et que la dissociation du CD8 qui en résultait empêchait leur activation et les rendait anergiques (Demotte et al. 2008). L'équipe de Pierre van der Bruggen a montré par la suite que le blocage de la galectine-3 pouvait restaurer l'activation des LT CD4 et CD8 et leurs sécrétions d'IFNγ (Demotte et al. 2010). Il a également été observé que la galectine-3 endogène régulait négativement le TCR (H.-Y. Chen et al. 2009), et qu'indépendamment de ses effets sur la signalisation TCR, la galectine-3 pouvait aussi induire l'apoptose des LT (Fukumori et al. 2003). Une étude récente montre dans un modèle de tumeur murine que l'inactivation des TIL par la galectine-3 est

dépendante de leur expression de LAG-3 et que la déplétion de la galectine-3 provoquait une augmentation de la production de cytokines proinflammatoire par ces cellules, mais aussi une expansion importante des pDC circulantes (Kouo et al. 2015). **L'expression ubiquitaire de cette molécule en fait un frein important lors de la réponse immune anti-tumorale.**

2.3.4.3. PD-1

Nous avons vu dans le chapitre I que PD-1 est un récepteur inhibiteur dont l'expression sur les LT est induite après activation par le TCR et est soutenue dans des cas d'infections chroniques où cette molécule est impliquée directement dans l'épuisement des LT (Barber et al. 2006). Or, le cancer peut être vu comme une stimulation antigénique chronique. Compte tenu de ce parallèle et du fait que PD-1 jour un rôle prépondérant dans l'inhibition de l'activation des LT, l'expression de PD-1 à la surface des LT intratumoraux reflète un état d'anergie, même si cela révèle aussi une activation antérieure (Sauce et al. 2007). Il a en effet été observé dans le mélanome que l'expression de PD-1 dans les tumeurs augmentait avec le stade de la maladie (Chapon et al. 2011).

Notre équipe avait aussi montré que l'expression de PD-1 à la surface de LT inhibait leurs fonctions, même en l'absence d'une interaction avec ses ligands (S.-F. Wang et al. 2011). Si les expressions de PD-L1 et PD-L2 sont faibles dans d'autres conditions, ces ligands peuvent être surexprimés par les cellules tumorales suite à certaines dérégulations, comme la perte de PTEN et l'activation de la voie de la PI3K (Parsa et al. 2007). Les ligands de PD-1 peuvent également être induits par l'IFNγ, comme cela a été montré dans des modèles murins (Bald et al. 2014; Spranger et al. 2013). Il a été mis en évidence que le ligand de PD-1, PD-L1, retrouvé à la surface des cellules tumorales humaines, participait au mécanisme de résistance de ces cellules face à la réponse immune (Dong et al. 2002). Par la suite, plusieurs groupes ont montré que l'expression de PD-L1 et PD-L2 dans plusieurs types de cancer était significativement corrélée à un mauvais pronostic comme dans le carcinome rénal (Thompson et al. 2004) ou le cancer des ovaires (Hamanishi et al. 2007). D'autres études ont confirmé que PD-1/PD-L1 interférait avec la cytotoxicité de LT spécifiques des cellules tumorales (Blank et al. 2004). Ces données accablantes ont provoqué de nombreuses études ayant pour but de cibler PD-1 par immunothérapie, ce dont nous parlerons dans la dernière partie de cette introduction. **Bien que les interactions PD-1/PD-L1 soient nécessaires pour réguler la tolérance, leur excès dans les tumeurs provoque l'anergie des LT et l'inhibition de la réponse anti-tumorale.**

Quelques études chez l'homme montrent que PD-L1 est exprimé différemment sur les cellules tumorales et les cellules immunes infiltrantes en fonction des cancers. Il a en effet été observé que PD-L1 prédominait sur les cellules myéloïdes dans le cancer du côlon (Llosa et al. 2015), mais qu'il pouvait être plus fréquemment à la fois exprimé par les cellules tumorales et les cellules immunes dans des cancers tels que le mélanome, le cancer du poumon ou du rein (Taube et al., 2014). Il semblerait même que l'expression de PD-L1 par les cellules myéloïdes, plutôt que sur les cellules tumorales, prédise une bonne réponse anti-tumorale suite à un traitement ciblant l'interaction PD-1/PD-L1 (Herbst et al. 2014). Des efforts sont actuellement faits pour préciser davantage quelles sont les cellules qui expriment PD-L1 dans les différents types de cancer, mais également pour PD-L2, présent à une moindre fréquence dans les tumeurs, et encore peu décrit *in situ*.

Au regard de ces données de la littérature il est donc fort probable que les interactions PD-1/PD-L1/2 dans les tumeurs inhibent les LT. Cependant, l'expression de PD-1 reflète un état d'activation et l'expression de PD-L1 peut également refléter le fait que les cellules aient été exposées à des cellules fonctionnelles, à un moment donné, produisant de l'IFNγ. Ces données expliquent probablement le fait que dans des cancers de la tête et du cou positifs pour HPV ou le mélanome, les expressions respectives de PD-1 et PD-L1 corrèlent avec une meilleure survie (Badoual et al. 2013; Taube et al. 2012). **Bien que l'expression de PD-1 traduise un état anergique des cellules, elle reflète aussi une activation passée, et donc l'existence d'une réponse anti-tumorale sous-liminaire, qui mériterait d'être amplifiée.**

2.3.4.4. Tim-3

Si l'expression de PD-1 à la surface les LT traduit un dysfonctionnement des TIL, l'expression de Tim-3, elle, permet d'échelonner cet état d'épuisement (Sakuishi et al. 2010). Sakuishi et al. montrent en effet dans leurs travaux, sur un modèle murin de tumeur CT26, que la co-expression de Tim-3 et PD-1 par des TIL marque une population dans un état d'épuisement plus prononcé qu'en absence d'expression de Tim-3, et que les blocages combinés des signalisations de PD-1 et de Tim-3 freinent de manière synergique la progression tumorale. Ces deux molécules freinent donc efficacement la réponse anti-tumorale, indépendamment l'une de l'autre.

Chez des patients atteints de mélanome, l'expression de Tim-3 en association avec PD-1 sur des LT périphériques révèle aussi un état de dysfonctionnement avancé (Fourcade et al. 2010). De la même manière, dans un contexte de lymphome non Hodgkinien, suite à un traitement combinant

IL-12 et rituximab, l'expression de Tim-3 bloque l'activité anti-tumorale des LT $CD8^+$, et notamment les productions d'IL-2 et d'IFNγ (Z.-Z. Yang, 2012). Il faut cependant garder en mémoire que Tim-3 est exprimé par de nombreuses sous-populations immunitaires, et régule aussi leurs activités, mais toujours dans le sens de l'inhibition de la réponse anti-tumorale. Il a aussi été montré que la surexpression de Tim-3 par les LT et les NK était accompagnée d'une expansion des MDSC, et donc pouvait aussi de manière indirecte, réguler la réponse immune anti-tumorale (Dardalhon et al. 2010). **Il ne fait aucun doute qu'en plus de son rôle dans la tolérance immunitaire, Tim-3 est impliqué dans le dysfonctionnement de la réponse anti-tumorale.**

2.3.4.5. CTLA-4

De même que pour PD-1, le rôle que joue CTLA-4 dans la régulation de la réponse immune est délétère pour la réponse anti-tumorale. Les études de son rôle dans les modèles murins ont révélé que le blocage de CTLA-4 s'avérait efficace dans des tumeurs immunogènes (Leach, Krummel, and Allison 1996), mais qu'en revanche, la perte de fonction de CTLA-4 était sans effet sur des tumeurs faiblement immunogènes (Hurwitz et al. 1998). **Cela suggère que l'inhibition de ce récepteur ne permet une amélioration de la réponse immune que lorsqu'une réponse T spécifique est déjà en place**. Cela se confirme en partie avec une synergie d'action observée entre le blocage de CTLA-4 et une vaccination contre des tumeurs peu immunogènes (van Elsas, Hurwitz, and Allison 1999). Je parlerai dans la prochaine partie des immunothérapies qui ciblent CTLA-4, qui se révèlent finalement interférer dans l'activité des LTreg plutôt que de lever une inhibition des TIL.

2.3.4.6. La compétition métabolique

Un autre phénomène, de plus en plus étudié, est la compétition pour les nutriments entre les cellules immunes et les cellules tumorales. L'activité glycolytique importante des cellules tumorales prive par exemple les TIL en glucose, ressource nécessaire à la production d'IFNγ et par conséquent interfère avec l'élimination des cellules tumorales. Une étude récente du groupe d'Erika Pearce pointe du doigt ce phénomène tout en montrant que la signalisation de récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 ou CTLA-4 régule négativement la glycolyse des TIL (Chang et al. 2015). Ces travaux mettent en évidence l'importance des besoins en glucose des LT pour leurs activités effectrices.

Un autre groupe a montré que le microenvironnement tumoral participait au dysfonctionnement du métabolisme mitochondrial, en soutenant la signalisation d'Akt qui réprime PGC1α. Dans un modèle de tumeurs B16, un transfert adoptif de cellules OT-1 qui surexpriment PGC1α rend ces LT plus fonctionnels, ce qui ralenti significativement la croissance tumorale (Scharping et al. 2016).

Cette privation métabolique, qui touche également la disponibilité en acides-aminés comme la glutamine, pourrait participer à la différenciation de cellules suppressives dont les Treg comme l'a montré le groupe de N. Taylor (Klys et al. 2015).

Nous venons de voir dans cette partie que les mécanismes de développement des tumeurs sont encadrés par le système immunitaire qui élimine les cellules transformées les plus immunogènes. L'apparition clinique de tumeurs, solides ou liquides, résulte d'une prolifération de cellules peu ou pas immunogènes. En plus du fait que ces cellules n'induisent pas de fortes réponses immunes à leur encontre, lorsque c'est le cas, des mécanismes freinent la réponse immune anti-tumorale et participent à l'échappement tumoral.

III. Immunothérapie des cancers

L'immunothérapie comme nous la connaissons aujourd'hui est une avancée exceptionnelle pour laquelle William Coley a joué un rôle de pionnier. A la fin du XIXe siècle, W. Coley a observé des régressions spontanées de tumeurs chez des patients souffrant d'infections à streptocoque. Suite à ces observations, il a expérimenté un traitement contre le cancer à base de bactéries vivantes, ce qui fut très encourageant, malgré la toxicité flagrante rapportée (Coley 1891). En revanche, l'inoculation de bactéries inactivées s'est avérée moins efficace. Dans la volonté d'augmenter l'efficacité du traitement et d'éliminer l'apparition d'infections incontrôlées, il a élaboré un vaccin contre le cancer composé de toxines bactériennes, à partir de *S*. pyogenes et *Serratia marcescens*. La vaccination provoque une très forte inflammation à l'origine de plus de 40% de guérison chez les patients (essentiellement atteints de sarcomes). Il s'agit ici des premières études qui mettent en évidence le fait qu'activer le système immunitaire peut provoquer une régression tumorale. Ce type de traitement n'est plus guère utilisé de nos jours, sauf pour le BCG (Bacille de Calmette et Guérin), pour traiter des cancers de la vessie.

A la même période, Paul Ehrlich spéculait que, s'il est possible qu'un colorant chimique marque de manière sélective un microorganisme ou un tissu, un agent pourrait être utilisé de la même manière pour tuer un microorganisme ou des cellules transformées, laissant intact les cellules avoisinantes (Strebhardt and Ullrich 2008). Il a assimilé cela à une « balle magique » (*magic bullet*). Dans les années 1950, des études mettent en évidence le fait que des tumeurs peuvent être rejetées lorsque le système immunitaire a déjà rencontré ces tumeurs, soit lorsque les tumeurs ont été retirées par chirurgie après la croissance de la tumeur, soit lorsque ce sont des cellules tumorales irradiées qui ont été inoculées aux souris au préalable (Foley 1953; Klein et al. 1960). Cela laissait suggérer que des antigènes spécifiques peuvent être reconnus par le système immunitaire. Ces notions sont les bases de notre immunothérapie actuelle, car le concept de la balle magique de Paul Ehrlich a été remis au gout du jour avec les anticorps monoclonaux (Sanz, Blanco, and Alvarez-Vallina 2004).

Comme nous allons le voir par la suite, la plupart des immunothérapies utilisées à ce jour dépendent de ces découvertes. Bien que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie constituent toujours les premières lignes de traitements, les notions de spécificités antigéniques pour éliminer les cellules tumorales et la possibilité de mimer une infection ou une inflammation avec des adjuvants, laissent de grands espoirs pour que l'immunothérapie soit moins toxique mais efficace.

J'évoquerai dans cette partie les différents vaccins utilisés dans le cadre du cancer, puis j'aborderai les transferts adoptifs des LT qui s'appuient sur l'efficacité de la réponse T, ainsi que les transferts cellules T dotées de récepteur à l'antigène chimérique (CAR, *chimeric antigen receptor*). Nous finirons par aborder l'efficacité des anticorps bloquants des récepteurs inhibiteurs et la possibilité de combiner certaines de ces immunothérapies. En revanche, je n'évoquerai pas les anticorps monoclonaux dirigés contre les tumeurs, malgré le fait qu'ils aient prouvé leur efficacité clinique. Bien qu'ils soient considérés comme une thérapie passive, de plus en plus d'évidences mettent en avant leur capacité à induire une réponse cellulaire adaptative chez les patients (Vacchelli et al. 2015).

1. La vaccination anti-tumorale

La vaccination anti-tumorale est un traitement dépendant de la découverte d'antigènes tumoraux. C'est en effet ces cibles antigéniques qui sont directement visées par la vaccination. Le choix des antigènes est donc crucial, et plusieurs critères sont à prendre en compte pour cela. Tout d'abord, les antigènes doivent être spécifiques des cellules tumorales, donc très peu ou pas exprimés par les tissus sains. Il faut ensuite prendre en compte le caractère immunogène de l'antigène ciblé afin que la réponse puisse être robuste contre cet antigène reconnu comme étranger. Enfin, le caractère oncogénique est aussi à prendre en compte, car, bien qu'il ait été montré que l'expression de certaines molécules de surfaces comme le MHC pouvaient être régulées dans les cellules transformées, l'expression des antigènes liés à l'oncogénicité, vitale pour ces cellules, est considérée comme étant très rarement régulée.

Avant toute chose, des investigations chez la souris ont été nécessaires à la mise en évidence de l'efficacité de la vaccination thérapeutique contre le cancer. Les modèles murins les plus utilisés pour ces investigations sont ceux pour lesquelles des lignées tumorales murines ont été modifiées pour exprimer l'antigène OVA. Cela a permis par la suite de cibler les cellules tumorales qui expriment cet antigène, in vitro, mais surtout, in vivo. Grâce à ce type de modèle, plusieurs stratégies vaccinales ont pu être expérimentées comme les vaccins basés sur l'utilisation de DC, de peptides, ou encore d'ADN. Le but de chaque stratégie est le même pour toutes, c'est-à-dire permettre aux APC de *primer* efficacement le système immunitaire afin de déclencher une réponse immune cellulaire spécifique des antigènes tumoraux. A partir de ce modèle d'étude, dans lequel l'antigène OVA est exprimé sur des cellules tumorales, B16 par exemple (mélanome), il a été montré que les différentes stratégies vaccinales, administrées de manière préventive diminuaient de manière conséquente le développement des tumeurs, et pouvaient induire des LT $CD8^+$ (ici

récupérés dans la rate) capable de lyser les cellules tumorales *in vitro* après restimulation, observé par analyse du ^{51}Cr (Bellone et al. 2000).

1.1. Les vaccins à ADN

Autour des années 1990, des chercheurs ont montré que l'injection intramusculaire d'ADN nu pouvait induire une réponse immune adaptative contre l'antigène exprimé par le plasmide injecté (Ulmer et al. 1993; Wolff et al. 1990). Ce fut la naissance du vaccin à ADN (sous forme de plasmide, la plupart du temps vectorisé), dont le principe est de générer une expression antigénique capable d'être prise pour cible par le système immunitaire. Ce type de traitement présente l'avantage d'être plus simple à fabriquer que les thérapies cellulaires, et beaucoup moins coûteux. La méthode la plus commune est l'administration d'un plasmide bactérien couplé à un promoteur capable de fonctionner chez l'humain (du Cytomégalovirus la plupart du temps), et une séquence génétique codante pour le peptide immunogène, capable d'induire une réponse T. Suite à la transfection des cellules, sa transcription aboutira à la présentation de peptides par le MHC I qui peut induire une réponse T $CD8^+$.

Chez la souris, de nombreux travaux ont participé à la mise en évidence de l'effet d'un tel traitement dans le cadre du cancer. Par exemple, une étude a montré que la vaccination intramusculaire avec un ADNc, codant pour gp100 exprimé par les cellules de mélanome (B16 dans ce modèle), protégeait les souris contre ces cellules tumorales (Schreurs et al. 1998). Cela n'était cependant qu'un traitement prophylactique, et plus récemment, d'autres équipes ont testé l'utilisation thérapeutique d'un vaccin à ADN, comme dans le modèle de cellules tumorales TC1 qui expriment les antigènes E6 et E7 de HPV16. Dans ce modèle, la vaccination par un ADN codant pour les protéines E6 et E7 mène à un retard significatif de la croissance tumorale (Yan et al. 2009). Si les résultats sont encourageants car ils montrent qu'une telle vaccination provoque une mémoire immunitaire (en traitement prophylactique) et freine la croissance tumorale, ils ne montrent pas d'induction de réponses anti-tumorales assez efficaces pour provoquer des régressions tumorales systématiques en traitement thérapeutique.

Les études de l'impact de cette vaccination sur la réponse immune montrent qu'une réponse T $CD8^+$ est initiée soit par des APC, soit par les cellules musculaires, qui peuvent présenter naturellement l'antigène aux LT $CD8^+$ par le MHC I. Bien que les cellules musculaires ne soient pas très efficaces pour déclencher une réponse T (Shirota et al. 2007), leur mort par apoptose et/ou le relargage d'antigènes permet une présentation par le MHC II aux LT $CD4^+$, mais aussi par le MHC I des APC environnantes grâce à la présentation croisée (Rice, Ottensmeier, and

Stevenson 2008). Comme illustré en figure 8, **ce type de vaccination, induit une réponse complète, pouvant activer les LT CD4$^+$ et CD8$^+$, mais aussi les LB, et provoquent donc de manière coordonnée l'immunité spécifique contre l'antigène codé par un plasmide en activant les cellules T et B.**

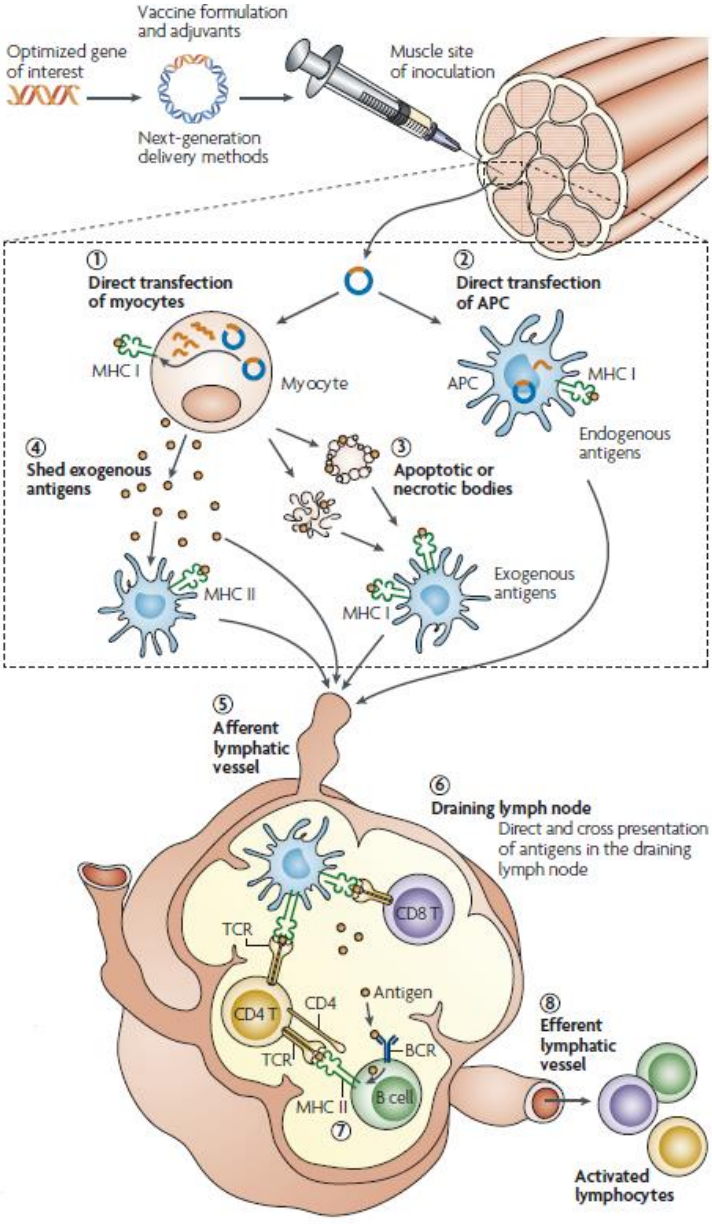


Figure 8 : Adapté de (Kutzler and Weiner, 2008). Induction de la réponse cellulaire et humorale par un vaccin à ADN. En utilisant la machinerie cellulaire de l'hôte, le plasmide pénètre dans le noyau des myocytes transfectées **(1)** et des APC **(2)**. Les composants du plasmide initient la transcription du gène et la production de la protéine d'intérêt ou de chaines peptidiques. Ces antigènes de synthèse peuvent alors faire l'objet d'une surveillance immunitaire par les MHC I et II. Cela peut faire suite soit à la transfection directe par le vaccin plasmidique **(2)** ou la présentation croisée des antigènes exogènes associés aux cellules suite la phagocytose de cellules transfectées apoptotiques par des APC **(3)**. Suite à l'endocytose d'antigènes, les APC peuvent naturellement présenter l'antigène par le MHC II **(4)**. Les APC migrent vers le ganglion **(5)**, où elles présentent les peptides antigéniques aux LT naïfs **(6)**. Les LT CD4$^+$ activées sécrètent des cytokines lors de l'interaction avec les LB et engagent des molécules de co-stimulation nécessaires pour l'activation des LB **(7)**. L'antigène peut alors être capturé par le BCR; ceux-ci présentent ensuite antigène traité à des LT CD4, facilitant ainsi l'induction d'une réponse efficace des LB. Ces cellules, maintenant spécifiques, peuvent se déplacer à travers le système lymphatique efférent **(8)** et participer à la surveillance et l'élimination de leurs cellules cibles.

Si certains tests précliniques ont donné des résultats prometteurs, ceux obtenus dans les premiers essais cliniques restent limités (Bloy et al. 2015). Plusieurs critères peuvent expliquer cela : 1) les ADN sont injectés sans les vecteurs susceptibles d'améliorer le taux de transduction et donc l'expression des antigènes tumoraux ; 2) l'injection intramusculaire n'induit qu'une faible immunogénicité alors qu'une délivrance au niveau des muqueuses est plus efficace (Sandoval et al. 2013) ; 3) Enfin, il ne serait pas surprenant qu'une combinaison thérapeutique entre ce type de vaccination et le blocage de récepteurs inhibiteurs soit bénéfique, car si la présentation d'antigènes tumoraux peut induire une réponse immune spécifique contre ces derniers, il n'en reste pas moins que celle-ci pourrait être freinée de manière non négligeable par le microenvironnement immunosuppresseur. **Les vaccins à ADN montrent donc des résultats encourageants mais nécessitent encore des améliorations du protocole, et pourraient tirer profit d'une combinaison avec d'autres immunothérapies émergentes.**

1.2. Les vaccins à base de peptides

La vaccination basée sur l'administration de peptides permet de présenter directement aux LT les épitopes correspondants aux antigènes de tumeurs à cibler. Nous pouvons distinguer les peptides courts (≈8-12 a.a.) et les peptides longs (≈25-35 a.a.), qui correspondent à des épitopes reconnus par les LT $CD8^+$ le plus souvent alors que les peptides longs incluent des épitopes pour les CD8 et les CD4, ou bien plusieurs épitopes possibles en fonction des divers MHC. Compte tenu de l'importance de la réponse des LT $CD8^+$ dans la réponse immune anti-tumorale et de leur potentiel cytotoxique envers les cellules tumorales, de nombreuses études utilisent des peptides courts pour favoriser cette réponse LT $CD8^+$. Pourtant, l'utilisation de peptides longs présente plusieurs avantages, comme le fait de ne pas être restreint à certaines molécules de MHC des patients ou de pouvoir induire une réponse plus complète en ciblant les LT $CD8^+$ et $CD4^+$. Il a en effet été montré, dans un modèle murin de tumeurs positives à l'antigène E7 d'HPV16, que la vaccination médiée par un peptide long était plus efficace que le peptide court (Zwaveling et al. 2002). Dans cette étude le peptide long permet l'induction d'une réponse LT $CD8^+$ plus forte, notamment grâce à la présentation antigénique soutenue par les LT $CD4^+$ activés et à l'interaction CD40/CD40L.

Alors qu'il était attendu que la vaccination contre des antigènes tumoraux permette l'expansion de clones T spécifiques de l'antigène ciblé, et que ceux-ci éliminent les cellules tumorales par leur cytotoxicité directe, T.Boon et P.Coulie ont nuancé cette hypothèse. Chez des patients traités par un vaccin ciblant l'antigène MAGE-3, exprimé par les cellules de mélanome, il a été mis en

évidence que les T spécifiques de MAGE-3 post-vaccination étaient bien moins fréquents que d'autres clones T anti-tumoraux présents dans la circulation sanguine, eux, déjà présents avant le traitement (Germeau et al. 2005). Cette observation est aussi valable au sein des métastases de mélanome, dans lesquelles la fréquence de T induits par la vaccination est très faible (ratio de 1 LT pour 10^6 cellules tumorales), alors que d'autres T anti-tumoraux sont beaucoup plus fréquents, même avant vaccination (Lurquin et al. 2005). Ces résultats ont conduit le groupe de Pierre Coulie à proposer que les LT ciblés par le vaccin donneraient comme une « étincelle », permettant d'activer l'environnement tumoral et provoquer la réactivation de clones T préexistants et la prolifération de nouveaux clones qui sont préférentiellement recrutés dans la tumeur. Il n'est pas exclu non plus que d'autres effecteurs que les LT agissent contre les tumeurs (comme des macrophages activés localement) mais à ma connaissance les auteurs n'ont pas exploré cet aspect. D'autres essais montrent des effets cliniques limités de cette stratégie vaccinale, malgré la mise en évidence d'une réponse anti-tumorale. En effet, le groupe de Pedro Romero a analysé l'état fonctionnel des LT circulants avec une vaccination contre Melan-A, et observent que les T spécifiques induits retrouvent leur capacité cytotoxique qu'ils avaient perdue (Appay et al. 2006). L'analyse des TIL montre une grande proportion des LT $CD8^+$ intratumoraux avec un phénotype activé ($CD38^{hi}$ $Bcl\text{-}2^{lo}$), et un faible enrichissement en T spécifiques de Melan-A est observé, alors que les LT $CD4^+$ ne montrent pas de signe d'activation. En revanche, il est important de noter que la population $CD4^+$ contient une fréquence non négligeable de Treg (21%). L'analyse fonctionnelle des TIL révèle que, contrairement à leurs homologues circulants, ces cellules ont de faibles capacités cytotoxiques (faible production de perforine et de granzyme B), et un défaut de sécrétion d'IFNγ.

A ce jour, les essais cliniques montrent des effets modestes de ce type d'immunothérapie seule, et aucun vaccin n'a pour l'instant été commercialisé à une fin thérapeutique (Pol et al. 2015). Je ne prends pas en compte volontairement les vaccins Cervarix® et Gardasil® qui utilisent ce type de vaccination pour prévenir une infection par le virus HPV16, et donc l'apparition du cancer du col de l'utérus lié à ce virus, plutôt qu'en thérapie anti-tumorale. Son utilisation contre le carcinome positif à HPV16 n'a d'ailleurs pas d'effet (Aranda et al. 2013). **La vaccination autour des peptides antigéniques a donc permis de montrer chez l'homme qu'il était bien possible d'induire des réponses lymphocytaires T anti-tumorales, même si cette activité biologique ne se traduit que dans de rares cas en efficacité clinique avec des régressions tumorales. L'étude des cas de régression a montré que leur stimulation seule n'est pas suffisante pour obtenir un effet clinique significatif.**

1.3. Les vaccins basés sur les spécificités des DC

1.3.1. Injection de DC

Comme nous venons de le voir avec les vaccins à ADN et à base de peptides, ces approches ne permettent pas de contrôler quelles APCs vont présenter les antigènes tumoraux *in vivo* et déclencher une réponse immune le plus efficacement possible. En effet, les DC des patients montrent des anomalies (immaturité par ex) liées au contexte immunosuppresseur. Il est important de rappeler que les DC ont un rôle majeur lors de toute réponse immune (y compris anti-tumorale), en tant qu'APC professionnelles (J. Banchereau and Steinman 1998), qui orchestrent la réponse immune grâce à la présentation des peptides par le MHC I ou II, et aussi grâce au fait que certaines d'entre elles aient une forte capacité à engager le processus de présentation croisée, comme les DC CD8α^+ (Dudziak et al. 2007). Au début des années 1990, RM. Steinman et son équipe publient des travaux prouvant la possibilité d'induire une réponse T spécifique contre un antigène grâce à l'injection de DC préalablement chargées avec cet antigène *in vitro* (Inaba et al. 1990), puis la possibilité de cultiver in vitro des DC à partir de moelle osseuses murines, à l'aide du facteur de croissance GM-CSF (Inaba et al. 1992). Deux ans plus tard, Sallusto et al. utilisent une combinaison de GM-CSF et d'IL-4 pour générer des DC humaines à partir de cellules sanguines (Sallusto & Lavanzecchia, 1994).

Dans la foulée, d'autres équipes s'intéressent alors à l'application de cette méthode pour déclencher une réponse immune anti-tumorale. Comme évoqué précédemment, des réponses immunes spécifiques peuvent être initiées suite à la transfection d'ADN ou directement par le peptide antigénique internalisé et présenté par les APC. Ces techniques sont utilisées pour charger les DC *in vitro* avec les antigènes à cibler, au même titre que la mise en co-culture de DC avec des cellules tumorales. En 1996, plusieurs études font état de réponses anti-tumorales spécifiques suite à une vaccination par des DC, et montrent aussi que ces réponses dépendent de LT CD8$^+$ spécifiques de l'antigène ciblé (Celluzzi et al. 1996; Zitvogel et al. 1996).

Ces données encourageantes ont suffi à mettre en œuvre des essais cliniques, comme par exemple un essai de phase I en 1996 pour des patients atteints de cancer de la prostate, lesquels recevaient des DC autologues chargées avec le peptide PSMA (*prostate-specific membrane antigen*) (Murphy et al. 1996). Depuis, d'autres études ont été lancées chez l'humain, comme par exemple pour le mélanome (Palucka et al. 2006), le carcinome rénal (HOLTL et al. 1999) ou encore le gliome (Okada et al. 2011). Une étude corrélative chez des patients atteints de mélanome montre que la réponse T (cellules IFNγ^+ par ELISPOT) est corrélée à un meilleur pronostic clinique, et que les

LT des patients sont spécifiques de plusieurs antigènes tumoraux (Jacques Banchereau et al. 2001). Chez ce même type de patients, il a été montré que la vaccination par des DC stimulées par un lysat tumoral pouvait induire des réponses T spécifiques des antigènes tumoraux, producteurs de perforine *ex vivo*, et d'IFNγ seulement après re-stimulation (Bercovici et al. 2008). Cela souligne le fait que les réponses T spécifiques ne sont pas très soutenues, et peut expliquer les réponses cliniques peu convaincantes. En effet, une revue récente fait le point sur les résultats d'essais cliniques publiés, et quantifie le pourcentage de réponse à la vaccination par des DC en combinant les réponses complètes et partielles (Anguille et al. 2014). Ce regroupement de données montre qu'une réponse au traitement est observée chez 8,5% des patients atteints de mélanome, 7,1% dans le cancer de la prostate, 15,6% dans le gliome et 11,5% dans le carcinome rénal. En 2010, un vaccin à base de DC a été approuvé par le FDA (*Food and Drug Administration*) comme traitement de cancer de la prostate métastasé (Kantoff et al. 2010), mais il n'est plus fabriqué en raison des difficultés à produire ces cellules à grande échelle.

Ces DC, qui pourtant sont les plus efficaces pour induire des réponses T en stimulant des LT naïfs, n'ont pas démontré pour le moment de supériorité par rapport aux autres stratégies, bien qu'elles induisent un répertoire de LT diversifié. Enfin, la littérature indique que l'induction de cellules T spécifiques grâce à cette approche vaccinale ne se traduit pas systématiquement par une réponse clinique, probablement à cause de la complexité du microenvironnement tumoral fortement immunosuppresseur. Comme pour d'autres vaccins, il a été montré que l'injection de DC chargées avec MAGE-3 induisait des LT spécifiques dans la circulation, bien que minoritaires par rapport à d'autres T anti-tumoraux déjà présents. Parfois, ces cellules T spécifiques de la vaccination sont faiblement enrichis au niveau des métastases, mais toujours minoritaires face à d'autres clones qui se sont eux aussi multipliés (Carrasco et al. 2008). **La vaccination par les DC est donc faisable chez l'homme, mais induit des réponses T spécifiques qui ne semblent pas beaucoup plus robustes que les autres approches vaccinales à ce jour, ce qui peut expliquer son efficacité limitée en termes de réponse clinique.**

De nombreux facteurs influencent l'efficacité de ce type de traitement, avec en première ligne l'état de maturation des DC. En effet, les DC immatures (iDC) peuvent présenter des antigènes aux LT CD4, mais induisent la tolérance et la différenciation des Treg. La maturation *in vitro* oriente les DC vers un phénotype, c'est pourquoi il est important de les stimuler de manière appropriée, par exemple avec un cocktail TNFα/IL-1β/IL-6/PGE2 (Jonuleit et al. 1997), ou encore TNFα/IFNα/IFNγ/IL-1β/polyI:C, très efficace pour favoriser la maturation des DC productrices d'IL-12p70, nécessaire à l'induction d'une réponse de type Th1 (Mailliard et al.

2004). En réponse à une stimulation par le CD40L (à la surface des cellules T, au moment d'une interaction T-DC antigène-spécifique), ces DC produisent aussi CXCL9/10 et CCL3/4 favorisant le recrutement d'autres LT, et très peu d'IL-10. Ce profil de production cytokinique suggère que ces DC seraient d'un grande aide *in vivo*. Plus récemment, la combinaison IFNγ/LPS est apparu comme la plus appropriée pour induire des DC matures, avec un meilleur ratio de sécrétion IL-12p70/IL-10, un meilleur profil d'activation avec la surexpression de CD80, CD83, CD86 et MHC II, associée à la perte de CD14 (Vopenkova et al. 2012). Un dernier paramètre concerne la voie d'administration des DC. Elles peuvent être injectées en intraveineux (IV), sous-cutané (SC), intradermique (ID), intra-nodal (IN), directement dans la circulation lymphatique ou en intratumoral (IT). Les injections i.v. et s.c. sont les plus répandues, mais l'optimisation de la voie d'injection est encore débattue (Dudda, Simon, and Martin 2004; Fong et al. 2001; Lesterhuis et al. 2011). **L'efficacité de la vaccination par des DC dépend donc en majeure partie de leur préparation *in vitro*, et de l'étape cruciale de leur maturation.**

1.3.2. Ciblage des DC *in vivo*

En prenant en compte l'importance d'induire une réponse T spécifique contre un ou plusieurs antigènes ciblés et le fait que les DC soient les cellules les plus efficaces pour la présentation antigénique à des LT naïfs, des vaccins à base de peptides ont été optimisés afin de cibler *in vivo* une présentation par les DC par le biais d'un vecteur. Parmi ces derniers, nous pouvons distinguer le vecteur utilisé lors de cette thèse, la sous-unité B non toxique de la Shiga toxine. Cette dernière est produite par la bactérie *Shigella dysenteriae* et certaines souches d'*Escherichia coli*. Couplée à un antigène tumoral, elle est capable d'induire une réponse T $CD8^+$ spécifique en ciblant la présentation du peptide par le MHC I des DC (R. S. Lee et al. 1998). Ce vecteur privilégie les DC, car il se lie préférentiellement aux globotriaosylcéramides, aussi appelés récepteurs Gb3 (CD77), fortement exprimés par ces cellules au niveau de leur membrane plasmique (Haicheur et al. 2000). Suite à la liaison de la sous-unité B de la Shiga toxine aux Gb3, celle-ci est endocytée puis transportée vers le réticulum endoplasmique (Johannes & Römer 2010). Des modèles murins ont montré que ce vecteur pouvait induire une réponse anti-tumorale CD8 spécifique d'un antigène tumoral ciblé (Sandoval et al. 2013; Vingert et al. 2006).

Une autre technique utilisée dans une étude préclinique a consisté à cibler les DC par des nanoparticules lipidiques qui véhiculent des ARN (Kranz et al. 2016). Ces nanoparticules (LPX) sont endocytées par les macrophages et DC dans les organes lymphoïdes, et ces dernières montrent une bien meilleure présentation de l'antigène codé par l'ARN. Cette présentation

antigénique déclenche une réponse immune spécifique contre des cellules tumorales, très proche d'une réponse antivirale, ce qui mène à des régressions tumorales dans des modèles murins. L'utilisation très récente de ce traitement en essai clinique sur 3 patients atteints de mélanome montre pour l'instant l'induction d'une réponse immune spécifique des antigènes tumoraux ciblés.

Un autre type de traitement, la virothérapie, utilise la maturation des DC et leur pouvoir de présentation pour induire une réponse immune anti-tumorale. Bien qu'à la base ces traitements visaient principalement à la destruction des cellules tumorales infectées par des virus, il s'est avéré que la mort cellulaire immunogène induite était accompagnée d'une réponse spécifique des cellules tumorales. Le ciblage des cellules tumorales par ces virus dits oncolytiques est possible grâce au tropisme particulier de ces virus pour les cellules tumorales. Je prendrai pour exemple le virus atténué de la rougeole. Son tropisme s'explique d'abord par l'expression sur les cellules tumorales du récepteur CD46 (Schneider, von Messling, Devaux, & Cattaneo, 2002), utilisé par ces cellules pour réguler le système du complément et échapper à une mort médiée par celui-ci, mais aussi utilisé par les virus pour infecter ces cellules (S. J. Russell, Peng, & Bell, 2012). De plus, les mécanismes développés par les cellules tumorales pour échapper au système immunitaire et à la mort cellulaire participent au contrôle de la réplication virale. L'intérêt de cette thérapie est qu'au-delà de l'élimination de certaines cellules tumorales, la mort immunogène des cellules tumorales active les cellules immunes environnantes grâce aux signaux de danger (DAMP, *Damage Associated Molecular Pattern*). En parallèle, les cellules peuvent reconnaitre des PAMP viraux via leurs PRR (H. Kumar, Kawai, & Akira, 2011). Plus précisément, des travaux du groupe de Marc Gregoire montrent que la mort des cellules tumorales permet une activation et maturation des pDC suite à la phagocytose des cellules infectées, rendant possible la présentation croisée d'antigènes tumoraux (Guillerme et al. 2013). De nombreux groupes ont montré *in vitro* que différents types de cellules cancéreuses étaient sensibles à cette approche (Gauvrit 2008, K.-W. Peng et al., 2002, K.-W. Peng et al., 2001, Donnely 2013), et cela a aussi été montré *in vivo* sur des modèles de xénogreffes (K.-W. Peng et al., 2001, K.-W. Peng et al., 2002, McDonald et al. 2006). Toujours à propos du virus atténué de la rougeole, des essais cliniques de phase 1 et 2 sont en cours, et dont certains sont déjà très encourageant, comme le traitement de deux patients atteints de myélomes multiples, qui ont très bien répondu au traitement par virothérapie (S. J. Russell et al. 2014). Depuis 2005, un traitement par virothérapie a obtenu une licence en Chine, pour une utilisation combinée avec de la chimiothérapie (Pol et al. 2016). En octobre 2015, seulement, l'Oncovex$^{GM\text{-}CSF}$ (un variant de HSV-1 qui exprime le GM-CSF) a été approuvé aux Etats-Unis

pour traiter des patients atteints de mélanome. Ce type d'approche devrait bientôt faire son apparition en Europe, seule ou combinée à d'autres immunothérapies.

La vaccination peut donc aussi se faire en ciblant les DC *in vivo* grâce à des vecteurs ou par des virus oncolytiques, ce qui est prometteur et permet d'éviter la culture de cellules, longue et onéreuse.

1.4. Le rôle des adjuvants

L'efficacité des vaccins dépend non seulement de son immunogénicité et de sa voie d'administration, mais aussi de la nature de l'adjuvant utilisé. Ce dernier permet de compenser la faible immunogénicité du composé injecté lors de la vaccination, et d'orienter la réponse immune. Leurs différentes compositions et modes d'action induisent des réponses immunes variées.

Nous pouvons séparer les adjuvants en deux catégories, d'un côté ceux qui améliorent la captation de l'antigène par les APC, et de l'autre, ceux qui stimulent la réponse immune. Dans le premier groupe, l'alum et l'IFA (*Incomplete Freund's Adjuvant*) favorisent des réponses de type Th2 (et donc plutôt la production d'anticorps). La seconde catégorie regroupe les ligands de PRR, dont la plupart agissent sur des TLR, et induisent de fortes réponses de type Th1. Nous y trouvons le poly(I:C), MPLA (*monophosphoryl lipid A*), l'Imiquimod ou ODN 1826 (CpG), qui agissent respectivement sur les TLR3, 4, 7 et 9. Ces différents adjuvants peuvent activer préférentiellement certains types cellulaires et stimuler une réponse innée ou adaptative. Ils peuvent en effet provoquer la production de cytokines différentes, induire une réponse de type Th1 et favoriser la présentation croisée aux LT $CD8^+$ (Figure 9). La combinaison de certains adjuvants peut ainsi entrainer une synergie d'action, comme illustré en figure 9B. **Cela montre que le choix des adjuvants est important et doit correspondre à la réponse immune souhaitée.**

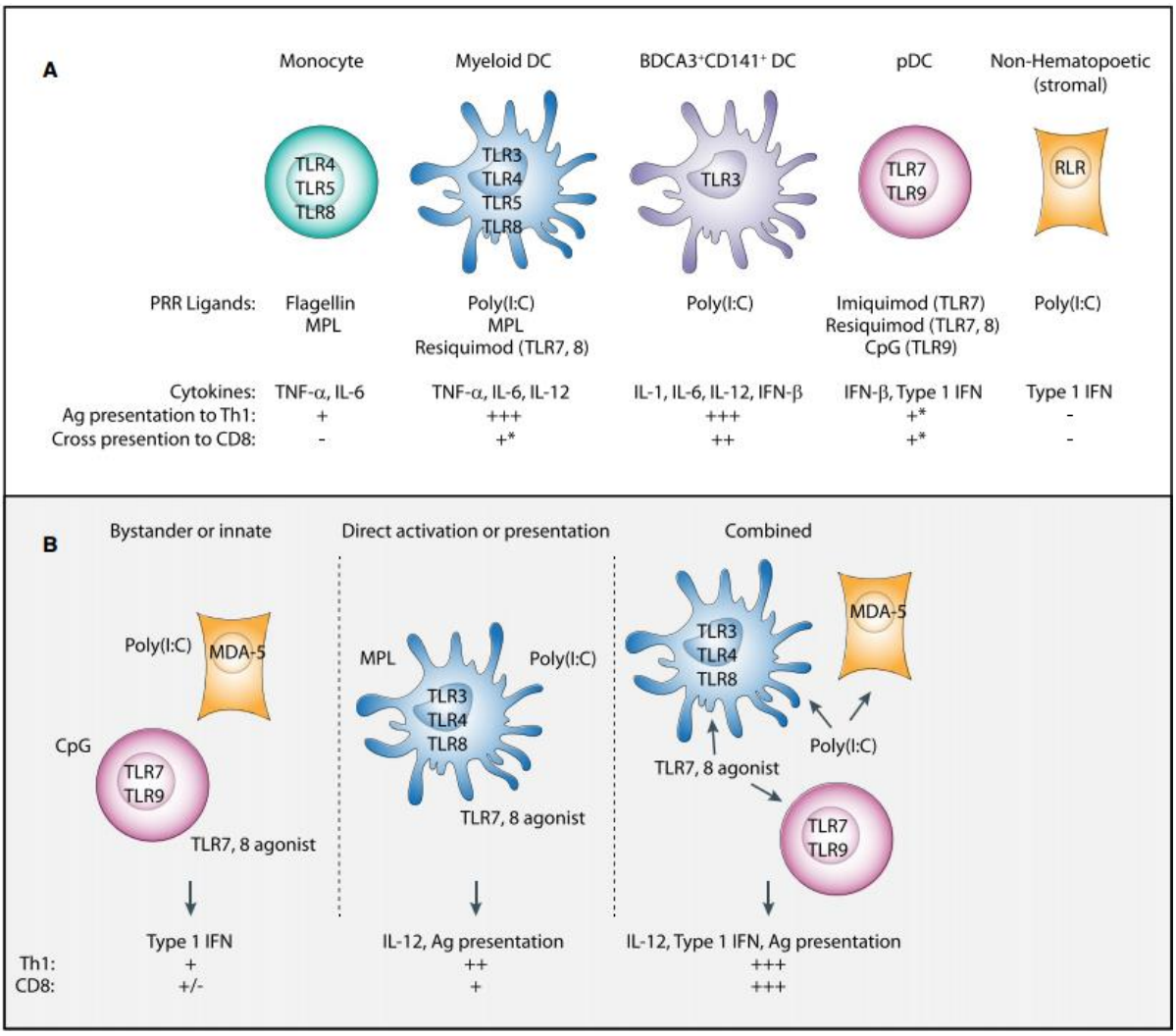


Figure 9 : Adapté de (Coffman, Sher, and Seder 2010) Les ligands de PRR induisent une réponse adaptative par leurs effets sur les APC. A) les ligands de PRR agissent sur les APC et induisent des réponses Th1 et la présentation croisée. MPL active les monocytes et cellules myéloïdes alors que les ligands des TLR 7, 8 et 9 activent les pDC. **B)** La combinaison d'une présentation de l'antigène et d'un effet *bystander* induisant la production d'IFNα optimise le déclenchement d'une réponse Th1 et LT CD8+.

2. Transfert adoptif de TIL et de *CAR T cells*

2.1. Transfert adoptif de LT naturels

La meilleure manière de s'assurer que les TIL des patients sont stimulés de façon à garantir leurs capacités cytotoxiques, est de le faire *in vitro*. Il s'agit là du principe de base du transfert adoptif de LT utilisé en tant qu'immunothérapie anti-tumorale (ACT pour *adoptive cell transfer*). Dans les années 1960, la découverte du rôle des LT dans le rejet d'allogreffe mène à des expériences, notamment chez le rat, visant à montrer le potentiel anti-tumoral d'un transfert adoptif des LT provenant d'un autre rat, lequel avait reçu un implant provenant d'un fibrosarcome spontané qui était la tumeur à cibler (Delorme and Alexander 1964). Quelques années plus tard, S.A.

Rosenberg traite des souris porteuses de métastases pulmonaires et hépatiques par un ACT combiné à de l'IL-2, pour une meilleure expansion des TIL après stimulation *in vitro*, et du cyclophosphamide (Rosenberg, Spiess, and Lafreniere 1986). Les résultats sont très positifs et montrent une survie des souris nettement améliorée par cette stratégie thérapeutique. Des travaux plus récents ont permis d'obtenir des LT spécifiques d'antigènes tumoraux, amplifiés *in vitro*, à partir des PBMC de patients atteints de mélanome (Labarrière et al. 2008). Il faut en revanche préciser que dans ce cas, il est plus simple d'obtenir des TIL spécifique de Melan-A que des TIL dirigés contre d'autres antigènes tumoraux, car les LT spécifiques de Melan-A/MART-1 sont présents dans notre répertoire à une fréquence très élevée, comparé à tous les autres antigènes associés aux tumeurs (Benlalam et al. 2001). Cela dit, la même équipe a par la suite publié une étude montrant la possibilité d'adapter ce protocole en clinique, avec amplification *in vitro* de TIL spécifiques de Melan-A, mais aussi de MELOE-1, à partir d'échantillons sanguins de patients atteints de mélanome métastasé (Labarrière et al. 2013). Cette approche reste donc intéressante et faisable, mais probablement pas applicable à tous les types de cancers, en raison des trop faibles fréquences de LT spécifiques d'antigènes tumoraux circulants, comme par exemple contre les antigènes MAGE.

L'application de cette thérapie à l'humain a été effectuée chez des patients atteints de mélanomes métastatiques (Dudley et al. 2002). Dans cette étude, une déplétion lymphoïde par cyclophosphamide et fludarabine précède l'ACT qui est combiné à de l'IL-2. Ce transfert de TILs permet une infiltration élevée des LT $CD8^+$ spécifiques dans la tumeur, qui continuent à proliférer *in vivo*. Le même groupe a cherché à améliorer son protocole en augmentant l'intensité de la déplétion lymphoïde en combinant la déplétion chimique à une irradiation totale, de 2 ou 12 Gy, cette dernière étant myélo-supressive. Les résultats étaient déjà très encourageants sans l'irradiation, avec 49% de réponses partielles ou complètes, mais les irradiations de 2 et 12 Gy mènent respectivement à 52 et 72% de réponses (Dudley et al. 2008). Ces résultats s'expliquent en partie par l'élimination des Treg, mais aussi par le fait que les TIL transférés sont moins en compétition pour les cytokines sériques, comme l'IL-7 et l'IL-15. Ces dernières sont présentent en plus grande quantité après l'irradiation, permettant une meilleure prolifération et survie, améliorant ainsi la persistance des TIL transférés. Malgré les nombreuses études cliniques réalisées par le groupe de S. Rosenberg, ce type de traitement n'a cependant toujours pas été testé en essai clinique de phase III. **L'ACT a donc prouvé son efficacité, même si, comme tous les traitements efficaces, il ne provoque pas de réponses cliniques chez tous les patients.**

Pendant que ce protocole d'immunothérapie était développé chez l'homme, N. Restifo a obtenu un résultat remarquable chez la souris. Il a montré que le bénéfice de l'irradiation n'était pas seulement lié à la déplétion cellulaire, mais aussi à des lésions au niveau intestinal ayant pour conséquence la libération de LPS. Ce dernier, *via* son action sur TLR4, active les APC et induit une réponse innée (Paulos et al. 2007). D'autres équipes de recherche se sont attachées à comprendre le mécanisme d'action des cellules transférées. Plusieurs investigations ont été menées dans des modèles murins par l'équipe de RW Dutton. L'étude de transfert adoptif de T spécifiques d'OVA pour induire le rejet du thymome EG7 (EL4-OVA) montre que l'effet bénéfique de cet ACT ne peut pas être dû à une cytotoxicité direct dépendante de la perforine, de la voie Fas/Fas-L ou du TNFα car leurs déficiences dans des cellules T transférées ne perturbent pas l'effet anti-tumoral (Helmich and Dutton 2001; Hollenbaugh et al. 2004). A l'inverse, une déficience pour l'IFNγ des LT transférés réduit considérablement l'efficacité du traitement. La forte proportion d'effecteurs tels que les cellules NK, macrophages et neutrophiles dans les ganglions drainants après l'ACT suggère que les LT pourraient plutôt jouer un rôle dans leur recrutement. Peu de temps après, ce groupe a confirmé le rôle indirect des LT. Grâce à l'IFNγ qu'ils sécrètent, les LT permettent la sécrétion de facteurs solubles impliqués dans le recrutement de cellules myéloïdes, comme MIP-1α et β (CCL3, CCL4), CCL2 et CXCL10 (Hollenbaugh and Dutton 2006). Ces cellules effectrices, non identifiées, sont cytotoxiques envers les cellules tumorales par leur production de NO. Une autre équipe a aussi observé une activité tumoricide des macrophages activés par l'IFNγ suite à un ACT (Vicetti Miguel et al. 2010). Bien qu'une coopération paraisse être nécessaire, des études utilisant l'imagerie intra-vitale ont révélé que des interactions *in vivo* au niveau stromal ne sont pas toujours fructueuses. Cela n'est pas totalement surprenant, étant donné que ces études ne montrent pas de régressions tumorales et donc, que les réponses immunes ne sont pas totalement efficaces (Boissonnas et al. 2013; Engelhardt et al. 2012). D'autres travaux montrent bien évidemment que les LT spécifiques peuvent être au contact des cellules tumorales, et peuvent directement provoquer leur mort (Boissonnas et al. 2007). Néanmoins, une analyse de ces cellules après ACT a révélé que l'élimination d'une cellule tumorale par un LT était très lente et pouvait prendre environ 6h (Breart et al. 2008). **Ces études montrent qu'une coopération entre différents types cellulaires est très vraisemblablement nécessaire à l'induction de l'effet anti-tumoral de l'ACT. Par contre, ce type de traitement pourrait encore être optimisé en augmentant l'efficacité ou l'affinité des LT à transférer.**

2.2. TCR transgéniques et *CAR T cell*

L'amélioration de l'ACT a été nécessaire pour plusieurs raisons, comme par exemple les difficultés/l'impossibilité d'isoler les TIL, la complexité des manipulations *ex vivo* qui demandent beaucoup de temps, mais aussi le besoin de résultats cliniques encore meilleurs. Cette amélioration passe par une plus grande fréquence de LT spécifiques à transférer, et par des LT plus affins. Une équipe a généré *in vitro* des LT qui expriment un TCR transgénique dirigé contre un antigène d'intérêt (Kessels et al. 2001). Dans un modèle murin, le transfert de telles cellules dirigées contre un antigène exprimé par des cellules tumorales $EL4^{NT}$ permet d'induire une régression tumorale. En revanche, l'application à des patients atteints de mélanomes métastasés, traités avec des LT dont le TCR est spécifique de MART-1, montre un faible effet clinique malgré la persistance de ces cellules dans le sang, plusieurs mois après le traitement (Morgan et al. 2006). Même si cette technique est prometteuse, elle semble déjà délaissée au profit de celle des cellules T exprimant un récepteur à l'antigène chimérique, ou *CAR T cells*, pour laquelle il y a à ce jour 10 fois plus d'essais cliniques en cours (426).

Le principe de cette thérapie émergente est de faire exprimer aux LT des récepteurs à l'antigène composés des régions variables des chaines lourdes et légères d'un anticorps, liés au domaine de signalisation intracellulaire de la chaine CD3ζ et d'un ou deux domaines de costimulation (CD28, 4-1BB, ICOS, OX-40, CD27) pour les *CAR T cells* de 2^{e} et 3^{e} générations (Gilham et al. 2012). La forte affinité de ces récepteurs artificiels est indépendante d'une présentation par le MHC, ce qui offre un avantage considérable à cette technique. Effectivement, comme évoqué plus haut, il est fréquent que les cellules tumorales régulent l'expression à leur surface de certaines molécules comme le MHC. **Les *CAR T cells* permettent de cibler des antigènes non présentés par le MHC, mais qui doivent être exprimés en surface. Pour éviter une réaction de type GVH (*graft versus host*), ce traitement doit être effectué de manière autologue, si les cellules T transfectées avec un CAR expriment toujours leur TCR endogène.**

Nous devons cette technologie aux travaux de Z.Eshhar (Gross, Waks, and Eshhar 1989), à partir desquels de nombreux scientifiques ont cherché à optimiser l'ACT de *CAR T cells*. Des études précliniques sur un lymphome B ont donné des résultats encourageants d'ACT de *CAR T cells* spécifiques de CD19, exprimé par les LB, avec une survie nettement améliorée des souris (Brentjens et al. 2003; Kowolik et al. 2006). L'application en essai clinique sur les lymphomes B ou leucémies montre des résultats impressionnants pouvant atteindre 70 à 80% de réponses complètes sur des patients en rechute (Davila et al. 2014; D. W. Lee et al. 2015), et a aussi montré

des résultats très prometteurs sur des enfants atteints de leucémie aigue lymphoïde (SA Grupp 2014). Ce protocole a également été essayé sur d'autres types de cancers, solides, pouvant être ciblés notamment par les antigènes tumoraux publics tels que Melan-A, NY-ESO-1 ou HER2 (Aranda et al. 2015; Maher 2014). Mais les résultats cliniques, décevants, montrent de faibles taux de réponse comme ce fut le cas pour 17 patients atteints de sarcome, traités par des *CAR T cells* spécifique de HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), parmi lesquels seulement 4 patients ont bénéficié d'une stabilisation de la maladie (Ahmed et al. 2015). Ce faible taux de réponse est pourtant un des plus hauts obtenus actuellement avec ce type de thérapie dans les tumeurs solides. Un autre problème rencontré avec l'ACT des CARs dans des tumeurs solides est celui de la toxicité de ces cellules contre d'autres organes du patient

Le manque d'efficacité de ces transferts adoptifs dans le cas des tumeurs solides peut être expliqué par de nombreux facteurs, comme la barrière que forme la matrice, le microenvironnement tumoral et les facteurs immunosuppresseurs (solubles ou cellulaires), ou encore les mécanismes d'immunosuppression intrinsèques aux LT comme l'action des récepteurs inhibiteurs. Dans le cas des tumeurs solides, le recrutement des LT sur le site tumoral est un facteur majeur et indispensable à prendre en compte, et qui est encore loin d'être optimisé. Les études de Dudley et al. ont toutefois montré que la suppression des lymphocytes des patients permettait de rendre l'ACT de TIL plus efficace, c'est pourquoi d'autres études sont en cours pour vérifier l'utilité d'un prétraitement identique avant le transfert de *CAR T cells*.

Des études faites chez la souris visent à améliorer l'ACT de *CAR T cells*, notamment en augmentant le recrutement des LT et leur efficacité. A ce titre, des travaux de l'équipe de Steven Albelda ont montré dans un modèle de cellules tumorales humaines produisant CCL2 que, grâce à des *CAR T cells* optimisés par l'expression CCR2b, l'ACT était suivi d'une forte infiltration provoquant la régression tumorale (Moon et al. 2011). Dans une autre étude, avec des *CAR T cells*, dont la régulation de l'activation par la PKA était bloquée, les fonctions effectrices des cellules T ainsi que leur acheminement vers la tumeur étaient améliorés (Newick et al. 2016). **Ces *CAR T cells* peuvent donc être façonnés de manière à faciliter leurs activités intratumorales**

A l'image des études menées sur le mécanisme d'action des TIL naturels après ACT, quelques équipes ont étudié celui des *CAR T cells*. Récemment, Textor et al. montrent que l'action anti-tumorale de ces cellules est dépendante de l'expression du récepteur à l'IFNγ par les cellules stromales, suggérant la nécessité d'activation d'autres acteurs (Textor et al. 2014). Si les cellules NK sont recrutées suite à l'ACT, leur déplétion n'altère pas la régression tumorale. De manière

intéressante, bien qu'ils ne soient pas recrutés à la suite de l'ACT, les macrophages présents initialement sont activés. Cela suggère de nouveau que les LT transférés ne sont pas les seuls effecteurs anti-tumoraux. Dans un autre modèle, l'équipe de J.Maher a montré que ces macrophages pouvaient être responsable de la toxicité de l'ACT lorsque l'administration se faisait en intra-péritonéale (van der Stegen et al. 2013). **Ces résultats sont finalement assez proches de ceux obtenus après ACT de TIL, montrant l'importance de l'IFNγ produit par les cellules transférées, responsable du recrutement d'autres effecteurs.**

3. Blocage des récepteurs inhibiteurs et combinaisons

3.1. Blocages de CTLA-4 et PD-1

Comme je l'ai évoqué plus tôt, des molécules de costimulation et d'inhibition régulent l'activation des cellules T lors du contact avec les APC. J'ai déjà introduit dans la partie II les effets connus des liaisons de PD-1, CTLA-4 et LAG-3 à leurs ligands dans le contexte tumoral, je vais donner quelques exemples qui illustrent bien les essais cliniques ciblant ces récepteurs inhibiteurs, actuellement très utilisés.

CTLA-4 peut être bloqué par l'Ipilimumab ou le Tremelimumab, des anticorps monoclonaux approuvés par la FDA, le premier dans des mélanomes métastasés et le second dans les mésothéliomes. Chez des patients atteints de mélanome, une vaccination contre le peptide gp100 montre une survie moyenne de 6,4 mois, alors que l'Ipilimimab la prolonge à 10 mois (et 10,1 pour Ipilimumab + vaccin gp100) (Hodi et al. 2010). Utilisé en complément d'une chimiothérapie (dacarbazine) ce traitement anti-CTLA-4 prolonge aussi la survie des patients tout au long de l'essai (47,3% contre 36,3% à 1 an, 20,8% contre 12,2% à 3 ans) (Robert et al. 2011). Un article récent a recensé de nombreux essais en phase III afin de conclure quant au taux de survie des patients atteints de mélanome traités avec l'Ipilimumab. Ce taux reste à 22% au bout de 12 ans (Schadendorf et al. 2015). Ce type de traitement montre un taux de réponses cliniques limité, mais il faut souligner le fait que dans le cas de réponse au traitement, celle-ci est durable, et la combinaison avec d'autres thérapies telle que la chimiothérapie est bénéfique.

L'analyse des effets d'un anti-CTLA-4 a donné un résultat inattendu: ce traitement a pour effet, en plus de bloquer l'activité de CTLA-4 sur les LT effecteurs, d'éliminer les Treg, et donc d'inhiber l'immunosuppression dépendante de ces cellules (Peggs et al. 2009). Cette déplétion des Treg a aussi été observée dans des essais cliniques (O'Mahony et al. 2007; Romano et al. 2015). Il faut néanmoins nuancer cette formulation, car il a aussi été observé dans d'autres travaux une

expansion des T reg à la suite d'un anti-CTLA-4, ce qui a mené à des études plus précises sur le mécanisme d'action de l'anti-CTLA-4 (Kavanagh et al. 2008; Selby et al. 2013; Simpson et al. 2013). Il en ressort que les effets des anti-CTLA-4 sont différents selon les Ig utilisées, car dans des modèles murins, les IgG2a sont plus efficaces que les IgG2b, alors que les IgG1 n'ont pas d'effet. Tous les traitements montrent une expansion des Treg au niveau des ganglions, mais l'efficacité du traitement est surtout corrélée à une très nette diminution de la fréquence de Treg dans la tumeur.

Cependant, si cette augmentation du ratio T effecteur/Treg dans la tumeur contribue à l'efficacité de l'anti-CTLA-4, ce n'est pas sans conséquence pour le patient. En effet, l'anti CTLA-4 peut provoquer des réactions auto-immunes très pénibles pour les patients (Attia et al. 2005; Beck et al. 2006). Une optimisation pourrait être nécessaire, comme par exemple une délivrance locale d'une plus faible dose, qui peut agir aussi efficacement au niveau du site tumoral, mais réduit la toxicité du traitement et le risque de réaction auto-immune dû à une plus faible quantité d'anticorps dans la circulation sanguine (Fransen et al. 2013). **Malgré les bénéfices observés de l'anti-CTLA-4, ceux-ci sont modestes et ne sont pas seulement dus à une activation de la réponse immune, mais aussi au blocage d'une immunosuppression par les Treg. De ce fait, à forte dose, ce traitement présente des risques de réactions auto-immunes.**

L'anti-PD-1, quant à lui, peut être administré en tant que Nivolumab, Pidilizumab ou Pembrolizumab. Le nivolumab est utilisé contre plusieurs cancers, le mélanome, le carcinome rénal et le cancer du poumon. Un essai clinique de phase III a été réalisé sur des patients atteints de mélanome, dans lequel l'effet du nivolumab a été comparé à celui de la dacarbazine (Robert et al. 2015). Incontestablement, le traitement anti-PD-1 augmente la survie générale des patients à 1 an (72,9%) comparé à la chimiothérapie (42,1%). Le taux de réponse objective passe lui de 13,9 à 40%. Le pidilizumab et le pembrolizumab en sont encore aux essais de phase II, mais révèlent déjà des résultats intéressants, avec par exemple 51% de taux de réponse au pidilizumab dans un lymphome B (après transfert de cellules souches) (Armand et al. 2013). Ces traitements ciblant PD-1 ont été testés dans de nombreux autres essais cliniques sur d'autres types de cancers comme celui des poumons, des ovaires ou de la tête et du cou, et les réponses furent aussi encourageantes malgré l'efficacité seulement partielle de ces traitements (Hamanishi et al. 2016). En plus de cibler PD-1, d'autres anticorps monoclonaux bloquent cette signalisation inhibitrice en ciblant cette fois ses ligands PD-L1 ou PD-L2. Les effets d'anticorps monoclonaux sont actuellement étudiés, et révèlent des taux de réponses comparables à ceux obtenus avec les anti-PD-1 (Sunshine and Taube 2015).

Comme ces données cliniques le révèlent, une partie des patients ne répond pas favorablement aux traitements anti-PD-1 ou anti-PD-L1. Il est donc important de comprendre quelles en sont les raisons, pourquoi y a-t-il un bénéfice chez certains patients et d'autres non? Une étude de l'équipe d'Antoni Ribas a très justement remarquée que la réponse à ce type de traitement était corrélée à la présence d'un infiltrat T $DC8^+$ préexistant, dont l'activation est régulée par cette signalisation PD-1/PD-L1 (Tumeh et al. 2014). Cela explique probablement le fait que le taux de réponse à un anti-PD1 soit corrélé à l'expression de PD-L1 dans la tumeur (Taube et al. 2014), elle-même corrélée à certains marqueurs d'activation et de réponse T, notamment l'IFNγ qui, lui, est connu pour induire l'expression de PD-L1 (Taube et al. 2015). Il en est de même pour un traitement par anti-PD-L1 (MPDL3280A) pour lequel la réponse clinique engendrée est directement liée à l'expression de PD-L1 dans la tumeur (Herbst et al. 2014; Powles et al. 2014). **L'anti PD-1 est donc efficace en cas de réponse immune, antérieure ou présente, inhibée par la signalisation PD-1/PD-L1 causée, entre autres, par une production massive d'IFNγ qui provoque la surexpression de PD-L1 sur les cellules tumorales.**

Un autre exemple d'immunothérapie, cette fois plus récente, est le blocage de Tim-3. Comme abordé plus tôt dans ce document, Tim-3 participe à l'échec de la réponse anti-tumorale, c'est pourquoi il est donc une cible légitime. Les études menées dans des modèles murins montrent cependant que les effets d'anticorps anti-Tim-3 sont limités, mais qu'une synergie est observée avec un traitement anti-PD-1 (Zhou et al. 2011 ; Koyama et al. 2016). De récents essais cliniques de phase 1 ont été lancés sur des patients atteints de cancers à des stades avancés, mais il me parait évident qu'en absence de contre-indication, le traitement anti-Tim-3 devrait être combiné à un anti-PD-1 par la suite. Ce type de combinaison de traitements peut améliorer l'efficacité des thérapies bloquant les récepteurs inhibiteurs, mais d'autres associations comme celles d'anticorps bloquant les récepteurs inhibiteurs avec une vaccination paraissent judicieuse, comme nous allons le voir dans le prochain paragraphe.

3.2. Les combinaisons

En prenant en compte nos connaissances sur le microenvironnement tumoral, il ne fait alors aucun doute que ces anticorps, délivrés seuls, n'agissent pas de manière optimale. Malgré leurs différences, ces récepteurs inhibiteurs ont un point commun car ils participent à la modération de la réponse T. Mais pour qu'un tel traitement soit bénéfique encore faut-il que les LT puissent répondre aux antigènes tumoraux et infiltrer la tumeur. Comme nous l'avons vu plus tôt dans cette partie, les vaccins font partie des pistes prometteuses de l'immunothérapie. Ils bénéficient

des avancées de l'immunologie et permettent de cibler des antigènes tumoraux détectés au sein des tumeurs. Cependant leur efficacité, aussi, est relative, car si les réponses immunes peuvent être spécifiquement dirigées contre les antigènes souhaités, les mécanismes de régulation de la réponse T sont aussi déclenchés. C'est pourquoi, d'un côté, le blocage des récepteurs inhibiteurs nécessite une activation du système immunitaire pour être efficace, et de l'autre, les réponses immunes spécifiques déclenchées par les vaccins pourraient être plus robustes et/ou prolongées par le blocage des récepteurs inhibiteurs tels que PD-1 ou CTLA-4.

De telles combinaisons de traitements ont été étudiées chez la souris, apportant beaucoup d'espoir par des résultats satisfaisants. Déjà très tôt, sur le modèle de tumeurs B16, A.van Elsas avait comparé les effets d'un anti-CTLA-4, d'un vaccin composé de cellules tumorales irradiées, et de leur association (van Elsas, Hurwitz, and Allison 1999). Seule la combinaison des traitements menait au rejet des tumeurs grâce à un effet synergique. Depuis, d'autres études précliniques ont confirmé l'intérêt d'une telle combinaison, et ont montré que l'efficacité du traitement est corrélée à une augmentation du ratio T effecteur/Treg dans les tumeurs (Avogadri et al. 2014). Mais qu'en est-il des essais cliniques avec ce type de combinaison ? A l'image de l'étude menée par Stephen Hodi, l'effet synergique attendu de cette combinaison n'est pas visible (Hodi et al. 2010). Bien que l'efficacité de cette association ait été corrélée à l'augmentation du ratio T effecteur/Treg au sein de la tumeur, il est rare d'obtenir ces informations sur les tumeurs humaines. Néanmoins, l'allongement de la survie par un traitement anti-CTLA-4 après vaccination est lié à une activation des LT en périphérie, mais aussi à une l'apparition de réactions auto-immunes (Sarnaik et al. 2011). Les données de la littérature ne permettent malheureusement pas d'expliquer la différence d'efficacité de certaines combinaisons d'anti-CTLA-4 avec des vaccins entre les modèles précliniques et les essais en cours. **Plusieurs paramètres peuvent influencer les réponses à ce traitement, à commencer par le type d'Ig utilisées, mais aussi l'aspect cinétique du traitement car il a été montré dans un modèle murin que la délivrance de l'anti-CTLA-4 était plus efficace après la vaccination** (Wada et al. 2013)**. En nous appuyant sur les données précliniques, l'optimisation de cette association de traitements devrait permettre de mieux stimuler le système immunitaire.**

En ce qui concerne l'association d'un anti-PD-1 avec une vaccination, cela provoque aussi une synergie d'action dans les modèle murins, avec une augmentation de l'infiltrat T $CD8^+$ spécifiques au sein de la tumeur (Sawada et al. 2015; Soares et al. 2015). Les mécanismes par lesquels l'anti-PD-1 peut améliorer cette activité anti-tumorale peuvent être multiples. Il peut principalement bloquer l'interaction de PD-1 avec ses ligands, mais aussi inhiber l'immunosuppression des LT

par les Treg (W. Wang et al. 2009). L'inhibition de l'activité des Treg peut être due au blocage des interactions PD-1/PD-L1, ou à changement phénotypique comme le suggère la diminution de l'expression de FoxP3 dans cette étude. Cela a été montré par des expériences faites in vitro sur des PBT (*peripheral blood T cell*) de patients atteints de mélanomes, vaccinés contre gp100 et MART-1.

L'ajout de l'anti PD-1 permet aussi de restaurer la production de TNFα, IFNγ et IL-2 par les cellules T spécifiques. De telles études chez l'humain sont encore rares. Une équipe a tout de même étudié la corrélation entre des marqueurs sanguins et la réponse à une vaccination combinée à un anti-PD-1 sur les patients atteints de mélanome (Weber et al. 2013). De manière inattendue, la progression des tumeurs non répondeuses est corrélée à un taux élevé de LT $CD8^+$ spécifiques des antigènes tumoraux MART-1 et NY-ESO-1. Les auteurs émettent l'hypothèse que ces LT sont dysfonctionnels et qu'ils ne répondent pas au traitement anti-PD-1 probablement dû à l'expression d'autres récepteurs inhibiteurs. Cependant, ce taux de réponses cliniques, avec une moyenne de 25%, n'est pas différent entre les conditions avec et sans vaccination. Cette équipe a récemment commencé un essai de phase I dans lequel ils traitent les patients atteints de mélanome métastasé avec l'anti-PD-1 (nivolumab) et des peptides gp100, MART-1 et NY-ESO-1 (Gibney et al. 2015). Les résultats sont satisfaisants, avec une survie générale de 80% à 47 mois, corrélée à une augmentation du taux de LT $CD8^+$ spécifiques dans le sang, une diminution de leur expression de $PD\text{-}1^+$, mais aussi une augmentation des Treg, probablement en réponse à l'immunité adaptative mise en place. Malheureusement, il n'est pas possible d'analyser l'effet de la combinaison car les traitements uniques ne sont pas testés dans cet essai. A l'image de cette dernière étude, les données concernant une combinaison de vaccin et d'anti-PD-1 sont rares, **il est donc difficile de conclure quant à un éventuel effet de cette association chez l'humain. En outre, les données récoltées concernent le compartiment sanguin et il est possible, et même très probable, que l'analyse de ces marqueurs révèle tout autre chose au niveau du site tumoral**. C'est pourquoi l'étude de la réponse immune anti-tumorale déclenchée par l'association d'un vaccin à base de peptide et d'anticorps bloquant des récepteurs inhibiteurs s'avère délicate.

La combinaison entre le blocage de ces récepteurs et un vaccin est une idée très pertinente, et pleine d'avenir. Malgré le fait que les résultats soient difficilement analysables chez l'humain, et que ceux-ci ne montrent pas d'effets aussi nets que les modèles murins, de telles combinaisons sont à mon sens nécessaires. Les associations ici évoquées entre les anti-CTLA-4 ou anti-PD-1 avec des vaccins peptidiques pourraient être encore améliorées, par exemple par l'utilisation

d'adjuvants ligands de PRR. Cela pourrait améliorer la présentation de l'antigène et la réponse adaptative. Il est aussi envisageable de combiner le blocage de récepteurs inhibiteurs à un vaccin basé sur les DC, cela pourrait lever l'inhibition liée aux contacts effecteurs/APC. **Ces associations peuvent être très diverses et aboutir à une amélioration du traitement, à condition que ces combinaisons soient complémentaires, car dans ce cas elles pourraient améliorer la qualité de la réponse immune déclenchée.**

RESULTATS

Les résultats de cette thèse seront partagés en deux parties. Je vais d'abord présenter les données portant sur l'analyse de la cinétique de la réponse immune dans le cadre d'une régression tumorale induite par une vaccination. Dans un second temps, je présenterai des données préliminaires sur un essai de combinaison thérapeutique afin de prévenir l'échappement des tumeurs suite à la régression.

I. La régression tumorale induite par une vaccination requiert la coopération des LT et des cellules myéloïdes au sein de la tumeur

Il ne fait plus aucun doute que l'immunothérapie anti-tumorale est un traitement d'avenir. Contrairement aux traitements standards, cette approche pourrait permettre de mettre en place une mémoire immunitaire. La grande majorité des recherches dans ce domaine se focalisent sur deux notions, le fort potentiel cytotoxique des LT $CD8^+$, et l'inhibition de l'activation des LT par les cellules myéloïdes à activité immunosuppressive. De nombreux essais thérapeutiques ciblent donc ce potentiel suppresseur des cellules myéloïdes et cherchent à stimuler les LT cytotoxiques.

Les modèles murins utilisés pour analyser la réponse immune anti-tumorale sont liés à ces notions. Cependant, de tels traitements induisent le plus souvent un ralentissement de la croissance, mais pas de régressions tumorales qui seraient, elles, le signe d'une réponse immune efficace. L'efficacité de ces traitements est donc limitée.

L'objectif de cette thèse a été d'analyser une réponse immune capable de provoquer des régressions tumorales, donc efficace. Nous avons alors étudié la cinétique d'infiltration au sein de la tumeur ainsi que les rôles des différentes populations de cellules immunes impliquées dans la régression tumorale.

Les travaux de William Coley ont grandement inspiré la manière dont nous avons provoqué la régression de tumeurs murines. En effet, nous avons mimé une réponse anti-infectieuse capable de provoquer la fonte de la masse tumorale (Thoreau et al. 2015). Le traitement utilisé est STxB-E7, un vaccin composé de la sous-unité B (non toxique) de la toxine de Shiga, couplée à un peptide long, E7, qui est exprimé par les cellules tumorales TC1. Dans le but de mimer une infection virale au niveau du foyer tumoral, nous avons combiné ce vaccin à de l'IFNα.

1. La combinaison vaccin E7 + IFNα induit une régression systématique des tumeurs

Afin de mettre au point un schéma de vaccination nous permettant d'induire une régression systématique, des souris C57BL6/J ont été transplantées avec des cellules tumorales TC1 qui expriment la protéine E7 du virus HPV. Lorsque les tumeurs atteignent un diamètre de 6 mm, autour du dixième jour, les souris sont traitées avec une injection péritumorale de STxBE7 (que nous appellerons vaccin E7 dans la suite de ce manuscrit) et d'IFNα. Le jour suivant, les souris reçoivent une seconde injection d'IFNα pour maintenir son taux (Figure 10). Cette stimulation est renouvelée sept jours plus tard, comme décrit dans la partie « expérimentation animale » des matériels et méthodes. Suite à ce traitement, toutes les souris montrent alors des régressions des tumeurs TC1 après la deuxième injection (Figure 11B). De manière très intéressante, l'injection d'IFNα seul n'a cependant pas altéré la croissance tumorale, et les souris traitées avec le vaccin seul ont vu leurs tumeurs soit stabiliser soit progresser, mais quasiment jamais régresser après le *boost* (Figure 11C et D). Enfin, l'injection de cette combinaison en administrant l'IFNα en IV, et non en péritumoral, montre une diminution nette de l'efficacité de la vaccination (Figure 11E). La figure 11F résume les effets des différents traitements, en répertoriant le pourcentage de tumeurs en progression, en stabilisation ou en régression après le *boost*, entre les jours 7 et 11. Il apparaît très nettement que seule l'association du vaccin E7 et de l'IFNα local montre une efficacité, optimale. **Ces données montrent que la délivrance du vaccin conjointement avec l'IFNα local (mimant une infection à proximité du site de la tumeur) est optimale pour induire une régression systématique des tumeurs.**

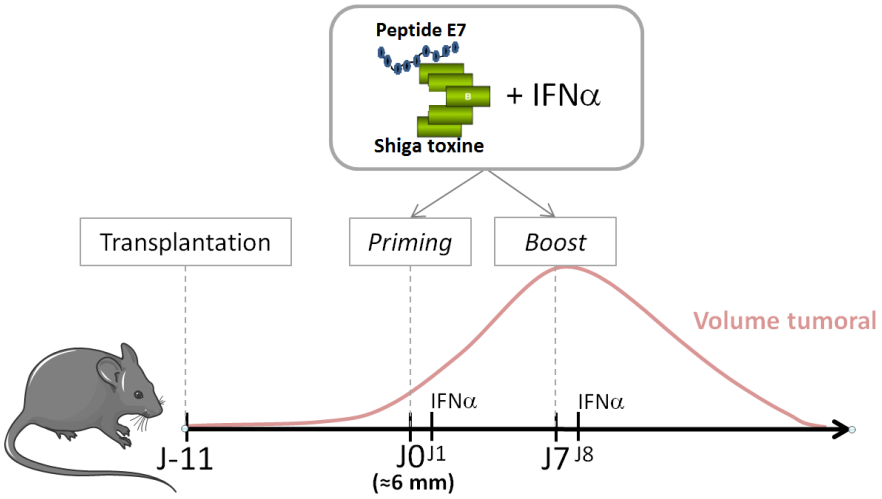


Figure 10 : Protocole expérimental. Des cellules tumorales TC1 (10^5) sont injectées en s.c. au niveau du flanc de souris C57BL6/J. 11 jours plus tard, les souris sont vaccinables si le nodule tumoral atteint environ 6 mm, soit autour de 70 mm^3. Aux jours 0 et 7, respectivement pour le *priming* et le *boost*, les souris sont vaccinées en péritumoral avec le vaccin STxBE7 combiné à de l'IFNα.

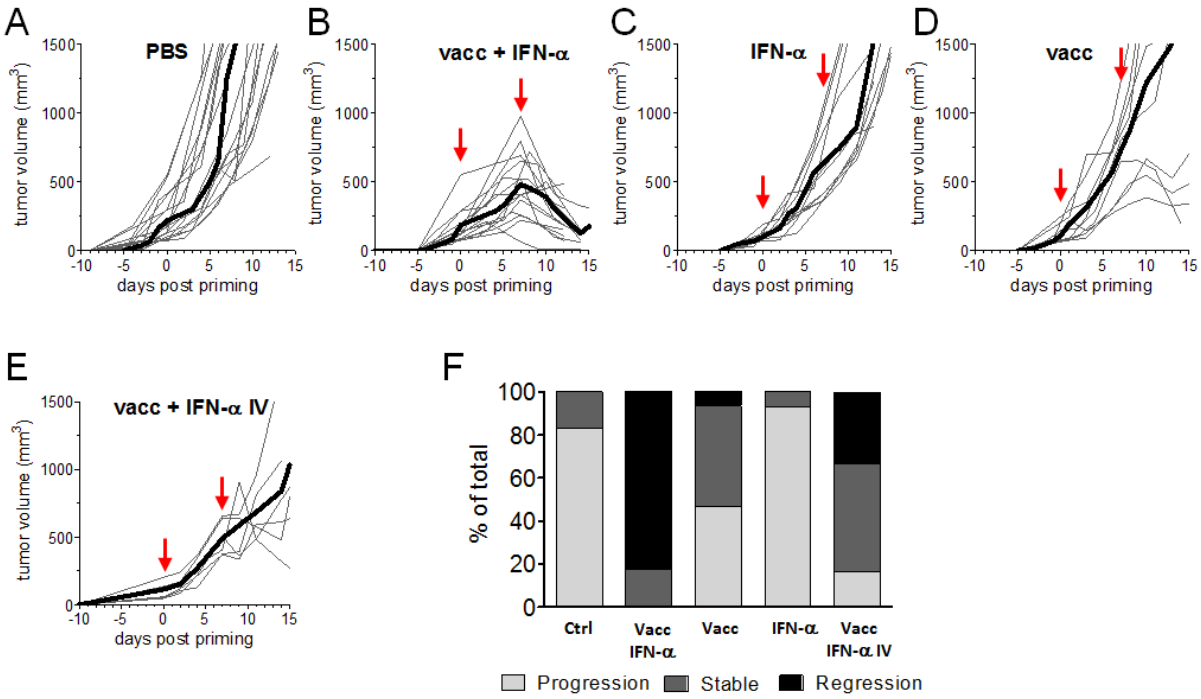


Figure 11 : La combinaison du vaccin E7 et de l'IFNα local permet la régression tumorale. Des souris C57BL6/J avec des tumeurs TC1 ont reçu des traitements composés de vaccin E7 et d'IFNα. **A-E.** Les courbes de croissance tumorale de chaque souris sont représentées en gris, et la moyenne est en noir. Les flèches rouges représentent le *priming* (J0) et le *boost* (J7). **F.** Les pourcentages de tumeurs en progression (<10%), stabilisation (10< x <20%) ou régression (>20%) entre les jours 7 et 11 sont représentés pour chaque traitement.

Les cellules tumorales TC1 ayant fait l'EMT, n'expriment plus EpCAM. C'est pourquoi nous avons développé une lignée de TC1 exprimant la GFP afin de pouvoir suivre *in situ* le sort des cellules tumorales TC1 lors de la régression tumorale. Des souris ont donc été transplantées avec des cellules TC1-GFP, et nous avons analysé des tranches épaisses de tumeurs (300 µm) par immunofluorescence. Contrairement aux souris contrôles (PBS), la plupart des cellules tumorales (avec de gros noyaux) avaient déjà été éliminées chez les souris vaccinées 11 jours après le *priming* (et 4 après le *boost*) et remplacées par des cellules avec de petits noyaux, très probablement les cellules immunitaires (Figure 12A). L'imagerie sur tranches de tumeur entière a révélé que, lors de la stabilisation 8 jours après la vaccination, l'attaque tumorale est initiée à partir de la périphérie de la tumeur (la zone devenue GFPneg), là où le système vasculaire est le plus dense (Figure 12B et 12C). Au jour 10, la tumeur a également été attaquée à l'intérieur et enfin à jour 11, seul un réseau vasculaire dense est détecté, dépourvu de cellules GFP^+. **Ces résultats montrent que les vaisseaux tumoraux sont préservés, et nous rappellent que ces vaisseaux nourriciers sont également la porte d'entrée pour le cheval de Troie, à savoir les cellules immunes anti-tumorales**.

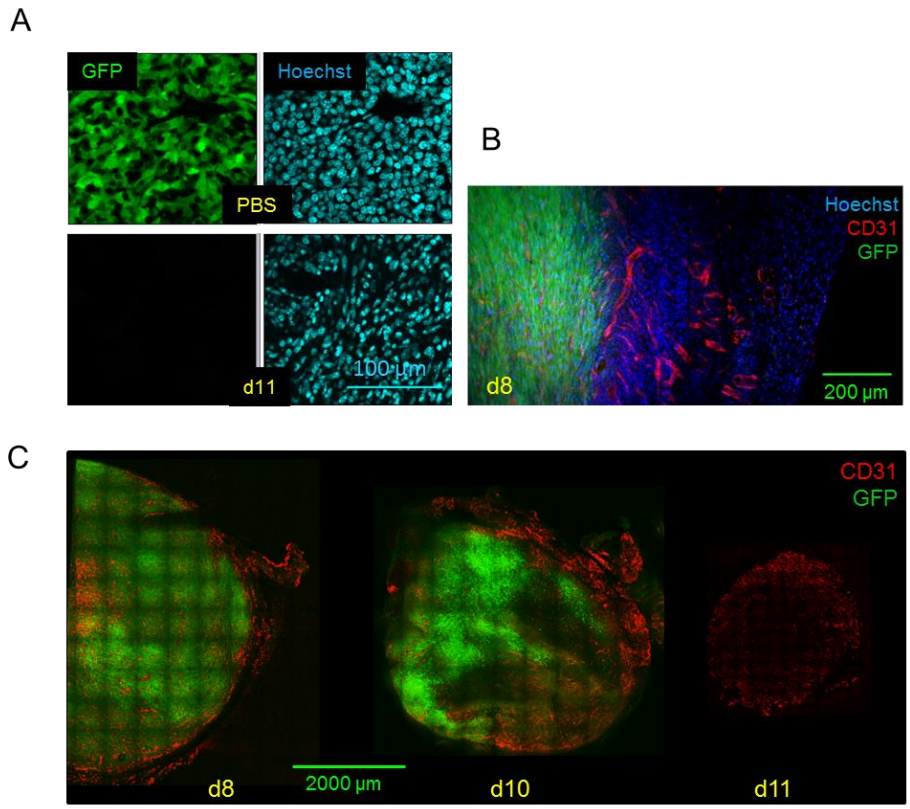


Figure 12 : La disparition des cellules tumorales fait suite à une attaque multifocale. A. 11 jours après le *priming*, la disparition des TC1-GFP (gauche) laisse place à des cellules à petits noyaux (en bas à droite), comparé aux grands noyaux des cellules tumorales (en haut à droite). **B.** Cette disparition commence à jour 8, en périphérie de la tumeur. **C.** Cette région périphérique possède un réseau vasculaire plus dense (J8), et l'attaque va ensuite toucher des régions plus internes (J10). A J11, le réseau vasculaire est dense, et la masse tumorale dépourvue de cellules tumorales vivantes TC1-GFP.

2. L'afflux de cellules myéloïdes coïncide avec le début de la régression tumorale et précède l'infiltration par des lymphocytes T CD8$^+$

Il a été montré précédemment que le vaccin E7, malgré la présence d'épitopes CD4 et CD8, induisait seulement une présentation aux LT CD8$^+$ par les DC (Adotevi et al. 2007; Vingert et al. 2006), donc *via* la présentation croisée. C'est pourquoi, nous nous sommes d'abord concentrés sur la réponse T induite par la vaccination. Grâce à une approche Nanostring, effectuée en collaboration avec l'équipe de J-P Abastado à Singapour, nous avons réalisé une analyse transcriptomique sur des fragments de tumeurs. Elle a révélé que les expressions de CD8α ainsi que TBX21, IFNγ et granzyme B augmentaient progressivement entre les jours 8 et 11 chez les animaux vaccinés (Figure 13A). Ces données montrent que le vaccin a induit une réponse T cytotoxique CD8$^+$ de type Th1. *In situ*, les lymphocytes T CD8$^+$ ont commencé à infiltrer les tumeurs à partir du jour 8 (Figure 13B). Cependant, il est étonnant de remarquer que ces cellules T CD8 ne représentent qu'une petite partie de l'infiltrat immunitaire CD45$^+$ détecté à ce

moment-là. Alors que les cellules myéloïdes F4/80$^+$ étaient déjà présentes dans la tumeur avant le traitement, nous avons observé un réseau encore plus dense au sein des tumeurs de souris vaccinées (Figure 13B).

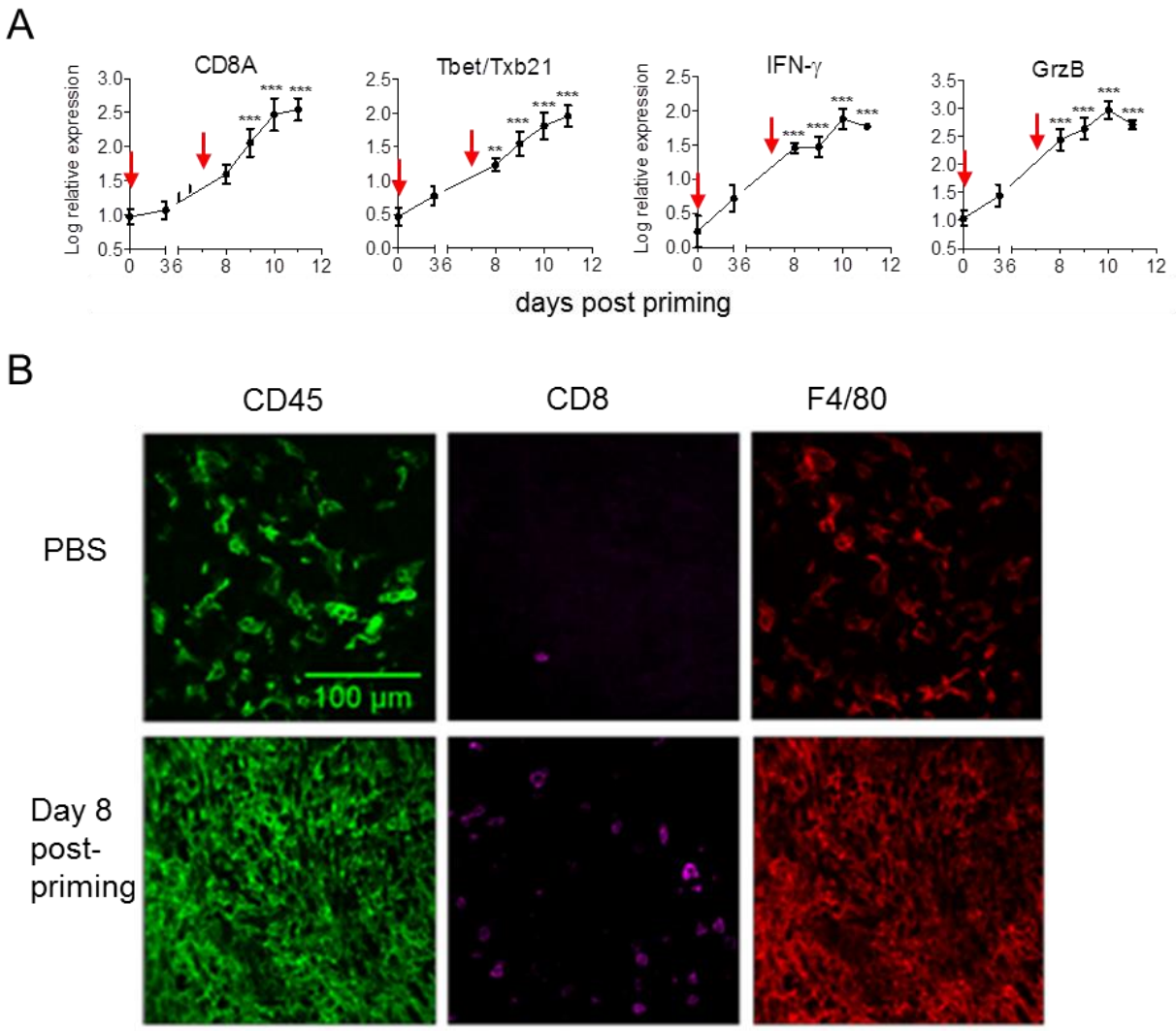


Figure 13 : L'infiltration de cellules T CD8$^+$ est accompagnée d'un réseau serré de cellules myéloïdes. A. L'analyse cinétique du transcriptome de l'infiltrat immunitaire après la vaccination montre une infiltration progressive de cellules T CD8 de type 1. **B.** Dans les souris contrôles (haut), l'infitrat CD45 est majoritairement composé de cellules F4/80$^+$. Après la vaccination (bas), les tumeurs en régression montrent un fort infiltrat CD45, composé de cellules CD8$^+$ et de F4/80$^+$.

Étant donné que la combinaison vaccin E7 + IFNα déclenche des régressions tumorales de manière systématique, il est possible d'analyser la composition de l'infiltrat immunitaire avant même cette régression. Nous avons donc sacrifié des souris à différents temps après le début du traitement afin d'analyser l'infiltrat tumoral au cours de la réponse immune déclenchée par la vaccination. Comme illustré en figure 14A, le recrutement de cellules immunes au sein des tumeurs des souris traitées se fait en 2 vagues bien distinctes.

Une première infiltration de cellules $CD45^+$ survient au 5ème jour après le *priming*, Leur fréquence passe alors de 5% à 12% (augmentation significative, p=0.03, Mann-Whitney), puis, lors de la seconde vague à jour 11, les $CD45^+$ représentent 40% des cellules vivantes dans la tumeur. La cinétique d'infiltration des $CD11b^+$ suit le même schéma, avec une première vague à jour 5, où ils représentent 8% des cellules vivantes et constituent la grande majorité des cellules $CD45^+$ infiltrantes. A ce temps-là, les LT $CD8^+$ sont rares et représentent moins de 1% des cellules vivantes. Au moment où la tumeur commence à régresser aux alentours du jour 8, les LT $CD8^+$ sont toujours rares, avec moins de 5% des cellules vivantes, alors que les $CD11b^+$ représentent en moyenne 15% de ces cellules. Ceci dit, comme le montre la figure 14A, il y a une petite augmentation du nombre de LT $CD8^+$ au jour 5, où ils passent de 0.2 à 0.7% des cellules vivantes. Il a été observé qu'à ce stade (par des marquages immunofluorescents sur tranches de tumeurs) les rares LT $CD8^+$ étaient en général en contact étroit avec des cellules myéloïdes, comme cela est illustré en figure 14B.

C'est à jour 10, au moment où la tumeur a déjà bien régressé, que la fréquence de $CD8^+$ au sein de la tumeur augmente de manière importante en atteignant plus de 20% des cellules vivantes. Ces résultats sont difficiles à concilier avec l'idée que les LT $CD8^+$ seraient les seuls effecteurs possibles lors de la réponse anti-tumorale. Ces données indiquent que la régression tumorale est ici accompagnée d'un fort et précoce infiltrat myéloïde, qui est suivi d'une augmentation des LT CD8 plus tardive. **L'arrivée tardive de ces cellules suggère que d'autres acteurs tels que les cellules myéloïdes participent activement à la régression tumorale.**

Les autres populations de cellules immunes telles que les LT $CD4^+$, les cellules NK, les neutrophiles et les LTγδ restent peu nombreuses avec un maximum de 4% pour les NK au pic de cette cinétique (Figure 14C).

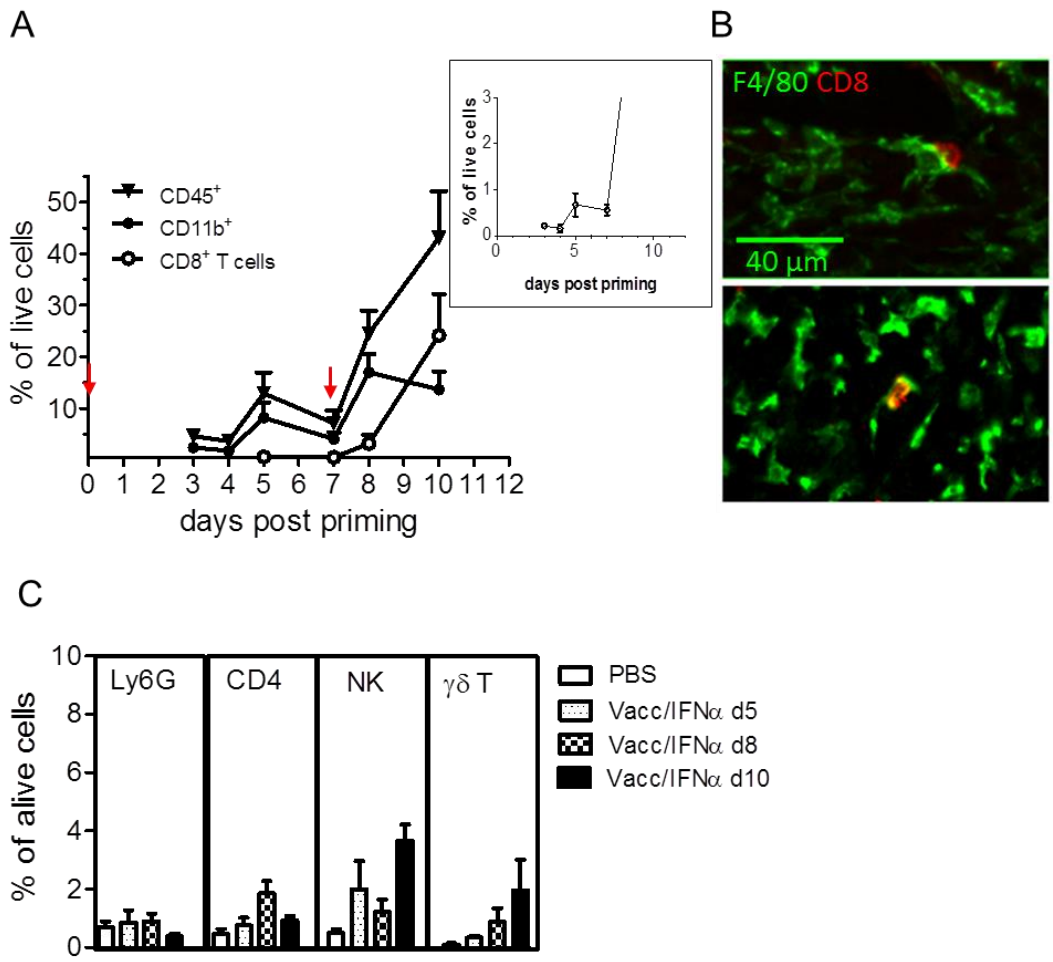


Figure 14 : Les cellules myéloïdes infiltrent la tumeur avant l'arrivée massive des LT CD8⁺. A. L'analyse cinétique par cytométrie en flux de l'infiltrat CD45, CD11b et CD8 après vaccination montre une première vague de cellules CD11b⁺ à jour 5. L'infiltrat Lymphocytaire T CD8⁺ augmente très faiblement, passant de 0.2 à 0.7% des cellules vivantes. **B.** A jour 5, la population T CD8⁺ est souvent retrouvée au contact de cellules F4/80⁺. **C.** L'analyse cinétique par cytométrie en flux des populations Ly6G⁺, CD4⁺, NK et Tγδ révèle des fréquences faibles durant la régression tumorale.

3. Les infiltrats de LT CD8⁺ et de cellules myéloïdes sont tous deux nécessaires à la régression tumorale

Comme les données précédentes ont montré que les LT CD8⁺ étaient assez rares au début de la régression tumorale, il parait légitime de s'interroger sur leur contribution dans la phase effectrice de la régression. Pour le tester, nous avons éliminé les LT CD8⁺ quelques jours avant la régression tumorale, à jour 5, par injection intra-péritonéale d'un anticorps déplétant anti-CD8. Le résultat fut sans appel, toutes les tumeurs des souris traitées avec l'anti-CD8 ont continué à progresser (Figure 15A). Nous avons fait de même pour les LT CD4⁺, mais leur absence n'a pas bloqué la phase de régression. **Malgré leur arrivée tardive, les CD8⁺ jouent donc bien un rôle majeur dans la régression.**

Par ailleurs, l'analyse transcriptomique avait révélé que les chimiokines CXCL9 et CXCL10, importantes pour le recrutement de LT au site d'inflammation, étaient retrouvées en grande quantité dans les tumeurs après vaccination (Figure 15B). Le récepteur de ces chimiokines étant CXCR3, nous avons reproduit notre modèle de régression tumorale dans des souris déficientes pour CXCR3. Cette expérience a été faite dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de J-P Abastado, et le soutien scientifique et technique de Kar Wai Tan et Xian Leong Penny. Les résultats obtenus furent alors surprenants, car malgré une diminution de la fréquence intratumorale de LT CD8 d'un facteur 4 dans les souris CXCR3$^{-/-}$ (Figure 15C), les tumeurs ont quand même amorcé une régression (Figure 15D). L'analyse transcriptomique a aussi permis d'observer une corrélation entre l'expression de CD8 et celles des cytokines CCL3 et CCL5, probablement impliquées dans le recrutement des TIL (Figures 15E et F). **La prise en compte de l'ensemble de ces résultats montre que les LT CD8 sont incontestablement nécessaires à la régression des tumeurs TC1, mais qu'ils peuvent difficilement être les seuls acteurs cytotoxiques au sein de la tumeur.**

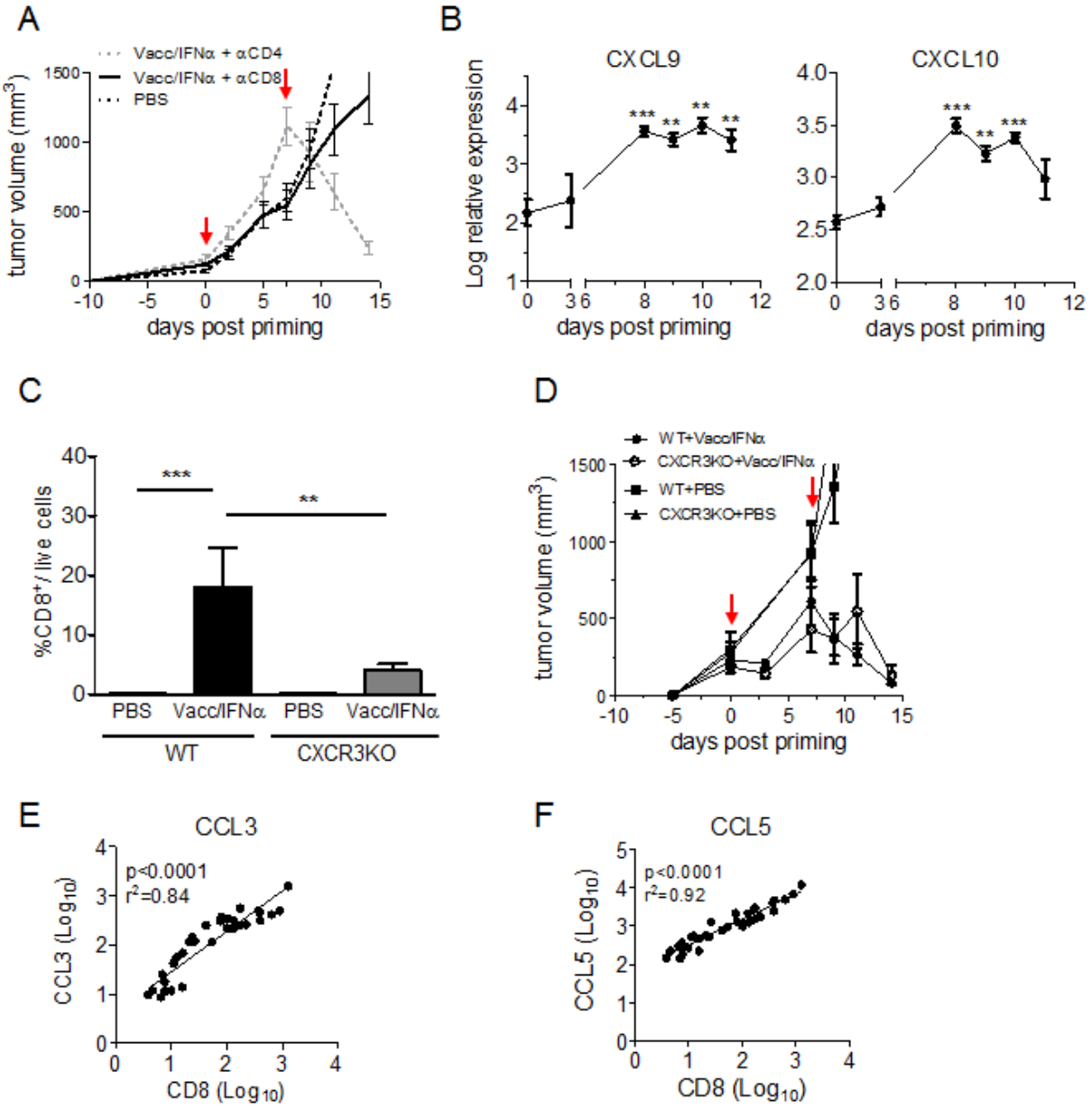


Figure 15 : Les cellules CD8⁺ sont nécessaires à la régression tumorale induite par la vaccination. **A.** L'absence des cellules CD8⁺ inhibe totalement la régression tumorale, alors que les CD4 ne sont pas nécessaires lors de la phase effectrice. Les courbes (moyennes de 8 à 12 souris) montrent les tailles des tumeurs après les traitements anti-CD4, anti-CD4, ou les contrôles. **B.** L'analyse transcriptomique a montré que CXCL9 et CXCL10 étaient surexprimés après la vaccination. **C.** Dans les souris CXCR3KO, l'infiltrat CD8 dans les tumeurs est considérablement réduit par rapport aux souris contrôles. **D.** La croissance tumorale dans les souris CXCR3KO est similaire à celle des souris contrôles, en absence de vaccination comme après vaccination. **E-F.** Corrélation de l'expression de CD8 avec CCL3 ou CCL5.

Dans les conditions contrôles, la grande majorité des cellules CD11b^{+} exprime peu ou pas CD11c (CD11c $^{neg/low}$). Ces cellules peuvent être séparées en trois sous-populations différenciées par leurs niveaux d'expressions de F4/80 et Ly6C. Ces populations sont les monocytes inflammatoires (F4/80^{int} Ly6C^{hi}), les macrophages (F4/80^{hi} Ly6C^{neg}), et les granulocytes, F4/80^{neg} Ly6C^{int}). Afin d'évaluer *in vivo* si les cellules myéloïdes participaient à l'élimination des cellules tumorales, nous

avons traité des souris vaccinées avec du PLX3397, un inhibiteur de la signalisation en aval du récepteur au CSF1 (DeNardo et al. 2011). L'administration du PLX3397 se fait par le biais de la nourriture, et faisant effet sous deux à trois jours, les souris ont été traitées à partir du jour du *priming*. Ce traitement a engendré une diminution de moitié des cellules $CD11b^+$ intratumorales, et réduit d'un facteur 5 la population cellulaire $F4/80^+$ (Figures 16A et B). Suite à ce traitement, les tumeurs n'ont pas régressé mais se sont stabilisées (Figure 16C). Dans ces conditions, l'élimination des CD8 inhibe l'efficacité de la vaccination et les tumeurs progressent. La spécificité des LT $CD8^+$ pour l'antigène E7 a été vérifiée durant la phase effectrice à jour 10 par l'utilisation de dextramères E7, et leur fréquence reste aussi élevée dans les souris traitées PLX3397 que dans ses souris contrôles vaccinées, avec environ 40% de LT $CD8^+$ spécifiques de l'épitope Kb/E7 à jour 10 (Figure 16D). Ce résultat est important car il montre que le traitement PLX3397 n'interfère pas avec le *priming* des cellules T. Précisons que ce résultat ne signifie pas que le nombre de T CD8 dans la tumeur est inchangé, en réalité il a légèrement diminué. Étant donné que le *priming* n'a pas été perturbé par le traitement, cette diminution des LT CD8 infiltrants, dépendant de leur recrutement, est liée à la déplétion des macrophages intratumoraux. **Ces données montrent ainsi que les cellules myéloïdes intratumorales sont nécessaires à l'élimination des tumeurs suite à la vaccination.**

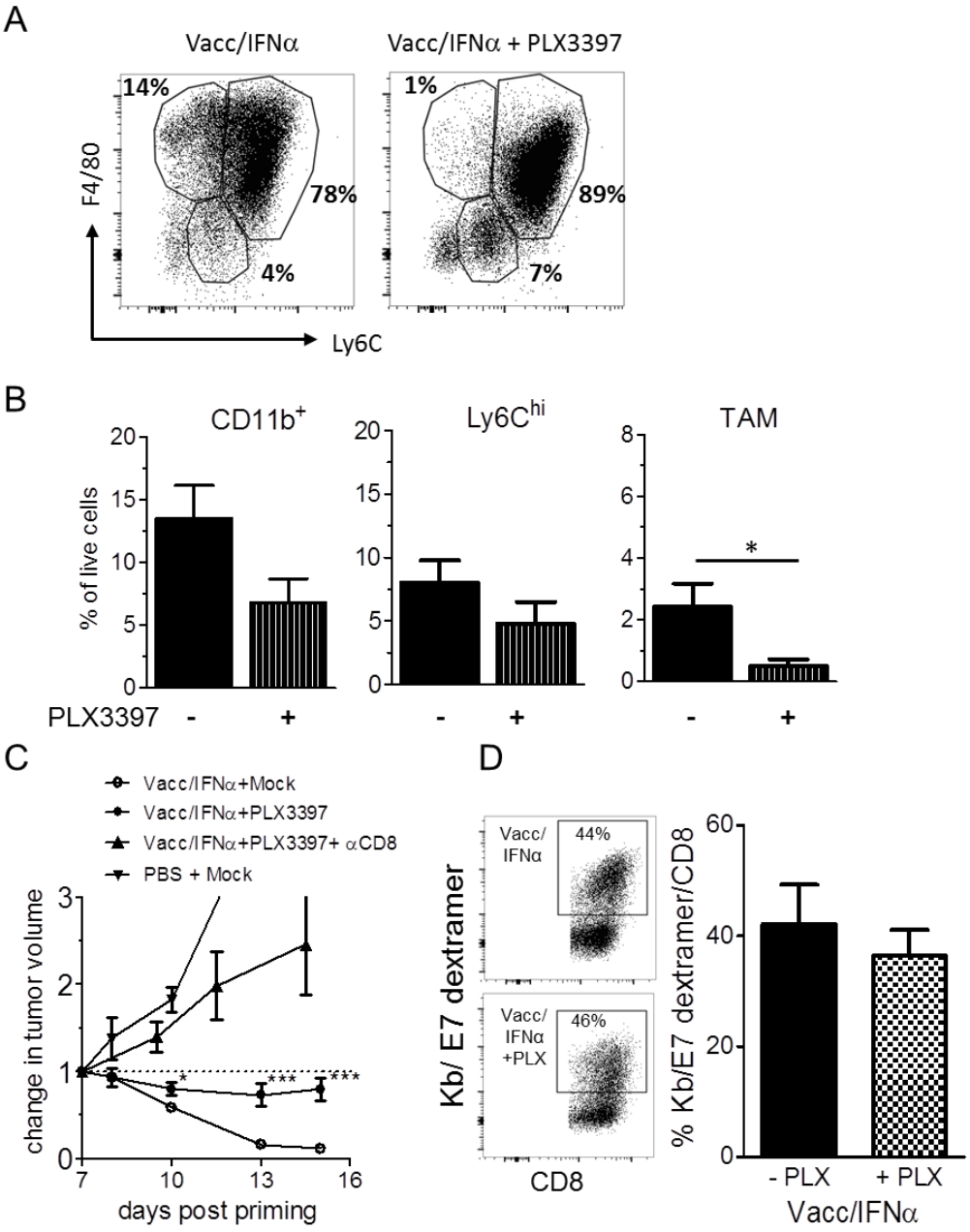


Figure 16 : La déplétion des cellules myéloïdes bloque la régression tumorale. A. Exemple représentatif de *dot plots* montrant la déplétion myéloïde après traitement par PLX3397 **B.** Pourcentage de cellules myéloïdes CD11b^{+} parmi les cellules vivantes, et de deux de ses sous-populations, les monocytes (Ly6C^{hi}) et les macrophages (TAM), après vaccination, et avec ou sans PLX3397 **C.** Après la déplétion des cellules myéloïdes par le PLX3397, le traitement vaccin E7+IFNα conduit à la stabilisation des tumeurs, alors que les tumeurs des souris traitées avec de la nourriture contrôle régressent. La croissance tumorale est restaurée lorsque les souris reçoivent un anti-CD8 en plus du PLX3397. Les courbes montrent la variation du volume tumoral par rapport à jour 7 (moyenne +/- SEM, avec 5 à 8 souris par groupe, de 2 à 3 expériences indépendantes). **D.** La déplétion des cellules myéloïdes ne perturbe pas le *priming* des LT CD8 spécifiques de Kb/E7, comme le montre la quantification des CD8 spécifiques intratumoraux à l'aide de dextramères à partir de souris vaccinées contrôles (haut), ou en plus traitées par le PLX3397 (bas). A droite, le graphique montre la quantification de deux expériences indépendantes.

Nous avons utilisé une autre approche pour réduire l'infiltrat myéloïde intratumoral afin de confirmer ces résultats. Nous avons pour cela implanté les cellules TC1 dans des souris déficientes pour CCR2, le récepteur de CCL2, dans lesquelles le recrutement des monocytes est inhibé. La fréquence de cellules myéloïdes infiltrantes a bien été diminuée, tout comme l'efficacité de la vaccination (Figure 17A).

Enfin, il était important de confirmer cela dans un autre modèle de tumeur. Nous avons utilisé les cellules tumorales EG7, qui ne sont autres que les cellules EL4 (modèle de thymome) exprimant l'ovalbumine de poulet. La régression tumorale, induite par le vaccin STxB-OVA combiné à l'IFNα, est aussi dépendante de l'infiltrat myéloïde (Figure 17B).

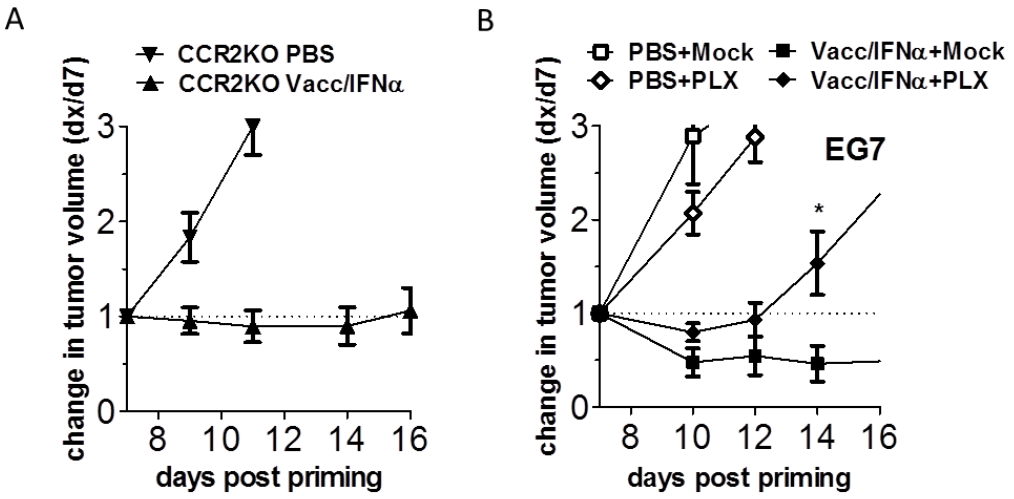


Figure 17 : La vaccination de souris CCR2KO transplantées avec les cellules TC1 et du modèle tumoral EG7 traité par PLX confirment l'importance des cellules myéloïdes lors de phase de régression. A. Dans des souris déficientes pour CCR2, la vaccination induit une stabilisation des tumeurs, mais pas de régression. **B.** Dans un modèle de tumeurs EG7, la régression tumorale induite par la vaccination STxB-OVA/IFNα est aussi bloquée en présence de PLX3397.

4. Les LT CD8 et cellules myéloïdes coopèrent au sein de la tumeur

Les conclusions précédentes nous ont amené à analyser le phénotype ainsi que l'état d'activation des cellules myéloïdes infiltrantes dans les tumeurs en régression. Nous nous sommes intéressés aux cellules myéloïdes CD11b^{+} CD11c^{-}, afin d'exclure les DC CD11c^{+} qui expriment constitutivement le MHC II (Figure 18A). Cette population dont les DC sont exclues regroupe les granulocytes (F4/80^{neg} Ly6C^{int}), les monocytes inflammatoires (F4/80^{int} Ly6C^{hi}) et les macrophages (F4/80^{hi} Ly6C^{neg}) (Figure 18B). L'analyse par cytométrie en flux montre que les monocytes inflammatoires ne sont qu'environ 10% à être MHC II^{+}, alors que de leur côté, les TAM ont des expressions plus variables, avec 20 à 40% de leur population positive pour les

MHC II (Figure 18C). Ce pourcentage relativement élevé de TAM MHC II^+ suggère qu'ils peuvent être activés localement, même dans les tumeurs en progression. Nous avons alors analysé l'activation de ces populations entre jour 3 et jour 10 après vaccination. À jour 5 après la vaccination, au moment de la première vague de l'infiltrat myéloïde, les monocytes activés représentent environ 30% de la population $CD11b^+$ $CD11c^{neg/low}$. Cette population va s'étoffer progressivement pour atteindre jusqu'à 50% des monocytes à jour 9. Si l'augmentation de l'expression du MHC II sur les macrophages semble plus tardive, peut-être due à l'hétérogénéité du contrôle, cette population de macrophages MHC $ClassII^+$ va constituer jusqu'à plus de 80% des TAM aux temps tardifs. Les images de marquage en immunofluorescence en figure 18D montrent aussi qu'à jour 10 la grande majorité des cellules $F4/80^{hi/int}$ expriment le MHC II. En figure 18C, nous avons reporté en rouge le pourcentage de TAM et monocytes MHC II^+ des souris dont les LT CD8 ont été éliminés. Ce résultat était inattendu, mais il semble que les cellules myéloïdes, TAM comme monocytes, aient des niveaux d'activation plus faibles dans cette condition. **Cette donnée laisse penser que les LT CD8 observés au contact des cellules myéloïdes dans les tumeurs participent activement à l'activation des TAM.**

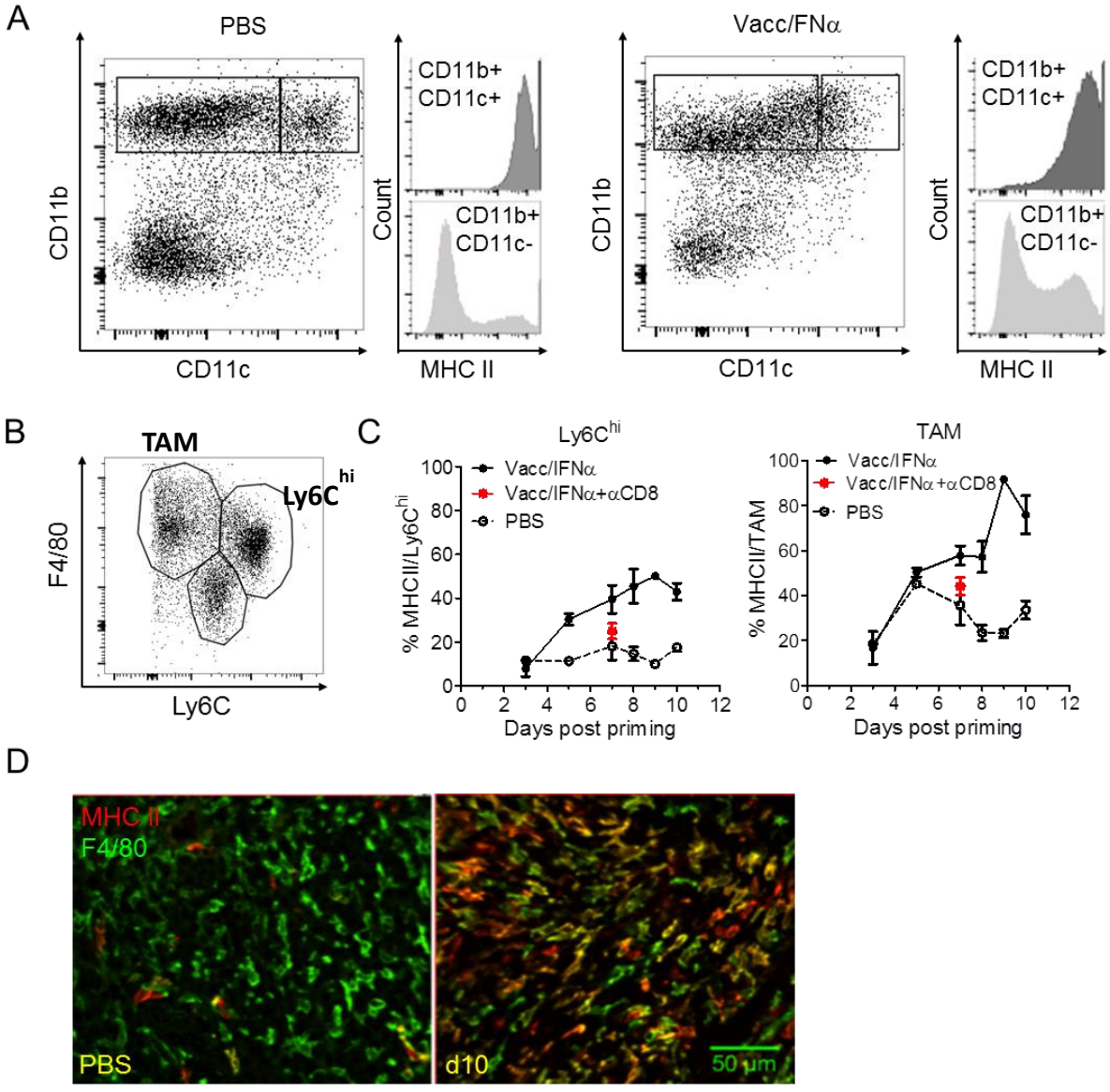


Figure 18 : L'activation des cellules myéloïdes dépend de la présence de LT CD8⁺. A. Dans les tumeurs en progression (PBS), une faible proportion des cellules CD11b⁺ exprime fortement CD11c et MHC II, alors que les autres CD11b⁺ les expriment très peu. Après vaccination (droite, J11), la population CD11b⁺ CD11c- surexprime le MHC II. **B.** Parmi les CD11b⁺, 3 sous-populations peuvent être différenciées, en fonction de leurs expressions de F4/80 et Ly6C. **C.** Après vaccination, l'expression du MHC II augmente sur les monocytes (gauche) et les macrophages (droite), mais est en partie bloquée par la déplétion des cellules CD8⁺ (point rouge). **D.** Dans les tumeurs contrôles (gauche), les cellules F4/80⁺ expriment rarement le MHC II, alors que pendant la régression (droite), la plupart d'entre elles sont MHC II⁺.

Sachant que la sécrétion d'IFNγ par les LT fait partie des mécanismes capables d'activer les cellules myéloïdes, nous avons testé notre modèle de régression tumorale dans des souris déficientes pour l'IFNγ. Force est de constater que l'absence de cette cytokine inhibe la régression tumorale, bien que la croissance tumorale soit ralentie par rapport aux souris IFNγKO sans vaccination (Figure 19A). Dans ces souris, l'absence de surexpression de MHC II à la surface des monocytes et macrophages traduit un échec de leur activation (Figure 19B). **Ces résultats suggèrent que, malgré leur faible fréquence aux temps précoces après la vaccination, les LT CD8 jouent un rôle dans l'activation des cellules myéloïdes infiltrantes, sans doute *via* la sécrétion d'IFNγ.**

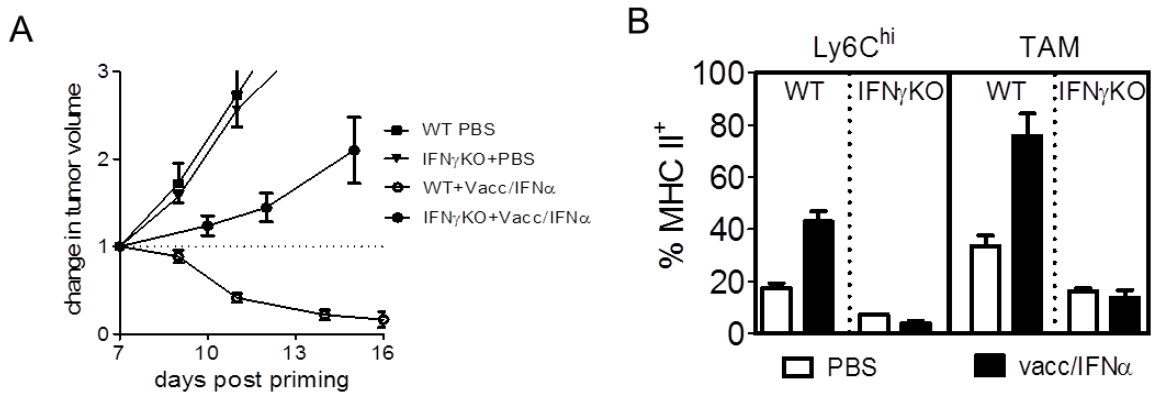


Figure 19 : Les interactions dépendantes de l'IFNγ permettent l'activation des cellules myéloïdes par les LT CD8⁺. A. L'efficacité de la vaccination est très diminuée dans les souris déficientes pour l'IFNγ (moyennes de variation du volume de la tumeur, avec 7 souris par groupes, sur deux expériences indépendantes). **B.** Les activations des monocytes et macrophages sont bloquées dans les souris IFNγKO (moyennes de 3 souris de 3 expériences indépendantes).

Toujours de manière cinétique, nous avons analysé l'état d'activation des cellules myéloïdes infiltrantes. L'expression génique de Ly6C est déjà fortement augmentée à jour 8, et sa surexpression est accompagnée par d'autres marqueurs myéloïdes habituellement surexprimés lors de réponse inflammatoire aigüe, comme TNFα, CD86 ou MHC II (Figure 20A). Ces molécules sont aussi associées à des macrophages activés. D'autres marqueurs de l'inflammation sont surexprimés, comme CCL2 et CCR2, mais aussi iNOS, un autre marqueur de polarisation M1. La plupart de ces marqueurs atteignent leur pic d'expression à jour 10, au moment où la tumeur est déjà en pleine régression. En parallèle, d'autres gènes cette fois associés aux macrophages polarisés vers un profil M2 ont été analysés, comme Fizz, Il-10, CD206 ou TGFβ (Figure 20B). Certains d'entre eux (Fizz et IL-10) sont surexprimés assez précocement autour de jour 8. **Ces profils d'expressions géniques montrent que la vaccination, qui mène à**

l'élimination de la tumeur, permet la reprogrammation et l'activation des cellules myéloïdes.

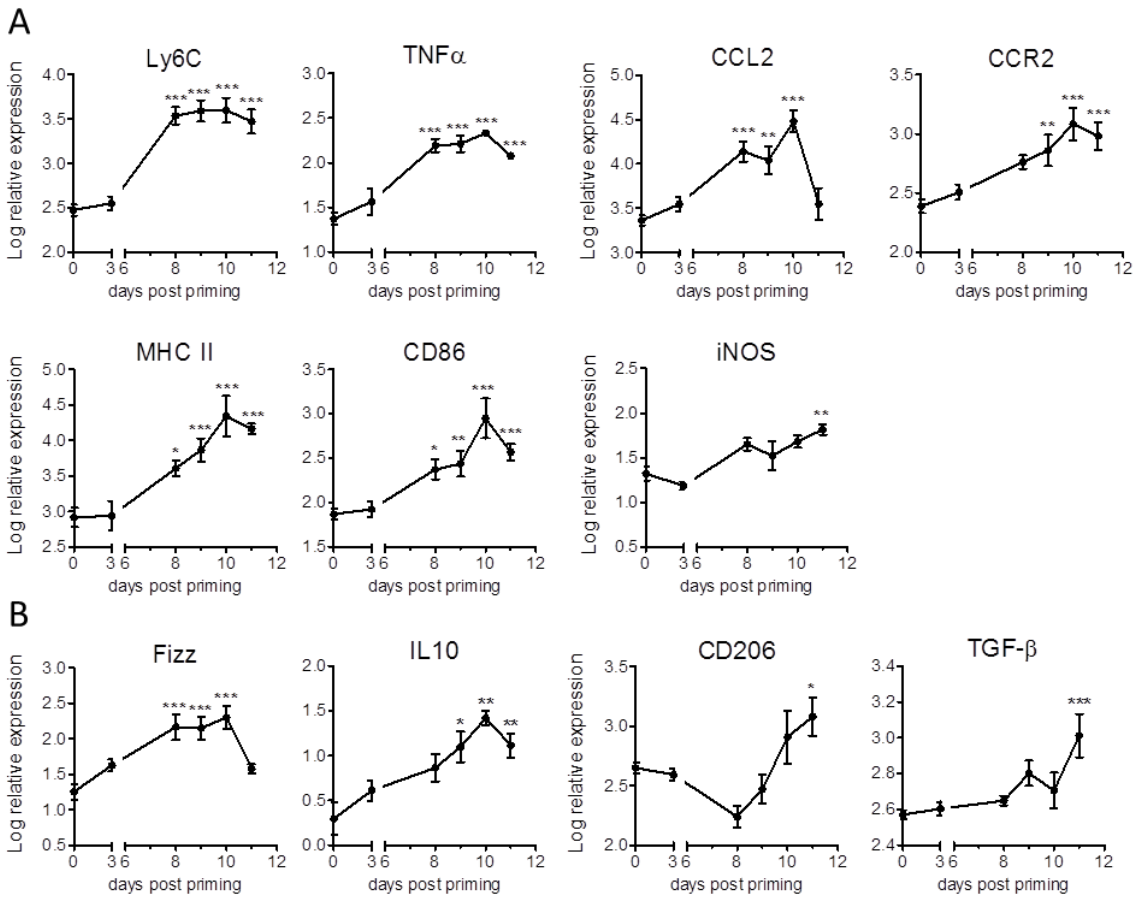


Figure 20: La combinaison vaccin E7 + IFNα induit une augmentation de l'infiltration de cellules myéloïdes activées. A. L'analyse cinétique des transcriptomes associés à des monocytes/macrophages activés montre une augmentation du profil myéloïde activé. **B.** Surexpression progressive des gènes associés à un profil myéloïde immunosuppresseur.

L'étape suivante était alors de déterminer de quelle manière les cellules myéloïdes pouvaient participer à la régression de la tumeur. Nous avons pour cela analysé leur production spontanée de TNFα *in vitro* après dissociation de la tumeur. Alors que seulement 3% des cellules $CD11b^+$ étaient productrices de TNFα dans la condition contrôle, 12% des $CD11b^+$ en produisent après vaccination (Figure 21A). Lorsque les cellules sont stimulées *in vitro* par une association LPS/IFNγ, 80% des cellules $CD11b^+$ produisent du TNFα, contre 40% dans la condition contrôle. Cela suggère que, suite à la vaccination, les cellules myéloïdes intratumorales ont un meilleur potentiel cytotoxique. De plus, parmi les cellules productrices de TNFα dans la tumeur, 80% sont des cellules myéloïdes (Figure 21B). Afin de vérifier l'idée que ces cellules peuvent participer directement à l'élimination des cellules tumorales, nous avons testé leur cytotoxicité *in*

vitro. La co-culture de cellules F4/80$^+$, purifiées de tumeurs en régression, avec des cellules TC1-GFP pendant 24h ou 48h, montre en effet que ces cellules F4/80$^+$ éliminent une grande partie du tapis formé par les cellules tumorales, avec seulement 30% de fraction GFP$^+$ dans les champs microscopiques (Figures 21C + Thoreau *et al.* annexe 1). Cela reflète l'activité cytotoxique des cellules F4/80$^+$ des tumeurs vaccinées. En revanche, l'ajout de cellules F4/80$^+$ provenant de tumeurs en progression montre peu de désordres induits dans le tapis tissulaire des TC1-GFP (60% de fraction GFP$^+$). Enfin, le fait de bloquer le TNFα par ajout d'anticorps inhibe partiellement mais de manière significative la cytotoxicité des cellules myéloïdes de tumeurs en régression. Il est important de préciser que les LT CD8$^+$ ont été triés à partir d'organes lymphoïdes secondaires de souris vaccinées, dont la fréquence de LT spécifiques de l'Ag E7 est estimée à 10%. Ces cellules triées, ajoutées avec un ratio d'un LT CD8$^+$ pour dix cellules myéloïdes (10:1) comme observé dans les tumeurs ne modifient par la cytotoxicité des macrophages (Figure 21D). Une augmentation de la fréquence des LT CD8$^+$ d'un facteur 3 (10:3) améliore cependant l'effet cytotoxique observé, et montre aussi une cytotoxicité sans les cellules myéloïdes (0:3). **Ces données montrent qu'après vaccination les cellules myéloïdes F4/80$^+$ ont un potentiel cytotoxique et peuvent éliminer les cellules tumorales par la sécrétion de TNFα.**

Afin de confirmer la cytotoxicité des cellules myéloïdes in vivo, nous avons bloqué les molécules cytotoxiques par lesquelles elles sont susceptibles d'éliminer directement les cellules tumorales, comme le TNFα et le NO. Après vaccination, le blocage de la production de NO par un traitement au L-NAME n'a pas perturbé la régression tumorale, alors qu'un traitement avec un anti-TNFα a significativement retardé la régression tumorale (Figure 21E).

Toutes ces données ont montré que la mise en place d'une coopération entre les LT CD8$^+$ et les cellules myéloïdes au sein de la tumeur est possible après vaccination. Dans ce modèle, cette coopération dynamique permet que les LT CD8$^+$ spécifiques et les cellules myéloïdes activées puissent toutes contribuer à la régression de la tumeur.

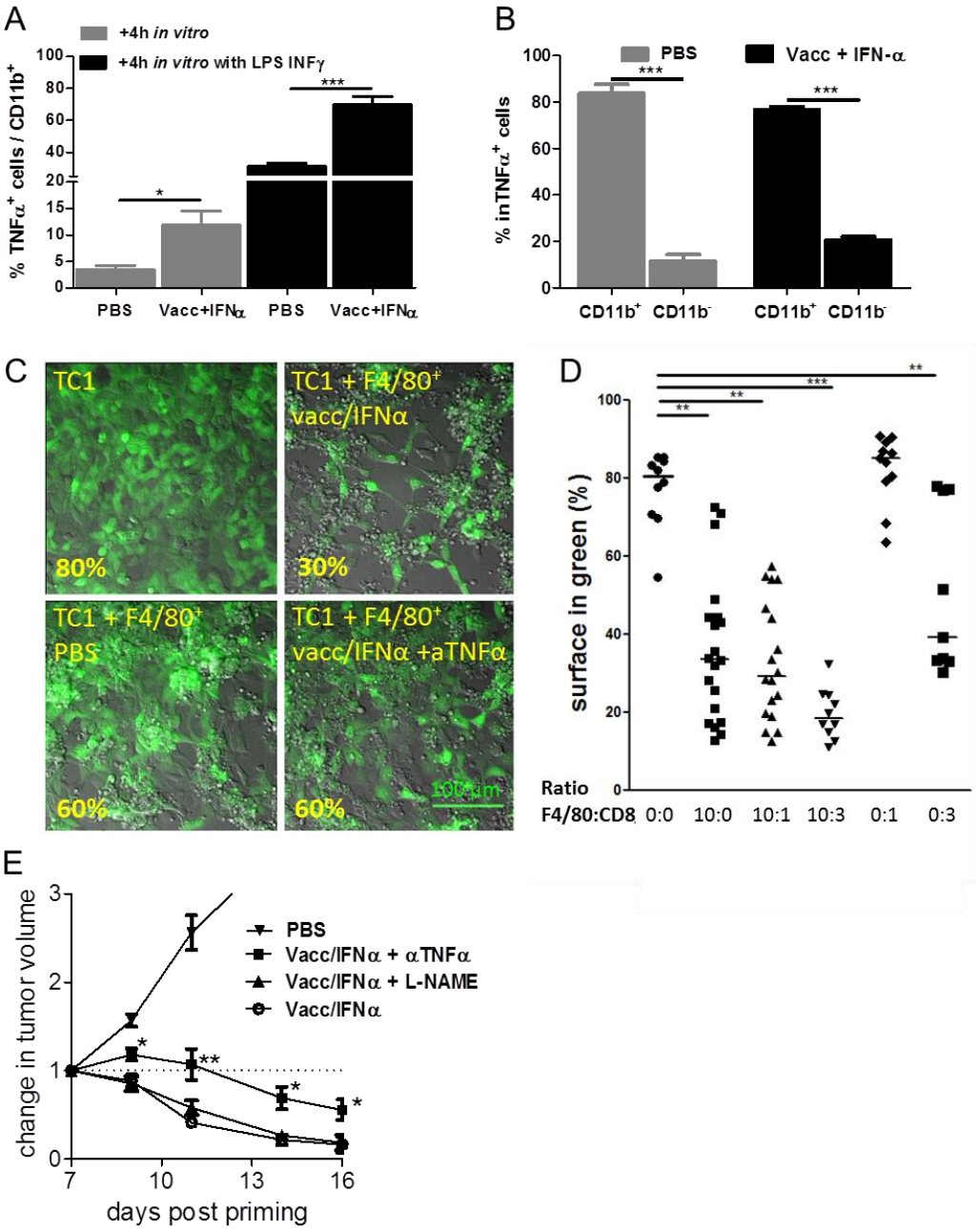


Figure 21 : Les cellules myéloïdes contribuent à l'élimination des cellules tumorales par l'intermédiaire du TNFα. A Pourcentages des cellules myéloïdes CD11b$^+$ qui produisent du TNFα à jour 10, après 4h d'incubation in vitro, avec ou sans stimulation (LPS/IFNγ). **B.** Distinction des cellules myéloïdes CD11b$^+$ des cellules non myéloïdes dans la population celluaire productrice de TNFα. **C.** Des cellules TC1-GFP sont mises en culture (en haut à gauche), et des cellules F4/80$^+$ triées à partir de tumeurs (jour 8) y sont ajoutées. Par rapport aux myéloïdes provenant de tumeurs contrôles (en bas à gauche), les F4/80$^+$ de tumeurs vaccinées sont cytotoxiques envers les cellules tumorales (en haut à droite), les cellules tumorales perdent la GFP et meurent). Cette cytotoxicité est bloquée par l'ajout d'un anti-TNFα (en bas à droite). Les pourcentages représentent la moyenne de la fraction GFP$^+$ des champs microscopiques dans chaques conditions (voir Thoreau et al. annexe1). Ces images sont représentatives de trois expériences indépendantes. **D.** Quantification des cellules vivantes (fraction GFP$^+$ des champs microscopiques, 8 à 20 images par conditions), sur des co-cultures de cellules F4/80$^+$ et CD8$^+$ de tumeurs vaccinées avec des ratios de 10 :1 ou de 10:3, les LT CD8 sont aussi ajoutés seuls aux deux fréquences (0:1 et 0:3). **E.** L'efficacité du traitement vaccin E7 + IFNα est partiellement réduite par un traitement avec un anti-TNFα, mais pas par l'inhibition de la production de NO par le L-NAME.

II. Données préliminaires sur la combinaison d'un anti-PD-1 avec l'IFNα

Dans le modèle de régression tumorale utilisé précédemment, une fraction des tumeurs ne régressait pas totalement, et finissait par échapper à nouveau. Nous nous sommes intéressés à cet échec de la réponse immune anti-tumorale, et aux moyens qui pourraient être mis en œuvre pour prolonger l'efficacité de la thérapie et donc prévenir la repousse de la tumeur. Quelques données suggèrent que des mécanismes d'immunosuppression sont mis en place pendant la régression de la tumeur, comme les surexpressions tardives de TGFβ, IL-10 ou CD206 (Figure 20 B). De plus, nous avons observé pendant la régression tumorale une augmentation de l'expression de PD-1 dans la population de LT CD8 (Figure 22), ce qui pourrait inhiber leur activité et également, interférer dans leur coopération avec les cellules myéloïdes. Nous avons donc tenté de prolonger ces interactions LT/cellules myéloides dans le but d'entretenir la régression tumorale amorcée.

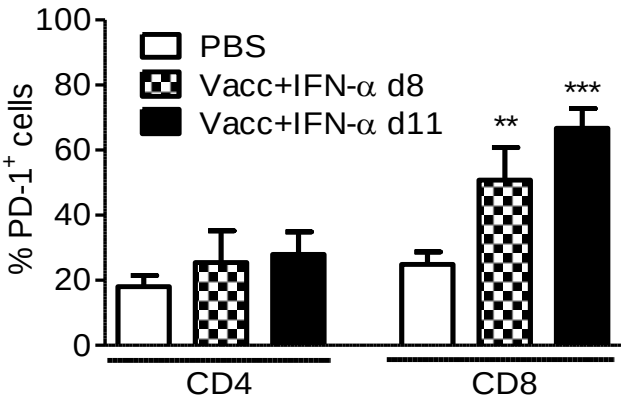


Figure 22 : Expression de PD-1 par les LT CD4⁺ et CD8⁺ infiltrant les tumeurs. L'expression de PD-1 a été analysée dans les conditions contrôles sans vaccination et aux jours 8 et 11 après le *priming*, parmi les populations LT CD4⁺ et LT CD8⁺.

Les effets de l'interaction PD-1/PD-L1 ne sont plus à démontrer, et il a été mis en évidence que le blocage de PD-1 pouvait améliorer les effets d'un vaccin dans le cadre du cancer (Fu et al. 2014). Depuis l'entrée en clinique du traitement par anti-PD1, les résultats montrent des réponses très encourageantes, mais il reste toutefois des patients pour lesquels ce traitement ne suffit pas. Comme nous l'avons vu en introduction, l'IFNα peut interférer de plusieurs façons, principalement positives, avec l'induction d'une réponse T. En revanche, il peut également induire l'expression PD1 et de PD-L1 sur les LT et cellules myéloïdes. Pour ces raisons, nous avons décidé de combiner l'IFNα à un anti-PD-1, pour tenter de prolonger la réponse immune anti-tumorale suite à la vaccination STxB-E7+IFNα.

1. La combinaison anti-PD-1/IFNα prévient l'échappement post-régression

Afin de pouvoir étudier cette phase d'échappement post-traitement, nous avons modifié le protocole de vaccination de notre modèle de régression tumorale, dans le but d'observer une efficacité moindre, et des échappements plus fréquents. Pour cela, les souris ont donc reçu un *prime* uniquement, sans *boost* ultérieur. Dans ces conditions, après une phase de régression, 2/3 des tumeurs échappent à nouveau au système immunitaire, et leur croissance repart à partir du jour 20 (Figure 23A). Pour contrecarrer cet échappement, nous avons traité les souris avec un anti-PD1, combiné à de l'IFNα. Les injections ont été faites au jour 14, une fois la phase de régression bien amorcée, puis aux jours 17 et 21. Dans ces conditions, au jour 40, seulement 14% des tumeurs échappent, contre 66% dans les conditions contrôles (Figures 23 A et B). Il faut noter que les traitements dissociés ont tous les deux des effets intermédiaires, avec environ 40% d'échappement. **Cela montre que la combinaison anti-PD-1/IFNα réduit fortement la probabilité d'échappement de la tumeur à la suite d'une phase de régression.**

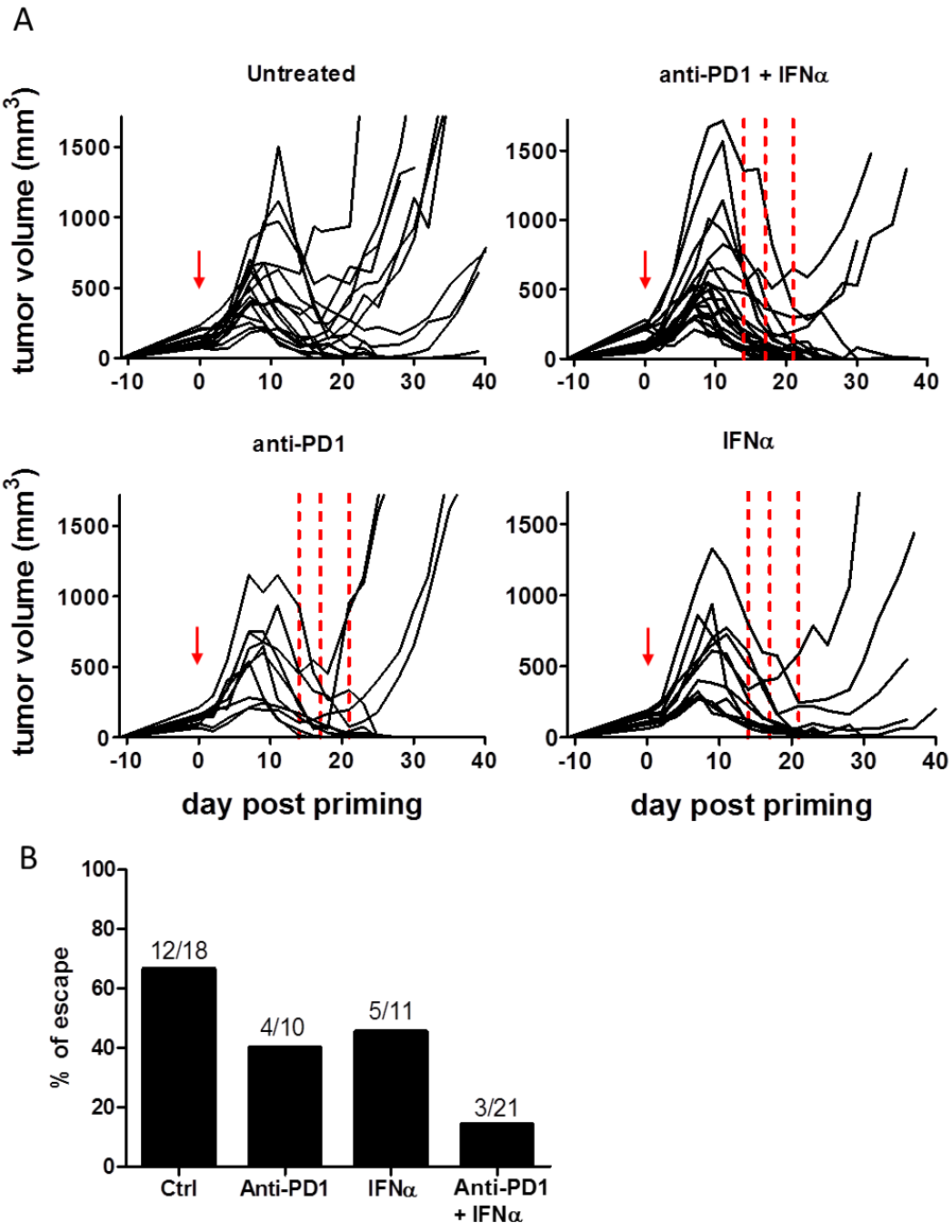


Figure 23 : La combinaison anti-PD1 + IFNα est efficace pour éviter l'échappement de la tumeur. Des souris C57Bl6/J porteuses de tumeurs TC1 ont été vaccinées une seule fois par le vaccin E7 + IFNα (flèche rouge) **A.** Aux jours 14, 17 et 21, les tumeurs en régression sont traitées avec un anti-PD1, de l'IFNα, ou par la combinaison des deux (Pointillés rouge). L'évolution des tumeurs a été suivie jusqu'au jour 40. **B.** Récapitulatif des résultats, montrant pour chaque condition le pourcentage et la fraction de tumeurs ayant échappé (p=0.01, Chi2 test).

2. La combinaison anti-PD-1/IFNα réactive les LT et les cellules myéloïdes

L'analyse préliminaire de l'infiltrat révèle que deux jours après la première injection (au jour 16), les LT $CD8^+$ constituent 30% des cellules vivantes suite aux traitements anti-PD-1, IFNα ou combinés, alors qu'ils ne représentaient que 5% des cellules vivantes dans la condition contrôle (*prime* seul à J16) (Figure 24A). La fréquence des LT $CD8^+$ qui expriment PD-1 passe alors de 65% à 90% suite aux différents traitements testés (Figure 24B). Les $CD11b^+$, quant à eux, représentent entre 4 et 9% des cellules vivantes, avec une augmentation (non significative) seulement lorsque l'IFNα a été injecté aux souris (données non montrées).

Concernant les cellules myéloïdes, approximativement 45% d'entre elles expriment PD-L1 dans les conditions contrôle, mais ce pourcentage double quasiment suite au traitement combiné, pour atteindre 80% (Figure 24C). L'IFNα seul induit une légère surexpression de ce ligand de PD-1 (60%), alors que l'anti-PD-1 n'a pas d'effet. L'expression du MHC II, qui reflète l'activation des cellules myéloïdes, est augmentée sur une fraction des cellules seulement, lorsque les deux agents sont combinés (Figure 24D). **Ces analyses révèlent que la combinaison anti-PD-1/IFNα permet le retour des LT $CD8^+$ dans la tumeur et la réactivation des LT et des cellules myéloïdes.**

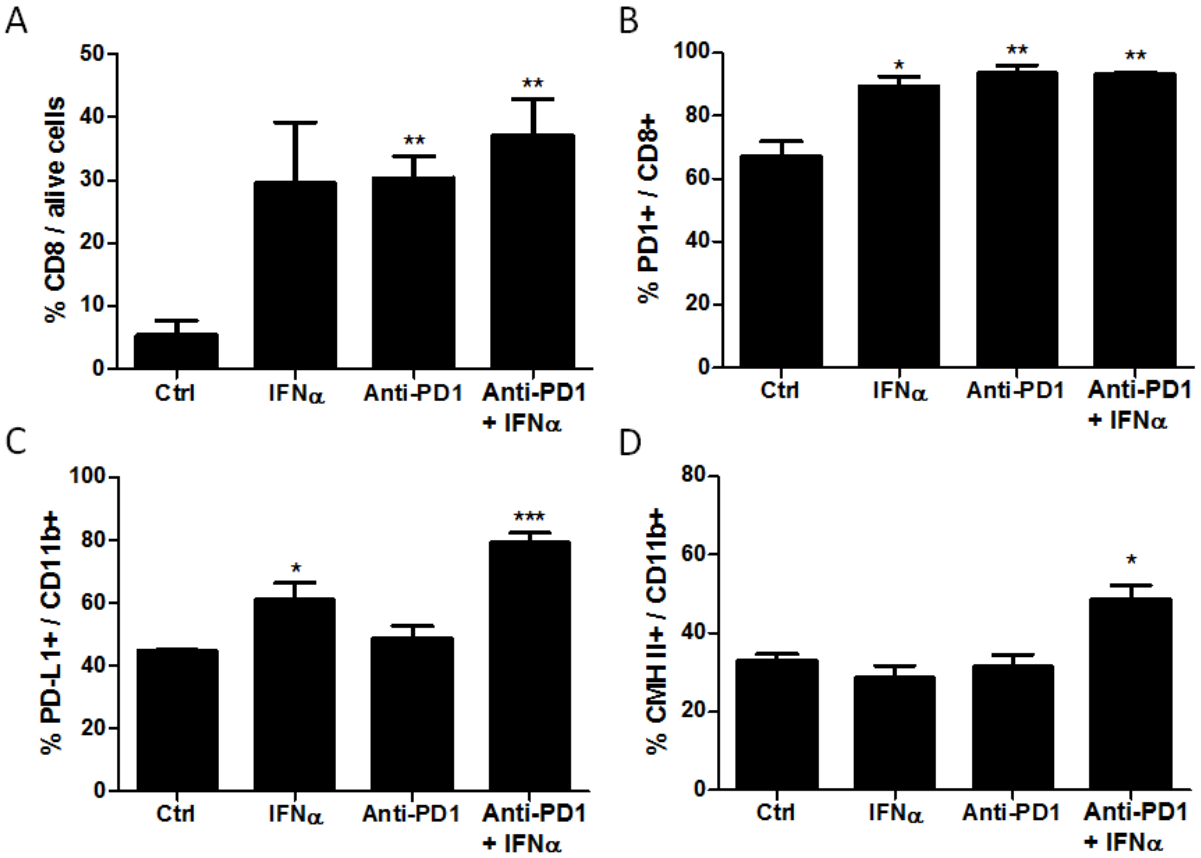


Figure 24 : La combinaison anti-PD-1 + IFNα réactive les cellules myéloïdes et lymphoïdes. Ces données montrent les moyennes d'expression à J16 sur 3 souris par groupe, issues d'une première expérience. Les graphiques montrent : **A.** la fréquence de LT CD8$^+$ parmi les cellules vivantes, **B.** la proportion de ces cellules qui expriment PD-1, **C.** le pourcentage des cellules CD11b$^+$ qui expriment PD-L1 et **D.** le pourcentage des cellules CD11b$^+$ qui expriment MHC II.

Ces données montrent que la combinaison anti-PD-1 + IFNα est efficace pour prévenir l'échappement tumoral à la suite d'une vaccination ayant une efficacité limitée. Les premières analyses de l'infiltrat immunitaire révèlent que les LT CD8$^+$ sont de nouveaux nombreux dans la tumeur après le début du traitement, et que presque tous expriment PD-1 à leur surface. De leur côté, les cellules myéloïdes, dont le nombre ne varie pas au jour 16 après les différents traitements, montrent une surexpression de PD-L1 et MHC II dans la condition du traitement combiné. D'autres investigations seront nécessaires pour démontrer la coopération cellules T / cellules myéloïdes qui pourrait être retrouvée suite à cette combinaison anti-PD1 + IFNα.

DISCUSSION

I. Régression tumorale déclenchée par la stimulation d'une coopération T/cellules myéloïdes?

1. Récapitulatif de la réponse immune mise en évidence pendant la régression tumorale

L'analyse cinétique de la réponse immunitaire induite par la vaccination contre l'antigène E7, en présence d'IFNα, nous a révélé que les cellules myéloïdes pouvaient jouer un rôle non négligeable, aux côtés des LT $CD8^+$ ciblés par le vaccin. Leur recrutement précoce, 5 jours après la vaccination, est associé aux surexpressions de CCL2 et Ly6C dans les tumeurs. Cela nous a mené à tester l'efficacité de la vaccination dans des souris CCR2-/-, et le résultat a confirmé que les cellules myéloïdes étaient en partie recrutées *via* CCR2. En outre, ces cellules contribuent clairement au recrutement ou à l'accumulation des LT dans la tumeur, car nous avons pu observer que la déplétion partielle des cellules myéloïdes inhibait une partie du recrutement des LT. Ce dernier est majoritairement dépendant de CXCL9 et CXCL10, étant donné qu'un faible nombre de cellules T infiltre des tumeurs de souris $CXCR3^{-/-}$. De manière inattendue, l'analyse de l'infiltrat myéloïde suite à une déplétion des cellules $CD8^+$ montre une absence d'activation des cellules myéloïdes (MHC II neg) en l'absence des cellules T. Ces résultats nous ont orientés vers la probabilité d'une activation des cellules myéloïdes par les LT, probablement dépendante de l'IFNγ. Et en effet, la faible efficacité de la vaccination de souris $IFN\gamma^{-/-}$ et le phénotype des cellules myéloïdes montre que l'indispensable activation des monocytes/macrophages est dépendante de cette cytokine. Les expériences de déplétion des macrophages montrent que la régression tumorale dépend de la présence des cellules myéloïdes activées au sein de la tumeur. Enfin, nous avons émis l'hypothèse que ces cellules myéloïdes infiltrantes pourraient avoir un rôle direct dans la cytotoxicité anti-tumorale. L'analyse *in vitro* de la cytotoxicité des cellules myéloïdes triées de tumeurs en progression ou en régression a confirmé le potentiel cytotoxique anti-tumoral des monocytes/macrophages lors de la régression tumorale. Enfin, alors que le blocage du NO n'inhibe pas l'activité cytotoxique de ces cellules, l'ajout d'un anticorps anti-TNFα affecte sérieusement l'action cytotoxique des cellules myéloïdes. La dimension cinétique de cette analyse a été cruciale et a permis de mettre en évidence le rôle d'autres cellules que les LT dans la réponse immune anti-tumorale. En effet, une analyse qui aurait porté uniquement sur la phase de régression n'aurait pas mené aux mêmes hypothèses. Cette étude nous permet de schématiser la réponse immune anti-tumorale à l'origine de la régression de la tumeur comme illustré en figure 25.

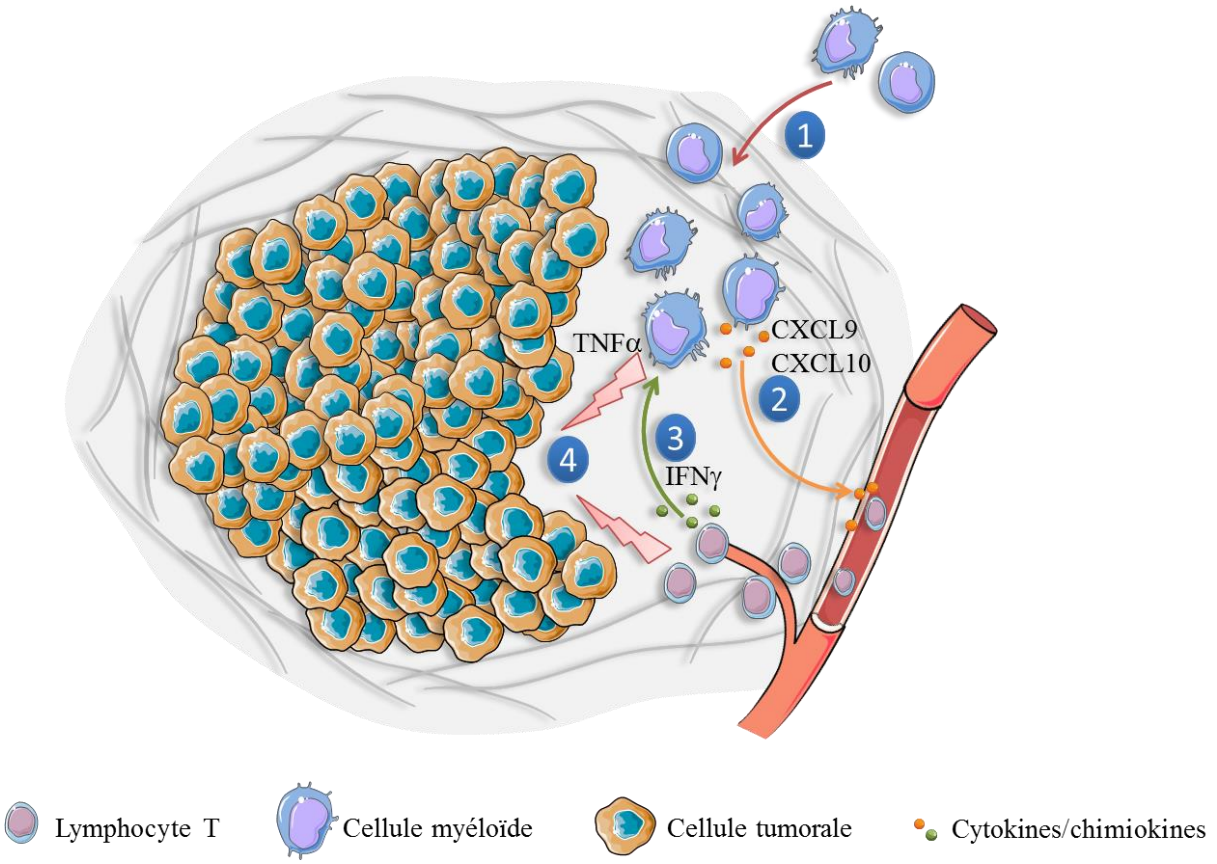


Figure 25 : Coopération lymphocytes T/cellules myéloïdes lors de la réponse immune anti-tumorale induite par la vaccination (Thoreau, Bercovici, and Trautmann 2016). La vaccination provoquant une régression tumorale implique une réponse immunitaire qui peut être schématisée ainsi : **(1)** une infiltration précoce de cellules myéloïdes fait suite à la vaccination, **(2)** ces monocytes/macrophages recrutent les lymphocytes T CD8$^+$ grâce à la production de CXCL9/CXCL10, **(3)** lymphocytes et cellules myéloïdes engagent une coopération dépendante de l'IFNγ aboutissant à l'activation myéloïde, **(4)** la régression tumorale est provoquée par la double cytotoxicité directe des lymphocytes T CD8 et des monocytes/macrophages (notamment *via* la sécrétion de TNFα).

2. Les traitements synergisent pour mimer une infection virale

En nous inspirant des travaux de W.Coley (Cann et al. 2003), nous avions pour objectif de stimuler le système immunitaire en mimant une infection virale. Dans ce cas, l'endocytose de la sous-unité non toxique de la toxine de Shiga et du peptide viral E7 combiné à l'administration d'IFNα déclencherait une réponse LT CD8$^+$ rapide, robuste et durable, dépendant d'interactions entre les acteurs de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. La stimulation est en effet efficace, et nous observons une réponse LT CD8$^+$ spécifique de l'antigène E7 (Figure 11 et 16D), alors que la tumeur TC1 n'est pas infiltrée par des LT CD8$^+$ avant vaccination (à la différence des LT CD4$^+$, présents, notamment en périphérie de tumeurs en progression). Concernant la cinétique de la réponse, elle est assez classique avec l'apparition d'une réponse LT CD8$^+$ plusieurs

jours après la vaccination, toutefois avec une première vague d'infiltration, discrète, mais fonctionnellement importante, à J5.

L'IFNα est bien connu pour la pléiotropie de ses actions et notamment son rôle dans l'initiation de la réponse antivirale (Isaacs and Lindenmann 1957; McNab et al. 2015), mais il est difficile de savoir quels éléments clés sont déclenchés par son injection. Cela dit, l'IFNα active les voies de signalisation de l'IFN de type 1 et alerte les cellules de l'immunité innée, notamment via l'induction de production de CCL2 qui va permettre d'attirer les monocytes en provenance de la moelle osseuse (Conrady et al. 2013; Salazar-Mather, Lewis, and Biron 2002). Nos données montrent qu'une injection intraveineuse d'IFNα combiné au vaccin STxB-E7 (injecté localement), ne déclenche pas de régression tumorale systématique (Figure 11E-F). Cela souligne l'importance de l'injection locale d'IFNα, probablement par l'induction d'une forte production de cytokines et chimiokines au niveau du site tumoral par les cellules résidentes, les cellules myéloïdes, les fibroblastes ou les cellules tumorales, lesquelles créent un gradient chimiokinique et favorisent le recrutement de cellules immunes (Lou et al. 2011). En plus de sensibiliser et recruter les acteurs de l'immunité innée, l'IFNα augmente le *priming* des LT, et favorise la présentation croisée, indépendamment des LT $CD4^+$ et de l'interaction CD40/CD40L (Agnes Le Bon et al. 2003; Agnes Le Bon et al. 2006). Cela peut expliquer en partie pourquoi dans notre modèle, la déplétion des LT $CD4^+$ ne perturbe pas la régression tumorale. Pourtant, l'administration de l'IFNα sans STxB-E7 n'est pas suffisante en soi pour perturber la progression tumorale (Figure 11C et F). Ces résultats pourraient sembler en contradiction avec une étude qui avait mis en évidence quelques cas de régressions tumorales après traitement à l'IFNα (Dubrot et al. 2011). Mais dans ces travaux, l'IFNα était injecté en intratumoral, traduisant très probablement l'effet direct de l'IFNα sur la croissance des cellules TC1, une inhibition que nous avons pu observer *in vitro* avec des doses croissantes d'IFNα ajoutées à des TC1 en culture (données non montrées). L'importance de l'injection péritumorale de l'IFNα rejoint pleinement les données de plusieurs études montrant l'importance de l'administration locale des adjuvants pour permettre une réponse anti-tumorale efficace, d'autant plus que l'injection systémique d'adjuvants comme l'IFNα peut être toxique à forte dose (De Palma et al. 2008; Kawarada et al. 2001). **Le fait que l'injection locale de l'IFNα soit importante suggère bien un rôle dans l'activation du microenvironnement et/ou le recrutement de cellules immunes, en mimant une infection locale.**

Le vaccin STxB favorise aussi la présentation croisée et cible préférentiellement une activation des LT $CD8^+$ (Haicheur et al. 2000; R. S. Lee et al. 1998). Le *priming* des LT $CD8^+$ spécifiques d'E7 par le vaccin seul n'est pas suffisant pour induire de manière systématique une régression tumorale, car l'ajout d'IFNα est indispensable à l'efficacité de cette stimulation (Figure 11). On observera que l'injection de STxB-E7 engendre une réponse bimodale, montrant soit des tumeurs toujours en progression, soit en régression, mais pas de cas intermédiaire (avec stabilisation de la croissance). Cela suggère un effet seuil suite à la vaccination, aboutissant à des variations de la masse tumorale répondant à un phénomène du « tout ou rien ». Cela me fait penser à la notion de seuil évoquée par exemple par G. Rizzuto, concernant le nombre de cellules T dans un transfert adoptif. Dans son cas, il était important de transférer un faible nombre de LT $CD8^+$ précurseurs, en dessous d'un certain seuil, pour éviter une compétition et pouvoir observer l'effet d'une vaccination anti-tumorale (Rizzuto et al. 2009). De manière intéressante, le même groupe a montré un effet inverse, avec la nécessité d'administrer une fréquence suffisante de précurseurs $CD4^+$ (au-dessus d'un certain seuil), pour induire leur différenciation en effecteurs et une réponse efficace (Malandro et al. 2016). Ces deux résultats ne sont cependant pas contradictoires. Il faut sans doute un minimum de LT précurseurs pour que ces cellules se différencient correctement dans un environnement hostile, mais pas nécessairement d'énormes quantités pour que ces LT puissent proliférer. Nous savons que l'injection du vaccin E7 seul n'induit pas de forte infiltration des LT $CD8^+$ (données préliminaires non montrées), mais il est possible que, dans de rares cas, « l'étincelle » évoquée par le groupe de P. Coulie (p.68) permettent le déclenchement d'une réponse anti-tumorale aboutissant à un effet net sur la croissance tumorale. En plus de jouer un rôle dans l'expansion de la réponse T, l'IFNα déclenche une inflammation locale, perturbe le microenvironnement tumoral immunosuppresseur difficile à renverser, et sensibilise ainsi les cellules de l'immunité innée. **Les multiples effets de l'IFNα combinés à la vaccination STxB-E7 peuvent alors expliquer la synergie d'action d'un tel traitement.**

Ces données sont en accord avec la littérature récente, de plus en plus optimiste quant au fait que la réponse immune anti-infectieuse pourrait être idéale pour provoquer la régression tumorale. Une revue du groupe d'E.Celis résume les données allant dans ce sens, et montre que mimer une infection virale pourrait constituer une stratégie vaccinale efficace (Sultan et al. 2016). Ils soulignent l'importance de la sélection des peptides, du choix des adjuvants ciblant des TLR, et le rôle de l'IFNα. Un autre paramètre étudié dans leurs études, est la voie d'administration. Ils avancent que (contrairement à nous), une injection i.v. du peptide serait plus efficace qu'en s.c, mais le peptide est injecté en association avec du poly(I:C) et parfois avec un anti-CD40 ce qui

leur permet sans doute d'éviter une forte présentation à des DC immatures et donc l'induction d'une tolérance. Pour ces raisons, nous n'avons pas injecté le vaccin STxB-E7 en i.v., car il y aurait de grands risques d'induire une tolérance immune contre l'antigène E7. D'autres études montrent l'importance de l'IFNα, comme celle de Krantz et al, évoquée dans la partie III de l'introduction. La vectorisation d'un ARN codant pour des antigènes viraux ou tumoraux par LPX (*lipoplex*) cible les DC, et provoque des régressions tumorales, dépendante de l'IFNα qui active ces APC (Kranz et al. 2016). C'est aussi le cas des chimiothérapies, comme la cyclophosphamide qui déclenche une production d'IFN de type 1 et réactive les DC (Schiavoni et al. 2011).

La synergie d'action des composés STxB-E7 et IFNα est en cours d'étude : nous avons généré des échantillons d'ARN de tumeurs de souris traitées avec les composés seuls ou combinés, et cela de manière cinétique. Une comparaison détaillée des expressions géniques sera faite afin de révéler quels peuvent être les éléments déclenchés par l'IFNα responsables de cette synergie d'action avec le vaccin, ou s'il est à l'origine de l'expression des cytokines responsables du recrutement des T comme CXCL9 et 10 dans notre modèle.

3. Les LT CD8$^+$, seuls effecteurs de la réponse anti-tumorale ?

Les données autour du rôle des LT soulèvent un paradoxe flagrant. En effet, alors que leur déplétion lors de la phase effectrice inhibe entièrement la régression tumorale (Figure 15A), une diminution conséquente de leur recrutement dans les tumeurs des souris CXCR3$^{-/-}$, n'empêche pas la régression (Figure 15D). Cela pourrait s'expliquer par les points suivants : 1) En plus d'un rôle effecteur direct, un minimum de TIL est requis pour agir indirectement et amplifier une réponse cytotoxique médiée par d'autres effecteurs 2) Les interactions nécessaires à la mise en place de l'élimination de la tumeur ont lieu dans les ganglions drainants, ce qui ne devrait pas être perturbé dans les souris CXCR3$^{-/-}$.

La présence des LT dans les tumeurs des souris CXCR3$^{-/-}$ suggère que plusieurs sous-populations de LT sont recrutées par différents facteurs solubles, comme le suggèrent les travaux du groupe de T. Gajewski montrant que CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5 peuvent aussi recruter les LT dans la tumeur (Harlin et al. 2009). Dans notre modèle, la majeure partie de ce recrutement est dépendante de CXCL9 et CXCL10 mais un résultat de l'analyse transcriptomique suggère que CCL3 (MIP-1α) et CCL5 (RANTES) pourraient être à l'origine du recrutement des cellules T observées dans les tumeurs CXCR3$^{-/-}$, *via* l'expression des récepteurs CCR1, CCR3, ou CCR5

(Figures 15E et F). Il serait très intéressant de caractériser et comparer l'état fonctionnel des TIL présents dans les souris CXCR3$^{-/-}$ et contrôles.

Comme je l'ai évoqué en introduction, des données de l'équipe de P. Bousso montrent que des LT cytotoxiques mettent plusieurs heures à éliminer une cellule tumorale (Breart et al. 2008). **Il parait alors très peu probable qu'une aussi faible fréquence de TIL dans les tumeurs induise à elle seule la régression tumorale, mais ces cellules ont sans doute des propriétés importantes, et agissent en coopération avec d'autres effecteurs.**

4. La coopération LT/cellules myéloïdes

Nos travaux montrent que les cellules myéloïdes peuvent contribuer, dans certains contextes inflammatoires, à une réponse immune anti-tumorale. Dans notre modèle, le vaccin STxB permet, en stimulant la différenciation de LT CD8$^+$ anti-E7, d'activer les cellules myéloïdes, sans doute grâce à la production d'IFNγ par les LT.

En effet, l'IFNγ active efficacement les cellules myéloïdes lorsqu'il est combiné à une interaction CD40/CD40L (Heusinkveld and van der Burg 2011). L'IFNγ joue bien un rôle central dans l'établissement de la réponse anti-tumorale dans notre modèle, car son absence bloque toute régression normalement induite par la combinaison vaccin E7 + IFNα, et inhibe totalement l'activation des cellules myéloïdes (Figure 19). La déplétion des cellules CD8$^+$ *in vivo* rappelle que celles-ci participent à l'activation des cellules myéloïdes (Figure 15A et 17C). Même si les cellules NK sont en général une source importante d'IFNγ, leur déplétion dans notre modèle n'affecte par la régression (données non montrés). L'ensemble de ces données suggère que les cellules myéloïdes, à la suite de la présentation de l'Ag E7 aux LT CD8$^+$, sont activées en partie par l'IFNγ produit par ces derniers. Pour vérifier cette hypothèse, il est envisageable de vacciner des souris MHC I$^{-/-}$, et d'effectuer un transfert adoptif de LT CD8$^+$ spécifiques de l'Ag E7 (pour pallier au défaut de *priming*), et d'observer l'effet de ce traitement en l'absence d'interactions antigène-spécifiques LT CD8$^+$/cellules myéloïdes. Je suppose que, dans ces conditions, une plus faible activation des cellules myéloïdes, due à l'absence d'interactions avec les LT CD8$^+$ et leur production d'IFNγ, devrait inhiber partiellement les effets du traitement, et nous devrions alors observer une fraction plus importante de souris dont les tumeurs ne régressent pas (comparé à la situation de transfert adoptif dans des souris contrôles).

Les données générées durant cette thèse suggèrent que l'activation LT $CD8^+$ et cellules myéloides se produisent, au moins en partie, au sein de la tumeur. Tout d'abord, dans les temps précoces après la vaccination, les cellules myéloïdes présentent des marqueurs d'activation tels que MHC II et CD86, en même temps que la première vague d'infiltration de LT $CD8^+$, peu abondants mais probablement capables de produire de l'IFNγ localement (Figures 13A et 20A). De plus, malgré la très faible fréquence de TIL à ce moment-là dans les tumeurs, ceux-ci sont fréquemment en contact avec des cellules myéloïdes $F4/80^+$ (Figure 14B). Enfin, il est peu probable que les cellules myéloïdes activées dans les ganglions par les LT $CD8^+$ migrent en retour dans la tumeur, mais il n'est pas exclu qu'une coopération similaire ait lieu également dans des ganglions drainants.

Ces résultats suggèrent fortement qu'une coopération entre les cellules T et les cellules myéloïdes est mise en place suite à la vaccination, notamment par la production d'IFNγ par les LT, qui active les cellules myéloïdes.

Ces données sont en accord avec d'autres études qui ont rapporté des phénomènes semblables lors de transferts adoptifs de LT, producteurs d'IFNγ (Hollenbaugh and Dutton 2006; Textor et al. 2014). Ces travaux montrent que l'activation des cellules myéloïdes est retrouvée dans le cadre d'autres immunothérapies comme l'ACT de TIL ou de *CAR T cells*. Le rôle des cellules de l'immunité innée a aussi été démontré lors de l'*immunoediting*, notamment grâce à la production d'IFNγ par les cellules NK, que les macrophages activés participaient à l'élimination des cellules tumorales (O'Sullivan et al. 2012). En revanche, aucune étude n'a mis en évidence un tel phénomène suite à une vaccination mimant une infection virale et surtout, ces études mettent peu l'accent sur l'importance de cette coopération positive entre cellules T et cellules myéloïdes. Finalement, rares sont les travaux qui évoquent la possibilité d'une coopération entre les cellules myéloïdes et les LT (Haabeth et al. 2011; Vicetti Miguel et al. 2010).

Nous avons montré que cette coopération engendrait la différenciation de cellules myéloïdes cytotoxiques. Lors de l'analyse de la cytotoxicité des cellules immunes triées à partir des tumeurs, il était logiquement attendu que l'ajout de LT $CD8^+$ devrait augmenter la cytotoxicité dans les co-cultures de myéloïdes et de cellules tumorales TC1 *in vitro*. Or, seule une fréquence élevée de LT $CD8^+$ augmentait légèrement la cytotoxicité (Figure 21D). Le fait que ces cellules ne proviennent pas de tumeurs, mais du ganglion drainant et de la rate, est à prendre en compte, car si les LT $CD8^+$ anti-E7 dans les tumeurs présentent environ 40% des TIL $CD8^+$ selon nos mesures lors de la régression, ils ne le sont qu'aux alentours de 10% dans les organes lymphoïdes secondaires

(pourcentages obtenus dans des expériences séparés). En revanche, ces LT ont moins de chance d'être anergiques que les TIL. Les conditions complexes rencontrées dans la tumeur, comme la proximité avec d'autres types cellulaires et l'environnement cytokine probablement moins restrictif, doivent participer à la coopération cellule T/cellule myéloïde, et peuvent également expliquer l'absence d'une meilleure cytotoxicité dans ces conditions.

Il serait intéressant de réaliser d'autres analyses de cytotoxicité *in vitro* cette fois à partir de TIL, soit ajoutés seuls à une culture TC1-GFP, soit en association avec les cellules F4/80$^+$ de tumeurs, à différents ratios. Ensuite, il serait très intéressant de reproduire ce type expérience en utilisant des TIL de souris déficientes pour la perforine. De ce fait, nous pourrions observer si l'effet en association avec les monocytes/macrophages est dû à une coopération ou bien à un effet additif des cytotoxicités.

Les LT CD4 *helper* infiltrent très peu les tumeurs après vaccination, et ont peu de chance d'être la source des interactions CD40/CD40L. Leur déplétion n'a d'ailleurs aucun effet sur la régression tumorale. En revanche, il est possible que les LT CD8$^+$ expriment CD40L, et engagent eux-mêmes cette interaction (Frentsch et al. 2013). Cela n'étant qu'une hypothèse, elle devrait être vérifiée, dans un premier temps par l'analyse de l'expression de CD40L à la surface des LT CD8$^+$, dans la tumeur et dans le ganglion drainant.

La coopération des LT CD8$^+$ avec les cellules myéloïdes est donc importante à deux niveaux : pour l'activation réciproque (activation par le TCR et production d'IFNγ) et également pour leur activité cytotoxique directe sur les cellules tumorales. Cette configuration pourrait être différente lors d'une réponse mettant en jeu les LT CD4$^+$. Pour répondre à cela, nous pourrions vacciner les souris avec le peptide long E7 (qui inclut un épitope CD4 et CD8), sans STxB qui cible uniquement une réponse CD8, accompagné d'un adjuvant. La réponse immune déclenchée par le peptide long, en l'absence de STxB, permettrait d'une part la présentation croisée aux LT CD8$^+$, mais stimulerait également les LT CD4$^+$. Dans ces conditions, le remplacement de la Shiga toxine par un autre adjuvant serait probablement accompagné d'une réponse plus « classique », avec une induction de LT CD8$^+$ cytotoxiques mais aussi de LT CD4$^+$ capables de soutenir la différenciation des LT CD8+, d'activer les APC par la production de cytokines et les interactions CD40/CD40L. Dans ce contexte, quelle que soit l'intensité de la réponse et de la régression tumorale, je pense que les macrophages pourraient être tout aussi bien activés et capables de cytotoxicité envers les cellules tumorales.

5. Le rôle des monocytes/macrophages

Habituellement, la présence des macrophages dans les tumeurs est considérée comme un facteur de mauvais pronostic dans de nombreux cancers. Dans certains modèles, il a été suggéré que l'élimination de ces cellules pouvait freiner la progression tumorale ou bien améliorer certaines thérapies (DeNardo et al. 2011; Lepique et al. 2009). Pourtant, notre étude montre que la présence de telles cellules est indispensable à la régression tumorale. Il faut en effet insister sur le fait que les données montrant le caractère pro-tumoral ou immunosuppresseur des monocytes/macrophages sont basées sur des analyses de tumeurs en progression. Or, nous nous plaçons ici dans un contexte particulier dans lequel la tumeur régresse, c'est pourquoi les données de la littérature ne doivent pas être considérées comme contradictoires avec nos conclusions sur la cytotoxicité des cellules myéloïdes intratumorales.

Les cellules myéloïdes activées sont nécessaires à la régression tumorale. En effet, dans notre modèle, leur déplétion par un inhibiteur du CSF1-R (PLX3397) qui permet d'éliminer les TAM, inhibe la régression tumorale (Figure 16). D'autres déplétions visant les cellules myéloïdes ont donné des résultats similaires, dans les souris $CCR2^{-/-}$, ou bien à la suite d'un traitement anti-Gr1 (données non montrées). Seule une stabilisation de la masse tumorale est généralement observée, suivie d'un échappement. Dans ces conditions, l'infiltrat T est un peu moins abondant (données non montrées), mais les données obtenues dans les souris $CXCR3^{-/-}$ suggèrent qu'une diminution partielle, même marquée, de cet infiltrat T ne supprime pas la régression tumorale. De plus, l'analyse par dextramères montre que l'administration du PLX3397 ne perturbe pas le *priming* car la fréquence de LT $CD8^+$ anti-E7 est semblable dans les souris ayant subi ou non une déplétion des cellules myéloïdes. **La déplétion partielle des TAM est donc délétère pour la régression tumorale, sans pour autant contrarier le *priming* des LT.**

Dans les tumeurs, les cellules productrices de TNFα sont en grande majorité les cellules myéloïdes (Figure 21D). Nous avons dans un premier temps montré que les cellules myéloïdes de tumeurs en régression produisaient davantage de TNFα *ex vivo* que les cellules myéloïdes de tumeurs en progression, spontanément ou après stimulation, ce qui nous a amené à analyser le potentiel cytotoxique de ces monocytes/macrophages (Figure 21A et C). L'activité anti-tumorale de ces cellules pendant la régression tumorale a d'abord été mise en évidence par des expériences *in vitro* sur des cellules $F4/80^+$ triées à partir de tumeurs en progression ou en régression. Les monocytes/macrophages provenant de tumeurs en régression, ont un profil de cellules activées et sont cytotoxiques envers les cellules tumorales. Cela dépend notamment du TNFα car son

blocage inhibe la cytotoxicité observée *in vitro* et retarde la régression tumorale *in vivo* (Figure 21E). Bien que d'autres études aient montré auparavant le potentiel anti-tumoral des macrophages, leur activation avait été ciblée spécifiquement, notamment par la stimulation de TLR9 et CD40 (Beatty et al. 2011; Buhtoiarov et al. 2011; Rakhmilevich et al. 2012; Shime et al. 2012). **Nos données montrent que les monocytes/macrophages de tumeurs en régression après vaccination sont capables d'éliminer les cellules tumorales par cytotoxicité directe.** Nous avons prévu de tenter d'observer en direct la mort des cellules tumorales causée pas les cellules myéloïdes, mais la durée nécessaire à observer ce phénomène en *live* reste à définir, ainsi que les conditions expérimentales précises. Un autre mécanisme de cytotoxicité utilisé par les macrophages, non testé durant ma thèse, est l'induction de TRAIL (*Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*). La liaison de TRAIL à des récepteurs de mort induit l'apoptose, et les macrophages peuvent aussi être cytotoxique via cette voie, et notamment après une stimulation par IFNα (Griffith et al. 1999). Il n'est donc pas exclu que TRAIL soit impliqué dans la mort des cellules tumorales médiée par les macrophages dans notre modèle.

A ma connaissance, l'observation de tels phénomènes chez l'homme n'a pas été démontrée. L'analyse de tumeurs en régression est délicate chez l'homme, éthiquement, car ces lésions en cours de régression sont rarement prélevées. Il est néanmoins envisageable de travailler sur des biopsies de mélanomes en régression (comme des métastases cutanées en transit, accessibles), comme par exemple à la suite de traitement anti-PD1. Dans ce cas, il serait très intéressant d'observer sur coupe paraffine ou congelée, la localisation de l'infiltrat myéloïde et des TIL, ainsi que les marqueurs d'activation des monocytes/macrophages ($CD68^{+}$) comme MHC II ou CD80/86. Il ne serait pas surprenant que dans ce contexte, probablement inflammatoire, les monocytes et macrophages affichent un profil de cellules activées, en contraste avec le profil immunosuppresseur de ce même type cellulaire dans des biopsies de tumeurs en progression.

En revanche, il est difficile de conclure quant à l'identité exacte des effecteurs myéloïdes. Dans notre modèle, il peut s'agir de monocytes ou de macrophages, car nos résultats montrent que les déplétions des monocytes (souris $CCR2^{-/-}$), ou des TAM et des monocytes inflammatoires (par le PLX3397) inhibaient la régression tumorale. La manière la plus simple pour répondre à cette question serait de trier les cellules myéloïdes par un protocole plus discriminant en distinguant les macrophages ($F4/80^{hi}/Ly6C^{neg}$) et les monocytes inflammatoires ($Ly6C^{hi}/F4/80^{int}$), par exemple à l'aide d'un trieur et non de billes magnétiques. L'analyse de leur cytotoxicité *in vitro* permettrait de savoir si l'une de ces populations est potentiellement plus cytotoxique que les autres dans les tumeurs en régression.

De même, nous ne connaissons pas l'origine des cellules myéloïdes présentes dans les tumeurs en régression, sont-elles la descendance de monocytes recrutés et différenciés ou bien s'agit-il de macrophages résidents en prolifération ? Nous pourrons répondre à cette question grâce à la mise en place d'un transfert adoptif de monocytes marqués, par exemple en injectant des cellules de souris CD45.1 dans des souris CD45.2. Cela permettra de suivre les cellules transférées, de savoir si elles infiltrent la tumeur après vaccination, et si elles se différencient en macrophages. L'éventuelle prolifération des macrophages au sein de la tumeur peut être observée par immunofluorescence ou par cytométrie, par exemple par un marquage des nucléotides (par exemple avec le Click-iT EdU) en injectant l'agent à différents temps avec le sacrifice des souris. Une autre possibilité d'investigation, plus complexe, serait d'utiliser des souris $CCR2^{RFP}$: $CX3CR1^{GFP}$, comme l'ont fait Yamasaki *et al* pour distinguer l'origine des macrophages lors d'encéphalomyélite auto-immune (Yamasaki et al. 2014). Il serait ainsi possible de différencier les cellules dérivées de monocytes $CCR2^{+}$, des cellules résidentes $CX3CR1^{+}$. Mon hypothèse est la suivante : nous verrions les deux, mais dans des proportions différentes. Des macrophages résidents sont très probablement présents et, je pense, prolifèrent à bas bruit notamment en réponse au CSF-1. Mais je suppose que parmi les monocytes issus de monocytes inflammatoires recrutés par CCR2, une partie d'entre eux se différencie en macrophages sous l'influence des facteurs environnementaux comme le GM-CSF.

Les macrophages devraient être cytotoxiques contre les cellules tumorales MHC I négatives, à la différence des LT $CD8^{+}$. Nous pourrions évaluer *in vivo* si les macrophages sont bien capables d'éliminer des cellules tumorales TC1 déficientes pour le MHC I, qu'il est possible de générer par exemple grâce à la technique des CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeat*). L'effet anti-tumoral observé serait alors indépendant de la cytotoxicité directe des LT $CD8^{+}$, et je m'attends à voir dans ces conditions une stabilisation transitoire de la tumeur suivie d'un échappement. Bien évidemment les NK pourraient avoir une activité anti-tumorale dans ces conditions, même si dans des souris greffées avec des TC1, nous avons observé que leur déplétion n'affecte pas la régression tumorale (données non montrées). Une autre investigation devrait être bientôt mise en œuvre dans l'équipe, par injection d'un mélange de cellules tumorales TC1-GFP et TC1-RFP MHC $I^{-/-}$. Suite à la vaccination, nous verrons par imagerie sur tranche de tumeurs quelles sont les cellules tumorales préférentiellement éliminées, les MHC I^{+} ou les MHC I^{-}. En fonction de la contribution relative des LT $CD8^{+}$ et des cellules myéloïdes, il sera intéressant de déterminer si nous obtenons toujours 100% de régression tumorale avec ces tumeurs mixtes. Il faudrait en parallèle s'assurer que les cellules myéloïdes peuvent toujours être

cytotoxiques contre les cellules tumorales MHC $I^{-/-}$, en réitérant le test de cytotoxicité *in vitro*, cette fois avec la lignée TC1 $MHCI^{-/-}$.

A l'image des macrophages dans les tissus sains, les monocytes/macrophages de la tumeur peuvent participer à la réponse immune anti-tumorale à différentes étapes : ils aident à attirer les LT car la déplétion par PLX3397 réduit leur recrutement, 2) ils participent à l'activation des TIL lors de la coopération LT/cellule myéloïde par la présentation antigénique locale, 3) ils ont une action cytotoxique directe contre les cellules tumorales, 4) ils peuvent phagocyter les débris cellulaires au niveau du site tumoral et 5) ils peuvent participer à la résolution de l'inflammation.

La mobilisation de ces différents types cellulaires présente donc plusieurs avantages : 1) l'activation des cellules myéloïdes leur confère un phénotype non propice aux activités immunosuppressives, 2) en plus de la cytotoxicité des TIL, dirigée contre les cellules tumorales MHC I^{+}, les cellules myéloïdes cytotoxiques peuvent éliminer les cellules dont l'expression du MHC I est diminuée par un phénomène de sélection.

II. La combinaison anti-PD-1 + IFNα évite l'échappement suite à une vaccination

Dans la seconde partie de mes travaux, je me suis attaché à prolonger l'efficacité de la vaccination afin d'inhiber la phase d'échappement tumoral. L'IFNα étant un élément nécessaire à la régression tumorale dans notre modèle, nous avons supposé que prolonger l'expression des gènes en aval de l'IFNα pourrait prévenir la rechute une fois la phase de régression amorcée (Figure 23). Cependant, il peut aussi, à forte dose, induire l'expression de PD-1 sur les macrophages et les LT (Cho et al. 2008; Terawaki et al. 2011). De plus, l'analyse cinétique de l'infiltrat immunitaire lors de la régression tumorale a révélé que les LT acquièrent progressivement l'expression de PD-1 durant la phase de régression (Figure 22). A la vue de ces données, l'ajout d'un anti-PD-1 nous est apparu comme une très bonne option pour bloquer l'anergie dépendante de PD-1 initiée soit par l'IFNα délivré localement soit par l'activation soutenue des TIL.

Le suivi des souris dans ces conditions montre que la combinaison de l'anti-PD-1 et de l'IFNα réduit la probabilité de rechute des tumeurs après régression (Figure 23). Dissociés, chacun des deux agents donne des résultats intermédiaires. L'effet intermédiaire de l'IFNα seul est explicable car, même s'il continue à améliorer le *priming* des T naïfs, si les effecteurs sont inhibés par PD-1 ou ne persistent pas, comme c'est le cas à J16 après le *priming*, le bénéfice de l'IFNα ne sera pas optimal. Les résultats de l'anti-PD-1 seul peuvent également s'expliquer car si les TIL ne persistent pas après la régression, l'anti-PD-1 aura peu d'effet car il agit surtout en « reboostant » les TIL, comme l'a montré l'étude de Tumeh *et al*, avec une corrélation entre l'efficacité du traitement anti-PD-1 et l'infiltrat T $CD8^+$ préexistant (Tumeh et al. 2014). De plus, le maintien de l'environnement inflammatoire grâce à l'IFNα local est très important.

L'analyse de l'infiltrat 2 jours après la première injection du traitement combiné ou dissocié montre que les LT $CD8^+$ sont de retour dans la tumeur et expriment fortement PD-1 dans toutes les conditions (Figure 24A). Ces LT ont donc été activés, mais ces résultats n'expliquent pas la différence observée sur la régression tumorale. Alors que la densité de l'infiltrat myéloïde ne varie pas (données non montrées), l'expression de PD-L1 à leur surface augmente aussi dans les conditions de traitements seuls, mais davantage avec la combinaison (Figure 24B). De plus c'est uniquement dans cette condition que l'expression de MHC II est augmentée parmi les $CD11b^+$, par rapport à des souris vaccinées n'ayant pas reçu l'anti-PD1 et l'IFNα. Il est possible que l'anti-PD-1 et l'IFNα associés permettent de prolonger le *priming* des T, une meilleure présentation

antigénique dans la tumeur, et une plus forte production d'IFNγ responsable de l'activation des cellules myéloïdes et de l'expression de PD-L1 à leur surface. Malheureusement la taille des échantillons récupérés à J16 (après un traitement aussi efficace) n'a pas permis d'étudier d'autres marqueurs « d' activation », comme CD69 pour les cellules T et CD80 ou CD86 pour les cellules myéloïdes, ou encore CD40. Cela devra être fait lorsque ces expériences seront reproduites.

Plusieurs questions peuvent se poser suite à ces résultats. Nous ne savons pas quelle est la conséquence de ce traitement sur le profil des monocytes/macrophages, et quel est leur état fonctionnel au moment du traitement. En effet, lors de l'étude de la régression tumorale, les macrophages ont été reprogrammés par la stimulation STxB-E7 + IFNα, et les analyses transcriptomiques montrent des marqueurs de type M1, et de type M2, surexprimés en même temps (Figure 20). Ces données ne sont pas en accord avec la polarisation classique M1/M2. Ce point a d'ailleurs récemment fait l'objet d'une étude transcriptomique poussée montrant qu'un spectre phénotypique pouvait être obtenu par différentes stimulations, formant un *continuum* entre ces deux profils M1 et M2 classiquement opposés (Xue et al. 2014). Le profil d'activation de ces macrophages devra être analysé lors de cette phase de régression transitoire possible grâce au *priming* seul, ainsi que durant la phase d'échappement, afin de constater un éventuel changement phénotypique de ces cellules, et des signes d'activité immunosuppressive de leur part. Cela ne serait pas surprenant, car suite à une réponse inflammatoire, les macrophages jouent un rôle important dans la résolution de l'inflammation, et il se peut que dans les temps tardifs de la régression tumorale, les variations du microenvironnement tumoral provoquent ce changement d'activité des macrophages. La comparaison des tumeurs en régression ou en rechute a déjà été faite suite à un ACT, montrant une augmentation de marqueur de monocytes et LT pendant la régression, et à l'inverse, une diminution de ces marqueurs pendant la rechute, mais le rôle des cellules myéloïdes n'y a pas été évoqué (Straetemans et al. 2015).

Au-delà de cette vision un peu simpliste des M1 *versus* M2, il me paraît important de préciser surtout la fonction des cellules myéloïdes lors de traitements combinés. En effet, je pense que la perte des propriétés anti-tumorales des cellules myéloïdes, causée par un microenvironnement propice à une réparation tissulaire après la régression est un élément clé de l'échappement ici observé. Il serait intéressant d'étudier la cytotoxicité des cellules myéloïdes dans les temps tardifs de la régression, et lors de l'échappement. Ces cellules perdent sans doute leur potentiel cytotoxique lors de la phase d'échappement, mais probablement déjà en amont. Le traitement avec l'anti-PD-1 et l'IFNα, soutenant l'activation des cellules myéloïdes, devrait ainsi prolonger leur activité cytotoxique et maintenir l'inflammation locale.

Ces résultats préliminaires suggèrent donc que la combinaison de l'anti-PD-1 et de l'IFNα après la phase de régression provoquée par le vaccin, entretienne la coopération et l'activité des effecteurs LT CD8$^+$ et des cellules myéloïdes et ainsi, prolonge la réponse anti-tumorale. Ce résultat pourrait être d'un grand intérêt pour les cliniciens qui cherchent à améliorer l'efficacité (en termes de % de répondeurs) des traitements anti-PD-1.

MATERIELS ET METHODES

Expérimentation animale

Les souris C57BL6/J ont été commandées aux laboratoires Charles River, et ont été stockées à l'animalerie EOPS de l'Institut Cochin. Les souris ont été entretenues par des techniciens experts en conformité avec l'association de la fédération des laboratoires européens de la science animale, et sous l'approbation du comité d'éthique d'expérimentation animale de Paris Descartes (CEEA34.ED.042.12).

Les lignées cellulaires TC1 et EG7 ont été maintenues en culture dans du RPMI complet, contenant 10% de SVF (GE Healthcare), des antibiotiques (penicilline 50U/ml, Streptomycine 50µg/ml, GIBCO), de la L-Glutamine (4mM, GIBCO) et du sodium pyruvate (1mM, GIBCO). La lignée TC1-GFP a été générée grâce à une infection de cellules TC1 par un lentivirus GFP (voir Thoreau et al., 2015).

Des souris âgées de 8 semaines ont reçu des injections de 10^5 cellules TC1 au niveau du flanc. Lorsque les tumeurs atteignent un diamètre approximatif de 6 mm (au bout de 10 jours), les souris sont vaccinées (J0, *priming*)) par une injection péritumorale de 20 µg de vaccin E7 (vaccin STxB-E7, Vingert et al. 2006) et 6.10^5 U d'IFNα (Le Bon et al. 2003), dans un volume total de 200µl. Les souris contrôles ont été injectées avec du PBS. Le lendemain, les souris vaccinées reçoivent la même dose d'IFNα. Ce protocole est répété une semaine après (J7, boost).Pour certaines expériences, nous avons utilisé des souris IFNγKO (en provenance de l'équipe d'O. Lantz, Institut Curie, Paris, France), des souris CXCR3KO (SigN, Singapour), et des souris CCR2KO (en provenance de l'équipe de T.Henry, CIRI Inserm, Lyon, France).

Pour la déplétion CD8, les souris ont été traitées tous les deux jours à partir du jour 5, par des injections intra-péritonéales de 200µl d'anticorps anti-CD8 (BioCcell, clone 53-6.72). Les anticorps anti-CD4 (BioXcell, clone GK1.5, 150 µg) et anti-TNFα (BioXcell, clone TN3-19.12, 300µg) ont été injectés tous les 3 jours à partir de J0. La déplétion des macrophages a été faite par le PLX3397 (Plexxikon), un inhibiteur de la signalisation du CSF1-R. Les souris ont été nourries avec de la nourriture contenant de PLX3397 (ou de la nourriture contrôle) juste après le *priming*. Avec ce traitement, la déplétion des macrophages est effective sous 2 à 3 jours (DeNardo 2011). L'oxyde nitrique a été bloqué par le L-NAME ajouté à l'eau de boisson des souris (500µg/ml, N5751 Sigma) à partir du *priming*, et renouvelé tous les deux jours. L'anticorps anti-PD-1 a été injecté en intrapéritonéal (200µg), aux jours 14, 17 et 21 après le *priming*, combiné à 6.10^5U d'IFNα injecté en péritumoral.

Analyse de l'infiltrat tumoral par cytométrie en flux

Les tumeurs TC1 sont dissociées mécaniquement puis incubées pendant 30 minutes à 37°C avec de la DNaseI (100µg/ml, Roche) et de la collagénase (1mg/ml, Roche). La suspension cellulaire est filtrée par des tamis (40µm) puis rincée plusieurs fois en PBS 2% SFV et 0.5mM EDTA. Les cellules (4.10^6) sont marquées dans des plaques 96 puits à fond rond par le marqueur de mort (blue fluorescent reactive dye, Invitrogen) pendant 20 minutes à température ambiante. Les récepteurs Fc sont bloqués avec un anti-FcR (anti-CD16/CD32, 5µg/ml, BD Pharmingen).

Les cellules sont ensuite marquées par un anti-Ly6C biotinylé (analyse myéloïde) ou un anti-TCRβ biotinylé (analyse lymphoïde), durant 15 minutes à 4°C sous agitation. Après deux lavages en PBS 2% SVF, les cellules sont marquées par les anticorps anti CD45.2-PerCP-Cy5.5, CD11b-APC, CD11c-PE-Cy7, NK1.1-PE, Streptavidine-Pacific Blue et Ly6G-FITC (analyse myéloïde), ou CD45.2-APC, IA/IE-PE, CD11b-FITC, CD11c-PE-Cy7, Streptavidine-Pacific Blue et F4/80-PerCP-Cy5.5 (analyse myéloïde bis), ou CD45.2-APC, CD4-Pacific Blue, CD8-APC-H7, Streptavidine-PE-Cy7, CD19-FITC, NK1.1-PerCP-Cy5.5 et TCRγδ-PE (analyse lymphoïde).

Les anticorps sont commandés chez BD Pharmingen, à l'exception du CD11b-APC, commandé chez eBiosciences. La détection des LT CD8+ anti-E7a été faite par un marquage dextramère PE-Kb/E7 (JA2195, Immudex), pendant 40 minutes à 4°C, suivit d'un marquage membranaire de CD8, CD4, NK, CD19 et CD45. Après un lavage en PBS, les cellules sont fixées en PFA 1%, puis stockées à 4°C en attendant l'acquisition au cytomètre LSR II (BD Bioscience).

Immunofluorescence sur tranches de tumeurs

Les tumeurs ou morceaux de tumeurs sont fixés durant la nuit en tampon PLP (Periodate-Lysine-Paraformaldéhyde) à 4°C. Les tranches de tumeurs sont réalisées comme il l'a été décrit précédemment (Asperti-Boursin, Real, Bismuth, Trautmann, & Donnadieu, 2007). Il est d'abord effectué un blocage des récepteurs Fc par un anti-FcR (BD Pharmingen), puis les tranches sont alors marquées 1h à température ambiante ou la nuit à 4°C avec les anticorps anti CD8-PerCp, CD45-APC, IA/IE-PE, CD11b-FITC, Ly6C-APC, CD31-biotine (tous en provenance de BD Pharmingen), fibronectine, gp38 et F4/80 biotinylés (tous de Biolegend), ou F4/80-PE (AbD Serotec). La détection d'anticorps primaires non couplés ou biotinylés a été faite en utilisant des anticorps anti-rat ou anti-lapin couplés à l'Alexa Fluor 488, 568 ou 647 (BD Pharmingen), ou de la streptavidine-Alexa Fluor 488 ou 647 (Invitrogen). Les tranches sont ensuite marquées dans un bain de Hoechst pendant 10 minutes à température ambiante. Les anticorps sont dilués en PBS

0.5% BSA 2% SVF. Les images sont obtenues sur par un microscope Spinning Disk équipé d'une caméra CoolSnap HQ2 (Photometrics) et d'objectifs 20x et 63x. Les images ont été acquises grâce au logiciel *MetaMorph* 7 (*Molecular Devices*), puis analysées sur le logiciel ImageJ.

Analyse transcriptomique

Les ARNs des tumeurs ont été extraits en utilisant le kit *RNeasy Mini kit* (Qiagen), et l'expression des gènes a été analysée par Nanostring. 36 pistes de données Nanostring sont traitée par le pilote Accelrys Pipeline. Pour plus de détails, voir Thoreau et.al, 2015.

Test de cytotoxicité des cellules myéloïdes de tumeur

Des cellules myéloïdes F4/80 sont purifiées à partir de suspension cellulaire, en utilisant un anticorps anti-F4/80 biotinylé (eBioscience), et des billes couplées à la streptavidine pour le tri sur Automacs (Miltenyi Biotec). Les cellules purifiées sont traitées 5minutes à 37°C par DNase (100µg/ml) pour enlever les débris cellulaires. La suspension cellulaire F4/80+ a une pureté supérieure à 90%. Les cellules myéloïdes purifiées (2.10^5) sont ajoutées à une monocouche de cellules TC1-GFP (2.10^4), et laissées en co-culture durant 48h à37°C. Le TNFα est bloqué par ajout d'un anticorps anti-TNFα (10µg/ml, Abcam). Les images sont obtenues sur un microscope inversé (TE2000-E ; Nikon), équipé d'un objectif 20x et du logiciel d'imagerie Metamorph.

Statistiques

Sans autres indications, les résultats sont exprimés en moyenne ± écart type, de 3 à 6 souris. Toutes les expériences ont été faites au moins deux fois, rapportant des résultats similaires. Les données ont été analysées sur le logiciel GraphPad Prism 5. La valeur *p* a été calculée par un t test de Student non apparié ou un ANOVA, ou encore le test de Tukey pour les comparaisons multiples. Les valeurs $p \leq 0.05$ sont considérées comme significatives.*$p < 0.05$; **$p < 0.01$; ***$p < 0.001$.

BIBLIOGRAPHIE

Adotevi, O., Vingert, B., Freyburger, L., Shrikant, P., Lone, Y.-C., Quintin-Colonna, F., … Tartour, E. (2007). B subunit of Shiga toxin-based vaccines synergize with alpha-galactosylceramide to break tolerance against self antigen and elicit antiviral immunity. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *179*(5), 3371–3379.

Ahmed, N., Brawley, V. S., Hegde, M., Robertson, C., Ghazi, A., Gerken, C., … Gottschalk, S. (2015). Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) –Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *Journal of Clinical Oncology*, *33*(15), 1688–1696. http://doi.org/10.1200/JCO.2014.58.0225

Alcántara-Hernández, M., Torres-Zárate, C., Pérez-Montesinos, G., Jurado-Santacruz, F., Domínguez-Gómez, M. A., Peniche-Castellanos, A., … Bonifaz, L. C. (2014). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 alpha impacts FoxP3 levels in mycosis fungoides--cutaneous T-cell lymphoma: clinical implications. *International Journal of Cancer*, *134*(9), 2136–2145. http://doi.org/10.1002/ijc.28546

Anguille, S., Smits, E. L., Lion, E., van Tendeloo, V. F., & Berneman, Z. N. (2014). Clinical use of dendritic cells for cancer therapy. *The Lancet Oncology*, *15*(7), e257–e267. http://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70585-0

Appay, V., Jandus, C., Voelter, V., Reynard, S., Coupland, S. E., Rimoldi, D., … Speiser, D. E. (2006). New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *177*(3), 1670–1678.

Aranda, F., Buqué, A., Bloy, N., Castoldi, F., Eggermont, A., Cremer, I., … Galluzzi, L. (2015). Trial Watch: Adoptive cell transfer for oncological indications. *Oncoimmunology*, *4*(11), e1046673. http://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1046673

Aranda, F., Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., … Galluzzi, L. (2013). Trial Watch. *Oncoimmunology*, *2*(12). http://doi.org/10.4161/onci.26621

Armand, P., Nagler, A., Weller, E. A., Devine, S. M., Avigan, D. E., Chen, Y.-B., … Gordon, L. I. (2013). Disabling Immune Tolerance by Programmed Death-1 Blockade With Pidilizumab After Autologous Hematopoietic Stem-Cell Transplantation for Diffuse Large B-Cell Lymphoma: Results of an International Phase II Trial. *Journal of Clinical Oncology*, *31*(33), 4199–4206. http://doi.org/10.1200/JCO.2012.48.3685

Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., & Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase- independent manner. *Journal of Experimental Medicine*, *204*(5), 1167–1179. http://doi.org/10.1084/jem.20062079

Attia, P., Phan, G. Q., Maker, A. V., Robinson, M. R., Quezado, M. M., Yang, J. C., … Rosenberg, S. A. (2005). Autoimmunity Correlates With Tumor Regression in Patients With Metastatic Melanoma Treated With Anti–Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4. *Journal of Clinical Oncology*, *23*(25), 6043–6053. http://doi.org/10.1200/JCO.2005.06.205

Avogadri, F., Zappasodi, R., Yang, A., Budhu, S., Malandro, N., Hirschhorn-Cymerman, D., … Merghoub, T. (2014). Combination of alphavirus replicon particle-based vaccination with immunomodulatory antibodies: therapeutic activity in the B16 melanoma mouse model and immune correlates. *Cancer Immunology Research*, *2*(5), 448–458. http://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0220

Azzi, S., Hebda, J. K., & Gavard, J. (2013). Vascular permeability and drug delivery in cancers. *Frontiers in Oncology*, *3*, 211. http://doi.org/10.3389/fonc.2013.00211

Bacher, N., Raker, V., Hofmann, C., Graulich, E., Schwenk, M., Baumgrass, R., … Steinbrink, K. (2013). Interferon-α suppresses cAMP to disarm human regulatory T cells. *Cancer Research*, *73*(18), 5647–5656. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3788

Badoual, C., Hans, S., Merillon, N., Van Ryswick, C., Ravel, P., Benhamouda, N., … Tartour, E. (2013). PD-1-expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. *Cancer Research*, *73*(1), 128–138. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2606

Bailey, C., Negus, R., Morris, A., Ziprin, P., Goldin, R., Allavena, P., … Darzi, A. (2007). Chemokine expression is associated with the accumulation of tumour associated macrophages (TAMs) and progression in human colorectal cancer. *Clinical & Experimental Metastasis*, *24*(2), 121–130. http://doi.org/10.1007/s10585-007-9060-3

Bald, T., Landsberg, J., Lopez-Ramos, D., Renn, M., Glodde, N., Jansen, P., … Tüting, T. (2014). Immune cell-poor melanomas benefit from PD-1 blockade after targeted type I IFN activation. *Cancer Discovery*, *4*(6), 674–687. http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0458

Banchereau, J., Palucka, A. K., Dhodapkar, M., Burkeholder, S., Taquet, N., Rolland, A., … Fay, J. (2001). Immune and Clinical Responses in Patients with Metastatic Melanoma to CD34+ Progenitor-derived Dendritic Cell Vaccine. *Cancer Research*, *61*(17), 6451–6458.

Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*(6673), 245–252. http://doi.org/10.1038/32588

Barber, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., … Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*, *439*(7077), 682–687. http://doi.org/10.1038/nature04444

Beatty, G. L., Chiorean, E. G., Fishman, M. P., Saboury, B., Teitelbaum, U. R., Sun, W., … Vonderheide, R. H. (2011). CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6024), 1612–1616. http://doi.org/10.1126/science.1198443

Beck, K. E., Blansfield, J. A., Tran, K. Q., Feldman, A. L., Hughes, M. S., Royal, R. E., … Yang, J. C. (2006). Enterocolitis in Patients With Cancer After Antibody Blockade of Cytotoxic

T-Lymphocyte–Associated Antigen 4. *Journal of Clinical Oncology*, *24*(15), 2283–2289. http://doi.org/10.1200/JCO.2005.04.5716

Bellone, M., Cantarella, D., Castiglioni, P., Crosti, M. C., Ronchetti, A., Moro, M., … Dellabona, P. (2000). Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *165*(5), 2651–2656.

Benlalam, H., Labarrière, N., Linard, B., Derré, L., Diez, E., Pandolfino, M. C., … Jotereau, F. (2001). Comprehensive analysis of the frequency of recognition of melanoma-associated antigen (MAA) by CD8 melanoma infiltrating lymphocytes (TIL): implications for immunotherapy. *European Journal of Immunology*, *31*(7), 2007–2015. http://doi.org/10.1002/1521-4141(200107)31:7<2007::AID-IMMU2007>3.0.CO;2-S

Bercovici, N., Haicheur, N., Massicard, S., Vernel-Pauillac, F., Adotevi, O., Landais, D., … Tartour, E. (2008). Analysis and characterization of antitumor T-cell response after administration of dendritic cells loaded with allogeneic tumor lysate to metastatic melanoma patients. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, *31*(1), 101–112. http://doi.org/10.1097/CJI.0b013e318159f5ba

Bissell, M. J., & Hines, W. C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine*, *17*(3), 320–329. http://doi.org/10.1038/nm.2328

Blachère, N. E., Morris, H. K., Braun, D., Saklani, H., Di Santo, J. P., Darnell, R. B., & Albert, M. L. (2006). IL-2 is required for the activation of memory CD8+ T cells via antigen cross-presentation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *176*(12), 7288–7300.

Blackburn, S. D., Shin, H., Haining, W. N., Zou, T., Workman, C. J., Polley, A., … Wherry, E. J. (2009). Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nature Immunology*, *10*(1), 29–37. http://doi.org/10.1038/ni.1679

Blank, C., Brown, I., Peterson, A. C., Spiotto, M., Iwai, Y., Honjo, T., & Gajewski, T. F. (2004). PD-L1/B7H-1 inhibits the effector phase of tumor rejection by T cell receptor (TCR) transgenic CD8+ T cells. *Cancer Research*, *64*(3), 1140–1145.

Bloy, N., Buqué, A., Aranda, F., Castoldi, F., Eggermont, A., Cremer, I., … Galluzzi, L. (2015). Trial watch: Naked and vectored DNA-based anticancer vaccines. *Oncoimmunology*, *4*(5), e1026531. http://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1026531

Boissonnas, A., Fetler, L., Zeelenberg, I. S., Hugues, S., & Amigorena, S. (2007). In vivo imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. *The Journal of Experimental Medicine*, *204*(2), 345–356. http://doi.org/10.1084/jem.20061890

Boissonnas, A., Licata, F., Poupel, L., Jacquelin, S., Fetler, L., Krumeich, S., … Combadière, C. (2013). CD8+ tumor-infiltrating T cells are trapped in the tumor-dendritic cell network. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *15*(1), 85–94.

Bönig, H., Banning, U., Hannen, M., Kim, Y. M., Verheyen, J., Mauz-Körholz, C., & Körholz, D. (1999). Transforming growth factor-beta1 suppresses interleukin-15-mediated interferon-gamma production in human T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, *50*(6), 612–618.

Breart, B., Lemaître, F., Celli, S., & Bousso, P. (2008). Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic activity during adoptive T cell therapy in mice. *Journal of Clinical Investigation*, *118*(4), 1390–1397. http://doi.org/10.1172/JCI34388

Brentjens, R. J., Latouche, J.-B., Santos, E., Marti, F., Gong, M. C., Lyddane, C., … Sadelain, M. (2003). Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nature Medicine*, *9*(3), 279–286. http://doi.org/10.1038/nm827

Brooks, D. G., Trifilo, M. J., Edelmann, K. H., Teyton, L., McGavern, D. B., & Oldstone, M. B. A. (2006). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nature Medicine*, *12*(11), 1301–1309. http://doi.org/10.1038/nm1492

Buhtoiarov, I. N., Sondel, P. M., Wigginton, J. M., Buhtoiarova, T. N., Yanke, E. M., Mahvi, D. A., & Rakhmilevich, A. L. (2011). Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages. *Immunology*, *132*(2), 226–239. http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03357.x

Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Progress in Experimental Tumor Research*, *13*, 1–27.

Burnet, M. (1957). Cancer—A Biological Approach. *British Medical Journal*, *1*(5022), 779–786.

Camisaschi, C., Casati, C., Rini, F., Perego, M., De Filippo, A., Triebel, F., … Castelli, C. (2010). LAG-3 expression defines a subset of CD4(+)CD25(high)Foxp3(+) regulatory T cells that are expanded at tumor sites. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(11), 6545–6551. http://doi.org/10.4049/jimmunol.0903879

Cann, H., A, S., Netten, V., P, J., & Van Netten, C. (2003). Dr William Coley and Tumour Regression: A Place in History or in the Future. *Postgraduate Medical Journal*, *79*(938), 672–680.

Carrasco, J., Van Pel, A., Neyns, B., Lethé, B., Brasseur, F., Renkvist, N., … Godelaine, D. (2008). Vaccination of a melanoma patient with mature dendritic cells pulsed with MAGE-3 peptides triggers the activity of nonvaccine anti-tumor cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *180*(5), 3585–3593.

Castle, J. C., Kreiter, S., Diekmann, J., Löwer, M., van de Roemer, N., de Graaf, J., … Sahin, U. (2012). Exploiting the mutanome for tumor vaccination. *Cancer Research*, *72*(5), 1081–1091. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3722

Celluzzi, C. M., Mayordomo, J. I., Storkus, W. J., Lotze, M. T., & Falo, L. D. (1996). Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(1), 283–287.

Chang, C.-H., Qiu, J., O'Sullivan, D., Buck, M. D., Noguchi, T., Curtis, J. D., … Pearce, E. L. (2015). Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell*, *162*(6), 1229–1241. http://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.016

Chapon, M., Randriamampita, C., Maubec, E., Badoual, C., Fouquet, S., Wang, S.-F., … Bercovici, N. (2011). Progressive Upregulation of PD-1 in Primary and Metastatic Melanomas Associated with Blunted TCR Signaling in Infiltrating T Lymphocytes. *J Invest Dermatol*, *131*(6), 1300–1307.

Chaturvedi, P., Gilkes, D. M., Takano, N., & Semenza, G. L. (2014). Hypoxia-inducible factor-dependent signaling between triple-negative breast cancer cells and mesenchymal stem cells promotes macrophage recruitment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(20), E2120-2129. http://doi.org/10.1073/pnas.1406655111

Chen, H.-M., Tanaka, N., Mitani, Y., Oda, E., Nozawa, H., Chen, J.-Z., … Takaoka, A. (2009). Critical role for constitutive type I interferon signaling in the prevention of cellular transformation. *Cancer Science*, *100*(3), 449–456. http://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.01051.x

Chen, H.-Y., Fermin, A., Vardhana, S., Weng, I.-C., Lo, K. F. R., Chang, E.-Y., … Liu, F.-T. (2009). Galectin-3 negatively regulates TCR-mediated CD4+ T-cell activation at the immunological synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(34), 14496–14501. http://doi.org/10.1073/pnas.0903497106

Chen, J. J. W., Lin, Y.-C., Yao, P.-L., Yuan, A., Chen, H.-Y., Shun, C.-T., … Yang, P.-C. (2005). Tumor-associated macrophages: the double-edged sword in cancer progression. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(5), 953–964. http://doi.org/10.1200/JCO.2005.12.172

Chikuma, S. (2016). Basics of PD-1 in self-tolerance, infection, and cancer immunity. *International Journal of Clinical Oncology*. http://doi.org/10.1007/s10147-016-0958-0

Cho, H.-Y., Lee, S.-W., Seo, S.-K., Choi, I.-W., Choi, I., & Lee, S.-W. (2008). Interferon-sensitive response element (ISRE) is mainly responsible for IFN-α-induced upregulation of programmed death-1 (PD-1) in macrophages. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, *1779*(12), 811–819. http://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2008.08.003

Chong, H. C., Tan, C. K., Huang, R.-L., & Tan, N. S. (2012). Matricellular proteins: a sticky affair with cancers. *Journal of Oncology*, *2012*, 351089. http://doi.org/10.1155/2012/351089

Clambey, E. T., McNamee, E. N., Westrich, J. A., Glover, L. E., Campbell, E. L., Jedlicka, P., … Eltzschig, H. K. (2012). Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the

mucosa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(41), E2784-2793. http://doi.org/10.1073/pnas.1202366109

Coffman, R. L., Sher, A., & Seder, R. A. (2010). Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*, *33*(4), 492–503. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.10.002

Coley, W. B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. *Annals of Surgery*, *14*(3), 199–220.

Conrady, C. D., Zheng, M., Mandal, N. A., van Rooijen, N., & Carr, D. J. J. (2013). IFN-α-driven CCL2 production recruits inflammatory monocytes to infection site in mice. *Mucosal Immunology*, *6*(1), 45–55. http://doi.org/10.1038/mi.2012.46

Corzo, C. A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M. J., Youn, J.-I., Cheng, P., … Gabrilovich, D. I. (2010). HIF-1α regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(11), 2439–2453. http://doi.org/10.1084/jem.20100587

Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., … Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature Medicine*, *10*(9), 942–949. http://doi.org/10.1038/nm1093

Dardalhon, V., Anderson, A. C., Karman, J., Apetoh, L., Chandwaskar, R., Lee, D. H., … Kuchroo, V. K. (2010). Tim-3/galectin-9 pathway: regulation of Th1 immunity through promotion of CD11b+Ly-6G+ myeloid cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *185*(3), 1383–1392. http://doi.org/10.4049/jimmunol.0903275

Davila, M. L., Riviere, I., Wang, X., Bartido, S., Park, J., Curran, K., … Brentjens, R. (2014). Efficacy and Toxicity Management of 19-28z CAR T Cell Therapy in B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Science Translational Medicine*, *6*(224), 224ra25-224ra25. http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008226

De Palma, M., Mazzieri, R., Politi, L. S., Pucci, F., Zonari, E., Sitia, G., … Naldini, L. (2008). Tumor-targeted interferon-alpha delivery by Tie2-expressing monocytes inhibits tumor growth and metastasis. *Cancer Cell*, *14*(4), 299–311. http://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.09.004

Delorme, E. J., & Alexander, P. (1964). Originally published as Volume 2, Issue 7351TREATMENT OF PRIMARY FIBROSARCOMA IN THE RAT WITH IMMUNE LYMPHOCYTES. *The Lancet*, *284*(7351), 117–120. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)90126-6

Demaria, O., De Gassart, A., Coso, S., Gestermann, N., Di Domizio, J., Flatz, L., … Gilliet, M. (2015). STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(50), 15408–15413. http://doi.org/10.1073/pnas.1512832112

Demotte, N., Stroobant, V., Courtoy, P. J., Van Der Smissen, P., Colau, D., Luescher, I. F., … van der Bruggen, P. (2008). Restoring the association of the T cell receptor with CD8 reverses anergy in human tumor-infiltrating lymphocytes. *Immunity*, *28*(3), 414–424. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.01.011

Demotte, N., Wieërs, G., Van Der Smissen, P., Moser, M., Schmidt, C., Thielemans, K., … van der Bruggen, P. (2010). A galectin-3 ligand corrects the impaired function of human CD4 and CD8 tumor-infiltrating lymphocytes and favors tumor rejection in mice. *Cancer Research*, *70*(19), 7476–7488. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-0761

DeNardo, D. G., Brennan, D. J., Rexhepaj, E., Ruffell, B., Shiao, S. L., Madden, S. F., … Coussens, L. M. (2011). Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. *Cancer Discovery*, *1*(1), 54–67. http://doi.org/10.1158/2159-8274.CD-10-0028

Deng, B., Zhu, J.-M., Wang, Y., Liu, T.-T., Ding, Y.-B., Xiao, W.-M., … Shen, X.-Z. (2013). Intratumor hypoxia promotes immune tolerance by inducing regulatory T cells via TGF-β1 in gastric cancer. *PloS One*, *8*(5), e63777. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0063777

Díaz-Montero, C. M., El Naggar, S., Al Khami, A., El Naggar, R., Montero, A. J., Cole, D. J., & Salem, M. L. (2008). Priming of naive CD8+ T cells in the presence of IL-12 selectively enhances the survival of CD8+CD62Lhi cells and results in superior anti-tumor activity in a tolerogenic murine model. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *57*(4), 563–572. http://doi.org/10.1007/s00262-007-0394-0

Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*, *1*(6), 447–456.

Dolcetti, L., Peranzoni, E., Ugel, S., Marigo, I., Fernandez Gomez, A., Mesa, C., … Bronte, V. (2010). Hierarchy of immunosuppressive strength among myeloid-derived suppressor cell subsets is determined by GM-CSF. *European Journal of Immunology*, *40*(1), 22–35. http://doi.org/10.1002/eji.200939903

Dong, H., Strome, S. E., Salomao, D. R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D. B., … Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature Medicine*, *8*(8), 793–800. http://doi.org/10.1038/nm730

Donnelly, O. G., Errington-Mais, F., Steele, L., Hadac, E., Jennings, V., Scott, K., … Melcher, A. A. (2013). Measles virus causes immunogenic cell death in human melanoma. *Gene Therapy*, *20*(1), 7–15. http://doi.org/10.1038/gt.2011.205

Dubrot, J., Palazón, A., Alfaro, C., Azpilikueta, A., Ochoa, M. C., Rouzaut, A., … Melero, I. (2011). Intratumoral injection of interferon-α and systemic delivery of agonist anti-CD137 monoclonal antibodies synergize for immunotherapy. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *128*(1), 105–118. http://doi.org/10.1002/ijc.25333

Dudda, J. C., Simon, J. C., & Martin, S. (2004). Dendritic Cell Immunization Route Determines CD8+ T Cell Trafficking to Inflamed Skin: Role for Tissue Microenvironment and Dendritic Cells in Establishment of T Cell-Homing Subsets. *The Journal of Immunology*, *172*(2), 857–863. http://doi.org/10.4049/jimmunol.172.2.857

Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., … Rosenberg, S. A. (2002). Cancer Regression and Autoimmunity in Patients After Clonal Repopulation with Antitumor Lymphocytes. *Science*, *298*(5594), 850–854. http://doi.org/10.1126/science.1076514

Dudley, M. E., Yang, J. C., Sherry, R., Hughes, M. S., Royal, R., Kammula, U., … Rosenberg, S. A. (2008). Adoptive Cell Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens. *Journal of Clinical Oncology*, *26*(32), 5233–5239. http://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.5449

Dudziak, D., Kamphorst, A. O., Heidkamp, G. F., Buchholz, V. R., Trumpfheller, C., Yamazaki, S., … Nussenzweig, M. C. (2007). Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, *315*(5808), 107–111. http://doi.org/10.1126/science.1136080

Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, *3*(11), 991–998. http://doi.org/10.1038/ni1102-991

Dunn, G. P., Sheehan, K. C. F., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2005). IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression. *Cancer Research*, *65*(8), 3447–3453. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-4316

Dvorak, H. F. (2015). Tumors: wounds that do not heal-redux. *Cancer Immunology Research*, *3*(1), 1–11. http://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0209

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Chemotherapie. *Berichte Der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, *42*(1), 17–47. http://doi.org/10.1002/cber.19090420105

Ejrnaes, M., Filippi, C. M., Martinic, M. M., Ling, E. M., Togher, L. M., Crotty, S., & von Herrath, M. G. (2006). Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(11), 2461–2472. http://doi.org/10.1084/jem.20061462

Engel, A. M., Svane, I. M., Mouritsen, S., Rygaard, J., Clausen, J., & Werdelin, O. (1996). Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, *104*(9), 629–639.

Engelhardt, J. J., Boldajipour, B., Beemiller, P., Pandurangi, P., Sorensen, C., Werb, Z., … Krummel, M. F. (2012). Marginating dendritic cells of the tumor microenvironment

cross-present tumor antigens and stably engage tumor-specific T cells. *Cancer Cell*, *21*(3), 402–417. http://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.008

Eruslanov, E., Neuberger, M., Daurkin, I., Perrin, G. Q., Algood, C., Dahm, P., … Kusmartsev, S. (2012). Circulating and tumor-infiltrating myeloid cell subsets in patients with bladder cancer. *International Journal of Cancer*, *130*(5), 1109–1119. http://doi.org/10.1002/ijc.26123

Erwig, L.-P., & Henson, P. M. (2007). Clearance of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death & Differentiation*, *15*(2), 243–250. http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402184

Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I. S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L.-P., … Coukos, G. (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature*, *475*(7355), 226–230. http://doi.org/10.1038/nature10169

Foley, E. J. (1953). Antigenic Properties of Methylcholanthrene-induced Tumors in Mice of the Strain of Origin. *Cancer Research*, *13*(12), 835–837.

Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*, *57*, 1–18. http://doi.org/10.1146/annurev.med.57.121304.131306

Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Wu, L., & Engleman, E. G. (2001). Dendritic Cells Injected Via Different Routes Induce Immunity in Cancer Patients. *The Journal of Immunology*, *166*(6), 4254–4259. http://doi.org/10.4049/jimmunol.166.6.4254

Forbes, S. J., & Rosenthal, N. (2014). Preparing the ground for tissue regeneration: from mechanism to therapy. *Nature Medicine*, *20*(8), 857–869. http://doi.org/10.1038/nm.3653

Fourcade, J., Sun, Z., Benallaoua, M., Guillaume, P., Luescher, I. F., Sander, C., … Zarour, H. M. (2010). Upregulation of Tim-3 and PD-1 expression is associated with tumor antigen-specific CD8+ T cell dysfunction in melanoma patients. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(10), 2175–2186. http://doi.org/10.1084/jem.20100637

Fransen, M. F., Sluis, T. C. van der, Ossendorp, F., Arens, R., & Melief, C. J. M. (2013). Controlled Local Delivery of CTLA-4 Blocking Antibody Induces CD8+ T-Cell–Dependent Tumor Eradication and Decreases Risk of Toxic Side Effects. *Clinical Cancer Research*, *19*(19), 5381–5389. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0781

Frantz, C., Stewart, K. M., & Weaver, V. M. (2010). The extracellular matrix at a glance. *Journal of Cell Science*, *123*(Pt 24), 4195–4200. http://doi.org/10.1242/jcs.023820

Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., … Honjo, T. (2000). Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(7), 1027–1034. http://doi.org/10.1084/jem.192.7.1027

Frentsch, M., Stark, R., Matzmohr, N., Meier, S., Durlanik, S., Schulz, A. R., … Thiel, A. (2013). CD40L expression permits CD8+ T cells to execute immunologic helper functions. *Blood*, *122*(3), 405–412. http://doi.org/10.1182/blood-2013-02-483586

Fu, J., Malm, I.-J., Kadayakkara, D. K., Levitsky, H., Pardoll, D., & Kim, Y. J. (2014). Preclinical evidence that PD1 blockade cooperates with cancer vaccine TEGVAX to elicit regression of established tumors. *Cancer Research*, *74*(15), 4042–4052. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2685

Fuertes, M. B., Kacha, A. K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D. M., Murphy, K. M., & Gajewski, T. F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *208*(10), 2005–2016. http://doi.org/10.1084/jem.20101159

Fukumori, T., Takenaka, Y., Yoshii, T., Kim, H.-R. C., Hogan, V., Inohara, H., … Raz, A. (2003). CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. *Cancer Research*, *63*(23), 8302–8311.

Gabrilovich, D. I., & Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nature Reviews. Immunology*, *9*(3), 162–174. http://doi.org/10.1038/nri2506

Gautier, G., Humbert, M., Deauvieau, F., Scuiller, M., Hiscott, J., Bates, E. E. M., … Garrone, P. (2005). A type I interferon autocrine–paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(9), 1435–1446. http://doi.org/10.1084/jem.20041964

Gauvrit, A., Brandler, S., Sapede-Peroz, C., Boisgerault, N., Tangy, F., & Gregoire, M. (2008). Measles virus induces oncolysis of mesothelioma cells and allows dendritic cells to cross-prime tumor-specific CD8 response. *Cancer Research*, *68*(12), 4882–4892. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6265

Germeau, C., Ma, W., Schiavetti, F., Lurquin, C., Henry, E., Vigneron, N., … Coulie, P. G. (2005). High frequency of antitumor T cells in the blood of melanoma patients before and after vaccination with tumor antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(2), 241–248. http://doi.org/10.1084/jem.20041379

Gibney, G. T., Kudchadkar, R. R., DeConti, R. C., Thebeau, M. S., Czupryn, M. P., Tetteh, L., … Weber, J. S. (2015). Safety, correlative markers, and clinical results of adjuvant nivolumab in combination with vaccine in resected high-risk metastatic melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(4), 712–720. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-2468

Gilham, D. E., Debets, R., Pule, M., Hawkins, R. E., & Abken, H. (2012). CAR-T cells and solid tumors: tuning T cells to challenge an inveterate foe. *Trends in Molecular Medicine*, *18*(7), 377–384. http://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.04.009

Ginhoux, F., Schultze, J. L., Murray, P. J., Ochando, J., & Biswas, S. K. (2016). New insights into the multidimensional concept of macrophage ontogeny, activation and function. *Nature Immunology*, *17*(1), 34–40. http://doi.org/10.1038/ni.3324

Goedegebuure, P., Mitchem, J. B., Porembka, M. R., Tan, M. C. B., Belt, B. A., Wang-Gillam, A., … Linehan, D. C. (2011). Myeloid-derived suppressor cells: general characteristics and relevance to clinical management of pancreatic cancer. *Current Cancer Drug Targets*, *11*(6), 734–751.

Golden-Mason, L., Palmer, B. E., Kassam, N., Townshend-Bulson, L., Livingston, S., McMahon, B. J., … Rosen, H. R. (2009). Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *Journal of Virology*, *83*(18), 9122–9130. http://doi.org/10.1128/JVI.00639-09

Goldszmid, R. S., & Trinchieri, G. (2012). The price of immunity. *Nature Immunology*, *13*(10), 932–938. http://doi.org/10.1038/ni.2422

Griffith, T. S., Wiley, S. R., Kubin, M. Z., Sedger, L. M., Maliszewski, C. R., & Fanger, N. A. (1999). Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. The Journal of Experimental Medicine, 189(8), 1343–1354.

Gross, G., Waks, T., & Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(24), 10024–10028.

Guillerme, J.-B., Boisgerault, N., Roulois, D., Ménager, J., Combredet, C., Tangy, F., … Gregoire, M. (2013). Measles virus vaccine-infected tumor cells induce tumor antigen cross-presentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *19*(5), 1147–1158. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2733

Guillot, B., Portalès, P., Thanh, A. D., Merlet, S., Dereure, O., Clot, J., & Corbeau, P. (2005). The expression of cytotoxic mediators is altered in mononuclear cells of patients with melanoma and increased by interferon-alpha treatment. *The British Journal of Dermatology*, *152*(4), 690–696. http://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2005.06512.x

Haabeth, O. A. W., Lorvik, K. B., Hammarström, C., Donaldson, I. M., Haraldsen, G., Bogen, B., & Corthay, A. (2011). Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nature Communications*, *2*, 240. http://doi.org/10.1038/ncomms1239

Haicheur, N., Bismuth, E., Bosset, S., Adotevi, O., Warnier, G., Lacabanne, V., … Tartour, E. (2000). The B subunit of Shiga toxin fused to a tumor antigen elicits CTL and targets dendritic cells to allow MHC class I-restricted presentation of peptides derived from exogenous antigens. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *165*(6), 3301–3308.

Hamanishi, J., Mandai, M., Iwasaki, M., Okazaki, T., Tanaka, Y., Yamaguchi, K., … Fujii, S. (2007). Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(9), 3360–3365. http://doi.org/10.1073/pnas.0611533104

Hamanishi, J., Mandai, M., Matsumura, N., Abiko, K., Baba, T., & Konishi, I. (2016). PD-1/PD-L1 blockade in cancer treatment: perspectives and issues. *International Journal of Clinical Oncology*, *21*(3), 462–473. http://doi.org/10.1007/s10147-016-0959-z

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57–70.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674. http://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

Harlin, H., Meng, Y., Peterson, A. C., Zha, Y., Tretiakova, M., Slingluff, C., … Gajewski, T. F. (2009). Chemokine expression in melanoma metastases associated with CD8+ T-cell recruitment. *Cancer Research*, *69*(7), 3077–3085. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-2281

Helmich, B. K., & Dutton, R. W. (2001). The role of adoptively transferred CD8 T cells and host cells in the control of the growth of the EG7 thymoma: factors that determine the relative effectiveness and homing properties of Tc1 and Tc2 effectors. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *166*(11), 6500–6508.

Herbst, R. S., Soria, J.-C., Kowanetz, M., Fine, G. D., Hamid, O., Gordon, M. S., … Hodi, F. S. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*, *515*(7528), 563–567. http://doi.org/10.1038/nature14011

Heuff, G., Oldenburg, H. S., Boutkan, H., Visser, J. J., Beelen, R. H., Van Rooijen, N., … Meyer, S. (1993). Enhanced tumour growth in the rat liver after selective elimination of Kupffer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *37*(2), 125–130.

Heusinkveld, M., & van der Burg, S. H. (2011). Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *Journal of Translational Medicine*, *9*, 216. http://doi.org/10.1186/1479-5876-9-216

Hinz, B., Phan, S. H., Thannickal, V. J., Prunotto, M., Desmoulière, A., Varga, J., … Gabbiani, G. (2012). Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *The American Journal of Pathology*, *180*(4), 1340–1355. http://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.02.004

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., … Urba, W. J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England Journal of Medicine*, *363*(8), 711–723. http://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466

Hollenbaugh, J. A., & Dutton, R. W. (2006). IFN-γ Regulates Donor CD8 T Cell Expansion, Migration, and Leads to Apoptosis of Cells of a Solid Tumor. *The Journal of Immunology*, *177*(5), 3004–3011.

Hollenbaugh, J. A., Reome, J., Dobrzanski, M., & Dutton, R. W. (2004). The rate of the CD8-dependent initial reduction in tumor volume is not limited by contact-dependent perforin, Fas ligand, or TNF-mediated cytolysis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *173*(3), 1738–1743.

HOLTL, L., RIESER, C., PAPESH, C., RAMONER, R., HEROLD, M., KLOCKER, H., … THURNHER, M. (1999). CELLULAR AND HUMORAL IMMUNE RESPONSES IN PATIENTS WITH METASTATIC RENAL CELL CARCINOMA AFTER VACCINATION WITH ANTIGEN PULSED DENDRITIC CELLS. *The Journal of Urology*, *161*(3), 777–782. http://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)61767-1

Høye, A. M., & Erler, J. T. (2016). Structural ECM components in the pre-metastatic and metastatic niche. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, ajpcell.00326.2015. http://doi.org/10.1152/ajpcell.00326.2015

Huang, A., Zhang, B., Wang, B., Zhang, F., Fan, K.-X., & Guo, Y.-J. (2013). Increased CD14(+)HLA-DR (-/low) myeloid-derived suppressor cells correlate with extrathoracic metastasis and poor response to chemotherapy in non-small cell lung cancer patients. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *62*(9), 1439–1451. http://doi.org/10.1007/s00262-013-1450-6

Huang, X., Venet, F., Wang, Y. L., Lepape, A., Yuan, Z., Chen, Y., … Ayala, A. (2009). PD-1 expression by macrophages plays a pathologic role in altering microbial clearance and the innate inflammatory response to sepsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(15), 6303–6308. http://doi.org/10.1073/pnas.0809422106

Huard, B., Tournier, M., Hercend, T., Triebel, F., & Faure, F. (1994). Lymphocyte-activation gene 3/major histocompatibility complex class II interaction modulates the antigenic response of CD4+ T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, *24*(12), 3216–3221. http://doi.org/10.1002/eji.1830241246

Hughes, R. C. (1999). Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1473*(1), 172–185.

Hurwitz, A. A., Yu, T. F., Leach, D. R., & Allison, J. P. (1998). CTLA-4 blockade synergizes with tumor-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for treatment of an experimental mammary carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(17), 10067–10071.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., … Steinman, R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *The Journal of Experimental Medicine*, *176*(6), 1693–1702.

Inaba, K., Metlay, J. P., Crowley, M. T., & Steinman, R. M. (1990). Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *The Journal of Experimental Medicine*, *172*(2), 631–640. http://doi.org/10.1084/jem.172.2.631

Isaacs, A., & Lindenmann, J. (1957). Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *147*(927), 258–267.

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nature Immunology*, *16*(4), 343–353. http://doi.org/10.1038/ni.3123

Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *54 Pt 1*, 1–13.

Johannes, L., & Römer, W. (2010). Shiga toxins--from cell biology to biomedical applications. *Nature Reviews. Microbiology*, *8*(2), 105–116. http://doi.org/10.1038/nrmicro2279

Jones, R. B., Ndhlovu, L. C., Barbour, J. D., Sheth, P. M., Jha, A. R., Long, B. R., … Ostrowski, M. A. (2008). Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *The Journal of Experimental Medicine*, *205*(12), 2763–2779. http://doi.org/10.1084/jem.20081398

Jonuleit, H., Kühn, U., Müller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., … Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European Journal of Immunology*, *27*(12), 3135–3142. http://doi.org/10.1002/eji.1830271209

Kacinski, B. M. (1995). CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer. *Annals of Medicine*, *27*(1), 79–85.

Kaiser, A., Bercovici, N., Abastado, J.-P., & Nardin, A. (2003). Naive CD8+ T cell recruitment and proliferation are dependent on stage of dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology*, *33*(1), 162–171. http://doi.org/10.1002/immu.200390019

Kantoff, P. W., Higano, C. S., Shore, N. D., Berger, E. R., Small, E. J., Penson, D. F., … IMPACT Study Investigators. (2010). Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. *The New England Journal of Medicine*, *363*(5), 411–422. http://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294

Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7556–7561.

Katze, M. G., He, Y., & Gale, M. (2002). Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature Reviews. Immunology*, *2*(9), 675–687. http://doi.org/10.1038/nri888

Kavanagh, B., O'Brien, S., Lee, D., Hou, Y., Weinberg, V., Rini, B., … Fong, L. (2008). CTLA4 blockade expands FoxP3+ regulatory and activated effector CD4+ T cells in a dose-dependent fashion. *Blood*, *112*(4), 1175–1183. http://doi.org/10.1182/blood-2007-11-125435

Kawarada, Y., Ganss, R., Garbi, N., Sacher, T., Arnold, B., & Hämmerling, G. J. (2001). NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *167*(9), 5247–5253.

Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., … Fauci, A. S. (2014). Pillars Article: Production of Transforming Growth Factor β by Human T Lymphocytes and Its Potential Role in the Regulation of T Cell Growth. J Exp Med. 1986. 163: 1037–1050. *The Journal of Immunology*, *192*(7), 2939–2952.

Keir, M. E., Liang, S. C., Guleria, I., Latchman, Y. E., Qipo, A., Albacker, L. A., … Sharpe, A. H. (2006). Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*, *203*(4), 883–895. http://doi.org/10.1084/jem.20051776

Kessels, H. W. H. G., Wolkers, M. C., van den Boom, M. D., van den Valk, M. A., & Schumacher, T. N. M. (2001). Immunotherapy through TCR gene transfer. *Nature Immunology*, *2*(10), 957–961. http://doi.org/10.1038/ni1001-957

Khong, H. T., Wang, Q. J., & Rosenberg, S. A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, *27*(3), 184–190.

Klein, G., Sjögren, H. O., Klein, E., & Hellström, K. E. (1960). Demonstration of Resistance against Methylcholanthreneinduced Sarcomas in the Primary Autochthonous Host. *Cancer Research*, *20*(11), 1561–1572.

Klysz, D., Tai, X., Robert, P. A., Craveiro, M., Cretenet, G., Oburoglu, L., … Taylor, N. (2015). Glutamine-dependent α-ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Science Signaling*, *8*(396), ra97. http://doi.org/10.1126/scisignal.aab2610

Koebel, C. M., Vermi, W., Swann, J. B., Zerafa, N., Rodig, S. J., Old, L. J., … Schreiber, R. D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*, *450*(7171), 903–907. http://doi.org/10.1038/nature06309

Kouo, T., Huang, L., Pucsek, A. B., Cao, M., Solt, S., Armstrong, T., & Jaffee, E. (2015). 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*(4), 412–423. http://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-14-0150

Kowolik, C. M., Topp, M. S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., … Cooper, L. J. N. (2006). CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Research*, *66*(22), 10995–11004. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0160

Koyama, S., Akbay, E. A., Li, Y. Y., Herter-Sprie, G. S., Buczkowski, K. A., Richards, W. G., … Hammerman, P. S. (2016). Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nature Communications*, *7*, 10501. http://doi.org/10.1038/ncomms10501

Kranz, L. M., Diken, M., Haas, H., Kreiter, S., Loquai, C., Reuter, K. C., … Sahin, U. (2016). Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. *Nature*. http://doi.org/10.1038/nature18300

Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *The Journal of Experimental Medicine*, *182*(2), 459–465.

Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International Reviews of Immunology*, *30*(1), 16–34. http://doi.org/10.3109/08830185.2010.529976

Kumar, V., & Gabrilovich, D. I. (2014). Hypoxia-inducible factors in regulation of immune responses in tumour microenvironment. *Immunology*, *143*(4), 512–519. http://doi.org/10.1111/imm.12380

Kumar, V., Patel, S., Tcyganov, E., & Gabrilovich, D. I. (2016). The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. *Trends in Immunology*, *37*(3), 208–220. http://doi.org/10.1016/j.it.2016.01.004

Labarriere, N., Fortun, A., Bellec, A., Khammari, A., Dreno, B., Saïagh, S., & Lang, F. (2013). A full GMP process to select and amplify epitope-specific T lymphocytes for adoptive immunotherapy of metastatic melanoma. *Clinical & Developmental Immunology*, *2013*, 932318. http://doi.org/10.1155/2013/932318

Labarrière, N., Gervois, N., Bonnin, A., Bouquié, R., Jotereau, F., & Lang, F. (2008). PBMC are as good a source of tumor-reactive T lymphocytes as TIL after selection by Melan-A/A2 multimer immunomagnetic sorting. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *57*(2), 185–195. http://doi.org/10.1007/s00262-007-0361-9

Lahmar, Q., Keirsse, J., Laoui, D., Movahedi, K., Van Overmeire, E., & Van Ginderachter, J. A. (2016). Tissue-resident versus monocyte-derived macrophages in the tumor microenvironment. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1865*(1), 23–34. http://doi.org/10.1016/j.bbcan.2015.06.009

Latchman, Y., Wood, C. R., Chernova, T., Chaudhary, D., Borde, M., Chernova, I., … Freeman, G. J. (2001). PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nature Immunology*, *2*(3), 261–268. http://doi.org/10.1038/85330

Lazear, H. M., Lancaster, A., Wilkins, C., Suthar, M. S., Huang, A., Vick, S. C., … Diamond, M. S. (2013). IRF-3, IRF-5, and IRF-7 Coordinately Regulate the Type I IFN Response in Myeloid Dendritic Cells Downstream of MAVS Signaling. *PLoS Pathogens*, *9*(1). http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003118

Le Bon, A., Durand, V., Kamphuis, E., Thompson, C., Bulfone-Paus, S., Rossmann, C., … Tough, D. F. (2006). Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *176*(8), 4682–4689.

Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., … Tough, D. F. (2003). Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nature Immunology*, *4*(10), 1009–1015. http://doi.org/10.1038/ni978

Le Bon, A., & Tough, D. F. (2008). Type I interferon as a stimulus for cross-priming. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *19*(1), 33–40. http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.10.007

Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science (New York, N.Y.)*, *271*(5256), 1734–1736.

Lee, D. W., Kochenderfer, J. N., Stetler-Stevenson, M., Cui, Y. K., Delbrook, C., Feldman, S. A., … Mackall, C. L. (2015). T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial. *The Lancet*, *385*(9967), 517–528. http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61403-3

Lee, R. S., Tartour, E., van der Bruggen, P., Vantomme, V., Joyeux, I., Goud, B., … Johannes, L. (1998). Major histocompatibility complex class I presentation of exogenous soluble tumor antigen fused to the B-fragment of Shiga toxin. *European Journal of Immunology*, *28*(9), 2726–2737. http://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2726::AID-IMMU2726>3.0.CO;2-W

Lepique, A. P., Daghastanli, K. R. P., Cuccovia, I. M., & Villa, L. L. (2009). HPV16 Tumor Associated Macrophages Suppress Antitumor T Cell Responses. *Clinical Cancer Research*, *15*(13), 4391–4400. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0489

Lesterhuis, W. J., de Vries, I. J. M., Schreibelt, G., Lambeck, A. J. A., Aarntzen, E. H. J. G., Jacobs, J. F. M., … Figdor, C. G. (2011). Route of administration modulates the induction of dendritic cell vaccine-induced antigen-specific T cells in advanced melanoma patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(17), 5725–5735. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-1261

Levental, K. R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J. N., Egeblad, M., Erler, J. T., … Weaver, V. M. (2009). Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin Signaling. *Cell*, *139*(5), 891–906. http://doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.027

Lewis, C. E., & Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research*, *66*(2), 605–612. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4005

Lewis, J. S., Landers, R. J., Underwood, J. C., Harris, A. L., & Lewis, C. E. (2000). Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. *The Journal of Pathology*, *192*(2), 150–158. http://doi.org/10.1002/1096-9896(2000)9999:9999<::AID-PATH687>3.0.CO;2-G

Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G., & Pollard, J. W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *The Journal of Experimental Medicine*, *193*(6), 727–740.

Lin, L., Hou, J., Ma, F., Wang, P., Liu, X., Li, N., … Cao, X. (2013). Type I IFN inhibits innate IL-10 production in macrophages through histone deacetylase 11 by downregulating microRNA-145. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(7), 3896–3904. http://doi.org/10.4049/jimmunol.1203450

Linsley, P. S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K. L., & Mittler, R. S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity*, *4*(6), 535–543.

Liu, Y.-J. (2005). IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology*, *23*(1), 275–306. http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115633

Llosa, N. J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E. C., Hechenbleikner, E. M., Taube, J. M., … Housseau, F. (2015). The Vigorous Immune Microenvironment of Microsatellite Instable Colon Cancer Is Balanced by Multiple Counter-Inhibitory Checkpoints. *Cancer Discovery*, *5*(1), 43–51. http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0863

Lou, Y., Liu, C., Lizée, G., Peng, W., Xu, C., Ye, Y., … Hwu, P. (2011). Antitumor activity mediated by CpG: the route of administration is critical. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, *34*(3), 279–288. http://doi.org/10.1097/CJI.0b013e31820d2a05

Lucas, T., Waisman, A., Ranjan, R., Roes, J., Krieg, T., Müller, W., … Eming, S. A. (2010). Differential Roles of Macrophages in Diverse Phases of Skin Repair. *The Journal of Immunology*, *184*(7), 3964–3977. http://doi.org/10.4049/jimmunol.0903356

Lurquin, C., Lethé, B., De Plaen, E., Corbière, V., Théate, I., van Baren, N., … Boon, T. (2005). Contrasting frequencies of antitumor and anti-vaccine T cells in metastases of a melanoma patient vaccinated with a MAGE tumor antigen. *The Journal of Experimental Medicine*, *201*(2), 249–257. http://doi.org/10.1084/jem.20041378

Maher, J. (2014). Clinical immunotherapy of B-cell malignancy using CD19-targeted CAR T-cells. *Current Gene Therapy*, *14*(1), 35–43.

Mailliard, R. B., Wankowicz-Kalinska, A., Cai, Q., Wesa, A., Hilkens, C. M., Kapsenberg, M. L., … Kalinski, P. (2004). α-Type-1 Polarized Dendritic Cells. *Cancer Research*, *64*(17), 5934–5937. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1261

Malandro, N., Budhu, S., Kuhn, N. F., Liu, C., Murphy, J. T., Cortez, C., … Wolchok, J. D. (2016). Clonal Abundance of Tumor-Specific CD4(+) T Cells Potentiates Efficacy and Alters Susceptibility to Exhaustion. *Immunity*, *44*(1), 179–193. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.12.018

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews. Cancer*, *3*(6), 459–465. http://doi.org/10.1038/nrc1097

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Reports*, *6*, 13. http://doi.org/10.12703/P6-13

McDonald, C. J., Erlichman, C., Ingle, J. N., Rosales, G. A., Allen, C., Greiner, S. M., … Galanis, E. (2006). A measles virus vaccine strain derivative as a novel oncolytic agent against breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, *99*(2), 177–184. http://doi.org/10.1007/s10549-006-9200-5

McNab, F., Mayer-Barber, K., Sher, A., Wack, A., & O'Garra, A. (2015). Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews. Immunology*, *15*(2), 87–103. http://doi.org/10.1038/nri3787

Melief, C. J. M. (2013). "License to Kill" Reflects Joint Action of CD4 and CD8 T Cells. *Clinical Cancer Research*, *19*(16), 4295–4296. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1432

Mempel, T. R., Pittet, M. J., Khazaie, K., Weninger, W., Weissleder, R., von Boehmer, H., & von Andrian, U. H. (2006). Regulatory T cells reversibly suppress cytotoxic T cell function independent of effector differentiation. *Immunity*, *25*(1), 129–141. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.015

Mills, C. D., Kincaid, K., Alt, J. M., Heilman, M. J., & Hill, A. M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *164*(12), 6166–6173.

Moon, E. K., Carpenito, C., Sun, J., Wang, L.-C. S., Kapoor, V., Predina, J., … Albelda, S. M. (2011). Expression of a Functional CCR2 Receptor Enhances Tumor Localization and Tumor Eradication by Retargeted Human T cells Expressing a Mesothelin-Specific Chimeric Antibody Receptor. *Clinical Cancer Research*, *17*(14), 4719–4730. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0351

Moore, R. J., Owens, D. M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., … Balkwill, F. (1999). Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nature Medicine*, *5*(7), 828–831. http://doi.org/10.1038/10552

Morgan, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., … Rosenberg, S. A. (2006). Cancer Regression in Patients After Transfer of Genetically Engineered Lymphocytes. *Science*, *314*(5796), 126–129. http://doi.org/10.1126/science.1129003

Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., & Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science (New York, N.Y.)*, *264*(5167), 1918–1921.

Murphy, G., Tjoa, B., Ragde, H., Kenny, G., & Boynton, A. (1996). Phase I clinical trial: T-cell therapy for prostate cancer using autologous dendritic cells pulsed with HLA-A0201-specific peptides from prostate-specific membrane antigen. *The Prostate*, *29*(6), 371–380. http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(199612)29:6<371::AID-PROS5>3.0.CO;2-B

Newick, K., O'Brien, S., Sun, J., Kapoor, V., Maceyko, S., Lo, A., … Albelda, S. M. (2016). Augmentation of CAR T-cell Trafficking and Antitumor Efficacy by Blocking Protein Kinase A Localization. *Cancer Immunology Research*, *4*(6), 541–551. http://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0263

Nishimura, H., Nose, M., Hiai, H., Minato, N., & Honjo, T. (1999). Development of Lupus-like Autoimmune Diseases by Disruption of the PD-1 Gene Encoding an ITIM Motif-Carrying Immunoreceptor. *Immunity*, *11*(2), 141–151. http://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80089-8

Nishimura, H., Okazaki, T., Tanaka, Y., Nakatani, K., Hara, M., Matsumori, A., … Honjo, T. (2001). Autoimmune dilated cardiomyopathy in PD-1 receptor-deficient mice. *Science (New York, N.Y.)*, *291*(5502), 319–322. http://doi.org/10.1126/science.291.5502.319

Oguma, K., Oshima, H., Aoki, M., Uchio, R., Naka, K., Nakamura, S., … Oshima, M. (2008). Activated macrophages promote Wnt signalling through tumour necrosis factor-alpha in gastric tumour cells. *The EMBO Journal*, *27*(12), 1671–1681. http://doi.org/10.1038/emboj.2008.105

Oh, K., Lee, O.-Y., Shon, S. Y., Nam, O., Ryu, P. M., Seo, M. W., & Lee, D.-S. (2013). A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model. *Breast Cancer Research: BCR*, *15*(5), R79. http://doi.org/10.1186/bcr3473

Okada, H., Kalinski, P., Ueda, R., Hoji, A., Kohanbash, G., Donegan, T. E., … Lieberman, F. S. (2011). Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with {alpha}-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the*

American Society of Clinical Oncology, *29*(3), 330–336. http://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.7744

O'Mahony, D., Morris, J. C., Quinn, C., Gao, W., Wilson, W. H., Gause, B., … Janik, J. E. (2007). A pilot study of CTLA-4 blockade after cancer vaccine failure in patients with advanced malignancy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(3), 958–964. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1974

Oosterling, S. J., van der Bij, G. J., Meijer, G. A., Tuk, C. W., van Garderen, E., van Rooijen, N., … van Egmond, M. (2005). Macrophages direct tumour histology and clinical outcome in a colon cancer model. *The Journal of Pathology*, *207*(2), 147–155. http://doi.org/10.1002/path.1830

O'Sullivan, T., Saddawi-Konefka, R., Vermi, W., Koebel, C. M., Arthur, C., White, J. M., … Bui, J. D. (2012). Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(10), 1869–1882. http://doi.org/10.1084/jem.20112738

Outzen, H. C., Custer, R. P., Eaton, G. J., & Prehn, R. T. (1975). Spontaneous and induced tumor incidence in germfree "nude" mice. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, *17*(1), 1–9.

Padua, D., & Massagué, J. (2009). Roles of TGFbeta in metastasis. *Cell Research*, *19*(1), 89–102. http://doi.org/10.1038/cr.2008.316

Palucka, A. K., Ueno, H., Connolly, J., Kerneis-Norvell, F., Blanck, J.-P., Johnston, D. A., … Banchereau, J. (2006). Dendritic cells loaded with killed allogeneic melanoma cells can induce objective clinical responses and MART-1 specific CD8+ T-cell immunity. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, *29*(5), 545–557. http://doi.org/10.1097/01.cji.0000211309.90621.8b

Pang, Y., Gara, S. K., Achyut, B. R., Li, Z., Yan, H. H., Day, C.-P., … Yang, L. (2013). TGF-β signaling in myeloid cells is required for tumor metastasis. *Cancer Discovery*, *3*(8), 936–951. http://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0527

Papewalis, C., Jacobs, B., Wuttke, M., Ullrich, E., Baehring, T., Fenk, R., … Schott, M. (2008). IFN-alpha skews monocytes into CD56+-expressing dendritic cells with potent functional activities in vitro and in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *180*(3), 1462–1470.

Parsa, A. T., Waldron, J. S., Panner, A., Crane, C. A., Parney, I. F., Barry, J. J., … Pieper, R. O. (2007). Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nature Medicine*, *13*(1), 84–88. http://doi.org/10.1038/nm1517

Paulos, C. M., Wrzesinski, C., Kaiser, A., Hinrichs, C. S., Chieppa, M., Cassard, L., … Restifo, N. P. (2007). Microbial translocation augments the function of adoptively transferred

self/tumor-specific CD8+ T cells via TLR4 signaling. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(8), 2197–2204. http://doi.org/10.1172/JCI32205

Paust, S., Lu, L., McCarty, N., & Cantor, H. (2004). Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(28), 10398–10403. http://doi.org/10.1073/pnas.0403342101

Pedicord, V. A., Montalvo, W., Leiner, I. M., & Allison, J. P. (2011). Single dose of anti-CTLA-4 enhances CD8+ T-cell memory formation, function, and maintenance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(1), 266–271. http://doi.org/10.1073/pnas.1016791108

Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J., & Allison, J. P. (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(8), 1717–1725. http://doi.org/10.1084/jem.20082492

Peinado, H., Lavotshkin, S., & Lyden, D. (2011). The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts. *Seminars in Cancer Biology*, *21*(2), 139–146. http://doi.org/10.1016/j.semcancer.2011.01.002

Peng, K. W., Ahmann, G. J., Pham, L., Greipp, P. R., Cattaneo, R., & Russell, S. J. (2001). Systemic therapy of myeloma xenografts by an attenuated measles virus. *Blood*, *98*(7), 2002–2007.

Peng, K.-W., TenEyck, C. J., Galanis, E., Kalli, K. R., Hartmann, L. C., & Russell, S. J. (2002). Intraperitoneal therapy of ovarian cancer using an engineered measles virus. *Cancer Research*, *62*(16), 4656–4662.

Peranzoni, E., Zilio, S., Marigo, I., Dolcetti, L., Zanovello, P., Mandruzzato, S., & Bronte, V. (2010). Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Current Opinion in Immunology*, *22*(2), 238–244. http://doi.org/10.1016/j.coi.2010.01.021

Phillips, S., Chokshi, S., Riva, A., Evans, A., Williams, R., & Naoumov, N. V. (2010). CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *184*(1), 287–295. http://doi.org/10.4049/jimmunol.0902761

Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews. Immunology*, *5*(5), 375–386. http://doi.org/10.1038/nri1604

Pol, J., Bloy, N., Buqué, A., Eggermont, A., Cremer, I., Sautès-Fridman, C., … Galluzzi, L. (2015). Trial Watch: Peptide-based anticancer vaccines. *Oncoimmunology*, *4*(4), e974411. http://doi.org/10.4161/2162402X.2014.974411

Pol, J., Buqué, A., Aranda, F., Bloy, N., Cremer, I., Eggermont, A., … Galluzzi, L. (2016). Trial Watch-Oncolytic viruses and cancer therapy. *Oncoimmunology*, *5*(2), e1117740. http://doi.org/10.1080/2162402X.2015.1117740

Powles, T., Eder, J. P., Fine, G. D., Braiteh, F. S., Loriot, Y., Cruz, C., … Vogelzang, N. J. (2014). MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*, *515*(7528), 558–562. http://doi.org/10.1038/nature13904

Prehn, R. T. (1971). Perspectives on oncogenesis: does immunity stimulate or inhibit neoplasia? *Journal of the Reticuloendothelial Society*, *10*(1), 1–16.

Priceman, S. J., Sung, J. L., Shaposhnik, Z., Burton, J. B., Torres-Collado, A. X., Moughon, D. L., … Wu, L. (2010). Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. *Blood*, *115*(7), 1461–1471. http://doi.org/10.1182/blood-2009-08-237412

Qian, B.-Z., Li, J., Zhang, H., Kitamura, T., Zhang, J., Campion, L. R., … Pollard, J. W. (2011). CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature*, *475*(7355), 222–225. http://doi.org/10.1038/nature10138

Raber, P. L., Thevenot, P., Sierra, R., Wyczechowska, D., Halle, D., Ramirez, M. E., … Rodriguez, P. C. (2014). Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *International Journal of Cancer*, *134*(12), 2853–2864. http://doi.org/10.1002/ijc.28622

Rakhmilevich, A. L., Baldeshwiler, M. J., Van De Voort, T. J., Felder, M. A. R., Yang, R. K., Kalogriopoulos, N. A., … Sondel, P. M. (2012). Tumor-associated myeloid cells can be activated in vitro and in vivo to mediate antitumor effects. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, *61*(10), 1683–1697. http://doi.org/10.1007/s00262-012-1236-2

Rauch, I., Müller, M., & Decker, T. (2013). The regulation of inflammation by interferons and their STATs. *JAK-STAT*, *2*(1), e23820. http://doi.org/10.4161/jkst.23820

Rice, J., Ottensmeier, C. H., & Stevenson, F. K. (2008). DNA vaccines: precision tools for activating effective immunity against cancer. *Nature Reviews Cancer*, *8*(2), 108–120. http://doi.org/10.1038/nrc2326

Richter, K., Agnellini, P., & Oxenius, A. (2010). On the role of the inhibitory receptor LAG-3 in acute and chronic LCMV infection. *International Immunology*, *22*(1), 13–23. http://doi.org/10.1093/intimm/dxp107

Rigamonti, N., Capuano, G., Ricupito, A., Jachetti, E., Grioni, M., Generoso, L., … Bellone, M. (2011). Modulators of arginine metabolism do not impact on peripheral T-cell tolerance and disease progression in a model of spontaneous prostate cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(5), 1012–1023. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2547

Rizzuto, G. A., Merghoub, T., Hirschhorn-Cymerman, D., Liu, C., Lesokhin, A. M., Sahawneh, D., … Houghton, A. N. (2009). Self-antigen-specific CD8+ T cell precursor frequency determines the quality of the antitumor immune response. *The Journal of Experimental Medicine*, *206*(4), 849–866. http://doi.org/10.1084/jem.20081382

Robert, C., Long, G. V., Brady, B., Dutriaux, C., Maio, M., Mortier, L., … Ascierto, P. A. (2015). Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *The New England Journal of Medicine*, *372*(4), 320–330. http://doi.org/10.1056/NEJMoa1412082

Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., … Wolchok, J. D. (2011). Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine*, *364*(26), 2517–2526. http://doi.org/10.1056/NEJMoa1104621

Rodriguez, P. C., Zea, A. H., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., & Ochoa, A. C. (2002). Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(24), 21123–21129. http://doi.org/10.1074/jbc.M110675200

Romano, E., Kusio-Kobialka, M., Foukas, P. G., Baumgaertner, P., Meyer, C., Ballabeni, P., … Speiser, D. E. (2015). Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells ex vivo by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(19), 6140–6145. http://doi.org/10.1073/pnas.1417320112

Rosenberg, S. A., Spiess, P., & Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science (New York, N.Y.)*, *233*(4770), 1318–1321.

Rui, Y., Honjo, T., & Chikuma, S. (2013). Programmed cell death 1 inhibits inflammatory helper T-cell development through controlling the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(40), 16073–16078. http://doi.org/10.1073/pnas.1315828110

Russell, J. H., & Ley, T. J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, *20*, 323–370. http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.100201.131730

Russell, S. J., Federspiel, M. J., Peng, K.-W., Tong, C., Dingli, D., Morice, W. G., … Dispenzieri, A. (2014). Remission of disseminated cancer after systemic oncolytic virotherapy. *Mayo Clinic Proceedings*, *89*(7), 926–933. http://doi.org/10.1016/j.mayocp.2014.04.003

Russell, S. J., Peng, K.-W., & Bell, J. C. (2012). Oncolytic virotherapy. *Nature Biotechnology*, *30*(7), 658–670. http://doi.org/10.1038/nbt.2287

Ryder, M., Ghossein, R. A., Ricarte-Filho, J. C. M., Knauf, J. A., & Fagin, J. A. (2008). Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. *Endocrine-Related Cancer*, *15*(4), 1069–1074. http://doi.org/10.1677/ERC-08-0036

Rygaard, J., & Povlsen, C. O. (1974). The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Section B: Microbiology and Immunology*, *82*(1), 99–106.

Said, E. A., Dupuy, F. P., Trautmann, L., Zhang, Y., Shi, Y., El-Far, M., … Sekaly, R.-P. (2010). Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. *Nature Medicine*, *16*(4), 452–459. http://doi.org/10.1038/nm.2106

Saji, H., Koike, M., Yamori, T., Saji, S., Seiki, M., Matsushima, K., & Toi, M. (2001). Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. *Cancer*, *92*(5), 1085–1091.

Sakuishi, K., Apetoh, L., Sullivan, J. M., Blazar, B. R., Kuchroo, V. K., & Anderson, A. C. (2010). Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity. *The Journal of Experimental Medicine*, *207*(10), 2187–2194. http://doi.org/10.1084/jem.20100643

Salazar-Mather, T. P., Lewis, C. A., & Biron, C. A. (2002). Type I interferons regulate inflammatory cell trafficking and macrophage inflammatory protein 1α delivery to the liver. *The Journal of Clinical Investigation*, *110*(3), 321–330. http://doi.org/10.1172/JCI15376

Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of Experimental Medicine*, *179*(4), 1109–1118.

Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M.-C., Validire, P., Trautmann, A., … Donnadieu, E. (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(3), 899–910. http://doi.org/10.1172/JCI45817

Sandoval, F., Terme, M., Nizard, M., Badoual, C., Bureau, M.-F., Freyburger, L., … Tartour, E. (2013). Mucosal imprinting of vaccine-induced $CD8^+$ T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors. *Science Translational Medicine*, *5*(172), 172ra20. http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004888

Sanz, L., Blanco, B., & Alvarez-Vallina, L. (2004). Antibodies and gene therapy: teaching old "magic bullets" new tricks. *Trends in Immunology*, *25*(2), 85–91. http://doi.org/10.1016/j.it.2003.12.001

Sarnaik, A. A., Yu, B., Yu, D., Morelli, D., Hall, M., Bogle, D., … Weber, J. S. (2011). Extended dose ipilimumab with a peptide vaccine: immune correlates associated with clinical benefit in patients with resected high-risk stage IIIc/IV melanoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *17*(4), 896–906. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-2463

Sauce, D., Almeida, J. R., Larsen, M., Haro, L., Autran, B., Freeman, G. J., & Appay, V. (2007). PD-1 expression on human CD8 T cells depends on both state of differentiation and activation status. *AIDS*, *21*(15), 2005–2013. http://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282eee548

Sawada, Y., Yoshikawa, T., Shimomura, M., Iwama, T., Endo, I., & Nakatsura, T. (2015). Programmed death-1 blockade enhances the antitumor effects of peptide vaccine-induced peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. *International Journal of Oncology*, *46*(1), 28–36. http://doi.org/10.3892/ijo.2014.2737

Scanlan, M. J., Welt, S., Gordon, C. M., Chen, Y.-T., Gure, A. O., Stockert, E., … Old, L. J. (2002). Cancer-related Serological Recognition of Human Colon Cancer Identification of Potential Diagnostic and Immunotherapeutic Targets. *Cancer Research*, *62*(14), 4041–4047.

Schadendorf, D., Hodi, F. S., Robert, C., Weber, J. S., Margolin, K., Hamid, O., … Wolchok, J. D. (2015). Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *33*(17), 1889–1894. http://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2736

Scharping, N. E., Menk, A. V., Moreci, R. S., Whetstone, R. D., Dadey, R. E., Watkins, S. C., … Delgoffe, G. M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity*, *45*(2), 374–388. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.07.009

Schiavoni, G., Sistigu, A., Valentini, M., Mattei, F., Sestili, P., Spadaro, F., … Bracci, L. (2011). Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Research*, *71*(3), 768–778. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2788

Schmetterer, K. G., Neunkirchner, A., & Pickl, W. F. (2012). Naturally occurring regulatory T cells: markers, mechanisms, and manipulation. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *26*(6), 2253–2276. http://doi.org/10.1096/fj.11-193672

Schneider, U., von Messling, V., Devaux, P., & Cattaneo, R. (2002). Efficiency of measles virus entry and dissemination through different receptors. *Journal of Virology*, *76*(15), 7460–7467.

Schreurs, M. W. J., Boer, A. J. de, Figdor, C. G., & Adema, G. J. (1998). Genetic Vaccination against the Melanocyte Lineage-specific Antigen gp100 Induces Cytotoxic T Lymphocyte-mediated Tumor Protection. *Cancer Research*, *58*(12), 2509–2514.

Selby, M. J., Engelhardt, J. J., Quigley, M., Henning, K. A., Chen, T., Srinivasan, M., & Korman, A. J. (2013). Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells. *Cancer Immunology Research*, *1*(1), 32–42. http://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-13-0013

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, *410*(6832), 1107–1111. http://doi.org/10.1038/35074122

Sheu, B.-C., Chiou, S.-H., Lin, H.-H., Chow, S.-N., Huang, S.-C., Ho, H.-N., & Hsu, S.-M. (2005). Up-regulation of inhibitory natural killer receptors CD94/NKG2A with suppressed intracellular perforin expression of tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes in human cervical carcinoma. *Cancer Research*, *65*(7), 2921–2929. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2108

Shi, M., Hao, S., Chan, T., & Xiang, J. (2006). CD4+ T cells stimulate memory CD8+ T cell expansion via acquired pMHC I complexes and costimulatory molecules, and IL-2 secretion. *Journal of Leukocyte Biology*, *80*(6), 1354–1363. http://doi.org/10.1189/jlb.0506321

Shime, H., Matsumoto, M., Oshiumi, H., Tanaka, S., Nakane, A., Iwakura, Y., … Seya, T. (2012). Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(6), 2066–2071. http://doi.org/10.1073/pnas.1113099109

Shirota, H., Petrenko, L., Hong, C., & Klinman, D. M. (2007). Potential of Transfected Muscle Cells to Contribute to DNA Vaccine Immunogenicity. *The Journal of Immunology*, *179*(1), 329–336. http://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.329

Simpson, T. R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M. A., Bergerhoff, K., Arce, F., … Quezada, S. A. (2013). Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti–CTLA-4 therapy against melanoma. *The Journal of Experimental Medicine*, *210*(9), 1695–1710. http://doi.org/10.1084/jem.20130579

Smyth, M. J., Strobl, S. L., Young, H. A., Ortaldo, J. R., & Ochoa, A. C. (1991). Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8+ T lymphocytes. Inhibition by transforming growth factor-beta. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *146*(10), 3289–3297.

Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., … Godfrey, D. I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *The Journal of Experimental Medicine*, *191*(4), 661–668.

Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., MacGregor, D., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of Experimental Medicine*, *192*(5), 755–760.

Soares, K. C., Rucki, A. A., Wu, A. A., Olino, K., Xiao, Q., Chai, Y., … Zheng, L. (2015). PD-1/PD-L1 blockade together with vaccine therapy facilitates effector T-cell infiltration into pancreatic tumors. *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md.: 1997)*, *38*(1), 1–11. http://doi.org/10.1097/CJI.0000000000000062

Spandidos, D. A., & Anderson, M. L. (1989). Oncogenes and onco-suppressor genes: their involvement in cancer. *The Journal of Pathology*, *157*(1), 1–10. http://doi.org/10.1002/path.1711570102

Spranger, S., Spaapen, R. M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T. T., & Gajewski, T. F. (2013). Up-Regulation of PD-L1, IDO, and Tregs in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8+ T Cells. *Science Translational Medicine*, *5*(200), 200ra116. http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3006504

Srivastava, M. K., Zhu, L., Harris-White, M., Kar, U. K., Kar, U., Huang, M., … Sharma, S. (2012). Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PloS One*, *7*(7), e40677. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040677

Srivastava, S., Koch, M. A., Pepper, M., & Campbell, D. J. (2014). Type I interferons directly inhibit regulatory T cells to allow optimal antiviral T cell responses during acute LCMV infection. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(5), 961–974. http://doi.org/10.1084/jem.20131556

Stern-Ginossar, N., Gur, C., Biton, M., Horwitz, E., Elboim, M., Stanietsky, N., … Mandelboim, O. (2008). Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nature Immunology*, *9*(9), 1065–1073. http://doi.org/10.1038/ni.1642

Sternlicht, M. D., Lochter, A., Sympson, C. J., Huey, B., Rougier, J.-P., Gray, J. W., … Werb, Z. (1999). The Stromal Proteinase MMP3/Stromelysin-1 Promotes Mammary Carcinogenesis. *Cell*, *98*(2), 137–146.

Straetemans, T., Berrevoets, C., Coccoris, M., Treffers-Westerlaken, E., Wijers, R., Cole, D. K., … Debets, R. (2015). Recurrence of melanoma following T cell treatment: continued antigen expression in a tumor that evades T cell recruitment. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, *23*(2), 396–406. http://doi.org/10.1038/mt.2014.215

Strebhardt, K., & Ullrich, A. (2008). Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. *Nature Reviews Cancer*, *8*(6), 473–480. http://doi.org/10.1038/nrc2394

Street, S. E. A., Trapani, J. A., MacGregor, D., & Smyth, M. J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of Experimental Medicine*, *196*(1), 129–134.

Street, S. E., Cretney, E., & Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, *97*(1), 192–197.

Stromnes, I. M., Brockenbrough, J. S., Izeradjene, K., Carlson, M. A., Cuevas, C., Simmons, R. M., … Hingorani, S. R. (2014). Targeted depletion of an MDSC subset unmasks pancreatic ductal adenocarcinoma to adaptive immunity. *Gut*, *63*(11), 1769–1781. http://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-306271

Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science (New York, N.Y.)*, *183*(4124), 534–536.

Sultan, H., Fesenkova, V. I., Addis, D., Fan, A. E., Kumai, T., Wu, J., … Celis, E. (2016). Designing therapeutic cancer vaccines by mimicking viral infections. *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*. http://doi.org/10.1007/s00262-016-1834-5

Sunshine, J., & Taube, J. M. (2015). PD-1/PD-L1 inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, *23*, 32–38. http://doi.org/10.1016/j.coph.2015.05.011

Swain, S. L., McKinstry, K. K., & Strutt, T. M. (2012). Expanding roles for $CD4^+$ T cells in immunity to viruses. *Nature Reviews. Immunology*, *12*(2), 136–148. http://doi.org/10.1038/nri3152

Swann, J. B., Vesely, M. D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R. D., & Smyth, M. J. (2008). Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(2), 652–656. http://doi.org/10.1073/pnas.0708594105

Takahashi, H., Feuerhake, F., Kutok, J. L., Monti, S., Dal Cin, P., Neuberg, D., … Shipp, M. A. (2006). FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *12*(11 Pt 1), 3265–3271. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0076

Talmadge, J. E., & Gabrilovich, D. I. (2013). History of myeloid-derived suppressor cells. *Nature Reviews. Cancer*, *13*(10), 739–752. http://doi.org/10.1038/nrc3581

Tania, M., Khan, M. A., & Fu, J. (2014). Epithelial to mesenchymal transition inducing transcription factors and metastatic cancer. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, *35*(8), 7335–7342. http://doi.org/10.1007/s13277-014-2163-y

Tartour, E., Pere, H., Maillere, B., Terme, M., Merillon, N., Taieb, J., … Oudard, S. (2011). Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. *Cancer Metastasis Reviews*, *30*(1), 83–95. http://doi.org/10.1007/s10555-011-9281-4

Taube, J. M., Anders, R. A., Young, G. D., Xu, H., Sharma, R., McMiller, T. L., … Chen, L. (2012). Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Science Translational Medicine*, *4*(127), 127ra37-127ra37. http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003689

Taube, J. M., Klein, A., Brahmer, J. R., Xu, H., Pan, X., Kim, J. H., … Anders, R. A. (2014). Association of PD-1, PD-1 Ligands, and Other Features of the Tumor Immune Microenvironment with Response to Anti–PD-1 Therapy. *Clinical Cancer Research*, *20*(19), 5064–5074. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3271

Taube, J. M., Young, G. D., McMiller, T. L., Chen, S., Salas, J. T., Pritchard, T. S., … Topalian, S. L. (2015). Differential Expression of Immune-Regulatory Genes Associated with PD-L1 Display in Melanoma: Implications for PD-1 Pathway Blockade. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *21*(17), 3969–3976. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0244

Teicher, B. A. (2001). Malignant cells, directors of the malignant process: role of transforming growth factor-beta. *Cancer Metastasis Reviews*, *20*(1–2), 133–143.

Terawaki, S., Chikuma, S., Shibayama, S., Hayashi, T., Yoshida, T., Okazaki, T., & Honjo, T. (2011). IFN-α Directly Promotes Programmed Cell Death-1 Transcription and Limits the Duration of T Cell-Mediated Immunity. *The Journal of Immunology*, *186*(5), 2772–2779. http://doi.org/10.4049/jimmunol.1003208

Textor, A., Listopad, J. J., Wührmann, L. L., Perez, C., Kruschinski, A., Chmielewski, M., … Charo, J. (2014). Efficacy of CAR T-cell therapy in large tumors relies upon stromal targeting by IFNγ. *Cancer Research*, *74*(23), 6796–6805. http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0079

Thomas L. (1959). Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitivity States., p. 529–532.

Thompson, R. H., Gillett, M. D., Cheville, J. C., Lohse, C. M., Dong, H., Webster, W. S., … Kwon, E. D. (2004). Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(49), 17174–17179. http://doi.org/10.1073/pnas.0406351101

Thoreau, M., Bercovici, N., & Trautmann, A. (2016). [The vaccination-induced cooperation of T cells and myeloid cells leads to an anti-tumoral effect]. *Médecine Sciences: M/S*, *32*(3), 244–246. http://doi.org/10.1051/medsci/20163203006

Thoreau, M., Penny, H. L., Tan, K., Regnier, F., Weiss, J. M., Lee, B., … Bercovici, N. (2015). Vaccine-induced tumor regression requires a dynamic cooperation between T cells and myeloid cells at the tumor site. *Oncotarget*, *6*(29), 27832–27846. http://doi.org/10.18632/oncotarget.4940

Tinoco, R., Alcalde, V., Yang, Y., Sauer, K., & Zuniga, E. I. (2009). Cell-intrinsic transforming growth factor-beta signaling mediates virus-specific CD8+ T cell deletion and viral persistence in vivo. *Immunity*, *31*(1), 145–157. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.06.015

Toh, B., Wang, X., Keeble, J., Sim, W. J., Khoo, K., Wong, W.-C., … Abastado, J.-P. (2011). Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biology*, *9*(9), e1001162. http://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001162

Trautmann, L., Janbazian, L., Chomont, N., Said, E. A., Gimmig, S., Bessette, B., … Sekaly, R.-P. (2006). Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8+ T cells leads to reversible immune dysfunction. *Nature Medicine*, *12*(10), 1198–1202. http://doi.org/10.1038/nm1482

Tripathi, P., & Agrawal, S. (2006). Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. *Cancer Investigation*, *24*(2), 178–186. http://doi.org/10.1080/07357900500524579

Tschurtschenthaler, M., Wang, J., Fricke, C., Fritz, T. M. J., Niederreiter, L., Adolph, T. E., … Kaser, A. (2014). Type I interferon signalling in the intestinal epithelium affects Paneth cells, microbial ecology and epithelial regeneration. *Gut*, *63*(12), 1921–1931. http://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-305863

Tumeh, P. C., Harview, C. L., Yearley, J. H., Shintaku, I. P., Taylor, E. J. M., Robert, L., … Ribas, A. (2014). PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, *515*(7528), 568–571. http://doi.org/10.1038/nature13954

Uderhardt, S., Herrmann, M., Oskolkova, O. V., Aschermann, S., Bicker, W., Ipseiz, N., … Krönke, G. (2012). 12/15-Lipoxygenase Orchestrates the Clearance of Apoptotic Cells and Maintains Immunologic Tolerance. *Immunity*, *36*(5), 834–846. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.010

Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., … Friedman, A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science (New York, N.Y.)*, *259*(5102), 1745–1749.

Vacchelli, E., Pol, J., Bloy, N., Eggermont, A., Cremer, I., Fridman, W. H., … Galluzzi, L. (2015). Trial watch: Tumor-targeting monoclonal antibodies for oncological indications. *Oncoimmunology*, *4*(1). http://doi.org/10.4161/2162402X.2014.985940

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., … Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science (New York, N.Y.)*, *254*(5038), 1643–1647.

van der Stegen, S. J. C., Davies, D. M., Wilkie, S., Foster, J., Sosabowski, J. K., Burnet, J., … Maher, J. (2013). Preclinical in vivo modeling of cytokine release syndrome induced by ErbB-retargeted human T cells: identifying a window of therapeutic opportunity? *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *191*(9), 4589–4598. http://doi.org/10.4049/jimmunol.1301523

van Elsas, A., Hurwitz, A. A., & Allison, J. P. (1999). Combination immunotherapy of B16 melanoma using anti-cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-producing vaccines induces rejection of subcutaneous and metastatic tumors accompanied by autoimmune depigmentation. *The Journal of Experimental Medicine*, *190*(3), 355–366.

van Rooij, N., van Buuren, M. M., Philips, D., Velds, A., Toebes, M., Heemskerk, B., … Schumacher, T. N. (2013). Tumor exome analysis reveals neoantigen-specific T-cell reactivity in an ipilimumab-responsive melanoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(32), e439-442. http://doi.org/10.1200/JCO.2012.47.7521

Vicetti Miguel, R. D., Cherpes, T. L., Watson, L. J., & McKenna, K. C. (2010). CTL induction of tumoricidal nitric oxide production by intratumoral macrophages is critical for tumor elimination. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *185*(11), 6706–6718. http://doi.org/10.4049/jimmunol.0903411

Vigneron, N., Stroobant, V., Van den Eynde, B. J., & van der Bruggen, P. (2013). Database of T cell-defined human tumor antigens: the 2013 update. *Cancer Immunity*, *13*. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3718731/

Vingert, B., Adotevi, O., Patin, D., Jung, S., Shrikant, P., Freyburger, L., … Tartour, E. (2006). The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *European Journal of Immunology*, *36*(5), 1124–1135. http://doi.org/10.1002/eji.200535443

Vopenkova, K., Mollova, K., Buresova, I., & Michalek, J. (2012). Complex evaluation of human monocyte-derived dendritic cells for cancer immunotherapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *16*(11), 2827–2837. http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2012.01614.x

Wada, S., Jackson, C. M., Yoshimura, K., Yen, H.-R., Getnet, D., Harris, T. J., … Drake, C. G. (2013). Sequencing CTLA-4 blockade with cell-based immunotherapy for prostate cancer. *Journal of Translational Medicine*, *11*, 89. http://doi.org/10.1186/1479-5876-11-89

Walker, L. S. K., & Sansom, D. M. (2015). Confusing signals: recent progress in CTLA-4 biology. *Trends in Immunology*, *36*(2), 63–70. http://doi.org/10.1016/j.it.2014.12.001

Walunas, T. L., Lenschow, D. J., Bakker, C. Y., Linsley, P. S., Freeman, G. J., Green, J. M., … Bluestone, J. A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, *1*(5), 405–413.

Wang, S.-F., Fouquet, S., Chapon, M., Salmon, H., Regnier, F., Labroquère, K., … Bercovici, N. (2011). Early T cell signalling is reversibly altered in PD-1+ T lymphocytes infiltrating human tumors. *PloS One*, *6*(3), e17621. http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017621

Wang, W., Lau, R., Yu, D., Zhu, W., Korman, A., & Weber, J. (2009). PD1 blockade reverses the suppression of melanoma antigen-specific CTL by CD4+ CD25(Hi) regulatory T cells. *International Immunology*, *21*(9), 1065–1077. http://doi.org/10.1093/intimm/dxp072

Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., … Mak, T. W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science (New York, N.Y.)*, *270*(5238), 985–988.

Weber, J. S., Kudchadkar, R. R., Yu, B., Gallenstein, D., Horak, C. E., Inzunza, H. D., … Chen, Y. A. (2013). Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *31*(34), 4311–4318. http://doi.org/10.1200/JCO.2013.51.4802

Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nature Immunology*, *12*(6), 492–499.

Whiteside, T. L. (2014a). Induced regulatory T cells in inhibitory microenvironments created by cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, *14*(10), 1411–1425. http://doi.org/10.1517/14712598.2014.927432

Whiteside, T. L. (2014b). Regulatory T cell subsets in human cancer: are they regulating for or against tumor progression? *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII*, *63*(1), 67–72. http://doi.org/10.1007/s00262-013-1490-y

Wolf, K., Alexander, S., Schacht, V., Coussens, L. M., von Andrian, U. H., van Rheenen, J., … Friedl, P. (2009). Collagen-based cell migration models in vitro and in vivo. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *20*(8), 931–941. http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.08.005

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A., & Felgner, P. L. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, *247*(4949 Pt 1), 1465–1468.

Workman, C. J., Cauley, L. S., Kim, I.-J., Blackman, M. A., Woodland, D. L., & Vignali, D. A. A. (2004). Lymphocyte activation gene-3 (CD223) regulates the size of the expanding T cell population following antigen activation in vivo. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *172*(9), 5450–5455.

Wrzesinski, S. H., Wan, Y. Y., & Flavell, R. A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(18 Pt 1), 5262–5270. http://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1157

Xiao, Q., & Ge, G. (2012). Lysyl oxidase, extracellular matrix remodeling and cancer metastasis. *Cancer Microenvironment: Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*, *5*(3), 261–273. http://doi.org/10.1007/s12307-012-0105-z

Xue, J., Schmidt, S. V., Sander, J., Draffehn, A., Krebs, W., Quester, I., … Schultze, J. L. (2014). Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, *40*(2), 274–288. http://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.01.006

Yamasaki, R., Lu, H., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A. M., Cialic, R., … Ransohoff, R. M. (2014). Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *The Journal of Experimental Medicine*, *211*(8), 1533–1549. http://doi.org/10.1084/jem.20132477

Yan, J., Reichenbach, D. K., Corbitt, N., Hokey, D., Ramanathan, M. P., McKinney, K. A., … Sewell, D. (2009). Induction of Antitumor Immunity In vivo Following Delivery of a Novel HPV-16 DNA Vaccine Encoding an E6/E7 Fusion antigen. *Vaccine*, *27*(3), 431–440. http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.078

Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A. E., Chytil, A., Aakre, M., … Moses, H. L. (2008). Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell*, *13*(1), 23–35. http://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.12.004

Yang, Z.-Z., Grote, D. M., Ziesmer, S. C., Niki, T., Hirashima, M., Novak, A. J., … Ansell, S. M. (2012). IL-12 upregulates TIM-3 expression and induces T cell exhaustion in patients with follicular B cell non-Hodgkin lymphoma. *The Journal of Clinical Investigation*, *122*(4), 1271–1282. http://doi.org/10.1172/JCI59806

Yokosuka, T., Takamatsu, M., Kobayashi-Imanishi, W., Hashimoto-Tane, A., Azuma, M., & Saito, T. (2012). Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(6), 1201–1217. http://doi.org/10.1084/jem.20112741

Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., … Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *190*(7), 3783–3797. http://doi.org/10.4049/jimmunol.1201449

Zajac, A. J., Blattman, J. N., Murali-Krishna, K., Sourdive, D. J., Suresh, M., Altman, J. D., & Ahmed, R. (1998). Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *The Journal of Experimental Medicine*, *188*(12), 2205–2213.

Zhou, Q., Munger, M. E., Veenstra, R. G., Weigel, B. J., Hirashima, M., Munn, D. H., … Blazar, B. R. (2011). Coexpression of Tim-3 and PD-1 identifies a CD8+ T-cell exhaustion phenotype in mice with disseminated acute myelogenous leukemia. *Blood*, *117*(17), 4501–4510. http://doi.org/10.1182/blood-2010-10-310425

Zhu, X.-D., Zhang, J.-B., Zhuang, P.-Y., Zhu, H.-G., Zhang, W., Xiong, Y.-Q., … Sun, H.-C. (2008). High expression of macrophage colony-stimulating factor in peritumoral liver tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma.

Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, *26*(16), 2707–2716. http://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.6521

Zippelius, A., Batard, P., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Liénard, D., Lejeune, F., … Pittet, M. J. (2004). Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Research*, *64*(8), 2865–2873.

Zitvogel, L., Mayordomo, J. I., Tjandrawan, T., DeLeo, A. B., Clarke, M. R., Lotze, M. T., & Storkus, W. J. (1996). Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *The Journal of Experimental Medicine*, *183*(1), 87–97.

Zwaveling, S., Mota, S. C. F., Nouta, J., Johnson, M., Lipford, G. B., Offringa, R., … Melief, C. J. M. (2002). Established Human Papillomavirus Type 16-Expressing Tumors Are Effectively Eradicated Following Vaccination with Long Peptides. *The Journal of Immunology*, *169*(1), 350–358. http://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.350

ANNEXES

Annexe 1 : Article

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Vol. 6, No. 29

Vaccine-induced tumor regression requires a dynamic cooperation between T cells and myeloid cells at the tumor site

Maxime Thoreau[1,2,3,4], HweiXian Leong Penny[5], KarWai Tan[5], Fabienne Regnier[1,2,3,4], Julia Miriam Weiss[1,2,3,4], Bernett Lee[5], Ludger Johannes[6,7,8], Estelle Dransart[6,7,8], Agnès Le Bon[1,2,3], Jean-Pierre Abastado[5], Eric Tartour[9], Alain Trautmann[1,2,3,4,*], Nadège Bercovici[1,2,3,4,*]

[1]Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France

[2]Cnrs, UMR8104, Paris, France

[3]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[4]Equipe labellisée "Ligue contre le Cancer", Paris, France

[5]Singapore Immunology Network, BMSI, A-STAR, Singapore

[6]Institut Curie, Paris, France

[7]INSERM U1143, Paris, France

[8]CNRS UMR3666, Paris, France

[9]Inserm U970, PARCC, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[*]These authors have contributed equally to this work

Correspondence to:
Nadège Bercovici, **e-mail:** nadege.bercovici@inserm.fr
Alain Trautmann, **e-mail:** alain.trautmann@inserm.fr

Keywords: *T lymphocytes, myeloid cells, vaccine, tumor regression, imaging*

Abbreviations: TAM, tumor-associated macrophages; TIL, tumor-infiltrating T lymphocytes.

Received: *April 15, 2015* ***Accepted:*** *July 29, 2015* ***Published:*** *August 11, 2015*

ABSTRACT

Most cancer immunotherapies under present investigation are based on the belief that cytotoxic T cells are the most important anti-tumoral immune cells, whereas intra-tumoral macrophages would rather play a pro-tumoral role. We have challenged this antagonistic point of view and searched for collaborative contributions by tumor-infiltrating T cells and macrophages, reminiscent of those observed in anti-infectious responses. We demonstrate that, in a model of therapeutic vaccination, cooperation between myeloid cells and T cells is indeed required for tumor rejection. Vaccination elicited an early rise of CD11b$^+$ myeloid cells that preceded and conditioned the intra-tumoral accumulation of CD8$^+$ T cells. Conversely, CD8$^+$ T cells and IFNγ production activated myeloid cells were required for tumor regression. A 4-fold reduction of CD8$^+$ T cell infiltrate in CXCR3KO mice did not prevent tumor regression, whereas a reduction of tumor-infiltrating myeloid cells significantly interfered with vaccine efficiency. We show that macrophages from regressing tumors can kill tumor cells in two ways: phagocytosis and TNFα release. Altogether, our data suggest new strategies to improve the efficiency of cancer immunotherapies, by promoting intra-tumoral cooperation between macrophages and T cells.

INTRODUCTION

T lymphocytes play an important role in restraining tumor development. Their infiltration in most human primary tumors is associated with better prognosis [1] and they seem to keep in check disseminated tumor cells and metastatic outgrowth [2]. Based on these notions, various types of T-cell based immunotherapies have been developed for treating cancer patients, and provided encouraging clinical results in the past few years.

In particular, melanoma patients have been successfully treated with high doses of IL-2 following adoptive transfer of TIL (Tumor infiltrating T lymphocytes) and lympho-depletion by chemo- and radiotherapy [3]. Leukemic patients have been treated with autologous T cells engineered to express anti-CD19 chimeric receptors [4]. Other impressive results have been achieved in patients with advanced melanoma treated with a combination of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 antibodies [5].

At the same time where these successes were obtained, the dominant point of view attributed a major role for T cells in the anti-tumor defense and most often restricted the contribution of macrophages to their suppressive and pro-tumoral potential. The temporal dimension of anti-tumoral immune responses is too rarely taken into account, which leads to neglect a major fact: cell states are dynamic. The immune system has been shaped by evolution so as to fight infections, not cancer, and efficient immune responses against viruses or bacteria invariably require a whole set of cellular interactions. When these pathogens are cleared, the immune responses are transient, with an acute and a recovery phase that are quite different, and both necessary for the efficacy and the safety of the system [6].

It is conceivable that a similar biphasic time-response would apply for an immune reaction leading to tumor rejection. More than a century ago, W. Coley was one of the first to show that responses to infections could be followed by tumor regression, without clearly understanding why [7]. Adjuvants like CpG have been used to mimic such an inflammation in the context of tumors, but have often been considered mostly as an efficient way of maturing antigen-presenting cells to facilitate T cell priming. Such a view centered on T cells has overlooked the notion that innate cells like macrophages and neutrophils can also be efficient killers, for instance during the acute phase of anti-infectious responses.

A fundamental question that remains to be solved is how immune cells can reject tumor cells embedded in a tumor mass, in a connective network of stromal cells. In particular, the role of T lymphocytes in the rejection of such nodules is far from being understood. A classical view poses that T cells kill tumor cells directly in the tumor. Dynamic imaging revealed indeed that TCR-transgenic T cells can be found close to dying tumor cells after adoptive transfer [8] and apoptosis induced by T cells in contact with tumor cells could be monitored directly *in vivo* [9]. It is difficult however to estimate how important these events are during tumor regression. One must take into account that this process is relatively slow, since one T cell needs several hours to kill one tumor cell [9]. This may explain why adoptive transfer of large numbers of T cells or chimeric receptor-transfected T cells is necessary to induce objective clinical responses in solid tumors (i.e., partial or complete tumor regression). Without adoptive transfer of such massive quantities of T cells, TIL are largely outnumbered by tumor cells, and it is highly unlikely that they would exhibit a massive direct cytotoxic effect. One must therefore consider more likely that T cells interact and cooperate with other immune cells that could gain cytotoxic potential against tumor cells to reject an established tumor.

It is striking that the ability of infiltrating T cells to secrete IFNγ appeared more crucial than their perforin-dependent cytotoxicity in various cancer models [10, 11]. This observation suggested that other cytotoxic effector cells may indeed be activated due to IFNγ-producing T cells. Our group has previously shown that in advanced human tumors, T cells accumulate in the peri-tumoral stroma, and are rarely in direct contact with tumor cells [12]. It is thus likely that T cells mostly interact with other immune cells in the stroma. Intriguingly, frequent contacts between T cells and myeloid cells in tumors have been reported [13]. The functional consequences of such interactions remain unclear although they are generally considered to be non productive in progressing tumors [14, 15].

Previous studies have focused on progressing tumors and mechanisms of immune failure. By contrast, the goal of this work was to study the dynamics of an efficient anti-tumoral immune response occurring in regressing tumors. Drawn from observations of immune responses during infections, we co-administered IFNα with a vaccine, in the TC1 tumor transplantation model. The vaccine was composed of a delivery system targeting dendritic cells, the non-toxic B-subunit of Shiga toxin coupled to HPV16 derived-E7 peptide (STxBE7 or E7-vaccine), and was used to elicit $CD8^+$ T cells specific for E7 antigen expressed by the TC1-tumor cell line [16]. Vaccination of these tumor-bearing mice induced tumor regression, and by monitoring the influx of immune cells into tumors preceding regression, we have identified the key cellular and molecular players mediating the anti-tumor immunity. Using different experimental approaches, we provide evidence that, at least in this model and in the EG7 model, not only T cells but also activated, cytotoxic, tumor infiltrating myeloid cells are required for eliminating the tumor by TNFα production and phagocytosis of tumor cells. In these models, the key factor for the anti-tumoral action is not one cell type, but a dynamic and multi-step *cooperation* between two cell types.

RESULTS

The combination of E7-vaccine + IFNα induces systematic regression of TC1-tumors

C57BL/6J mice were transplanted with TC1 tumor cells expressing the E7 protein from HPV. When tumor nodules reached 6 mm in diameter (~10 days), mice were treated with two peri-tumoral injections of

STxBE7- (termed E7-vaccine thereafter) and IFNα, one week apart. All mice showed a regression of TC1 tumors after the second injection (Figure 1A). Injection of IFNα alone did not halt the tumor growth and in mice treated with the vaccine alone tumors either stabilized or progressed, but almost never regressed after the boost (Figure 1A). These data show that the delivery of the vaccine together with IFNα (mimicking an infection near the tumor site) was optimal for inducing a systematic regression of tumors.

To follow the fate of TC1 tumor-cells *in situ* during tumor regression, mice were transplanted with TC1-GFP cells and tumors were analyzed by immunofluorescence on tumor slices [17]. In contrast to PBS-control mice, most tumor cells had been already eliminated in vaccinated mice at day 11, and replaced by cells with small nuclei, likely immune cells (Figure 1B). Imaging of whole tumor slices revealed that during stabilization at day 8 post-vaccination, tumor attack occurred from the periphery of the tumor (GFP^{neg} area) where the vasculature was denser (Figure 1C and 1D). At day 10, the tumor was also attacked from the inside and finally by day 11, only a dense vascular network, no longer surrounded by GFP^+ cells, was detected. These results confirmed that tumor vessels, which are required for tumor growth, are also the entry door for the Trojan horse, i.e. anti-tumor immune cells.

Influx of myeloid cells coincides with the onset of tumor regression and precedes infiltration by $CD8^+$ T cells

As T cells were the primary target of the E7-vaccine, we first focused on the T cell response induced by vaccination. Transcriptomic analysis showed that expression of *CD8A* together with *TBX21*, *IFNG* and granzyme B progressively increased between day 8 and day 11 in vaccinated animals (Figure 2A). These data indicate that the compound vaccine primed type 1 cytotoxic $CD8^+$ T cells. *In situ*, $CD8^+$ T cells started to infiltrate the tumors by day 8 (Figure 2B). Surprisingly however, these CD8 T cells represented only a small portion of the $CD45^+$ immune infiltrate detected at that time. While myeloid $F4/80^+$ cells were already present in the tumor before treatment, we observed that they formed a much denser network around tumor cells in vaccinated mice compared to T cells (Figure 2B).

As tumor regression in mice treated with E7-vaccine + IFNα occurred in a predictable and reproducible manner (Figure 1A), it was possible to analyze the composition of the immune infiltrate *before* the onset of tumor regression. As shown in Figure 2C, immune cells were recruited to tumors of vaccinated mice in two distinct waves. A first rise in the $CD45^+$ cells infiltrate occurred 5 days after priming, increasing from 5% to 12% (a significant increase, $p = 0.03$, Mann-Whitney) and a second rise at day 11, when $CD45^+$ cells represented up to 40% of viable cells in the tumor. The kinetics of $CD11b^+$ cells followed the same pattern, with an early rise in $CD11b^+$ cells 5 days after priming. At this time point, $CD11b^+$ cells represented 8% of living cells, and constituted the vast majority of $CD45^+$ cells in the tumor, whereas infiltrating $CD8^+$ T cells were scarce and represented less than 1% of living cells. At the time when the tumor started to shrink (day 8–9), $CD8^+$ T cells were still poorly represented (<5% of live cells) and were largely outnumbered by $CD11b^+$ cells (which reached 15% of living cells). Nevertheless, there was a very small increase in $CD8^+$ T cells at day 5 (from 0.2 to 0.7% of living cells, right box Figure 2C) and these very rare CD8 T cells made frequent contact with myeloid cells as illustrated in Figure 2D. The density of $CD8^+$ T cells became important only at late time points (day 10) when most of the tumor mass had already regressed. Such levels point out an indirect role of these cells, but not a role as major direct cytotoxic effector cells. Other immune cell subsets ($CD4^+$ T cells, NK cells, $Ly6G^+$ cells and γδT cells) remained at low levels (< 4% of living cells, Figure S1) at all time points. Altogether, these data show that tumor regression is associated with the presence of an early dense myeloid infiltrate in the tumor followed by a secondary accumulation of $CD8^+$ T cells.

Both $CD8^+$ TIL and infiltrating-$F4/80^+$ cells are necessary for the tumor regression

$CD8^+$ TIL were rare when the tumor started to shrink at day 8–9, despite a clear activation and infiltration later on. These data made us wonder whether $CD8^+$ TIL were really essential for tumor regression. To address this question, $CD8^+$ T cells were depleted at the time of regression, i.e. starting anti-CD8 i.p. injections on day 5 after priming of TC1 tumor bearing mice. All tumors progressed in CD8-depleted animals (Figure 3A). In comparison, depletion of CD4 T cells did not inhibit tumor regression (Figure 3A). These results showed that the presence of CD8, but not that of CD4 T cells, was necessary for TC1 tumor regression.

Our transcriptomic analysis revealed that T-cell chemoattractants CXCL9 and CXCL10 were strongly upregulated after vaccination (Figure 3B). For this reason, we treated chemokine receptor 3 (CXCR3) knockout mice with the compound vaccine. Surprisingly, despite the marked 4-fold reduction in $CD8^+$ T cell infiltrate (Figure 3C), TC1-tumors were quite efficiently rejected in vaccinated CXCR3KO mice (Figure 3D). Altogether, these results show that $CD8^+$ T cells were important for TC1 tumor regression, but they cannot be the sole cytotoxic effectors at the tumor site.

In order to investigate whether myeloid cells participate in the elimination of tumor cells *in vivo*, we treated TC1-tumor bearing mice with the compound vaccine and PLX3397, a CSF1-R signaling inhibitor [18]. This treatment led to an average 2-fold reduction of

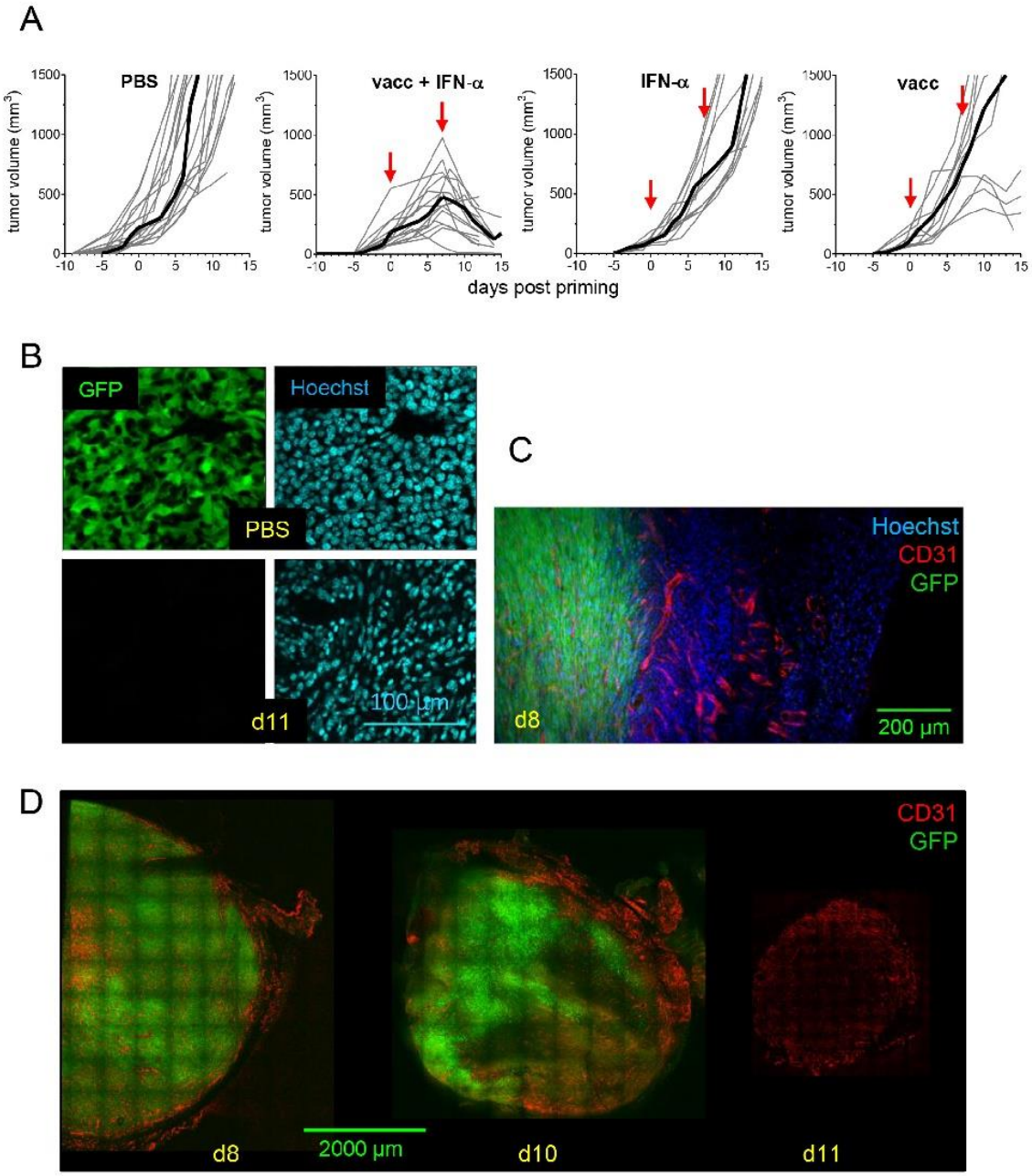


Figure 1: TC1 tumor regression is triggered by injection of E7-vaccine + IFNα. C57BL6/J mice with TC1-tumors received various combinations of the E7-vaccine and IFNα. **A.** Tumor growth curves (individual mice, grey thin line; mean, dark thick line) are shown for each treatment. Red arrows : days of priming (day 0) and boost (day 7). **B.** The disappearance of tumor cells after vaccination is viewed 11 days after the priming as the disappearance of GFP$^+$ cells (left) and as the decrease in the size of the nuclei (right), tumor nuclei being clearly larger (top) than nuclei of infiltrating immune cells (bottom). **C.** The disappearance of GFP$^+$ cells (d8) begins in the tumor peripheral regions, **D.** which show a dense CD31$^+$ vasculature (d8) and then affects more internal regions (d10), still the most vascularized ones. At d11, all GFP$^+$ cells have disappeared.

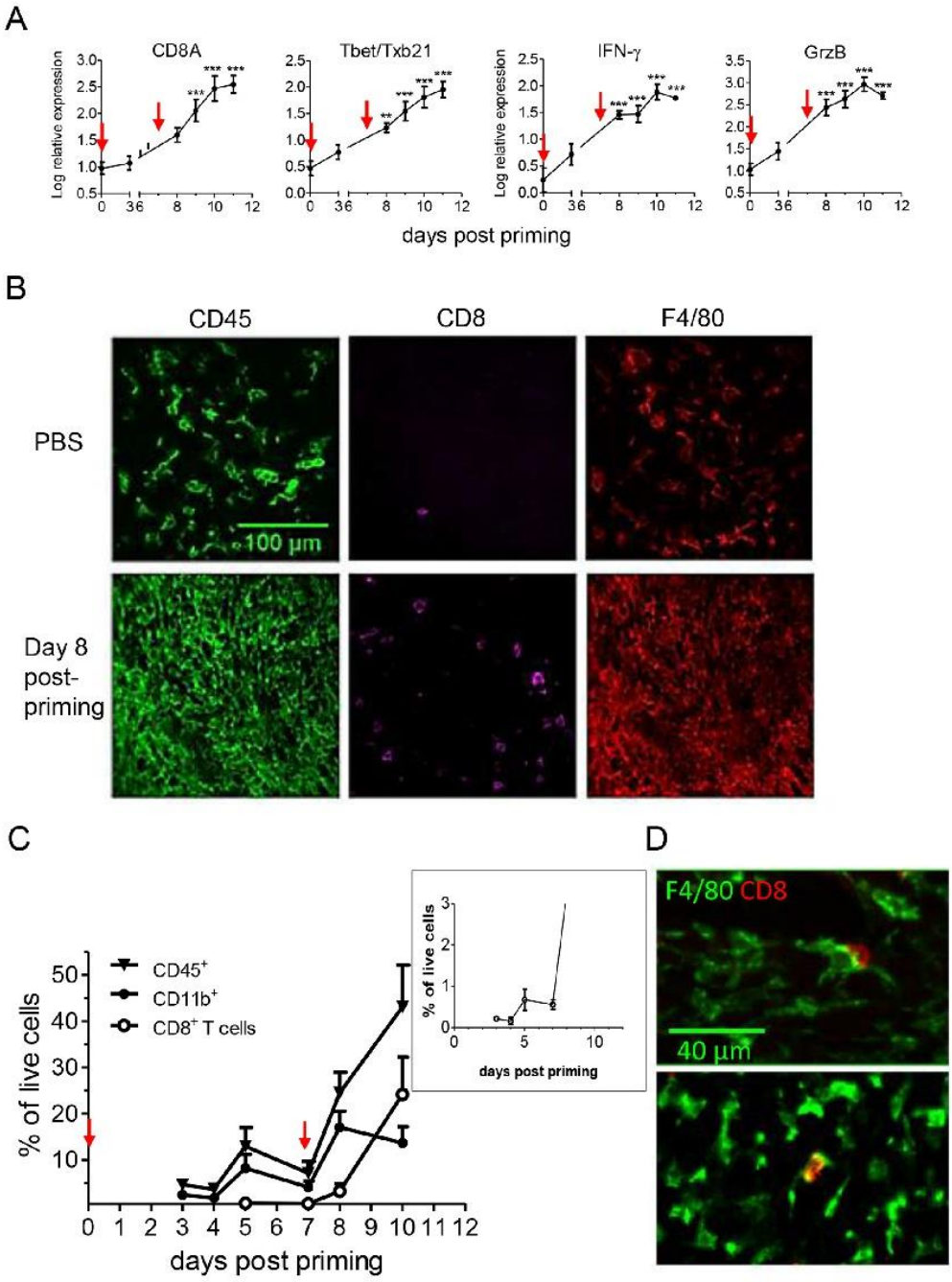


Figure 2: After vaccination with E7-vaccine + IFNα, an increase in the CD11b$^+$ myeloid infiltrate precedes the accumulation of CD8$^+$ T cells. A. Transcriptomic analysis of tumor infiltrate collected at various time points after vaccination show a progressive infiltration by type-1 effector CD8$^+$ T cells. Time 0 corresponds to aged-matched PBS treated mice in which gene expression was quite stable during the follow up period. Statistical differences between individual time points and time 0 are shown. **B.** In control mice (top, PBS), the CD45$^+$ infiltrate is mainly constituted of myeloid F4/80$^+$ cells. After vaccination (bottom), regressing tumors (day 8) show a high density of CD45$^+$ cells with both CD8$^+$ T cells and F4/80$^+$ cells. **C.** A detailed kinetics analysis by flow cytometry of CD45$^+$, CD11b$^+$ and CD8$^+$ T cell infiltration after vaccination revealed an early rise in CD11b$^+$ cells at day 5. A tiny increase of CD8 T cells, from 0.2 to 0.7% of live cells in the tumor, occurred in this time frame (Inset). **D.** Two examples showing that these rare CD8$^+$ T cells at day 5 are in frequent interaction with F4/80$^+$ cells.

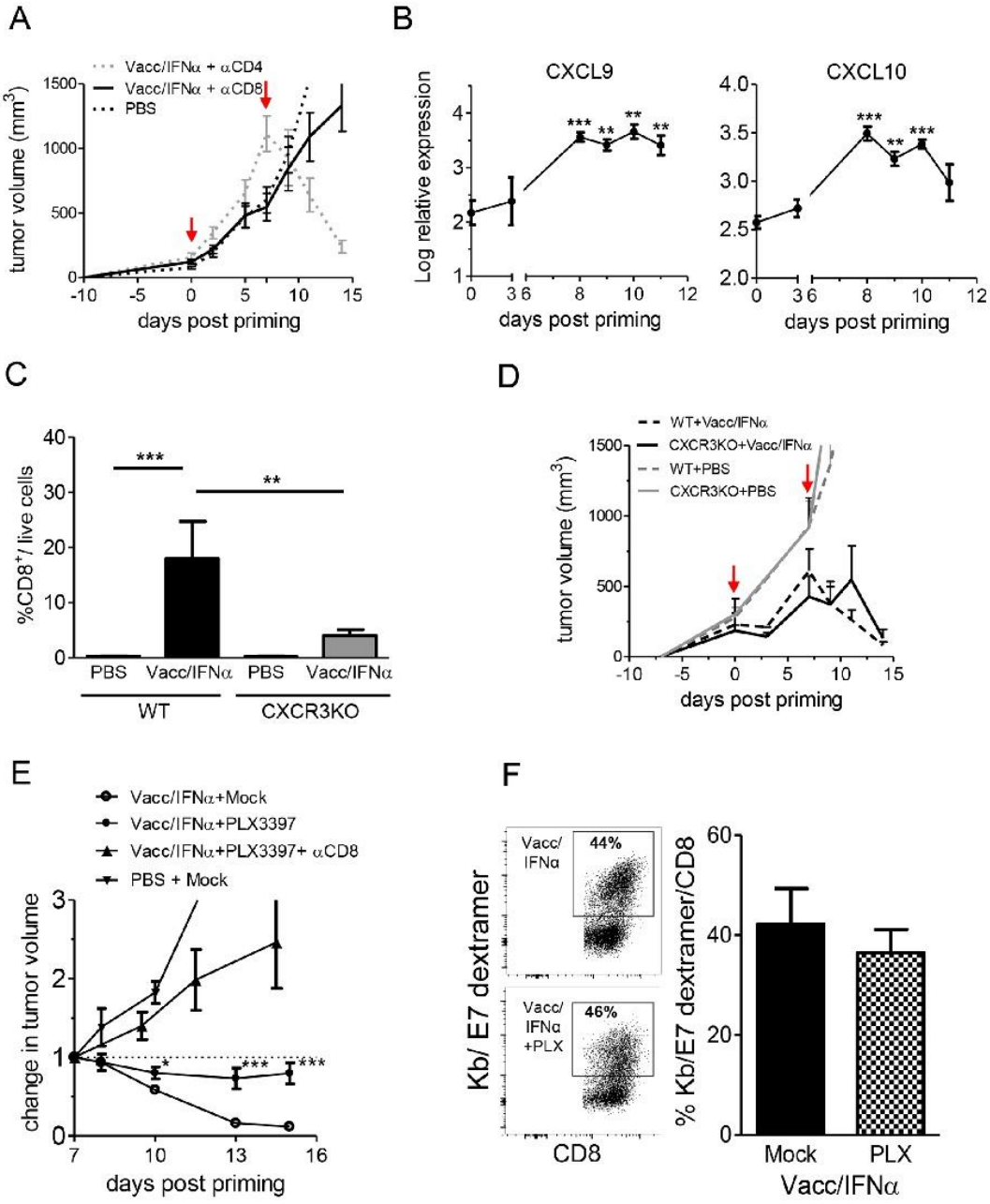


Figure 3: CD8⁺ T cells and myeloid-cell infiltrate are necessary for the tumor regression. A. Depletion of CD8 T cells prevented vaccine induced-tumor regression whereas depletion of CD4⁺ T cells did not. Tumor growth curves (mean of 8–12 individual mice) are shown for anti-CD8 Ab, anti-CD4 Ab and PBS-control littermates. **B.** Transcriptomic analysis shows that CXCL9 and CXCL10 are upregulated in tumors after E7-vaccine+IFNα treatment. **C.** Reduction in vaccine-induced CD8⁺ T cell infiltrate in CXCR3KO mice compared to wild type mice. **D.** The growth of untreated TC1 tumors is unaffected by the KO of CXCR3. The vaccine treatment induced tumor regression in CXCR3KO just like in wild type littermates. **E.** After depletion of myeloid cells with PLX3397, the E7-vaccine+IFNα only elicited tumor stabilization, but not the tumor regression observed in mice fed with the control chow. Tumor regression was further blocked in mice treated with PLX3397 and anti-CD8 antibody. The change in tumor volume at various days post priming compared to tumor size at day 7 is shown (mean+/−SEM from 5 to 8 mice from 2–3 independent experiments). **F.** Depletion of myeloid cells with PLX3397 did not prevent the priming of Kb/E7-specific CD8 T cells by E7-vaccine, as quantified (left, one typical experiment) with dextramers on CD8 TIL from mock (top) or PLX3397-treated mice (bottom). Right : quantification done in 2 independent experiments.

intra-tumoral CD11b$^+$ cells within 2–3 days, with a significant reduction (~5-fold) in the proportion of F4/80$^+$ cells (Figure S2). In these conditions, the tumors were stabilized, i.e., tumor regression no longer took place (Figure 3E). The simultaneous depletion of CD8$^+$ T cells and F4/80$^+$ cells abolished the efficacy of the vaccine. Of note, the combination of PLX3397 + anti-CD8 was not more efficient than anti-CD8 alone, because the anti-CD8 alone has already reached a full anti-vaccine efficiency. The frequencies of E7-specific CD8$^+$ T cells infiltrating tumors were similarly high in macrophage-depleted and control mice (~45% of CD8$^+$ TIL on day 10, Figure 3F), which demonstrated that this treatment did not interfere with priming by the vaccine compound. It does not mean that the absolute number of CD8 T cells was not affected within the tumor, and in fact, it was decreased. This number results from the combination of the priming efficacy (which was kept intact) and of the efficiency in the recruitment of activated T cells in the tumor (whether E7-specific or not), which was diminished, as a direct or indirect result of the depletion of intra-tumoral macrophages. Altogether, these results show that activated tumor-infiltrating myeloid cells are necessary for TC1-tumor cell elimination after vaccination, and that their action depends on the presence of anti-tumor CD8$^+$ T cells.

To strengthen this conclusion, we used another way of reducing the intra-tumoral myeloid infiltrate, by implanting the tumors in CCR2-deficient mice, a condition well known to lower intra-tumoral monocyte recruitment [19]. Under these conditions, the intra-tumoral myeloid infiltrate was reduced, and so was the efficacy of the anti-tumoral vaccine (Figure S3A), which confirmed the necessity of myeloid cells for tumor regression. We investigated further whether anti-tumor myeloid cells could also be induced after immunization in additional tumor models. This turned out to be the case for EG7-tumors (EL4 thymoma cells expressing the chicken ovalbumin antigen) in which regression induced by STxB-OVA+IFNα is dependent on tumor-infiltrating myeloid cells (Figure S3B).

Dynamic cooperation between intra-tumoral CD8$^+$ T cells and myeloid cells

We then analyzed in more details the phenotype and activation status of myeloid cells infiltrating regressing tumors. The CD11b$^+$-infiltrate was mainly composed of CD11b$^+$CD11c$^{neg/lo}$ and to a lesser extent of CD11b$^+$CD11c^{hi} cells (~10%) (Figure 4A, dot plots). Expression of MHC II molecule was upregulated on CD11b$^+$ cells after treatment (Figure 4A, histograms) indicating that these cells were activated. The CD11b$^+$CD11c$^{neg/lo}$ infiltrate was composed of F4/80^{hi} Ly6C^{lo} cells (tumor-associated macrophages, TAM) and Ly6C^{hi} F4/80^{lo} cells (Ly6C^{hi}, inflammatory monocytes) subsets (Figure 4B). In the absence of vaccination, a minority of Ly6C^{hi} cells (~10%) expressed MHC II (Figure 4C). The level of MHC II on TAM was more variable along the same period in control mice (from 20–40% MHC II$^+$) suggesting that TAM could be locally activated by the growing tumor. However, vaccination induced a strong upregulation of MHC II expression at day 5 on Ly6C^{hi} cells, concomitant with the early rise in myeloid cell number depicted in Figure 2C. Myeloid activation progressively increased to reach a maximum at day7 (~45% of Ly6C^{hi} cells were MHC II$^+$). MHC II expression on TAM was upregulated a bit later (~day 8) and was expressed by most of these cells (>80%) by day 10. As illustrated in Figure 4D, a large fraction of CD11b$^+$ cells expressed F4/80 in progressing tumors (PBS), whereas CD11b$^+$ Ly6C$^+$ cells were scarce. The major vaccination-induced increase in MHC II expression by F4/80$^+$ cells is also shown. It is striking that activation of myeloid cells at day 7 did not occur in animals depleted of CD8$^+$ T cells (Figure 4C), indicating that, despite their paucity at that time, vaccine primed-CD8$^+$ T cells, that were frequently in close contact with F4/80$^+$ cells at this early time point (Figure 2D), were necessary for the activation of infiltrating myeloid cells.

In an attempt to prevent some of the interactions between myeloid cells and T cells, IFNγKO mice were treated with the compound vaccine. In IFNγKO mice, tumor regression was prevented (Figure 4E) and the activation of myeloid cells (i.e., upregulation of MHC II) was markedly decreased compared to that observed in wild type mice (Figure 4F). These results indicate that efficient activation of F4/80$^+$ myeloid cells, presumably by CD8$^+$ T cells, is dependent on IFNγ.

We further characterized the activation status of myeloid cells infiltrating the tumor. The early increase in *Ly6C* gene expression in the tumor (before day 8) was accompanied with the expression of some myeloid markers upregulated during acute inflammation and commonly associated with M1-polarized macrophages (i.e. MHC II^{hi}, TNFα^{hi}, CD86^{hi}, Figure S4). However, the expression peak for several other markers of inflammatory cells was only reached later: see e.g. the abundance of CCL2 and CCR2$^+$ cells (peaking at day 10), or iNOS, a key M1 marker whose expression peaked at day 11, when the tumors had already markedly regressed (Figure S4). We examined additional genes initially associated with M2 cells (Fizz, IL-10, CD206, TGF-β), and observed an early and marked increase for some of them (Fizz, IL-10). These data underline that the local delivery of the vaccine+IFNα activated and reprogrammed the myeloid cell compartment with modulation of various genes that no more fit with the polarized M1/M2 schema as underlined recently [20].

To determine how tumor-infiltrating myeloid cells could contribute to tumor regression, we first looked at the production of TNFα by myeloid cells. About 12% of CD11b$^+$ cells infiltrating regressing tumors in vaccinated mice spontaneously produced TNFα *ex vivo*, compared to 3% of these cells in tumors from control mice (Figure S5). Stimulation with IFNγ+LPS *in vitro* revealed that the vast

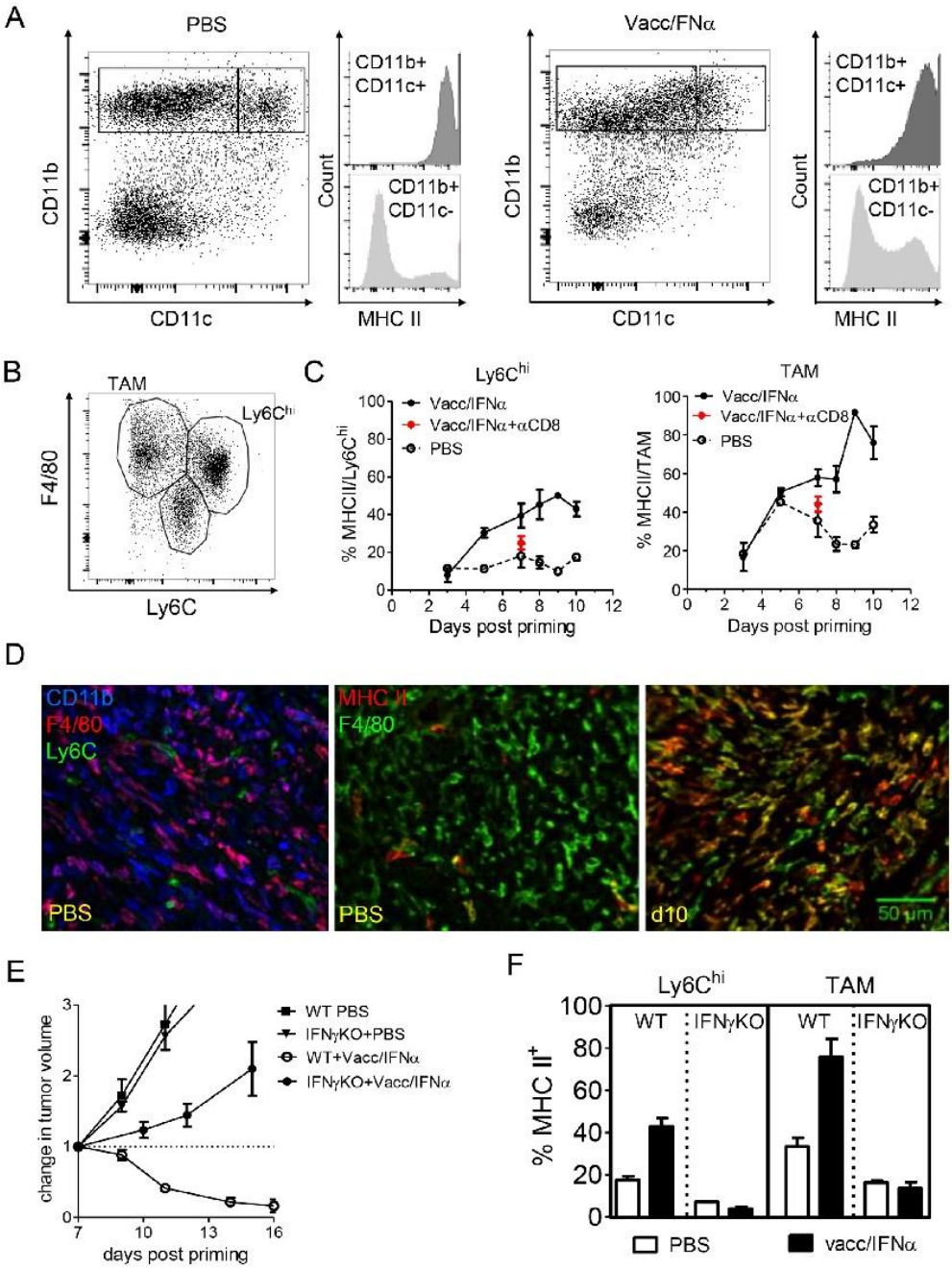


Figure 4: Local activation of F4/80$^+$ myeloid cells is promoted by the interactions with IFN-γ producing CD8 T cells. **A.** In progressing tumors (PBS, left), a fraction of CD11b$^+$ cells also express CD11c and MHC II, but most CD11b$^+$ cells do not express MHC II. After vaccination (right, d11 in this example), an increased fraction of CD11b cells express MHC II. **B.** Among CD11b$^+$ myeloid cells, at least 3 populations may be distinguished based on F4/80 and Ly6C expression. **C.** After vaccination, MHC II expression is increased both in Ly6C^{hi} cells and in F4/80^{hi} Ly6C^{neg} TAM, except in mice depleted in CD8 (red asterix). **D.** Left : in progressing tumors (PBS), a large fraction of CD11b$^+$ cells express F4/80 (different hues of purple). Middle: in progressing tumors, very few macrophages (F4/80$^+$) are activated (MHC II$^+$). MHC II$^+$ F4/80^{neg} cells are even rarer. Right : at day10, a majority of F4/80$^+$ cells are MHC II$^+$. **E.** The efficacy of E7-vaccine + IFNα treatment is abrogated in IFNγ KO mice (tumor growth curves with the mean+/-SEM of 7 mice from 2 independent experiments). **F.** Activation of Ly6C^{hi} cells and TAM was prevented at day 10 after priming in IFNγ KO mice (mean+/-SEM of 3 mice from 3 independent experiments).

majority of CD11b$^+$ cells (>80%) from vaccinated mice readily produced TNFα. These results are suggestive of a cytotoxic potential for these myeloid cells infiltrating regressing tumors. In co-culture experiments, TC1-GFP$^+$ cells were effectively killed by F4/80$^+$ cells purified from regressing tumors, as detected by the reduced density of adherent TC1 cells (Figure 5A and 5B). In sharp contrast, a dense network of healthy TC1-GFP$^+$ cells was observed in co-cultures with myeloid cells from progressing tumors. Importantly, we could show that the cytotoxic activity of myeloid cells was partially blocked in the presence of an anti-TNFα antibody (Figure 5A and 5B). Of note, in this *in vitro* assay, CD8 T cells, purified from tumor-bearing-mice that were vaccinated 8 days earlier, did not modify the cytotoxicity of purified macrophages. CD8 T cells were added at densities 10 times lower than that of monocytes/macrophages, which corresponds to *in vivo* ratios (data not shown). The CD8-macrophage cooperation observed *in vivo* presumably required precise spatio-temporal constraints that were not recapitulated in the *in vitro* assay.

Next, we attempted to visualize directly dying tumor cells in the tumor tissue of vaccinated animals: in tumors examined 24 h after the boost, most dead (PI$^+$) tumor cells were found surrounded by F4/80$^+$ myeloid cells (Figure 5C, left panel), at several cell diameters from CD8$^+$ T cells. In addition, we frequently observed examples of living (still green) but compacted TC1 cells fully engulfed by myeloid cells (Figure 5C, right panel). These results revealed that at least a fraction of myeloid cells that infiltrate regressing tumors were likely to be cytotoxic for TC1-tumor cells by mechanisms that could include TNFα release and phagocytosis.

To gain further insight into the anti-tumoral *in vivo* mechanisms, we blocked potential myeloid effector molecules, TNFα and NO, in vaccinated TC1-bearing mice. As suggested by *in vitro* experiments, an anti-TNFα treatment, but not L-NAME treatment (an inhibitor of NO production), partially inhibited vaccination-induced tumor regression (Figure 5D).

Altogether, these results show that a multi-step CD8$^+$ T cell / myeloid-cell cooperation takes place within the tumor microenvironment after vaccination : this dynamic cooperation allows that vaccine-elicited CD8 T cells and activated cytotoxic myeloid-cells contribute to tumor regression.

DISCUSSION

CSF-1 overexpression and high densities of intra-tumoral macrophages are often considered as indicators of poor prognosis for cancer patients [21, 22]. Even if this is true in progressing tumors, this should not hide the fact that appropriately stimulated macrophages may directly or indirectly slow down tumor growth [23, 24]. Here, we have shown that *after an appropriate stimulation*, intra-tumoral macrophages - in cooperation with T cells - contributed efficiently to tumor regression. This apparent discrepancy (pro- or anti-tumoral macrophages) illustrates the importance of taking into account the interactions between different immune cells, and the temporal dimension of an immune response, which allows the apparently same cell type to exert quite different effects [6].

More precisely, we have shown that rejection of TC1 and EG7 solid tumors induced by a vaccine+IFNα requires the participation of activated-myeloid cells. Our study highlights the anti-tumoral potential of macrophages during an acute immune response induced in tumors. Such an anti-tumoral potential has already been reported, but after a targeted macrophage activation [23, 25, 26] and rarely following cooperation with T cells [27–29]. What was the appropriate monocyte/macrophage stimulation in our experiments? Both components of the vaccine (IFNα and STxB-vaccine) probably contributed to it. IFNα is known to be able to trigger an inflammatory response [29, 30] and IFN type I downstream signaling was recently associated with efficient antitumor activity in some chemotherapy-induced immune responses [31]. The contribution of STxB-vaccine to the appropriate myeloid stimulation could have lied in the activation of a CD8$^+$ T cell response associated with an increase in IFNγ. IFNγ is a potent stimulus for myeloid cells, especially when combined with CD40 stimulation [32]. Such a coupled IFNγ plus CD40 stimulation may occur during cognate T cell-myeloid cell close contacts. The existence of such a phenomenon is suggested by different observations. 1) Signs of myeloid cell activation (MHC II and CD86 expression, Figure 4C and S4) took place with the first wave of T cell infiltration (5 days after the priming), quantitatively quite modest, but potentially qualitatively important. 2) Intra-tumoral T cell-macrophage interactions were easily observed at day 5, despite the rarity of infiltrating T cells at that time (Figure 2C and 2D). 3) T cells played an important role even when they were not abundant, e.g., in CXCR3 KO mice. 4) Macrophage activation, measured by MHC II expression, did not occur under conditions in which activated-T cells were absent (e.g., after CD8$^+$ T cell depletion, Figure 4C). 5) IFNγ played a key role in vaccine efficacy, potentially and at least in part, through T cell-induced macrophage activation (Figure 4E and 4F). This T cell / myeloid cells cooperation is reminiscent of the activation of host macrophages reported after adoptive cell transfer of IFNγ-producing T cells [10, 28, 33, 34, 35]. However, here, it has not been observed as a result of the massive introduction of IFNγ-producing T cells but simply as a result of T-cell stimulation in parallel to mimicking a local infection.

The efficient priming of E7-specific CD8$^+$ T cells, which is necessary to achieve tumor regression, was made possible by the use of the STxB-vaccine that favors induction of CD8$^+$ T cells [36, 37], in the absence of a marked CD4 activation. In our compound vaccine, it is likely that CD8$^+$ T cell help and recruitment were provided

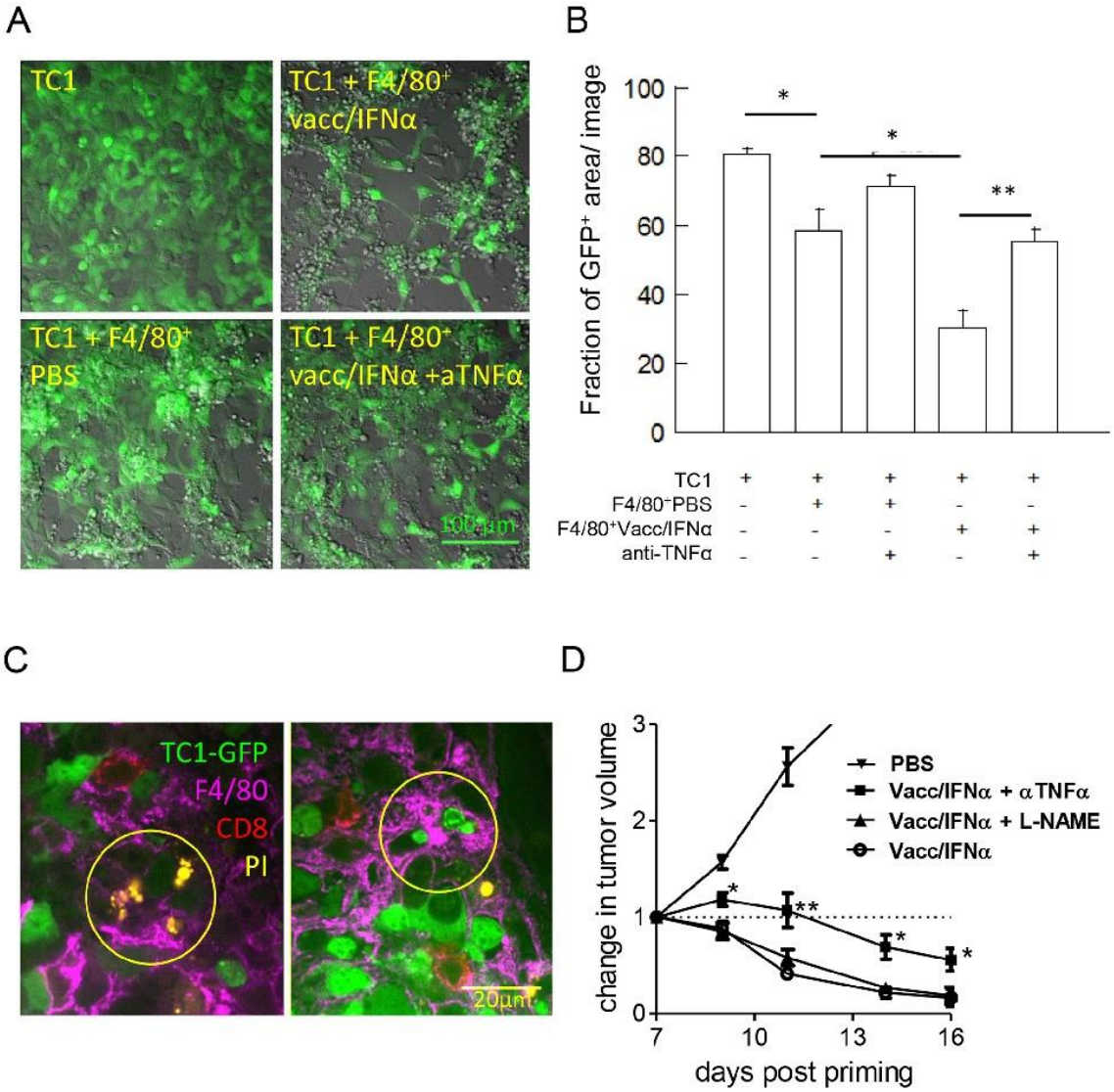


Figure 5: Activated-myeloid cells contribute to the killing of TC1-tumor cells by TNF-α release. A. TC1-GFP$^+$ tumor cells were co-cultured with F4/80$^+$ cells isolated from tumors at day 8. Contrary to control tumors (lower left), myeloid cells from vaccine treated mice (right panels) were cytotoxic for tumor cells (disappearance of GFP labeling, loss of tumor cells). Cytotoxic activity of F4/80$^+$ cells was blocked in the presence of anti-TNFα Ab (lower right). Representative examples out of 3 independent experiments are shown. **B.** Quantification of the living cells, measured in one out of 3 independent experiments. The apparent fraction of living adherent TC1 cells (fraction of the image occupied by GFP$^+$ cells, measured in 6–17 images per condition) is shown in the various conditions. **C.** Example of dying tumor cells in tumors of vaccinated mice 1 day after the boost, where PI$^+$ GFP$^-$ cells were found in close contact with F4/80$^+$ cells (left) or living tumor cells (small round GFP^{++} cells) were found within F4/80$^+$ cells (right). **D.** The efficacy of E7-vaccine + IFNα treatment is partially reduced in anti-TNFα treated mice but was not affected by NO inhibition with L-NAME.

by IFNα-dependent responses. There is an apparent paradox in the fact that tumor regression was blocked by complete CD8$^+$ T cells depletion with anti-CD8 antibodies, but remained unaffected when tumor-infiltrating CD8 T cells were markedly depleted in CXCR3KO mice. Different and non-exclusive explanations are possible. One is that the consequences of a full depletion are quite distinct from those of a partial depletion, especially if T cells act as a trigger or an amplifier for other cytotoxic effectors, as discussed below. Secondly, tumor regression could be conditioned by CD8$^+$ T cell/myeloid cell interactions taking place in tumor-draining lymph nodes, a phenomenon not expected to be affected in CXCR3 KO mice. Finally, CD8$^+$ T cells may include two subsets,

one of which being independent of CXCR3 ligands, for instance depending on CCL5 for its infiltration.

After treatment with the compound vaccine, the first sign of local anti-tumoral response was an increase in $CD11b^+$ myeloid cells, associated with high intra-tumoral levels of *Ly6C* and *CCL2* gene expression, typical of the appearance of classical/inflammatory monocytes recruited by CCL2/CCR2 [38]. This recruitment is functionally important, since we have shown that TC1-tumor regression was blocked in CCR2KO mice. A crucial difference with monocytes infiltrating progressing tumors [39, 40] is the fact that the vaccination promoted an inflammatory microenvironment. In our settings, IFNα induces the production of CXCL10. The fact that the depletion of myeloid cells with PLX3397 decreases the T cell infiltrate strongly suggests that myeloid cells act upstream to attract T cells to the tumor. In return, the coexistence of a small but decisive amount of T cells at the time of myeloid cell infiltration might have driven the swift up regulation of MHC class II, CD86 and TNFα in myeloid cells. The emergence of such activated myeloid cells is reminiscent of the TipDC observed after bacterial infection [41] or the $CD11b^+CD11c^+Ly6C^{hi}$ cells infiltrating tumors treated with anthracycline [42]. Note that the coexpression of F4/80 and CD11c in a fraction of activated intra-tumoral myeloid cells obscures the distinction between macrophages and dendritic cells in this microenvironment (contrary to the situation observed in lymph nodes). In order to mimic the local activation of macrophages by infiltrating T cells, we performed intra-tumoral injections of an anti-CD40 agonist antibody + IFNγ. However, this treatment elicited regression / stabilization in only a minority (4 out of 12) of TC1 tumors (data not shown). Thus, this combined treatment did not faithfully mimic the spatio-temporal features of the synchronized recruitment of T cells and monocytes elicited by the vaccine compound.

Myeloid cells could mediate cytotoxic and/or cytostatic effects on malignant cells. Our *in vitro* and *in vivo* data show that $F4/80^+$ cells from vaccinated mice can directly kill TC1 tumor cells by mechanisms that involve phagocytosis and TNFα. In previous studies with anti-tumoral macrophages, NO, ROS or TNFα were shown to slow down tumor growth *in vitro*, which may reveal cytostatic rather than cytotoxic effects [10, 26, 43, 44]. Even if $iNOS^+$ macrophages could be necessary in other settings for an optimal recruitment of T cells into tumors [24], in our system of vaccination against TC1 tumors, NO production was dispensable for vaccine-induced tumor regression.

When macrophages are considered exclusively as pro-tumoral cells, it is logical to aim at depleting them so as to facilitate the efficacy of cytotoxic agents or cytotoxic T cells [18, 45]. It has been reported that macrophage stimulation with poly I:C triggers an antitumor cytotoxicity [23], and that local low-dose gamma irradiation activated TAM and resulted in the recruitment of cytotoxic T cells [24]. We propose a more global view, in which myeloid cells, when appropriately stimulated, can be activated by primed T cells and can support those T cells to directly eliminate tumor cells. The existence of a bi-directional interaction between myeloid cells and T cells in the tumor, including attraction and activation, warrants further investigations.

Our findings contrast with recent reports in which myeloid cells reduce the anti-tumoral action of chemotherapy or adoptive T cell transfer [18, 45, 46]. This paradox most probably reflects the heterogeneity of the tumor types and microenvironments and the need to identify which therapies or treatment-schedule conditions the generation of anti-tumor myeloid cells.

As mentioned earlier, a few studies report on the existence of anti-tumoral macrophages. However, to our knowledge, this is the first report in which an efficient anti-infectious response is used as a conceptual model for an anti-tumoral response. In a typical anti-infectious response the local alert of resident macrophages results in macrophage activation and recruitment of more innate cells followed by T cell priming and antigen-specific T cell recruitment to the infection site. By making the appropriate spatio-temporal measurements, we were able to describe an anti-tumoral response with the initial local activation of myeloid cells, involving a small amount of tumor-infiltrating T cells, which clearly preceded a more massive T cell infiltrate immediately after the vaccination boost. Our study highlights that the anti-tumoral myeloid cells should not be viewed as a static subset entirely distinct from the pro-tumoral ones, but rather as a dynamic population resulting from an influx of myeloid cells and from their intra-tumoral differentiation. The kinetics of these fluxes would deserve a whole additional study.

MATERIALS AND METHODS

Animal studies

C57BL/6J mice were purchased from Charles River laboratories. Mice were maintained in the Cochin Institute SPF animal facility. Animal care was performed by expert technicians in compliance with the Federation of European Laboratory Animal science association and under the approval of the animal experimentation ethics committee of Paris Descartes (CEEA34.ED.042.12).

The TC1 cell line, and for some experiments the EG7 cell line, were maintained in culture in complete RPMI, including 10% FCS (GE Healthcare), antibiotics (Penicillin 50U/ml, Streptomycin 50 µg/ml, GIBCO), L-Glutamine (4 mM, GIBCO) and Sodium Pyruvate (1 mM, GIBCO). The TC1-GFP cell line was generated by infection of TC1 cells with a GFP-lentivirus. Lentiviral production was obtained by transient calcium-phosphate co-transfection of the 293T cell line with the TRIPΔU3-EF1α vector, the p8.91 encapsidation

vector (ΔVprΔVifΔVpuΔNef), and a vesicular stomatitis virus-G protein (VSV-G) envelop expression plasmid (pHCMV-G). GFP was expressed by >90% of TC1 cells.

Eight weeks-old C57BL/6J were inoculated in the flank with 10^5 TC1 cells. When tumors reached a diameter of 6 mm (~10 days), mice were primed (= day 0) with a peritumoral injection of 20 µg of E7-vaccine (STxBE7 vaccine, [16]) and 6×10^5U of IFNα_4 [47] in a total volume of 200 µl. Littermates were injected with PBS as control. The next day, vaccinated mice received the same dose of IFNα. This protocol was repeated one week later (boost, = day7). For some experiments, IFNγKO (kindly provided by O. Lantz, Institut Curie, Paris, France), CXCR3KO mice (SigN, Singapore) and CCR2KO mice (kindly provided by T. Henry, CIRI Inserm, Lyon, France) were used.

For $CD8^+$ T cell depletion, 200 µg of anti-CD8 antibody (BioXcell, clone 53–6.72) were injected every 2 days starting on day 5 after the priming. Anti-CD4 antibody (BioXcell, clone GK1.5, 150 µg) or anti-TNFα (BioXcell, clone TN3–19.12, 300 µg), were injected every 3 days starting at the time of priming. Macrophage depletion was performed with PLX3397 (Plexxikon), a CSF1-R signaling inhibitor. Mice were fed with chow containing PLX3397, or control chow, right after the priming. With such a treatment, macrophage depletion is expected to begin 2–3 days later [18]. Nitric oxide (NO) was blocked with L-NAME added in the drinking water (500 µg/ml, N5751 Sigma,) the day of priming and renewed every 2 days.

Analysis of the tumor infiltrate by multicolor flow cytometry

Fresh TC1 tumors were dissociated mechanically and incubated 30 minutes at 37°C with DNaseI (100 µg/ml, Roche) and collagenase (1 mg/ml, Roche). The cell suspension was filtered on a 40 µm sieve, and rinsed several times with PBS 2% FCS 0.5 mM EDTA. Cells (4×10^6) were stained in 96-wells round bottom plates with dead/live staining (Blue fluorescent reactive dye, Invitrogen) during 20 minutes at room temperature. Fc receptors were blocked with anti-FCR (anti-CD16 CD-32 at 5 µg/ml, BD Pharmingen). Then, cells were either stained with biotinylated anti-Ly6C (myeloid analysis) or biotinylated anti-TCRβ (lymphoid analysis), for 15 minutes at 4°C with agitation. After 2 washes in PBS 2% FCS, cells were stained with antibodies CD45.2-PerCP-Cy5.5, CD11b-APC, CD11c-PE-Cy7, NK1.1-PE, streptavidin-Pac Blue and Ly6G-FITC (for myeloid staining), antibodies CD45.2-APC, IA/IE-PE, CD11b-FITC, CD11c-PE-Cy7, streptavidin-Pacific Blue and F4/80-PerCP-Cy5.5 (for macrophages and MHC II staining), or with antibodies CD45.2-APC, CD4-Pacific Blue, CD8-APC-H7, streptavidin-PE-Cy7, CD19-FITC, NK1.1-PerCP-Cy5.5 and anti-TCRβ-PE (for lymphoid staining). Antibodies were purchased from BD Pharmingen, except for the CD11b-APC antibody, which was purchased from eBiosciences. For detection of E7-specific $CD8^+$ T cells, cell suspensions were stained with PE-Kb/E7 dextramer (JA2195, Immudex) for 40 minutes at 4°C, followed by staining with cell surface markers for CD8, CD4, NK, CD19 and CD45. After washing in PBS, cells were fixed in 1% PFA, stored at 4°C, and acquired the next day with LSR II flow cytometer (BD Bioscience).

Immunofluorescence

Tumor pieces were fixed overnight with Periodate-Lysine-Paraformaldehyde [48] at 4°C and Immunofluorescence on tumor slices was performed as previously described [17, 49]. Immunostaining was performed by first blocking Fc receptors with anti-FCR (BD Pharmingen), then staining for 1 h RT or at 4°C overnight was performed with primary antibodies specific for CD8-PerCP, CD45-APC, IA-IE-PE, CD11b-FITC, Ly6C-APC, CD31-biotin (all from BD Pharmingen), fibronectin, gp38/podoplanin, F4/80-biotin (all from Biolegend) or F4/80-PE (AbD Serotec). Immunodetection was performed using anti-Rat or anti-rabbit antibodies coupled to 488, 568 or 647 (BD Pharmingen) and streptavidin- Alexa Fluor 488 or 647 (Invitrogen). Slices were then counter-stained with Hoechst for 10 min at room temperature. Antibodies were diluted in PBS, 0.5% BSA, 2% human serum. Images were obtained with a spinning disk microscope equipped with a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) and a 20x and a 63x objective. All images were acquired with MetaMorph 7 imaging software (Molecular Devices) and analysed with ImageJ. For staining of dying cells *in vivo*, vaccinated TC1-GFP bearing mice received an intra-tumoral injection of propidium iodide (1 mg/ml) and were sacrificed 30 min later.

Transcriptomic analysis

Tumor RNA was extracted using RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and gene expression was analyzed with the nanostring technology. 36 lanes of Nanostring data were processed using Accelrys Pipeline Pilot. The geometrical mean of the positive control probe counts were computed for each lane and a scaling factor computed for each lane being the average of the geometrical means of all lanes A was divided by the geometrical mean of that particular lane. This scaling factor was then applied to all probe counts for all lanes as a means to normalize for the technical variability of the platform. The house keeping genes *ACTB, GAPDH* and *RPL4* were then used to normalize for any RNA loading differences. This was performed in the same manner as the positive control probes where the scaling factor was computed from the geometrical mean of the housekeeping genes. The positive control and housekeeping normalized counts were then logarithmically transformed and used for all subsequent

analysis. One way ANOVAs were used to test if any of the probes counts were significantly different between sample groups. Pearson correlations were to identify pairs of correlating genes. All statistical testing was done using the R statistical language version 2.15.2. $p < 0.05$ were deemed to be statistically significant. Multiple testing corrections were performed for all tests using the method of Benjamini and Hochberg. Visualization of the data and test results were done using GraphPad Prism 5.

Cytotoxic assay with tumor-derived myeloid cells

F4/80$^+$ myeloid cells were purified from tumor cell suspensions using F4/80-biotin Ab (eBioscience), and streptavidin-beads before sorting with Automacs (Miltenyi Biotec). Purified cells were treated 5 minutes at 37°C with DNase (100 µg/ml) to remove cell debris. F4/80$^+$ cell suspension were > 90% pure. Purified myeloid cells (2×10^5) were added on the top of a monolayer of TC1-GFP$^+$ cells (2×10^4 cells) and co-cultured for 48 h at 37°C. TNFα was blocked with anti-TNFα at 10 µg/ml (Abcam). Images were obtained with an inverted microscope (TE2000-E; Nikon) equipped with a 20x objective, and Metamorph imaging software.

Statistics

Unless otherwise indicated, results are expressed as means ± SEM of 3 to 6 mice. All experiments were repeated at least twice, yielding similar results. Data were analyzed with GraphPad Prism5 software. p values were calculated by the unpaired Student's t test or One-way ANOVA and Tukey test for multiple comparison. Values ≤ 0.05 were considered significant. $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Plexxikon for providing the PLX3397 inhibitor. We would like to thank Olivier Lantz for providing IFNγKO mice, Thomas Henry for CCR2KO mice, Quitterie Largeteau and Marianne Mangeney for the generation of the TC1-GFP cell line, the staff of the imaging and flow cytometery (CYBIO) facilities of the Cochin Institute for their helpful advice, Pascale Villefroy for the preparation of IFNα, and Arnaud Pommier for advice on multicolor flow cytometry. We would like to thank also Vincent Feuillet, Elisa Peranzoni and Emmanuel Donnadieu for critical review of the manuscript. The Johannes team is member of LabEx *CelTisPhyBio* (11-LBX-0038) and of *Idex Paris Sciences et Lettres* (ANR-10-IDEX-0001–02 PSL) and the Tartour team is member of the Labex Immuno-oncology and of the Siric Carpem.

FUNDING SUPPORT

This work was granted by La Ligue Nationale Contre le Cancer, by the Worldwide Cancer Research (formerly known as AICR) and by a grant from CNRS (PICS 06266 - Projets Internationaux de coopération scientifique).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors have declared that no conflict of interest exists.

REFERENCES

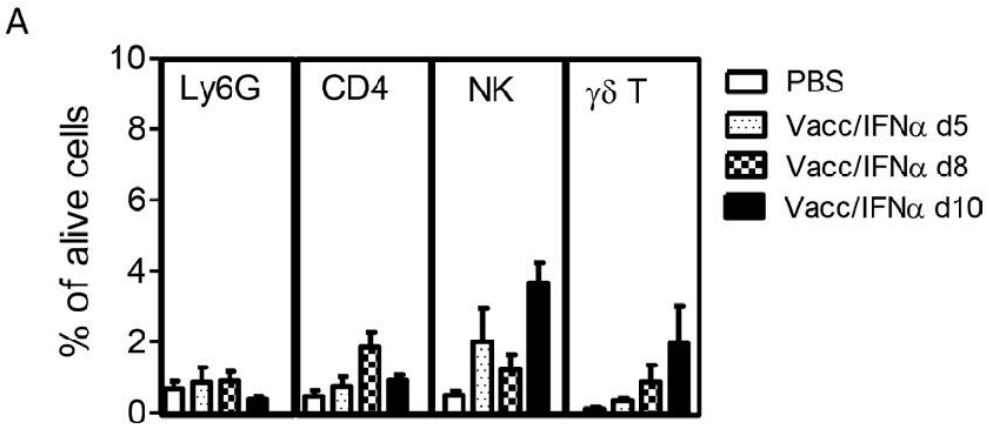
1. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc P-H, et al. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. Science. 2006; 313:1960–1964.
2. Eyles J, Puaux A-L, Wang X, Toh B, Prakash C, Hong M, Tan TG, Zheng L, Ong LC, Jin Y, Kato M, Prévost-Blondel A, Chow P, et al. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. J. Clin. Invest. 2010; 120:2030–2039.
3. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, Morton KE, Laurencot CM, Steinberg SM, et al. Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T-Cell Transfer Immunotherapy. Clin. Cancer Res. 2011; 17:4550–4557.
4. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, Aplenc R, Porter DL, Rheingold SR, Teachey DT, Chew A, Hauck B, Wright JF, Milone MC, Levine BL, June CH. Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells for Acute Lymphoid Leukemia. N. Engl. J. Med. 2013; 368:1509–1518.
5. Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, Segal NH, Ariyan CE, Gordon R-A, Reed K, Burke MM, Caldwell A, Kronenberg SA, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N. Engl. J. Med. 2013; 369:122–133.
6. Bercovici N, Trautmann A. Revisiting the role of T cells in tumor regression. Oncoimmunology. 2012; 1:346–350.
7. Hoption Cann SA, van Netten JP, van Netten C. Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. Postgrad Med J. 2003; 79:672–80.
8. Boissonnas A, Fetler L, Zeelenberg IS, Hugues S, Amigorena S. *In vivo* imaging of cytotoxic T cell infiltration and elimination of a solid tumor. J. Exp. Med. 2007; 204:345–356.
9. Breart B, Lemaitre F, Celli S, Bousso P. Two-photon imaging of intratumoral CD8+ T cell cytotoxic

activity during adoptive T cell therapy in mice. J Clin Invest. 2008; 118:1390–7.

10. Hollenbaugh JA, Reome J, Dobrzanski M, Dutton RW. The rate of the CD8-dependent initial reduction in tumor volume is not limited by contact-dependent perforin, Fas ligand, or TNF-mediated cytolysis. J Immunol. 2004; 173:1738–43.
11. Prevost-Blondel A, Neuenhahn M, Rawiel M, Pircher H. Differential requirement of perforin and IFN-gamma in CD8 T cell-mediated immune responses against B16.F10 melanoma cells expressing a viral antigen. Eur J Immunol. 2000; 30:2507–15.
12. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean MC, Validire P, Trautmann A, Mami-Chouaib F, Donnadieu E. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. J Clin Invest. 2012; 122:899–910.
13. Mrass P, Takano H, Ng LG, Daxini S, Lasaro MO, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Andrian UH von, Ertl HCJ, Haydon PG, Weninger W. Random migration precedes stable target cell interactions of tumor-infiltrating T cells. J. Exp. Med. 2006; 203:2749–2761.
14. Boissonnas A, Licata F, Poupel L, Jacquelin S, Fetler L, Krumeich S, Théry C, Amigorena S, Combadière C. CD8+ Tumor-Infiltrating T Cells Are Trapped in the Tumor-Dendritic Cell Network. Neoplasia N.Y.N. 2013; 15:85.
15. Engelhardt JJ, Boldajipour B, Beemiller P, Pandurangi P, Sorensen C, Werb Z, Egeblad M, Krummel MF. Marginating Dendritic Cells of the Tumor Microenvironment Cross-Present Tumor Antigens and Stably Engage Tumor-Specific T Cells. Cancer Cell. 2012; 21:402–417.
16. Vingert B, Adotevi O, Patin D, Jung S, Shrikant P, Freyburger L, Eppolito C, Sapoznikov A, Amessou M, Quintin-Colonna F, Fridman WH, Johannes L, Tartour E. The Shiga toxin B-subunit targets antigen *in vivo* to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. Eur. J. Immunol. 2006; 36:1124–1135.
17. Asperti-Boursin F, Real E, Bismuth G, Trautmann A, Donnadieu E. CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. J. Exp. Med. 2007; 204:1167–1179.
18. DeNardo DG, Brennan DJ, Rexhepaj E, Ruffell B, Shiao SL, Madden SF, Gallagher WM, Wadhwani N, Keil SD, Junaid SA, Rugo HS, Hwang ES, Jirström K, et al. Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy. Cancer Discov. 2011; 1:54–67.
19. Yang X, Lu P, Ishida Y, Kuziel WA, Fujii C, Mukaida N. Attenuated liver tumor formation in the absence of CCR2 with a concomitant reduction in the accumulation of hepatic stellate cells, macrophages and neovascularization. Int. J. Cancer J. Int. Cancer. 2006; 118:335–345.
20. Xue J, Schmidt SV, Sander J, Draffehn A, Krebs W, Quester I, De Nardo D, Gohel TD, Emde M, Schmidleithner L, Ganesan H, Nino-Castro A, Mallmann MR, et al. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. Immunity. 2014; 40:274–288.
21. Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-Stimulating Factor 1 Promotes Progression of Mammary Tumors to Malignancy. J. Exp. Med. 2001; 193:727.
22. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. Nat. Rev. Immunol. 2009; 9:259–270.
23. Shime H, Matsumoto M, Oshiumi H, Tanaka S, Nakane A, Iwakura Y, Tahara H, Inoue N, Seya T. Toll-like receptor 3 signaling converts tumor-supporting myeloid cells to tumoricidal effectors. Proc. Natl. Acad. Sci. 2012; 109:2066–2071.
24. Klug F, Prakash H, Huber PE, Seibel T, Bender N, Halama N, Pfirschke C, Voss RH, Timke C, Umansky L, Klapproth K, Schäkel K, Garbi N, et al. Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS+/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy. Cancer Cell. 2013; 24:589–602.
25. Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, Saboury B, Teitelbaum UR, Sun W, Huhn RD, Song W, Li D, Sharp LL, Torigian DA, O'Dwyer PJ, Vonderheide RH. CD40 Agonists Alter Tumor Stroma and Show Efficacy Against Pancreatic Carcinoma in Mice and Humans. Science. 2011; 331:1612–1616.
26. Buhtoiarov IN, Sondel PM, Wigginton JM, Buhtoiarova TN, Yanke EM, Mahvi DA, Rakhmilevich AL. Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages: Chemotherapy and immunotherapy synergize in M activation. Immunology. 2011; 132:226–239.
27. Haabeth OAW, Lorvik KB, Hammarström C, Donaldson IM, Haraldsen G, Bogen B, Corthay A. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. Nat. Commun. 2011; 2:240.
28. Vicetti Miguel RD, Cherpes TL, Watson LJ, McKenna KC. CTL induction of tumoricidal nitric oxide production by intratumoral macrophages is critical for tumor elimination. J. Immunol. Baltim. Md 1950. 2010; 185:6706–6718.
29. Chmielewski M, Kopecky C, Hombach AA, Abken H. IL-12 Release by Engineered T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptors Can Effectively Muster an Antigen-Independent Macrophage Response on Tumor Cells That Have Shut Down Tumor Antigen Expression. Cancer Res. 2011; 71:5697–5706.
30. Bogdan C, Mattner J, Schleicher U. The role of type I interferons in non-viral infections. Immunol. Rev. 2004; 202:33–48.

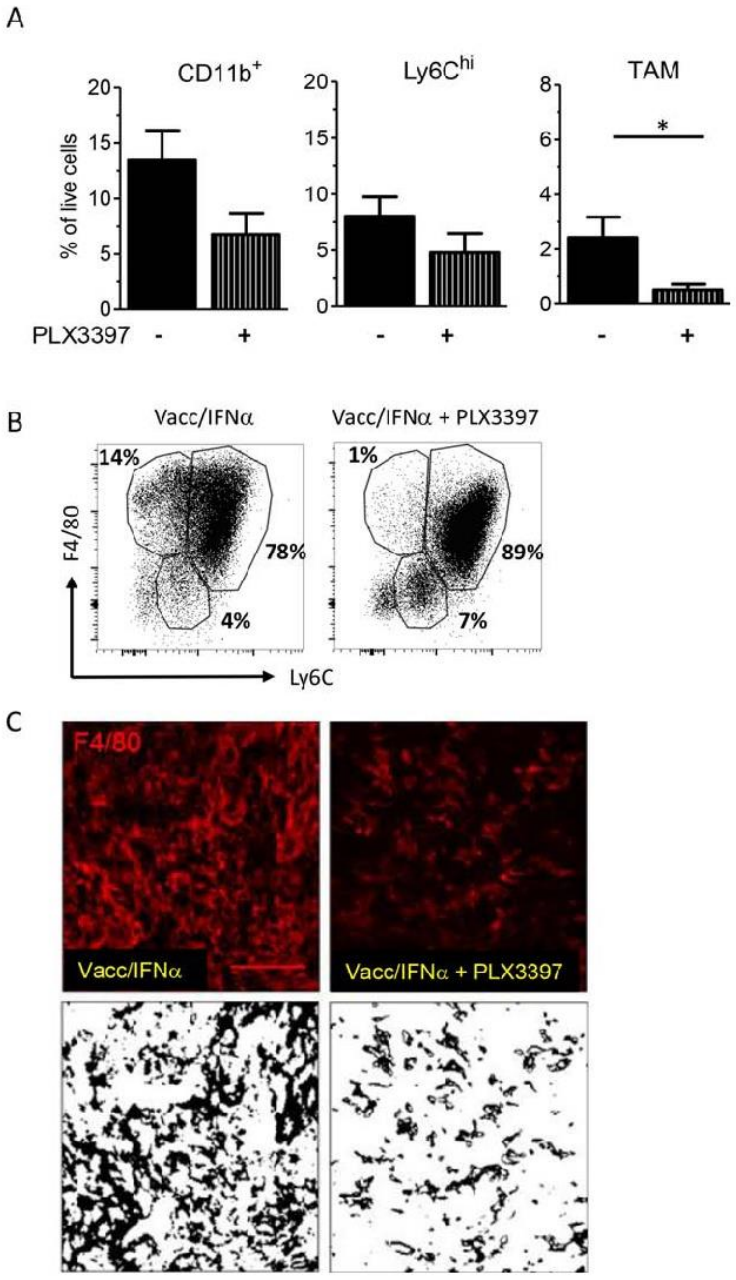
www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Supplementary Materials 2015

SUPPLEMENTARY FIGURES



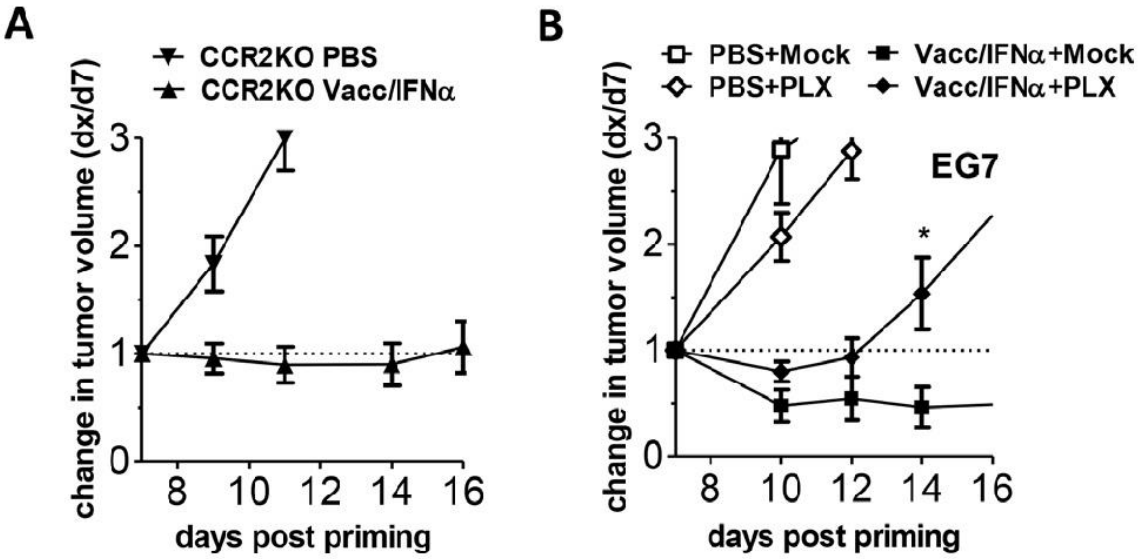
Supplementary Figure S1: Several immune cell subsets (Ly6G$^+$ cells, CD4$^+$ T cells, NK cells, and γδT cells) remained at low levels during the course of the treatment.

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Supplementary Materials 2015



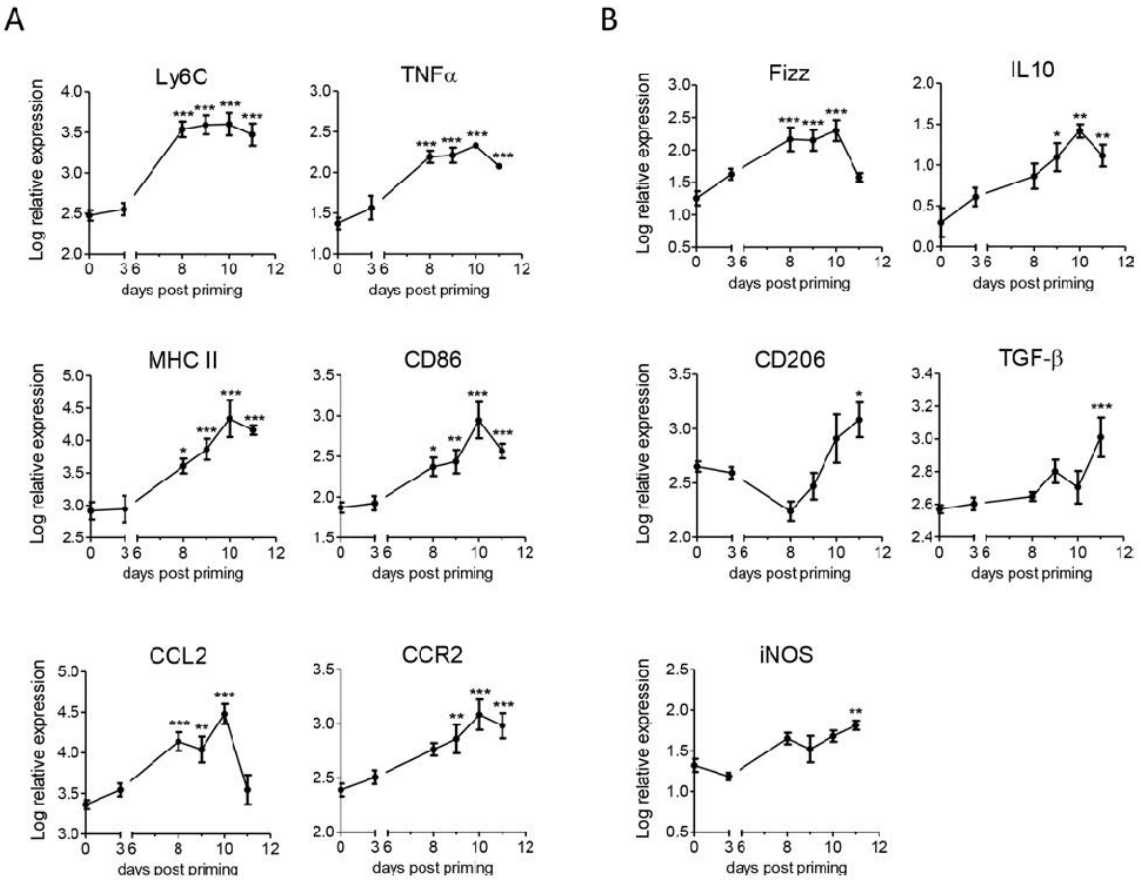
Supplementary Figure S2: **A.** % of myeloid cells (CD11b^{+}), and two of its subpopulation, tumor-associated macrophages (TAM F4/80^{hi} Ly6C^{neg}) and inflammatory monocytes (Ly6C^{hi} F4/80^{lo}) out of living cells dissociated from tumors at day 8 and 10 after E7-vaccine+IFNα in mice treated or not with PLX3397. Histograms represent the mean ± SEM of 6–7 mice, from 3 independent experiments. PLX3397 treatment reduced significantly the percentage of TAM (~5-fold) (Unpaired t test with Welch's correction). **B.** Typical examples of myeloid subpopulations highlighting the effect of PLX3397 on TAM in vaccine-treated mice. **C.** In PLX3397-treated mice, 8 days after priming with vacc/IFNα, myeloid cells express lower levels of F4/80 and are less abundant than in Mock, vaccine-treated mice. Bar 50 µm. According to the relative surface covered by F4/80 labeling, as estimated in the lower panels, this abundance is ~6-fold lower after PLX3397 in this experiment.

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Supplementary Materials 2015



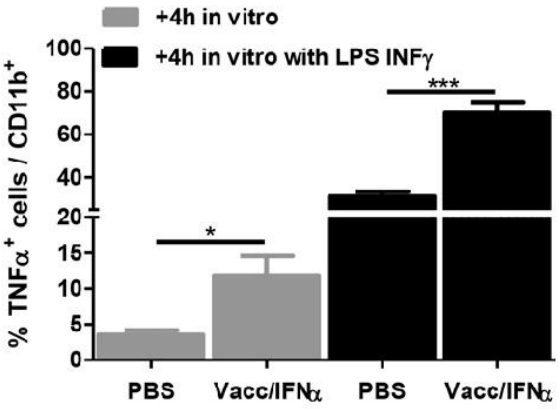
Supplementary Figure S3: Different strategies of myeloid depletion and other tumor models. Tumor evolution is expressed relative to the size at the time of the boost. **A.** In CCR2KO mice, vaccination induces a stabilization of TC1 tumors, but no longer their regression. **B.** The vaccine-induced regression of EG7 tumors is blocked in PLX-treated mice.

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Supplementary Materials 2015



Supplementary Figure S4: E7-vaccine+IFN-α induced an increase in activated myeloid cell infiltrate. **A.** Transcriptomic analysis showing the upregulation of markers associated with activated monocytes/macrophages in tumors after vaccination. **B.** Progressive upregulation of genes associated with M2 (Fizz, IL-10, CD206, TGF-β) and M1 (iNOS) macrophages during the course of tumor regression.

www.impactjournals.com/oncotarget/ Oncotarget, Supplementary Materials 2015



Supplementary Figure S5: Myeloid cells from vaccine-treated mice produced more TNF-α than the PBS control group, both with and without *in vitro* stimulation by LPS + IFNγ. Means of two independent experiments, with 8–10 mice per group.

Annexe 2 : Nouvelle

RÉFÉRENCES

10. Suva ML, Riggi N, Bernstein BE. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* 2013 ; 339 : 1567-70.
11. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, *et al.* Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* 2014 ; 156 : 663-77.
12. Lapasset L, Milhavet O, Lemaitre JM. La reprogrammation vers la pluripotence peut-elle effacer la mémoire d'une vie antérieure ? *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 902-3.
13. David L, John De Vos J. La reprogrammation, un jeu de hasard ? *Med Sci (Paris)* 2013 ; 29 : 405-10.
14. Broutier L, Castets L. *DCC : come back* d'un gène suppresseur de tumeur controversé. *Med Sci (Paris)* 2012 ; 28 : 465-8.

NOUVELLE

Lymphocytes T et cellules myéloïdes coopèrent au sein de la tumeur après vaccination

Maxime Thoreau, Nadège Bercovici, Alain Trautmann

Institut Cochin, université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, CNRS UMR 8104, Inserm U1016, département Infection, Immunité, Inflammation, 22, rue Méchain, 75014 Paris, France.
maxime.thoreau@live.fr

> Depuis quelques années, l'immunothérapie anti-tumorale est considérée comme un traitement d'avenir [12] (➜). À la différence des traitements standards en oncologie, cette approche permettrait de mettre en place une mémoire immunitaire, c'est-à-dire une protection à long terme de l'organisme contre les cellules tumorales. La plupart des recherches dans ce domaine se concentrent sur deux notions : le potentiel cytotoxique des lymphocytes T CD8 [1] et l'inhibition de ces réponses T par les cellules myéloïdes (monocytes/macrophages), considérées comme des cellules pro-tumorales [2]. Les essais de traitements dérivés de ces notions visent à réduire le potentiel « suppresseur » des cellules myéloïdes et à stimuler la réponse T cytotoxique. Dans des modèles murins de tumeurs, de tels traitements ne provoquent, la plupart du temps, que des ralentissements de la croissance tumorale et non des régressions. Leur efficacité reste donc limitée. Notre objectif a été de nous placer dans un contexte de régression tumorale, dans lequel la réponse immune est vraiment efficace, et d'analyser les rôles et les cinétiques d'infiltration intra-tumorale des populations immunitaires impliquées dans cette régression.

(➜) Voir la Synthèse de E. Tartour E *et al.*, *m/s* n° 10, octobre 2011, page 833

Mimer une réponse antivirale peut provoquer une régression tumorale

Nous avons induit la régression de tumeurs murines TC1[1] transplantées, en nous inspirant des travaux de W. Coley. Au début du XX[e] siècle, ce pionnier de l'immunothérapie avait en effet observé des régressions de tumeurs chez ses patients après injection de bactéries inactivées [3]. Nous avons donc mimé une réponse anti-infectieuse, capable de provoquer une fonte de la masse tumorale, à l'aide d'un vaccin composé d'une sous-unité de la toxine de Shiga[2] couplée à un peptide long (E7), exprimé par les cellules tumorales TC1 [4]. Ce vaccin a été combiné à l'interféron-α (IFN-α) afin de mimer une infection virale [5] au niveau du foyer tumoral. Après 8 jours de ce traitement combiné, la régression est systématiquement amorcée [6].

La coexistence intra-tumorale des lymphocytes T CD8 et des cellules myéloïdes est nécessaire à la régression

L'analyse d'un infiltrat tumoral à un instant donné ne fournit aucune information sur les caractéristiques dynamiques de la réponse immune. En outre, la rareté des prélèvements de tumeurs humaines en régression ne permet pas de bien documenter les réponses immunitaires efficaces. Le modèle murin que nous avons choisi permet d'analyser en détail la cinétique de la réponse immunitaire induite à la suite d'une vaccination anti-tumorale. Dans ce modèle, le couplage de l'antigène E7 à une sous-unité B non toxique d'un mutant de toxine Shiga favorise une présentation croisée par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC, *major histocompatibility complex*) de classe I [4]. En considérant ce résultat, ainsi que le rôle des lymphocytes T CD8 dans l'élimination des pathogènes lors d'infections bactériennes ou virales, nous nous attendions à observer une forte augmentation du nombre de ces cellules lors de la réponse immune. Ce fut en effet le cas, à ceci près que l'infiltration massive par des lymphocytes T CD8 débutait 8 jours après la vaccination, après que la tumeur ait amorcé sa régression. Cette observation a été déterminante dans la suite de notre exploration.

L'analyse de l'infiltrat myéloïde révèle que les cellules myéloïdes, déjà présentes en nombre non négligeable dans les tumeurs en progression, infiltrent fortement la tumeur trois jours avant les lymphocytes. Leur abondance, avant la phase de régression et l'infiltration tardive des lymphocytes T CD8, amène à s'interroger sur les rôles respectifs de chacune de ces

[1] Les cellules tumorales TC1 expriment l'oncogène E7 du papillomavirus humain HPV16.

[2] Toxine sécrétée par certaines souches de bactéries *Escherichia coli* inhibant la synthèse protéique dans les cellules cibles, principalement les cellules endothéliales intestinales, rénales et cérébrales.

m/s n° 3, vol. 32, mars 2016
DOI : 10.1051/medsci/20163203006

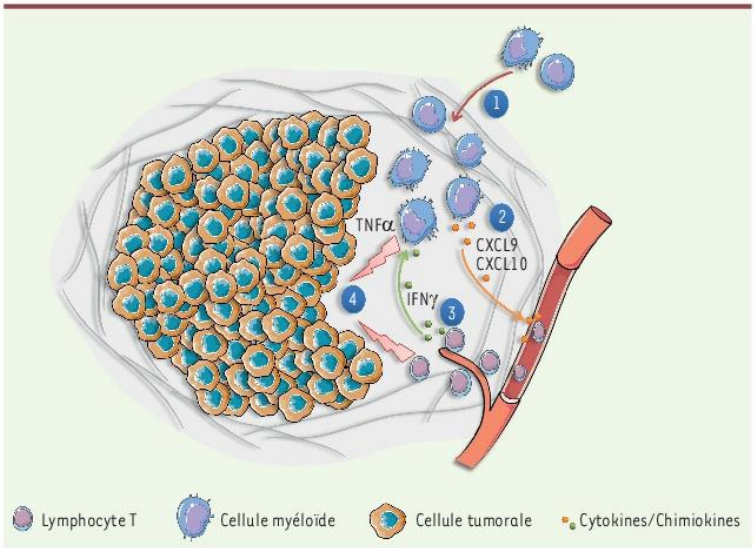


Figure 1. ***Coopération lymphocytes T/cellules myéloïdes lors de la réponse immunitaire anti-tumorale induite par la vaccination.*** La vaccination provoquant une régression tumorale implique une réponse immune qui peut être schématisée ainsi : (1) une infiltration précoce de cellules myéloïdes fait suite à la vaccination, (2) ces monocytes/macrophages recrutent les lymphocytes T CD8 grâce à la production de CXCL9/CXCL10, (3) les lymphocytes et les cellules myéloïdes engagent une coopération dépendante de l'IFNγ aboutissant à l'activation myéloïde, (4) la régression tumorale est provoquée par la double cytotoxicité directe des cellules lymphocytes T CD8 et des monocytes/macrophages (notamment *via* la sécrétion de TNFα). CXCL9/CXCL10 : *chemokine [C-X-C motif] ligand 9/10* ; IFNγ : interféron gamma ; TNFα : *tumor necrosis factor alpha*.

populations dans la régression tumorale induite par la vaccination. Pour répondre à cette question, nous avons éliminé les lymphocytes T CD8 *in vivo*, ce qui a eu pour effet d'abolir l'efficacité du vaccin. Les mécanismes potentiels de recrutement de ces cellules lymphoïdes incluent les chimiokines CXCL9 et CXCL10 (*chemokine [C-X-C motif] ligand 9/10*), sécrétées par les cellules myéloïdes. L'action de ces chimiokines implique le récepteur CXCR3 (*chemokine [C-X-C motif] receptor 3*) présent à la surface des lymphocytes T. Dans des souris déficientes en CXCR3, nous avons montré que l'infiltration des lymphocytes T CD8 dans la tumeur est inhibée d'un facteur 4, sans que cela affecte pour autant la régression induite par le vaccin. L'ensemble de ces résultats permet de tirer deux conclusions: (1) même en faible nombre, les lymphocytes T CD8 ont une importante efficacité anti-tumorale, et (2) dans ces conditions, ils ne peuvent pas être les seuls effecteurs directs anti-tumoraux.

Ce résultat inattendu, combiné à celui de l'infiltration précoce des cellules myéloïdes, nous a conduits à supprimer une partie de ces cellules dans la tumeur en utilisant le PLX3397, un inhibiteur de la signalisation CSF1/CSF1R (*colony stimulating factor 1/CSF1 receptor*) [7]. Le CSF1 (ou M-CSF, *macrophage colony stimulating factor*) est un facteur de croissance induisant la différenciation, la prolifération et la migration des monocytes/macrophages dans les tissus [8]. Suite au traitement par le PLX3397, qui réduit d'un facteur 5 le nombre de macrophages intra-tumoraux, le vaccin ne provoque plus de régression mais seulement une stabilisation de la tumeur.

Ainsi, une suppression partielle des cellules myéloïdes a davantage de conséquences sur la régression tumorale qu'une suppression partielle des lymphocytes T CD8. Mais ce qui altère le plus l'efficacité vaccinale est la suppression *totale* des lymphocytes T CD8. Malgré de nombreux essais, il n'a pas été possible d'obtenir une suppression totale des cellules myéloïdes intra-tumorales. Cependant, ces résultats montrent que les infiltrations intra-tumorales des cellules lymphoïdes et myéloïdes sont toutes deux nécessaires à l'efficacité de la réponse anti-tumorale.

Lymphocytes T et cellules myéloïdes coopèrent dans la tumeur

Certains macrophages intra-tumoraux sont capables de faciliter l'extravasation[3] des cellules tumorales, et donc l'apparition de métastases, et de promouvoir la néo-angiogénèse [9, 14] (➜). De plus, ces cellules ont le potentiel de neutraliser les lymphocytes T *via* de multiples mécanismes dont l'expression, par exemple, des ligands de PD-1 (*programmed cell death-1*) et CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*) [13] (➜). Cependant, dans d'autres contextes, les macrophages sont nécessaires au bon déroulement d'une réponse immunitaire, par exemple lors d'une infection. L'analyse phénotypique des cellules myéloïdes présentes durant la régression a révélé l'expression de marqueurs d'activation tels que CD86 ou des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) de classe II. Un résultat remarquable, obtenu chez les souris vaccinées et traitées avec des anti-CD8, est la diminution de l'acquisition de ces marqueurs du CMH de classe II par les cellules myéloïdes. Ces dernières ont donc besoin des lymphocytes T CD8 pour être pleinement activées. L'interféron gamma (IFNγ) fait partie des cytokines sécrétées par les lymphocytes T CD8, capables d'activer les cellules myéloïdes lors de réponses anti-infectieuses

(➜) Voir la Synthèse de L. Treps et J. Gavard, *m/s* n° 11, novembre 2015, page 989

(➜) Voir l'Éditorial de J.L. Teillaud, *m/s* n° 8-9, août-septembre 2015, page 707

[3] L'extravasation est le passage de produits intraveineux d'un vaisseau sanguin vers les tissus environnants.

[10]. Dans des souris déficientes pour l'IFNγ, les monocytes/macrophages ne sont plus activés après vaccination et le vaccin perd une grande partie de son efficacité puisqu'il ne provoque plus de régression. Cela suggère fortement que l'activation des cellules myéloïdes est en partie due aux lymphocytes T CD8 et dépend de la sécrétion d'IFNγ.

Les cellules myéloïdes peuvent contribuer directement à l'élimination des cellules tumorales

Afin de tester les capacités cytotoxiques des macrophages intra-tumoraux, nous avons effectué des expériences *in vitro* avec des macrophages purifiés de tumeurs en progression ou en régression. Ces cellules ont été cultivées pendant 48h en présence de cellules tumorales. Seuls des monocytes/macrophages provenant de tumeurs vaccinées pouvaient provoquer la mort d'une partie des cellules tumorales. Cette cytotoxicité était abolie par des anticorps bloquant le TNFα (*tumor necrosis factor alpha*), mais n'était pas altérée par des inhibiteurs de ROS (*reactive oxygen species*), deux médiateurs toxiques produits par les macrophages.

Conclusion

Il ne fait pas de doute que l'implication des macrophages dans la maintenance des tissus et dans les phénomènes inflammatoires leur permet d'avoir des effets pro-tumoraux dans des tumeurs en croissance. Cette réalité fait trop souvent oublier (sauf quelques exceptions [11]) que les macrophages peuvent aussi contribuer activement aux réponses immunitaires, y compris anti-tumorales. Notre équipe a montré, dans un modèle de régression tumorale causée par une vaccination mimant une infection virale, que la réponse immune mise en place requiert la présence des cellules myéloïdes, incluant les macrophages, et des lymphocytes au cœur de la tumeur. Cette coopération efficace des macrophages et des lymphocytes est schématisée dans la *Figure 1*. Nous défendons l'idée que les futurs traitements par immunothérapie devraient plus prendre en compte la possibilité de telles coopérations entre cellules T et macrophages, dont l'efficacité n'est plus à démontrer dans les réponses anti-infectieuses. ◊

The vaccination-induced cooperation of T cells and myeloid cells leads to an anti-tumoral effect

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Jeanne Froehlich et Nicolas Abraham pour la relecture de cette nouvelle.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* 2012 ; 12 : 269-81.
2. Hoves S, Krause SW, Schütz C, *et al.* Monocyte-derived human macrophages mediate anergy in allogeneic T cells and induce regulatory T cells. *J Immunol* 2006 ; 177 : 2691-8.
3. Cann H, A S, Netten V, *et al.* Dr William Coley and tumour regression: a place in history or in the future. *Postgrad Med J* 2003 ; 79 : 672-80.
4. Vingert B, Adotevi O, Patin D, *et al.* The Shiga toxin B-subunit targets antigen in vivo to dendritic cells and elicits anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* 2006 ; 36 : 1124-35.
5. Müller U, Steinhoff U, Reis LF, *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 1994 ; 264 : 1918-21.
6. Thoreau M, Penny HL, Tan K, *et al.* Vaccine-induced tumor regression requires a dynamic cooperation between T cells and myeloid cells at the tumor site. *Oncotarget* 2015 ; 6 : 27832-46.
7. Zhu Y, Knolhoff BL, Meyer MA, *et al.* CSF1/CSF1R blockade reprograms tumor-infiltrating macrophages and improves response to T-cell checkpoint immunotherapy in pancreatic cancer models. *Cancer Res* 2014 ; 74 : 5057-69.
8. Hamilton JA. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2008 ; 8 : 533-44.
9. Noy R, Pollard JW. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* 2014 ; 41 : 49-61.
10. Dalton DK, Pitts-Meek S, Keshav S, *et al.* Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 1993 ; 259 : 1739-42.
11. Long KB, Beatty GL. Harnessing the antitumor potential of macrophages for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2013 ; 2 : e26860.
12. Tartour E, Sandoval F, Bonnefoy JY, Fridman WH. Immunothérapie des cancers. *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 833-41.
13. Teillaud JL. Quand les anticorps rencontrent l'immunité antitumorale : fin de partie pour la cellule cancéreuse ? *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 707-8.
14. Treps L, Gavard J. L'angiogenèse tumorale : quand l'arbre de vie tourne mal. *Med Sci (Paris)* 2015 ; 31 : 989-95.

NOUVELLE

Des cellules NK mémoire découvertes chez les primates

Thierry Walzer, Antoine Marçais

CIRI, centre international de recherche en infectiologie, université de Lyon, Inserm, U1111, École Normale Supérieure de Lyon, CNRS, UMR5308, Lyon, France.
thierry.walzer@inserm.fr

Cellules NK mémoire chez la souris

Un nombre grandissant d'articles prête aux cellules *natural killer* (NK) des propriétés dites adaptatives [13] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de E. Narni-Mancinelli *et al. m/s* n° 4, avril 2013, page 389

Les cellules NK, identifiées dans les années 1970, constituent pourtant le membre fondateur de la famille des cellules lymphoïdes innées (ILC, *innate lymphoid cells*) [14] (➜).

(➜) Voir la Synthèse de M. Cherrier, *m/s* n° 3, mars 2014, page 280

Leur système de reconnaissance des cellules cibles repose sur un jeu de récepteurs, activateurs et inhibiteurs, exprimés de façon combinatoire, chaque récepteur étant exprimé sur tout ou partie des cellules NK, constituant ainsi un répertoire de diversité limitée. Le concept de « NK mémoire » est né de l'observation

Annexe 3 : Présentation internationale

Cell Symposia 2015 (14, 15 et 16 juin, Sitges, Espagne)

Vaccine-induced tumor regression requires a multi-step cooperation between T cells and myeloid cells at the tumor site

Maxime Thoreau[1,2,3,4], HweiXian Leong Penny[5], KarWai Tan[5], Fabienne Regnier[1,2,3,4], Julia Miriam Weiss[1,2,3,4], Bernett Lee[5], Ludger Johannes[6,7,8], Estelle Dransart[6,7,8], Agnès Le Bon[1,2,3], Jean-Pierre Abastado[5], Eric Tartour[9], Alain Trautmann[1,2,3,4,*] and Nadège Bercovici[1,2,3,4,*]

(1) Inserm, U1016, Institut Cochin, Paris, France (2) Cnrs, UMR8104, Paris, France (3) Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France (4) Equipe labellisée "Ligue contre le Cancer" (5) Singapore Immunology Network, BMSI, A-STAR, Singapore (6) Institut Curie, Paris, France (7) INSERM U1143, Paris, France (8) CNRS UMR3666, Paris, France (9) Inserm U970, PARCC, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France, * AT and NB contributed equally to this work

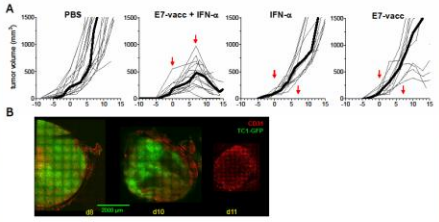
Introduction

It is well accepted that, in contrast to CD8 T cells, myeloid cells have mainly an immunosuppressive role and promote tumor progression. Many investigations in cancer immunotherapies aimed at blocking the immunosuppressive activity of myeloid cells.

Another option may be to provide an appropriate stimulation of myeloid cells by mimicking a local infection, in addition to the priming of anti-tumor T cells, in order to generate a robust anti-tumor response.

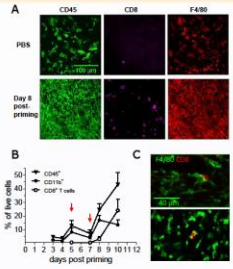
In this study, we have investigated, in space and time, the anti-tumor response during TC1 tumor regression induced by vaccine delivery with IFNα.

The combination of E7-vaccine and IFN-α induces systematic regression of TC1-tumors



The combination of both E7-vaccine and IFNα leads to tumor regression from day 8 after priming (A) which is concomitant with TC1-GFP disappearance (B).

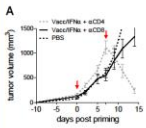
Influx of myeloid cells coincides with tumor regression onset and precedes CD8+ T cell infiltration



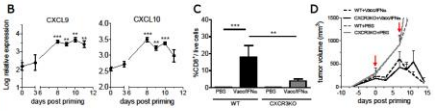
Analysis of tumor cell infiltrate by cytometry and immunofluorescence reveals:

- CD8 T cell infiltration after day 7 (A,B)
- Early influx of myeloid cells at day 5 (B)
- *In situ* interactions between macrophages and CD8 T cells (C)

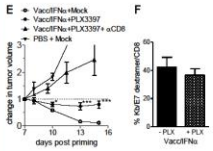
Both CD8+ TIL and infiltrating-F4/80+ cells are necessary for tumor regression



This regression depends on CD8 T cells, while CD4 T cells are not necessary.

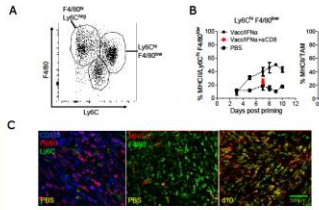


CXCL9/10 up-regulation led us to check their roles using CXCR3KO mice. Despite the low influx of CD8 T cells in tumors, regression still takes place.

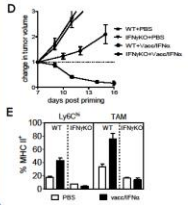


Macrophage depletion with a CSF1R inhibitor abrogates tumor regression (E), while the frequency of E7-specific CD8 T cells is unchanged (F).

Local activation of F4/80+ myeloid cells is promoted by IFN-γ producing CD8 T cells



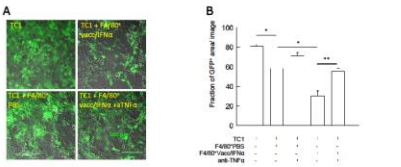
Vaccination induces up-regulation of MHC class II on F4/80+ cells (Ly6C^{hi} F4/80^{low} and F4/80^{hi} Ly6C^{neg})



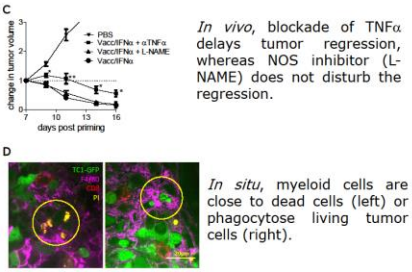
In IFNγKO mice, the lack of myeloid/T cell cooperation aborts tumor regression.

MHC II up-regulation is prevented in the absence of CD8 T cells (B) or IFNγ (E).

Activated-myeloid cells contribute to the killing of TC1-tumor cells by TNF-α release



In vitro, F4/80+ myeloids from vaccinated mouse tumors are cytotoxic and kill tumor cells. This death is reduced when TNFα is blocked.



In vivo, blockade of TNFα delays tumor regression, whereas NOS inhibitor (L-NAME) does not disturb the regression.

In situ, myeloid cells are close to dead cells (left) or phagocytose living tumor cells (right).

Conclusions

This study reveals that:

- After vaccination that induces tumor regression, myeloid cell infiltration into the tumor precedes tumor influx of CD8 T cells
- CD8 T cells and myeloid cells are both necessary to observe tumor regression induced by vaccination
- Myeloid cell activation depends on interaction with T cells through IFNγ production
- Myeloid cells are able to directly kill tumor cells, in part through TNFα release

In conclusion, when appropriately stimulated, myeloid cells are essential actors of an anti-tumor response, especially through their cooperation with T cells.

Acknowledgments:
We are grateful to Plexxikon for providing the PLX3397 inhibitor.

Résumé

De nombreuses études en oncoimmunologie portent sur l'échec immunitaire dans le contexte de progression tumorale, mais elles sont plus rares à porter sur un contexte de régression, lorsque le système immunitaire est efficace. De ce fait, bien souvent la littérature met en avant le rôle cytotoxique des lymphocytes T $CD8^+$, ou bien leur anergie dans le contexte de progression tumorale, causée par des cellules myéloïdes telles que les MDSC ou les macrophages de phénotypes M2, considérés comme pro-tumoraux. J'ai pour ma part étudié la réponse immunitaire dans le cadre d'une régression tumorale.

Des cellules TC1 transplantées en s.c. dans des souris C57BL6/J, donnent des tumeurs solides d'environ 6mm de diamètre 11 jours plus tard. A ce moment là (J0), les souris sont vaccinées à proximité de la tumeur (*priming)*, par un vaccin contenant la sous-unité B non toxique de la Shiga toxine couplée au peptide E7 de l'HPV16 (exprimé par les TC1), combiné à de l'IFNα. Une semaine plus tard (J7), un « *boost* » est effectué. Après le *boost*, la croissance tumorale cesse puis la tumeur régresse. L'analyse cinétique par cytométrie révèle un infiltrat immunitaire important pendant, et précédant la régression tumorale. La nature de cette infiltrat varie avec le temps. A J5, un infiltrat myéloïde est observé, suivi d'un infiltrat lymphocytaire à partir de J8. Une déplétion des cellules T $CD8^+$ inhibe la régression tumorale, alors que dans les souris $CXCR3^{-/-}$, dans lesquelles les $CD8^+$ ne sont pas déplétés mais leur recrutement est fortement affecté, une régréssion tumorale est possible malgré un infiltrat T $CD8^+$ très faible. Cela laisse penser que d'autres acteurs que les LT cytotoxiques sont nécessaires à la régression tumorale, comme probablement les cellules myéloïdes qui infiltrent le tumeur avant les cellules T. L'analyse de cette population montre une activation des monocytes et macrophages (MHC II^+), avec un pic d'activation autour de J9, au début de la régression. La capacité cytotoxique de ces cellules, mesurée *in vitro* par immunofluorescence est augmentée comparée à des myéloïdes isolées de tumeurs de souris en progression. De plus, l'ajout d'un anticorps anti-TNFα inhibe partiellement cette cytotoxicité. Cela montre qu'après vaccination, les monocytes/macrophages sont capables de tuer les cellules tumorales. Une déplétion partielle des macrophages au moment de la vaccination, à l'aide du PLX3397 (inhibiteur du CSF1R), réduit l'efficacité de la vaccination. Les cellules myéloïdes, lorsqu'elles sont présentes, contribuent fortement à la régression tumorale induit par le vaccin composite, et leur action implique probablement des interactions avec les LT $CD8^+$. C'est ce que suggère l'observation de tumeurs vaccinées dans des souris $IFN\gamma^{-/-}$, dans lesquelles l'efficacité vaccinale est aussi inhibée.

Cette thèse montre qu'après une stimulation appropriée, qui peut, comme ici, mimer une infection virale, les cellules myéloïdes peuvent participer activement à la régression tumorale.

Mots clés : TIL, cellules myéloïdes, vaccin, régression tumorale, coopération