UNIVERSITE DE BOURGOGNE

U.F.R de MEDECINE

Année 2010-2011

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BOURGOGNE

Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire, Immunologie

Présentée et soutenue publiquement

Par

Sylvain LADOIRE

Le 10 Mai 2011

ASPECTS FONCTIONNELS ET PRONOSTIQUES DES CELLULES MYELOIDES SUPPRESSIVES ET DE FOXP3 DANS LE CANCER

Directeurs de thèse :

Dr François GHIRINGHELLI

Membres du jury :

Dr François GHIRINGHELLI	Directeur de Thèse
Pr Pierre FUMOLEAU	Examinateur
Dr Christophe CAUX	Rapporteur
Pr Christophe BORG	Rapporteur
Pr Jean Yves PIERGA	Examinateur

SOMMAIRE

Partie I. Introduction sur l'importance du système immunitaire en cancérologie :

1. **Organisation générale du système immunitaire :**
2. **Le concept d'immunosurveillance des tumeurs :**
3. **L'échappement des tumeurs au système immunitaire : Immunosélection et Immunosubvertion :**

Partie II. Les Cellules Myéloïdes Suppressives : Les MDSCs :

1. **Origine et sous populations de MDSCs :**

   1.1 Chez la souris :

   1.2 Chez l'homme :

2. **Expansion et activation des MDSCs :**

   2.1 Expansion des MDSCs :

   2.2 Activation des MDSCs

3. **Mécanismes immunosuppresseurs mis en jeu par les MDSCs :**

   3.1 Action sur les acteurs cellulaires de l'immunité :

   3.2 Mécanismes moléculaires d'action sur les acteurs cellulaires de l'immunité :

4. **Moyens thérapeutiques pour cibler les MDSCs :**

   4.1 Favoriser la différenciation des cellules myéloïdes :

   4.2 Inhiber l'expansion des MDSCs :

   4.3 Inhiber les fonctions suppressives des MDSCs

4.4 Eliminer les MDSCs

5. **Article # 1**

6. **Synthèse – Discussion :**

7. **Article # 2**

8. **Synthèse - Discussion :**

Partie III. Foxp3 :

A. Le gène et la protéine Foxp3 dans le cancer:

Article # 3 :

B. Foxp3 et lymphocytes T régulateurs :

1. **Origine des Tregs**
2. **Les marqueurs spécifiques des Tregs**
3. **Action des Tregs sur les acteurs cellulaires de l'immunité :**
   3.1 Effet des Treg sur les lymphocytes T CD4+ et sur les lymphocytes CD8+:
   3.2 Effets des Tregs sur les NKT :
   3.3 Effets des Tregs sur les cellules NK :
   3.4 Effets des Tregs sur les cellules dendritiques :
   3.5 Effets des Tregs sur les autres cellules de l'immunité :
4. **Mécanismes moléculaires immunosuppresseurs mis en jeu par les Tregs :**
   4.1 Molécules impliquées dans l'activation et/ou la prolifération des Treg :
   4.2 Mécanismes moléculaires d'action sur les acteurs cellulaires de l'immunité :
5. **Rôle des Tregs dans les cancers :**
   5.1 Rôle des Tregs dans les tumeurs expérimentales :
   5.2 Rôle des Tregs dans les cancers humains :
6. **Moyens thérapeutiques pour cibler les Tregs :**

7. **Tregs et pronostic des cancers humains :**
8. **Article # 4 :**
9. **Appendice 1**
10. **Synthèse - Discussion:**

C. Foxp3 et le concept de Chimiothérapie Immunogène :

1. **Effets particuliers des traitements anti-tumoraux sur le système immunitaire :**
2. **Mécanismes généraux à l'origine d'une mort cellulaire immunogène :**
3. **Article # 5 :**
4. **Synthèse - Discussion :**

D. Foxp3 et cellules tumorales :

1. **Expression de Foxp3 dans les cellules tumorales :**
2. **Article #6 :**
3. **Synthèse - Discussion :**
4. **Appendice 2**

Conclusions - Perspectives:

Références bibliographiques :

Partie I. Introduction sur l'importance du système immunitaire en cancérologie

1. Organisation générale du système immunitaire :

Le système immunitaire comprend l'ensemble des mécanismes biologiques agissant conjointement pour protéger l'organisme d'agressions pathogènes, notamment extérieures (virales, bactériennes, parasitaires, fongiques). Cette protection est possible grâce à la discrimination entre les cellules saines de l'individu (le soi) et les cellules pathologiques, infectées et donc potentiellement dangereuses pour l'organisme (le non soi). L'immunité peut être divisée en 2 compartiments distincts : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée correspond à l'ensemble des barrières biologiques (peau, muqueuses), les systèmes du complément et de l'inflammation, les phagocytes et les cellules lymphocytaires à cytotoxicité naturelle (NK : Natural Killer). Les phagocytes (neutrophiles et monocytes/macrophages) ingèrent les organismes étrangers afin de les détruire, sécrètent des cytokines, et répondent par d'autres mécanismes qui contribuent à l'élimination des organismes étrangers et la réparation des tissus lésés. Les NK détruisent les cellules de l'hôte présentant des molécules reconnues par leurs récepteurs activateurs, et/ou ne présentant pas les molécules reconnues par leurs récepteurs inhibiteurs (KIR :Killer cell Immunoglobulin-like Receptors), et produisent de l'interféron-γ (INF-γ) qui active les macrophages afin qu'ils détruisent les éléments phagocytés, et sécrètent en retour des cytokines activant les NK comme l'IL-12, dans une boucle d'activation mutuelle. Les cytokines de l'immunité innée servent à stimuler le processus d'inflammation (IL-1, TNF-α), à activer les macrophages (INF-γ) et les NK (IL-12). Outre leur capacité à fournir des défenses précoces, les acteurs du système immunitaire inné délivrent des seconds signaux nécessaires à l'activation des cellules du système immunitaire adaptatif (lymphocytes B et T).

Le système immunitaire adaptatif se divise en immunité humorale, dans laquelle les anticorps (Ac) produits par les lymphocytes B neutralisent et éliminent les organismes étrangers et les toxines extracellulaires, et en immunité à médiation cellulaire dans laquelle les lymphocytes T éliminent les organismes étrangers intracellulaires. Les lymphocytes possèdent des récepteurs aux antigènes (Ag) distribués de façon clonale. La réponse immunitaire adaptative se décompose en phases consécutives : reconnaissance de l'antigène par le lymphocyte, l'activation lymphocytaire qui se traduit par leur prolifération et leur différenciation en cellules effectrice (qui vont exercer la réponse immédiate) et en cellules mémoires (destinées à protéger plus efficacement l'organisme lors d'une éventuelle deuxième rencontre avec le même antigène). Les lymphocytes T reconnaissent des fragments peptidiques d'antigènes protéiques présentés par d'autres cellules grâce à leur récepteur spécifique de l'Ag (TCR). Ces peptides peuvent être issus, pour la plupart des cellules, de protéines provenant de leur cytoplasme, et présentés par les molécules du CMH de classe I, ou issus de protéines phagocytées par les cellules présentatrices d'Ag professionnelles (CPAg) et présentées alors par les molécules du CMH de classe II. Les CPAg, comme les cellules dendritiques (DCs), capturent les antigènes, et les présentent aux lymphocytes T dans les organes lymphoïdes où les réponses immunitaires sont initiées et développées. Les lymphocytes naïfs circulent à travers les organes lymphoïdes périphériques à la recherche d'antigènes du non soi, et les lymphocytes T effecteurs migrent vers les sites de réponse inflammatoire en périphérie, où leur fonction est l'élimination des organismes étrangers, alors que les lymphocytes B effecteurs restent dans les organes lymphoïdes ou la moelle osseuse ou ils sécrètent des Ac. Les CPAg exposées aux signaux danger, ou aux cytokines produites lors de la réponse immunitaire innée expriment des molécules de costimulation, (comme B7) reconnues par des récepteurs sur les lymphocytes T (comme CD28), et délivrent ainsi les seconds signaux (en

plus de la reconnaissance de l'Ag) nécessaires à l'activation des lymphocytes T. En réponse à la reconnaissance de l'antigène et à la costimulation, les lymphocytes T sécrètent des cytokines qui induisent leur prolifération (notamment l'IL-2) ou leurs fonctions effectrices. Les lymphocytes T CD4 peuvent se différencier en différentes populations effectrices qui produisent des ensembles limités de cytokines et exercent différentes fonctions. Ainsi, les lymphocytes T helper de type 1 (Th1) produisent de l'INF-γ et activent ainsi les phagocytes en plus de stimuler la sécrétion d'Ac opsonisant et fixant le complément. Ces lymphocytes T expriment des molécules comme le ligand de CD40 (CD40L) induisant après liaison à CD40 sur la CPAg la sécrétion par cette dernière de cytokines comme l'IL-12 (qui favorise alors la polarisation d'une réponse Th1), et l'expression de molécules de costimulation comme B7 dans une boucle d'auto-activation. Les lymphocytes Th2 produisent eux de l'IL-4 et de l'IL-5, stimulant la production d'IgE et activant les éosinophiles, et sont ainsi le pilier de la réponse immunitaire contre les helminthes. En outre, la réponse Th2 s'accompagne d'une sécrétion de cytokines impliquées dans l'inhibition de la réponse Th1, comme l'IL-4, l'IL-10 ou l'IL-13.

Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques tuent (via le système perforine-granzyme) les cellules présentant des antigènes du non soi via les molécules du CMH de classe I, et peuvent nécessiter la collaboration des lymphocytes T CD4 pour se différencier en T effecteurs.

La réponse immunitaire doit subir un processus fin de régulation afin d'éviter son emballement et l'apparition de phénomènes auto-immuns. C'est ainsi qu'un certain nombre de molécules comme CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), qui constitue le ligand inhibiteur de la molécule de costimulation B7, sont produits lors de l'activation initiale des lymphocytes T, pour agir comme répresseur de cette activation. De même, l'expansion de certaines cellules comme les lymphocytes T régulateurs (Tregs), permet de contrôler négativement l'activation lymphocytaire T, et éviter ainsi la perenisation de celle-ci, qui pourrait être délétère si trop prolongée.

A coté de son rôle protecteur vis-à-vis d'agressions d'origine extérieure, le système immunitaire semble également capable de reconnaitre des cellules du soi en voie de transformation cancéreuse, et d'éliminer précocement ces précurseurs avant que la tumeur ne devienne cliniquement décelable. Cette théorie dite « d'immunosurveillance », apparue au début du XXième siècle avec les travaux de Paul Ehrlich (Ehrlich, 1909), fait l'objet depuis de nombreuses controverses, en dépit de l'accumulation d'un certain nombre de preuve de ce concept, notamment depuis la fin des années 90.

2. Le concept d'immunosurveillance des tumeurs:

La plupart des acteurs de l'immunité acquise ou adaptative participent au phénomène d'immunosurveillance (Zitvogel et al., 2006) :

. Les cellules tumorales génèrent des antigènes pouvant être captés et présentées par des APCs (notamment des DCs), capables de les présenter à des lymphocytes T naïfs, et de les activer via divers signaux de costimulation, et la sécrétion de cytokines orientant une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Th1), pilier de la réponse immunitaire anti-tumorale.

. Des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (CTL) sont ainsi générés et capables de reconnaitre via le CMH, et de tuer via la perforine les cellules tumorale. De façon parallèle, ces cellules sont capables de sécréter de l'INF-γ, qui polarise la réponse T vers une réponse Th1, s'oppose à l'angiogénèse, et exerce une activité cytostatique.

. Des lymphocytes T CD4 activés interagissent avec les macrophages infiltrant la tumeur (TAM), via le CMH II, convertissant ainsi les macrophages de type M2 sécréteurs d'IL-10, en macrophages de type M1, producteurs d'INF-γ. Ces lymphocytes T CD4 de type Th1, libèrent également de l'INF-γ.

. Les IKDC (INF-producing killer dendritic cells) constituent une nouvelle famille de cellules de l'immunité récemment identifiée, et capable à la fois de tuer les cellules tumorales via

TRAIL et la perforine, mais aussi de présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T. ces cellules constituent également une source d'INF-γ.

. Les cellules NK sont capables de tuer les cellules tumorales n'exprimant plus les ligands des récepteurs inhibiteurs des NK, comme le CMHI, ou au contraire des cellules tumorales exprimant des ligands des récepteurs activateurs des NK. Dans certaines hémopathies comme la leucémie myéloïde chronique (LMC), les cellules NK peuvent en outre être activées via leur récepteur activateur NKG2D par les DCs. Un des effets immunologique de l'imatinib dans la LMC est précisément l'activation des NK via un contact intercellulaire avec les DC.

. Les cellules T natural killer (NKT) participent à la reconnaissance de glycolipides tumoraux présentés par les APC via leur récepteur CD1d, signal capable de les activer. Les NKT activées sont alors capables de libérer de l'INF-γ, et de tuer les cellules tumorales via TRAIL et la perforine.

. Les cellules tumorales ou les APC sont susceptibles de présenter des antigènes tumoraux, notamment des phosphoantigènes aux lymphocytes Tγδ, qui en retour sont capables de tuer via la reconnaissance de ligands de NKG2D, exprimé à leur surface, ou de sécréter des cytokines favorisant une réponse immunitaire antitumorale (INF-γ, TNF-α).

. Les lymphocytes B et les plasmocytes sécrètent des anticorps spécifiques d'antigènes tumoraux, favorisant ainsi la lyse des cellules tumorale médiée par le complément ou les effecteurs cellulaires (ADCC : antibody dependent cellular cytotoxicity) comme les macrophages ou les NK qui possèdent des récepteurs membranaires au fragment Fc des immunoglobulines.

Il semble aujourd'hui clairement démontré dans plusieurs modèles cliniques que les animaux déficients pour ces principaux acteurs cellulaires ou moléculaires de l'immunité acquise ou adaptative sont particulièrement susceptibles au développement de tumeur malignes

spontanées ou induites chimiquement. C'est le cas des souris RAG-/- dépourvues de recombinase donc déficientes en lymphocytes B, T et NKT, des souris déficientes pour la chaine γ du TCR donc sans lymphocytes Tγδ, des souris déficientes en TCRβ et TCRδ donc sans lymphocyte Tαβ ni Tγδ, des animaux déficients en NKT, en récepteur à l'INFγ, en STAT1 (facteur de transcription nécessaire à la polarisation Th1), en TNF-α, en perforine ou en TRAIL (Dunn et al., 2004a). Des résultats similaires sont obtenus lorsque sont utilisés chez des animaux immunocompétents des anticorps déplétant les NK, les NKT ou antagonisant TRAIL ou NKG2D (Raulet, 2003; Takeda et al., 2002). Inversement des traitements capables d'augmenter le nombre de cellules NK, ou de NKT sont capables de limiter le développement de tumeurs malignes chez la souris (Smyth et al., 2005).

Chez l'homme, il existe de nombreuses preuves de l'existence d'une immunosurveillance. Ainsi, de nombreuses situation d'immunodéficience sont associées à une prédisposition pour le développement de cancers, comme c'est le cas pour les patients transplantés, y compris pour des cancers non reliés à des infections virales (Hollenbeak et al., 2005; Penn, 2000). Les patients porteurs d'un syndrome de Chediak-Higashi, caractérisé par un dysfonctionnement dans la cytotoxicité des NK, ont un risque de cancer 200 fois plus élevé que les sujets sains (Kobayashi, 1985). Certains polymorphismes des récepteurs NKG2D, ou des KIRs affectant la cytotoxicité des NK sont associés à un sur-risque de développer certains cancers (Carrington et al., 2005; Hayashi et al., 2006; Imai et al., 2000; Nakachi et al., 2004). Il en est de même pour certains polymorphismes inactivateurs de Fas-ligand, ou pour les patients porteurs de mutations du gène de la perforine (Clementi et al., 2005; Sun et al., 2005). Par ailleurs, des preuves directes d'une immunosurveillance existent chez les patients porteurs de gammapathie monoclonale bénigne, un état pouvant précéder l'apparition d'un authentique myélome multiple, chez qui il est possible de mettre en évidence une réponse T vis-à-vis des clones lymphocytaires B, qui n'est plus retrouvée chez les patients ayant évolués vers un

myélome (Dhodapkar et al., 2003). D'autre part, la présence de lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes tumoraux comme MUC-1 ou HER2 a été mise en évidence dans la moelle osseuse de patientes porteuses d'une tumeur localisée du sein, et ces lymphocytes sont capables d'induire la régression tumorale lorsqu'ils sont transférés de façon passive à des souris xénogreffées avec la tumeur primitive (Beckhove et al., 2004).

Ainsi, dans de nombreux cancers, la présence d'un infiltrat tumoral lymphocytaire T est habituellement considérée comme le témoin d'une tentative de détection et d'élimination des cellules anormales par le système immunitaire, et a pu être relié à un meilleure pronostic des patients pour certains types tumoraux (Kornstein et al., 1983) (Baxevanis et al., 1994) (Naito et al., 1998). Par ailleurs, chez des patients porteurs d'un cancer du colon, une forte expression au sein du microenvironnement tumoral de molécules importantes pour les fonctions des lymphocytes Th1 (CD8α, granzyme B, T-bet, INF-γ) est associée à une meilleure survie, et un moindre risque métastatique (Galon et al., 2006; Pages et al., 2009) (Pages et al., 2005).

Cependant alors même que certaines tumeurs sont capables d'induire une réponse immunitaire au moins transitoire, la plupart des cancers sont tout de même capables de se développer chez des patients, indiquant donc que les cellules transformées sont capables d'échapper à l'immunosurveillance soit par immunosélection, c'est-à-dire par la sélection de variants cellulaires tumoraux non immunogènes, ou par immunosubversion c'est-à-dire par des mécanismes actifs de suppression de la réponse immunitaire capables d'induire une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur (Dunn et al., 2004a).

3. L'échappement des tumeurs au système immunitaire : Immunosélection et Immunosubvertion :

Les mécanismes d'échappement au système immunitaire par immunosélection sont bien décrits :

. La perte de l'expression par les cellules tumorale du récepteur à l'INF-γ, et des molécules du CMH I est documentée dans de nombreuses variétés de cancers épithéliaux et dans les mélanomes (So et al., 2005). De façon proche, les cellules cancéreuses perdent progressivement l'expression de molécules d'amont, impliquées dans le processing et la présentation de l'antigène via le CMH I : c'est le cas de TAP-1 (transporter associated with antigen processing 1), de LMP2 (low molecular mass protein 2), LMP7 et la tapasine, dont l'expression est progressivement perdue au cours par exemple de la cancérogénèse colique (Atkins et al., 2004).

Les cellules tumorales sont également capables de développer des mécanismes d'échappement aux systèmes de lyse cellulaire produits par les lymphocytes T cytotoxiques (CTLs), comme la surexpression de l'inhibiteur de serine protease PI9, capable de bloquer la voie perforine-granzyme B, et ainsi la lyse cellulaire tumorale (Medema et al., 2001). De même, les cellules tumorales sont capables d'échapper à la mort induite par les CTLs, en down régulant l'expression des récepteurs de mort, ou par leur mutation. Il a été également mis en évidence des mutations ou bien la méthylation de gènes impliquées dans l'apoptose des cellules cancéreuses comme le gène de la caspase 8, ou à l'inverse l'hyperexpression de FLIP (un inhibiteur de la caspase 8), ou encore l'expression de récepteur leurre pour TRAIL (Ochsenbein, 2005).

A coté de ces mécanismes d'immunosélection, les tumeurs sont capables également de développer des mécanismes actifs d'opposition à la réponse immunitaire anti-tumorale. Ainsi, dans la plupart des études humaines et des modèles pré cliniques, la carcinogénèse aboutissant au développement progressif d'une tumeur s'accompagne d'une immunosubversion progressive : la plupart des lymphocytes infiltrant les tumeurs sont spécifiques d'antigènes

tumoraux (Miescher et al., 1987) (Albers et al., 2005). Typiquement les clones lymphocytaires T CD8+ activés présents au début du développement tumoral voient leurs capacités cytolytiques vis-à-vis des cellules cancéreuses progressivement diminuer (Huang et al., 2005). De façon similaire, les clones T CD4+ spécifiques de la tumeur perdent progressivement leur réactivité vis-à-vis de la tumeur (Zhou et al., 2004). L'induction d'une tolérance immunitaire par la tumeur semble donc constituer une étape clé pour le développement d'un cancer (Willimsky & Blankenstein, 2005), et les mécanismes mis en jeu par les cellules tumorales pour y parvenir sont multiples :

. Ainsi, les cellules tumorales sont capables d'exprimer Fas-ligand, pouvant ainsi induire la mort de lymphocytes T spécifiques de la tumeur exprimant Fas. D'autre part, certaines tumeurs expriment (notamment en réponse à l'INF-γ) des molécules comme B7-H1 ou B7-H4, capable de directement lier PD1 sur les lymphocytes T et d'induire ainsi leur apoptose.

. L'immunosubvertion pourrait être également lié au volume tumoral lui-même, et en quelque sorte à une tolérance liée à une exposition massive aux antigènes tumoraux. Il est ainsi montré que la libération de ligands de NKG2D, comme MICA ou MICB survient progressivement au cours du développement de la tumeur (Holdenrieder et al., 2006b) (Holdenrieder et al., 2006a). Ces ligands sont normalement capables d'activer une réponse anti tumorale efficace dépendante des T CD8 et des NK (Zhou et al., 2005). Ce phénomène existe essentiellement lorsque la tumeur est petite, mais tend à disparaitre progressivement avec l'augmentation de la taille tumorale, notamment en raison d'une down regulation de NKG2D dans ces cellules (Coudert et al., 2005) (Oppenheim et al., 2005). Ce phénomène est induit par les ligands solubles de NKG2D, qui sont capables (contrairement aux ligands membranaires) de provoquer l'internalisation du récepteur (Holdenrieder et al., 2006a). Une preuve indirecte de ce concept d'immunosubversion induite par la masse tumorale est la constatation de la restauration d'une réponse T CD8 spécifique après une chimiothérapie efficace en terme de

réduction du volume tumoral, ou après éxérèse chirurgicale de la tumeur primitive (Coleman et al., 2005).

. Certaines tumeurs (mais aussi des cellules de l'immunité présentes dans le microenvironnement tumoral) sont capables de sécréter du NO, ou d'avoir une activité arginase 1 supraphysiologique, déplétant ainsi le milieu environnant en arginine, ces 2 mécanismes pouvant se traduire par une inhibition des principales fonctions lymphocytaires T (Bronte & Zanovello, 2005). De façon parallèle, la dégradation du tryptophane par l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO), constitutivement exprimée par certaines cellules tumorales ou produite par certaines cellules du microenvironnement comme des DCs subverties par des cellules immunorégulatrices, favorise la résistance des cellules cancéreuses à la réponse immunitaire (Uyttenhove et al., 2003). La carence en tryptophane bloque ainsi la prolifération des T CD8+ (Uyttenhove et al., 2003) et l'accumulation consécutive de kynurénines favorise l'apoptose des T CD4+ (Terness et al., 2002).

. Par ailleurs la présentation des antigènes tumoraux au sein de tumeurs établies est classiquement décrite comme défectueuse du fait de la présence de CPA tolérogènes, faisant ainsi comparer la tumeur à un organe lymphoïde « leurre » pour le système immunitaire (Zou, 2005). Ainsi, le microenvironnement tumoral est riche en de multiples facteurs capables d'inhiber la différenciation, la maturation et les principales fonctions des DCs (Zou, 2005). Sous l'effet de ces molécules (VEGF, IL-6, IL-10, TGF-β, M-CSF, NOSi, arginase 1, IDO, PGE2, COX2), les DCs infiltrant les tumeurs tendent plutôt à médier une tolérance vis-à-vis de la tumeur, plutôt qu'une stimulation de la réponse antitumorale. Elles tendent en outre à favoriser la différenciation T en lymphocytes T régulateurs (Ghiringhelli et al., 2005b), qui s'opposent à la réponse T conventionnelle :

Ainsi, si les DCs myéloïdes matures contribuent fortement à une réponse Th1, et sont considérées comme les principaux acteurs initiant la réponse immunitaire antitumorale

(Labeur et al., 1999) (Dhodapkar et al., 1999), la présence de DCs myéloïdes matures et fonctionnelles est en fait rarement constaté dans les tumeurs humaines (Zou et al., 2001) (Bell et al., 1999) (Iwamoto et al., 2003) (Troy et al., 1998). De multiples facteurs d'origine tumorale et présents dans le microenvironnement contribuent à perturber la différenciation et la maturation de ces DCs comme le VEGF (Gabrilovich et al., 1996), la PGE2 (Kalinski et al., 1998) (Sombroek et al., 2002) (Akasaki et al., 2004), les gangliosides (Peguet-Navarro et al., 2003; Shurin et al., 2001) d'origine tumorale, ou l'IL-10 et le TGFβ produits par les Tregs ou les TAMs de phénotype M2. Inversement, les cytokines favorisant la différenciation des DCs ou polarisant une réponse Th1 (IL-12, INFγ) sont beaucoup moins présentes dans ce même microenvironnement (Freedman et al., 2004; Kryczek et al., 2000). Cette balance cytokinique est favorable au maintient de DCs myéloïdes immatures, ou partiellement différenciées capables d'inhiber la réponse T directement (Hawiger et al., 2001) ou d'induire des Tregs (Jonuleit et al., 2000) (Dhodapkar et al., 2001)

De mêmes, certains facteurs présents dans le microenvironnement, comme l'IL-10, sont susceptibles de réduire l'expression par les DCs de molécules de costimulation classiques comme B7.1 et B7.2 et de favoriser l'expression de B7 H1 par les DCs myéloïdes. Cette molécule, membre de la famille B7 a pour ligand PD-1, présent notamment sur les Tregs (Curiel et al., 2004), qui peuvent en retour via cette interaction inhiber la sécrétion d'IL-12 par les DCs, et de ce fait limiter leur rôle stimulant de la réponse immunitaire anti tumorale (Curiel et al., 2003). L'expression de B7 H1 est également susceptible d'induire directement l'apoptose des T activés (Dong et al., 2002). Les cellules tumorales et les APCs infiltrant certaines tumeurs comme les cancers de l'ovaire sont également capables d'exprimer B7 H4 dont le ligand n'est pas identifié. B7 H4 est également un inhibiteur de la réponse T, s'opposant à la prolifération et à la production de cytokines par les lymphocytes T (Chen, 2004) (Sica et al., 2003) (Prasad et al., 2003) (Zang et al., 2003).

Certaines DCs du microenvironnement tumoral sont capables d'exprimer l'indoléamine 2,3 deoxygénase (IDO), enzyme catabolisant le tryptophane (amino acide indispensable à la prolifération des lymphocytes T) et générant des kynurénines (toxiques pour les lymphocytes T (Munn et al., 2002). Cette expression d'IDO dans les DCs est favorisé par CTLA4, exprimé notamment par les Tregs, illustrant un nouvel exemple de coopération de cellules régulatrices au sein du microenvironnement tumoral (Grohmann et al., 2002).

De même, des quantités importantes de DCs plasmocytoïdes sont retrouvées dans le microenvironnement tumoral (Zou et al., 2001). Si ces cellules en périphérie sont capables de stimuler la production d'INFγ par les T (Salio et al., 2003), celles infiltrant les tumeurs sont phénotypiquement et fonctionnellement différentes, capables notamment d'induire la production d'IL-10 (cytokine inhibant directement les CTLs ou indirectement via une inhibition des DCs) par les T, et même d'induire des cellules T CD4+ et CD8+ à fonction régulatrice (Moseman et al., 2004) (Gilliet & Liu, 2002).

. De fait, l'induction par la tumeur de cellules immunitaires s'opposant à une réponse T antitumorale, et favorisant la croissance tumorale constitue une découverte majeure des ces dernières années, expliquant la nécessité d'avoir une vision qualitative et non pas seulement quantitative des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral. Ainsi, de récentes analyses des interactions cellulaires, basées sur la nature, les fonctions, la densité et la localisation des cellules immunitaires du microenvironnement tumoral de cancers coliques humains permettent de mieux prédire le pronostic des patients (Galon et al., 2006) (Pages et al., 2005) (Pages et al., 2009).

Parmi ces cellules immunorégulatrices, il donc citer les lymphocytes T régulateurs (Tregs), phénotypiquement définis comme CD4+ $CD25^{high}$ et Foxp3 + (ce dernier constituant leur

principal facteur de transcription et leur marqueur le plus spécifique), et qui s'opposent à la prolifération des autres T. Ils feront l'objet d'un chapitre entier dans ce travail.

De même, les tumeurs sont capables de favoriser l'accumulation de cellules myéloïdes immatures suppressives (MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cells), qui favorisent la croissance tumorale, et bloquent la réponse immunitaire via de nombreux mécanismes différents, qui feront là encore l'objet d'un chapitre spécifique.

D'autres cellules immunitaires du microenvironnement tumoral peuvent également être subverties par la tumeur, comme les NKT qui dans certains modèles (Terabe & Berzofsky, 2004) par une sécrétion d'IL-13 sont capables d'induire la sécrétion de TGF-β par les MDSC et d'inhiber la cytotoxicité médiée par les T. De même, les tumeurs sont fréquemment infiltrés par des macrophages (TAMs : Tumor Associated Macrophages), qui ont plus volontiers un phénotype de type M2, c'est-à-dire produisant du TGF-β, de l'IL-10, de la PGE2 et de l'arginase 1, du VEGF, et peu d'IL-12 ou d'IL-23. Ils favorisent donc ainsi plutot une polarisation Th2 de la réponse immunitaire, l'angiogénèse tumorale, et sont globalement tolérogène, donc défavorable au rejet de la tumeur (au contraire des TAMs M1 qui gardent des propriétés tumoricides, et la capacité d'induire une réponse Th1 et NK par sécrétion d'IL-12) (Mantovani et al., 2002) (Martinez et al., 2008).

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés aux 2 populations cellulaires semblant jouer le rôle immunorégulateur le plus important dans le contexte des tumeurs solides : les MDSCs et les lymphocytes T régulateurs.

Notre travail concernant les MDSCs a essentiellement consisté à tenter de mieux comprendre les mécanismes moléculaires présidant à leur accumulation, et à l'acquisition de leurs fonctions immunosuppressives au cours du développement tumoral. Nos recherches nous ont

également conduit à explorer de nouveaux mécanismes thérapeutiques potentiels visant à s'opposer à leur activation ou leur accumulation dans un contexte tumoral.

Notre travail sur les lymphocytes T régulateurs à quand à lui été abordé sous l'angle plus large du rôle pronostic de la protéine Foxp3 dans les tumeurs humaines, et plus particulièrement dans le cancer du sein, au travers de l'étude immunohistochimique de l'infiltration de tumeurs humaines en cellules Foxp3+, et de leur modulation par la chimiothérapie anticancéreuse.

Partie II. Les Cellules Myéloïdes Suppressives : Les MDSCs :

La possibilité que des phénomènes inflammatoires chroniques puissent contribuer à initier la transformation maligne de cellules normales, puis favoriser la progression tumorale est évoquée depuis près de 150 ans et les hypothèses du pathologiste allemand Rudolf Virchow (Balkwill & Mantovani, 2001). De nombreuses observations cliniques viennent étayer cette hypothèse, liant inflammation et développement tumoral : c'est ainsi qu'un certain nombre de tumeurs malignes, comme les cancers de la sphère ORL, les cancers de l'estomac, de l'œsophage, du pancréas, de la vésicule biliaire, de la vessie, du poumon ou de la plèvre se développent plus volontiers au niveau d'organes atteints de phénomènes inflammatoires chroniques, ou sont associés à la présence de certains agents infectieux (Coussens & Werb, 2002) (Mantovani et al., 2008). De nombreux travaux précliniques montrent que l'inhibition de médiateurs pro-inflammatoires, ou de voies de régulation de l'inflammation est capable de diminuer la survenue de tumeurs malignes ou la progression tumorale, alors qu'inversement l'augmentation des médiateurs, ou le transfert adoptif de cellules impliquées dans les processus inflammatoires, sont capables de promouvoir le développement tumoral (Mantovani et al., 2008). Par ailleurs, il est clairement démontré en clinique humaine que des agents pharmacologiques anti-inflammatoires (AINS, aspirine) diminuent significativement l'incidence de certains cancers comme les cancers du colon, de l'estomac, de l'œsophage, du poumon ou du sein (Mantovani et al., 2008) (Baron & Sandler, 2000) chez les individus en consommant régulièrement.

Les phénomènes inflammatoires chroniques sont capables de favoriser la tumorogénèse à la fois via des phénomènes d'ordres immunologiques et non immunologiques : parmi ces derniers il faut citer notamment la production de produits réactifs de l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) tels les peroxynitrites capables de causer des dommages directs à

l'ADN, et donc par ce biais de contribuer à l'instabilité génique des cellules tumorales et donc à la progression tumorale (Coussens & Werb, 2002), la production de facteurs proangiogéniques, comme le VEGF, facilitant ainsi la néovascularisation indispensable à la croissance tumorale (Ellis & Hicklin, 2008), ou la production de metalloprotéases de la matrice, qui facilitent les processus d'invasion et de dissémination métastatique (Yang et al., 2008). Les cytokines proinflammatoires comme L'IL-6 ou le TNF-α, sécrétées au sein du microenvironement tumoral par les cellules immunitaires contribuent en outre à activer au sein des cellules tumorales des voies de transduction du signal impliquant des facteurs de transcription oncogéniques tels que NF-κB ou STAT3, impliqués dans l'expression de gènes favorisant la tumorigénèse, la résistance à l'apoptose, la prolifération cellulaire (Grivennikov & Karin, 2010).

Concernant les mécanismes d'ordre immunologique, le principal semble être la perturbation de l'hématopoïèse, et plus particulièrement la myelopoièse, induite par les phénomènes inflammatoires. La résultante en est un déficit dans la présentation de l'antigène (Ag) par les cellules dendritiques (DCs) non fonctionnelles et un dysfonctionnement de la réponse cellulaire immunitaire antitumorale (Gabrilovich, 2004). Une des étapes majeures de ce processus favorisant l'échappement des cellules tumorale au système immunitaire est l'accumulation de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs : myeloid-derived suppressor cells), population hétérogène de cellules immatures de la ligné myéloïde, capables d'inhiber à la fois la réponse immunitaire antitumorale innée et acquise. Il faut noter par ailleurs que ces cellules semblent également favoriser la croissance tumorale par un rôle promoteur de la néoangiogénèse tumorale (Murdoch et al., 2008), ce que nous n'aborderons pas dans ce travail.

Si la présence de cellules de la lignée myéloïdes avec des fonctions immunosuppressives est connue depuis plus de 20 ans (Young et al., 1987) (Buessow et al., 1984) (Seung et al., 1995),

leur importance au sein du système immunitaire, en particulier dans les contextes pathologiques, comme le cancer, n'est véritablement reconnue que depuis peu. Ces cellules s'accumulent dans le sang, la moelle osseuse, la rate, la tumeur et à un moindre degré dans les ganglions de souris porteuses de tumeur (Marigo et al., 2008) (Haile et al., 2008) (Kusmartsev et al., 2005) (Serafini et al., 2004) (Sinha et al., 2008). En clinique humaine, chez des patients porteurs de cancer, les MDSCs sont retrouvées en nombre important dans le sang (Almand et al., 2001) (Filipazzi et al., 2007) (Lathers et al., 2001) (Pandit et al., 2000) (Zea et al., 2005), sans qu'il soit actuellement connu d'autre site d'accumulation.

Cependant, malgré l'intérêt croissant pour cette population cellulaire et son rôle dans le cancer, la nature exacte, la caractérisation, le développement (ainsi que les moyens de s'y opposer) de ces cellules chez l'animal et l'homme restent encore mal définis.

1. Origine et sous populations de MDSCs :

Les MDSCs sont une population cellulaire hétérogène constituée de progéniteurs myéloïdes, et de cellules myéloïdes immatures. Chez l'homme comme chez la souris, leur niveau qualitatif et quantitatif dépend de la masse tumorale, mais aussi du type de tumeur et des divers facteurs solubles produit par celle-ci ou par les cellules de l'hôte infiltrant le microenvironnement tumoral. En situation non pathologique, les cellules myéloïdes immatures, générées dans la moelle osseuse, se différencient rapidement en granuleux, macrophages, ou cellules dendritiques. Par contraste dans des situations pathologiques variées telles que le cancer, le sepsis, les traumatismes graves, certaines maladies infectieuses ou auto-immunes, un blocage de la différenciation myéloïde a pour corollaire l'expansion de ces cellules, qui dans ces contextes pathologiques, voient l'up régulation d'un certain nombre de leurs gènes impliqués dans des fonctions immunorégulatrices, comme le gène de l'arginase 1, ou de la NO synthase inductible (NOSi). Il en résulte l'expansion d'une population de cellules

myéloïdes immatures aux fonctions immunosuppressives, groupées au sein de l'appellation cellules myéloïdes suppressives (MDSCs). Il s'agit donc d'une population hétérogène, avec un aspect morphologique proche des monocytes ou des polymorphonucléaires, mais n'exprimant pas les marqueurs membranaires spécifiques des granulocytes, des macrophages ou des DCs (Youn et al., 2008).

1.1 Chez la souris :

Chez la souris, les MDSCs sont caractérisées par la coexpression des marqueurs de surface Gr1 et CD11b (Kusmartsev et al., 2004), sans expression de marqueurs typique des macrophages ou des DCs. Gr1 constitue en fait un épitope commun à deux antigènes distincts : Ly6C, marqueur des cellules monocytaires, et Ly6G, marqueur des cellules granuleuses, toutes deux présentes dans les MDSCs murines. On distingue ainsi 2 catégories de MDSCs chez la souris : granulocytaires, de phénotype CD11b+, Ly6G+, $Ly6C^{low}$, et celles de morphologie monocytaire de phénotype CD11b+, Ly6G-, $Ly6C^{high}$ (Youn et al., 2008). Ces 2 sous populations pourraient avoir des rôles et des fonctions différentes dans des contextes pathologiques aussi variés que le cancer, les maladies infectieuses ou auto-immunes (Dietlin et al., 2007) (Zhu et al., 2007) (Movahedi et al., 2008). Dans certains modèles précliniques de cancer, il semble que l'expansion des MDSCs concerne essentiellement le sous type granulocytaire, alors que la capacité à voir se différencier in vitro les MDSCs murines en macrophages ou en DCs concerne essentiellement le sous type monocytaire (Youn et al., 2008). D'autres marqueurs membranaires comme la chaine alpha du récepteur de l'IL4 et de l'IL13 (IL-4Rα), F4/80, CD115 ou la molécule de costimulation CD80 ont également été décrits sur certains sous types de MDSCs chez la souris (Umemura et al., 2008) (Gallina et al., 2006) (Rossner et al., 2005) (Yang et al., 2006) (Huang et al., 2006). Il faut noter qu'à coté de cette variété phénotypique, est également décrite une variété fonctionnelle concernant

les fonctions immunosuppressives, avec des populations de MDSCs mettant plus volontiers en jeu l'arginase (Kusmartsev et al., 2004) (Bronte et al., 2003a) (Sinha et al., 2007b), la NOSi (Bronte et al., 2003b) et la production de cytokines immunosuppressives (pour les MDSCs monocytaires), ou bien les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Bronte et al., 2003b) (Kusmartsev & Gabrilovich, 2003) (pour les MDSCs granulocytaires). Ces différents mécanismes mis en jeu conditionnent le type d'immunosuppression réalisé : dépendante de l'antigène en nécessitant un contact intercellulaire étroit avec les lymphocytes T pour les MDSCs granulocytaires, ou au contraire médié à distance sans contact intercellulaire et de façon indépendante de l'antigène pour le sous type monocytaire. La moelle osseuse d'une souris contient normalement jusqu'à 20% de cellules ayant un phénotype Gr1+ CD11b+, mais celles-ci sont rares dans la rate (2-4%) et absentes des ganglions lymphatiques.

Des travaux récents montrent que les MDSCs infiltrants les tumeurs sont capables d'exprimer soit des marqueurs classiquement retrouvés au niveau des TAMs de phénotype M1 (CCR2, CCR5, CX3CR1, CCR7), soit des marqueurs de TAM de type M2 (CD206 (récepteur au mannose), CCL17, IL-10 par exemple) (Umemura et al., 2008). La description chez des souris porteuses de tumeur d'une population de cellules Gr-1+ CD11b+ expriment le récepteur à l'IL-4, et capable de sécréter à la fois de l'IL-13 et de l'INF-γ (donc ayant un phénotype intermédiaire M1-M2) (Sica & Bronte, 2007) ajoute encore à la complexité, et la diversité phénotypique et fonctionnelle de cette population cellulaire.

Plus récemment, des différences fonctionnelles entre les MDSCs infiltrant les tumeurs et les MDSC spléniques ont été mises en évidence : alors que phénotypiquement ces cellules sont identiques, les MDSCs d'origine spléniques sont capables d'inhiber la réponse CD8+ spécifique de l'antigène, celles ci semblent incapables d'inhiber une réponse T non spécifique, contrairement aux MDSC infiltrant les tumeurs, qui en plus ont la propriété de se différencier rapidement en macrophages infiltrant les tumeurs. Le microenvironnement

tumoral, et notamment les conditions d'hypoxie y régnant, en favorisant via la voie d'HIF-1α l'up régulation de l'arginase 1 et de la NOSi, semble à l'origine de la conversion préférentielle des MDSCs vers une population suppressive non spécifique se différenciant en macrophages (Corzo et al., 2010).

1.2 Chez l'homme :

Chez l'homme, les MDSCs sont le plus souvent définies comme des cellules CD11b+, CD14-, exprimant le marqueur myéloïde CD33, mais n'exprimant pas les marqueurs de cellules myéloïdes ou lymphoïdes matures, ou HLA-DR (Ochoa et al., 2007) (Almand et al., 2001). Ces cellules peuvent varier pour l'expression d'autres marqueurs de surface comme le CD15 (Filipazzi et al., 2007) (Zea et al., 2005) (Huang et al., 2006) (Srivastava et al., 2008). Chez l'individu sain, ces cellules représentent environ 0,5% des cellules mononuclées du sang circulant (Almand et al., 2001). Chez les patients porteurs de cancers du rein, du sein, du pancréas, ou du colon, (Rodriguez et al., 2009) (Schmielau & Finn, 2001) il existe un contingent majoritaire de cellules myéloïdes polymorphonucléaires exprimant CD11b et CD15 (Schmielau & Finn, 2001) (ce dernier étant caractéristique de la lignée granulocytaire polymorphonucléaire), ainsi que CD66b, marqueur des polymorphes activés, mais n'exprimant pas en revanche le marqueur monocytaire CD14. Schématiquement, chez l'homme, il semble également exister 2 populations de MDSCs, granulocytaire, caractérisée par l'expression de CD15, et monocytaire caractérisée par l'expression de CD66b (Ko et al., 2009) (Rodriguez et al., 2009). L'effet immunosuppresseur de ces cellules n'est pas retrouvé lorsqu'on étudie les fonctions des polymorphonucléaires de sujets non porteurs de cancer, bien que ceux-ci expriment des marqueurs de surface très proches, dont CD15, CD33, CD13, CD11c et CD24. Il est possible que les MDSCs de morphologie polymorphonucléaire représentent une fraction activée des polymorphonucléaires normaux, dans la mesure où les

polymorphonucléaires de sujets sains activés par PMA peuvent acquérir l'expression de CD66b, en même temps que la capacité à libérer de l'arginase 1 et d'inhiber les lymphocytes T (Schmielau & Finn, 2001).

Plus récemment, une nouvelle population de MDSC a été identifiée chez des patients porteurs de mélanomes malin et de carcinomes hépatocellulaires métastatiques, de phénotype CD14+, HLA-DR$^{-/low}$, suggérant que chez l'homme comme chez la souris, des variétés tumorales différentes sont susceptibles d'induire différentes populations de MDSCs (Filipazzi et al., 2007) (Hoechst et al., 2008), correspondant probablement à des niveaux différents de blocage de leur maturation. Ce dernier phénomène étant étroitement dépendant du contexte tumoral, et notamment des différentes combinaisons de facteurs solubles produits par la tumeur et son microenvironnement, le phénotype des MDSCs chez l'homme n'est donc pas fixe, et au final les MDSCs y doivent plutôt être définies par leur fonction biologique immunosuppressive commune que par une population phénotypiquement homogène.

En revanche, la question de savoir si les MDSCs sont des cellules normales dont la différenciation est bloquée, ou si elles constituent une population ayant divergé de la différenciation myéloïde normale vers une différenciation anormale reste sans réponse précise, même si les expériences de différenciation de MDSCs provenant de souris porteuses de tumeur, en DCs sous l'effet de l'acide tout trans rétinoïque, plaide plutôt en faveur de la première hypothèse (Mirza et al., 2006) (Kusmartsev et al., 2003).

2. Expansion et activation des MDSC :

L'accumulation et l'activation des MDSCs sont mises en jeu par de nombreux facteurs qui peuvent être directement secrétés par les cellules tumorales, ou par les autres cellules immunitaires en particulier celles du stroma tumoral. Les facteurs sécrétés par les cellules tumorales jouent en général un rôle majeur dans l'expansion des MDSCs par le biais d'une

stimulation de la myélopoièse conjuguée à l'inhibition de la différenciation myéloïde. A l'opposé, les facteurs sécrétés par les lymphocytes T et les cellules infiltrant le stroma tumoral sont essentiellement impliqués dans l'activation des MDSCs.

2.1 Expansion des MDSCs :

La cyclooxygénase II (Cox2), les prostaglandines(PG), en particulier la PGE2 (Pan et al., 2008) (Sinha et al., 2007b) (Serafini et al., 2004), les ligands des Toll like récepteurs (TLR) (Delano et al., 2007), le stem cell factor (SCF) (Pan et al., 2008), le M-CSF, l'IL-6 (Bunt et al., 2007), le GM-CSF (Serafini et al., 2004), le VEGF (Gabrilovich et al., 1998) ou l'IL-1β constituent des facteurs rapportés dans l'expansion des MDSCs.

La PGE2 est impliquée dans la croissance tumorale via un rôle promoteur sur l'angiogénèse, la prolifération cellulaire et la protection vis-à-vis de l'apoptose (Wang & DuBois, 2008), mais aussi vraisemblablement en limitant la réponse immunitaire anti-tumorale, notamment via l'expansion des MDSCs. Chez des patients porteurs de cancer du rein, la PGE2 est capable d'induire des MDSCs (Ochoa et al., 2007). Les MDSCs expriment les 4 récepteurs à la PGE2 (EP 1 à 4). La signalisation via EP4 dans les MDSCs est capable d'activer l'expression et l'activité de l'arginase 1 (Rodriguez et al., 2005). L'administration d'un inhibiteur pharmacologique de la COX2 (enzyme nécessaire à la conversion de l'acide arachidonique en PGE2) à des animaux porteurs de tumeurs réduit le nombre de MDSCs et retarde la progression tumorale (Sinha et al., 2007b). Les souris KO pour EP2 porteuses de tumeurs mammaires 4T1 voient une accumulation moindre de MDSCs, et un retard à la croissance tumorale par rapport aux animaux sauvages (Sinha et al., 2007b). In vitro, l'addition au milieu de culture d'un inhibiteur de COX2 est capable d'inhiber le blocage de différenciation myeloide induit par le surnageant de cellules cancéreuses, et est capable de

down réguler l'expression de l'arginase dans les cellules myéloides (Eruslanov et al., 2010). La PGE2 semble donc constituer une voie de signalisation majeure non seulement dans l'expansion des MDSCs, mais aussi vraissemblablement pour l'acquisition de leurs fonctions régulatrices.

L'IL-1β (Bunt et al., 2006) (Song et al., 2005b) (Tu et al., 2008) et l'IL-6 (Bunt et al., 2007) sont capables d'augmenter significativement l'expansion, mais aussi la survie et l'effet suppresseur (Bunt et al., 2006) des MDSCs. Par ailleurs, concernant l'IL-1β, cet effet semble indépendant des autres cellules immunitaires de l'hôte (Bunt et al., 2006). Les souris porteuses de tumeur, KO pour le récepteur de l'IL-1β (IL-1R) ont significativement moins de MDSCs (Bunt et al., 2007), voient leur tumeur pousser plus lentement (Song et al., 2005b) (Voronov et al., 2003).

Au niveau des MDSCs, les voies de signalisation intra cellulaires en aval des récepteurs concernés convergent vers les protéines de la famille Jak (Janus kinase) et le facteur de transcription STAT3, impliqués tout deux dans les phénomènes de prolifération, de différentiation, et de survie cellulaire (Bromberg, 2002). A cet égard, STAT3 est jusqu'à présent considéré comme le principal facteur de transcription responsable de l'expansion des MDSCs en induisant dans les cellules myeloides la transcription de gènes tels Bcl-xL, c-myc, celui de la survivine ou de la cycline D1, s'opposant ainsi à l'apoptose et la différenciation en cellules plus matures (Yu et al., 2009): L'équipe de Gabrilovich montre ainsi que les MDSCs d'animaux porteurs de tumeurs ont des niveaux de STAT3 activé (phosphorylé) significativement plus important que les cellules myéloïdes immatures d'animaux sains (Nefedova et al., 2005). Par ailleurs, l'exposition de progéniteurs hématopoïétiques à du surnageant de cellules tumorales en culture active JAK2 et STAT3, et induit l'expansion de MDSCs in vitro. Cette expansion est bloquée par l'extinction de STAT3 dans les progéniteurs (Nefedova et al., 2004). In vivo, dans des modèles murins, l'inhibition de STAT3 par des

inhibiteurs pharmacologiques est capable de significativement diminuer l'expansion des MDSCs, et d'augmenter la réponse T antitumorale (Nefedova et al., 2005). Il faut cependant noter qu'un travail récent du groupe de Pardoll (Kortylewski et al., 2005) utilisant chez des souris porteuses de tumeur, un système de KO conditionel STAT3 dans les cellules hématopoiétiques montre, outre que l'ablation de STAT3 dans les cellules hématopoiétiques s'accompagne d'une amélioration significative des fonctions des cellules dendritiques, des lymphocytes T, et des cellules NK dans un contexte tumoral, mais aussi que dans ce modèle, il existe une augmentation de l'accumulation de cellules Gr1+ CD11b+ infiltrant les tumeurs, allant donc à l'encontre d'un rôle important de STAT3 dans l'expansion des MDSCs.

La phosphorylation de STAT3 augmente la survie et la prolifération des cellules myéloïdes probablement via l'up régulation de molécules comme BCL-XL, MYC, la cycline D1 ou la survivine. Cette importante et persistante activation de STAT3 dans les progéniteurs myéloïdes empêche leur maturation et leur différenciation en cellules myéloïdes matures, favorisant ainsi l'expansion de MDSCs.

Des données plus récentes suggèrent également que STAT3 contrôle l'expansion des MDSC via l'induction des protéines S100A8 et S100A9, dont les récepteurs sont eux même situés à la surface des MDSCs, constituant ainsi une possibilité de boucle autocrine permettant leur accumulation. La signalisation d'aval des récepteurs à S100A8 et S100A9 implique la voie NF-κB (Sinha et al., 2008). Les hétérodimères S100A8/S100A9 sont retrouvées à des taux élevés chez des patients porteurs de maladies inflammatoires chroniques (Foell et al., 2004) (Gebhardt et al., 2006), ou elles sont libérées par les neutrophiles et les monocytes activés (Foell et al., 2007). Dans ces situations, elles semblent impliquées dans la chemo-attraction des leucocytes, amplifiant ainsi les phénomènes inflammatoires (Hiratsuka et al., 2006). Des progéniteurs myéloïdes exprimant S100A8 et S100A9 infiltrent la muqueuse colique au voisinage de zones adénomateuses ou dysplasiques dans des modèles pré cliniques de cancer

du colon (Turovskaya et al., 2008). La prise tumorale de cellules de cancer colique est abolie chez les animaux déficients en S100A9, et ce phénomène peut être contrecarré par la co-injection de MDSCs provenant d'animaux wild-type (Cheng et al., 2008). L'expression de ces 2 gènes, sous la dépendance de STAT3, bloque la différenciation des progéniteurs myéloïdes et favorise l'expansion de MDSC dans la rate de souris porteuses de tumeurs, ou transgéniques, surexprimant S100A9, contrairement aux animaux déficients en S100A9 (Cheng et al., 2008). Il semble que les hétérodimères S100A8/S100A9 participent à la formation du complexe NADPH oxydase, responsable de la formation des ROS dans les MDSCs, et impliqués dans le blocage de leur différenciation (Cheng et al., 2008).

Ces 2 protéines semblent également être impliquées dans la migration des MDSCs au niveau du lit tumoral d'une façon NF-κB dépendante (Sinha et al., 2008). Le blocage de l'interaction entre S100A8/S100A9 et leurs récepteurs se traduit par une réduction du nombre de MDSCs dans le sang et les organes lymphoïdes d'animaux porteurs de tumeur (Sinha et al., 2008). Il permet en outre d'observer dans des modèles de cancer colique une importante réduction de l'inflammation chronique, et de la tumorogénèse (Turovskaya et al., 2008).

Plus récemment, le facteur de transcription CCAAT-enhancer-binding protein β (C/EBPβ) a été identifié comme impliqué dans la différenciation des précurseurs myéloides en MDSCs fonctionnelles (Marigo et al., 2010). L'accumulation de MDSCs dans la rate d'animaux porteurs de tumeur est ainsi abolie chez les animaux déficients en C/EBPβ, et les précurseurs myéloides issus de ces animaux ne peuvent acquérir in vitro des propriétés suppressives. Il est d'ailleurs possible que cette expansion des MDSCs médiée par C/EBPβ soit en partie sous le contrôle de STAT3, dans la mesure ou il était préalablement montré que dans les progéniteurs myeloides, l'induction de STAT3 en réponse au G-CSF s'accompagnait d'évènements biologiques en partie médiés par C/EBPβ (Zhang et al., 2010).

Différents ligands de TLRs semblent également impliqués dans l'expansion des MDSCs, et cette voie pourrait être en lien avec celle de l'IL-1β : les MDSCs de souris porteuses de tumeurs sécrétant de l'IL-1β produisent plus d'IL-10, et semble plus capables d'inhiber la sécrétion d'IL-12 par les macrophages du microenvironnement tumoral. Les expériences menées chez la souris déficiente en TLR4 semblent montrer que cet effet passe par la voie LPS-TLR4. Cependant, dans des modèles précliniques de choc septique induit par ligature du caecum chez la souris, des MDSCs s'accumulent dans la rate des animaux. Cette observation persiste chez les animaux TLR4 -/-, indiquant donc l'implication d'autres voies TLR, dans la mesure où les souris MyD88 -/- (une protéine adaptatrice d'aval de nombreux TLRs) voient l'abolition de l'expansion des MDSCs dans ce type de modèle (Delano et al., 2007). Ainsi, les TLR participent à l'expansion des MDSCs, et leur activation via TLR4 semble indispensable pour la polarisation Th2 de la réponse T via les MDSCs, favorisant ainsi la progression tumorale (Bunt et al., 2009). Par ailleurs, dans des modèles précliniques de souris transgéniques dont les cellules gastriques expriment l'IL-1β, l'apparition d'une gastrite, puis d'un cancer est corrélé au recrutement de MDSCs au sein de la muqueuse gastrique (Tu et al., 2008). In vitro et in vivo, l'IL-1β active les MDSCs via NF-κB, et l'antagonisation du récepteur à l'IL-1 bloque l'afflux de MDSCs et le developpement de la gastrite prénéoplasique (Tu et al., 2008).

2.2 Activation des MDSCs :

L'activité immunosuppressive des MDSCs ne nécessite pas exclusivement leur expansion, mais aussi leur activation. Un certain nombre de facteurs, dont la plupart sont produits par les cellules du stroma tumoral et/ou les lymphocytes T, comme l'INFγ, l'IL-4, l'IL-13, le TGF-β, mais aussi certaines fractions du complément, sont ainsi capables d'activer différentes voies

de signalisation dans les MDSCs, s'appuyant en général sur les facteurs de transcription STAT1, STAT6, et NF-κB.

STAT1, qui est le principal facteur de transcription mis en jeu au cours d'une signalisation médiée par l'INFγ, est impliqué dans l'up-régulation de l'arginase 1 et de la NOSi dans les MDSCs (2 voies impliquées dans leur activité immunorégulatrice). A cet égard, les MDSCs de souris STAT1 -/- sont incapables d'inhiber la réponse T (Kusmartsev et al., 2005).

Ainsi, le blocage de l'INFγ, normalement sécrétés par les T activés diminue voire aboli la suppression de la réponse T induite par les MDSCs (Kusmartsev & Gabrilovich, 2005; Movahedi et al., 2008).

L'activation de STAT6 dans les MDSCs survien en réponse à une stimulation par L'IL-4 ou l'IL-13 qui peuvent se lier à l'IL-4Rα (CD124), présent à la surface des MDSCs. La stimulation in vitro de MDSCs par de l'IL-4 induit à la fois via STAT6, l'expression de l'arginase 1 (Bronte et al., 2003a), mais semble en outre, comme pour l'IL-13, up-réguler l'activité enzymatique de l'arginase 1, majorant ainsi les fonctions suppressives des MDSCs (Rutschman et al., 2001). Cette production d'arginase 1 par les MDSCs peut être bloquée par l'inhibition de STAT6 (Sinha et al., 2005a). Il faut signaler par ailleurs que dans des modèles précliniques de sarcome, la voie IL-4Rα – STAT6 est également mise en jeu par l'IL-13 pour l'induction de la production de TGF-β par les MDSCs, contribuant ainsi à polariser une réponse immunitaire tolérogène (Terabe et al., 2003).

La fraction C5a du complément a des récepteurs sur les MDSCs. Il semble que cette molécule puisse augmenter la migration des MDSCs granulocytaires (et non celle des monocytaires) dans la tumeur, et les organes lymphoïdes. La fraction C5a est également capable d'augmenter la production des ROS dans les MDSCs, cette fois de phénotype monocytaire. Ces actions conjuguées résultent en une augmentation de l'activité suppressive sur les lymphocytes T (Markiewski et al., 2008).

3. Mécanismes immunosuppresseurs mis en jeu par les MDSCs :

Les MDSC ont une action immunosuppressive à la fois sur l'immunité innée et acquise requérant dans la plupart des modèles une proximité cellulaire avec la cellule du système immunitaire étudiée, suggérant que l'activité immunosuppressive passe essentiellement par des molécules membranaires, et/ou par la libération de facteurs solubles de demi-vie courte.

3.1 Action sur les acteurs cellulaires de l'immunité :

Plusieurs études chez des patients porteurs de cancer semblent montrer que les MDSCs bloquent la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TILs) (Almand et al., 2001) (Diaz-Montero et al., 2009). Des travaux ultérieurs chez la souris ont montré que in vitro, les MDSCs d'animaux porteurs de tumeurs étaient capables d'inhiber l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD8+ (Sinha et al., 2005b) (Bronte et al., 1998) (Bronte et al., 2000) (Gabrilovich et al., 2001) et CD4+ (Sinha et al., 2005b) (Mazzoni et al., 2002), lorsqu'elles sont mise en co-cultures avec leurs antigènes spécifiques. Cette action suppressive sur les T nécessite un contact inter cellulaire, et peut être observée dans un contexte de spécificité vis-à-vis de l'antigène (Nagaraj et al., 2007) ou non (Sinha et al., 2005b) (Sinha et al., 2005a).

In vitro, plusieurs études montrent que les MDSCs peuvent inhiber la réponse T de façon non spécifique de l'antigène (Kusmartsev et al., 2000) (Watanabe et al., 2008). Cependant, un contact intercellulaire étroit semble nécessaire pour les effets immunorégulateurs médiés par les ROS ou les peroxynitrites (effets exercés essentiellement par le sous type granulocytaire), et leurs effets sur les molécules de surface des T. Ce type d'effet est responsable d'une

inhibition de la réponse T spécifique de l'antigène, sans aboutir à la mort lymphocytaire, ni à l'abolition d'une activation non spécifique des T (Kusmartsev et al., 2000) (Stoll et al., 2002) (Miller et al., 2004). Les MDSCs ont en effet la capacité à capter, apprêter et présenter des antigènes tumoraux aux lymphocytes T (Movahedi et al., 2008) (Nagaraj et al., 2007), laissant penser à la possibilité d'une inhibition spécifique de l'antigène. D'ailleurs, le blocage de l'interaction T-MDSC par un anticorps anti CMH I aboli in vitro l'inhibition d'une réponse T CD8 spécifique de l'antigène (Gabrilovich et al., 2001). Une inhibition de la réponse T CD8+ spécifique de l'antigène a également été mise en évidence in vivo (Kusmartsev et al., 2005) (Willimsky et al., 2008). Il n'est en revanche pas certain que le même phénomène concerne les T CD4+, notamment dans la mesure où une très faible proportion de MDSCs expriment les molécules de classe II du CMH. Cette possibilité d'un effet immunorégulateur spécifique de l'antigène pourrait permettre d'expliquer en partie pourquoi les lymphocytes T de souris, ou de patients atteints de cancer évolué restent activables par des stimulis antigéniques autres que ceux provenant de la tumeur (Mirza et al., 2006) (Nagaraj et al., 2007) (Monu & Frey, 2007) (Fricke et al., 2007) (Antonia et al., 2006).

Il est difficile de savoir à partir de données expérimentales chez l'homme si les MDSCs médient une immunosuppression spécifique de l'antigène ou non, dans la mesure ou la plupart des travaux étudient leur action immunosuppressive par l'inhibition d'une stimulation CD3, non spécifique.

In vivo, divers traitements réduisant le nombre de MDSCs (Ac anti Gr1 (Terabe et al., 2003), gemcitabine (Suzuki et al., 2005) (Sinha et al., 2007a), l'acide rétinoïque (Mirza et al., 2006) (Kusmartsev et al., 2003), sont capables de restaurer une immunosurveillance (Terabe et al., 2003), d'activer les lymphocytes T (Pan et al., 2008), les cellules NK (Li et al., 2009), et d'augmenter l'efficacité d'une immunothérapie (Mirza et al., 2006) (Kusmartsev et al., 2003) (Suzuki et al., 2005) (Nefedova et al., 2005). De même, l'inactivation de gènes impliqués

dans l'expansion et/ou l'activation des MDSCs, comme STAT3 ou STAT6 (Sinha et al., 2005b) (Terabe et al., 2003) (Nefedova et al., 2005) (Kortylewski et al., 2005) se traduit également in vivo par une régression tumorale et une diminution du potentiel métastatique accompagnant une réactivation de la réponse T.

Les MDSCs pourraient également indirectement exercer une action immunorégulatrice par l'induction de lymphocytes T régulateurs (Tregs) (Yang et al., 2006) (Huang et al., 2006), via la production de cytokines et/ou par contact direct intercellulaire. Par exemple, via la production d'IL-10 et de TGF-β (Huang et al., 2006) ou pour d'autres MDSCs, de l'arginase, de façon indépendante du TGF-β (Serafini et al., 2008). Ainsi dans certains modèles, l'induction de Tregs par les MDSCs semble nécessiter la présence de lymphocytes T spécifiques de la tumeur, et la présence d'INFγ et d'IL-10, mais semble indépendante de la production de NO (Huang et al., 2006). Dans d'autres modèles, l'induction de Tregs semble faire intervenir l'arginase 1, associée à la présentation d'antigènes tumoraux par les MDSCs (Serafini et al., 2008). Un contact intercellulaire semble également nécessaire dans des modèles précliniques de cancer de l'ovaire, où les MDSCs sont capables d'induire des Tregs via l'expression membranaire de CTLA4 (Yang et al., 2006).

Les MDSCs sont également capables de modifier la réponse immunitaire anti tumorale, en polarisant la réponse T vers une réponse Th2 par leur sécrétion propre d'IL-10, et par la down regulation de la production d'IL-12 par les macrophages du microenvironnement tumoral. Cet effet peut être amplifié au sein d'une boucle par les macrophages, qui à leur tour augmentent la sécrétion d'IL-10 par les MDSCs (Sinha et al., 2007a).

L'action des MDSCs sur les cellules NK reste à l'heure actuelle controversée : plusieurs études montrent en effet que les MDSCs sont capables d'inhiber la cytotoxicité des NK, et leur sécrétion d'INF-γ (Suzuki et al., 2005) (Li et al., 2009) (Liu et al., 2007a) via un contact inter cellulaire direct et l'antagonisme du récepteur activateur des NK, NKG2D (Li et al.,

2009). A l'opposé, une autre étude montre que les MDSCs expriment Rae-1, un ligand de NKG2D, capable donc en théorie d'activer les NK (Nausch et al., 2008), reflétant encore une fois l'hétérogénéité, y compris fonctionnelle, au sein de l'entité MDSCs.

Il faut en outre signaler qu'il est possible que le comportement des MDSCs soit différent en périphérie et au sein de la tumeur. Les MDSCs sont capables de migrer au sein des tumeurs (Kusmartsev et al., 2004), où leur niveau d'expression d'arginase 1 et de NOSi augmente, et au sein desquelles elles peuvent se différencier en TAM plutot de phénotype M2 (Mantovani et al., 2002) (Muller & Prendergast, 2007), qui à leur tour produisent des cytokines capables de bloquer la réponse T de façon non spécifique de l'antigène (Mantovani et al., 2002) (Muller & Prendergast, 2007). Les niveaux d'expression d'arginase 1 et de NO des MDSCs tumorales sont beaucoup plus élevés que ceux des MDSCs périphériques chez les mêmes animaux.

3.2 Mécanismes moléculaires d'action sur les acteurs cellulaires de l'immunité :

Les MDSCs sont capables de limiter l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ par de multiples mécanismes, les principaux en rapport avec leur métabolisme intense de la L-arginine qui sert de substrat à 2 enzymes : la NOSi qui génère du NO et l'arginase 1 qui catabolise l'arginine en urée et en ornithine. Ces 2 voies métaboliques sont théoriquement mutuellement exclusives, mais peuvent dans les MDSCs être activées de façon contemporaine (Gallina et al., 2006). Les MDSCs incorporent l'arginine de leur environnement qui sert de substrat à ces 2 enzymes dont l'action est fondamentale pour leurs fonctions immunorégulatrices (Bronte & Zanovello, 2005) (Rodriguez & Ochoa, 2008). Ainsi, grâce à l'activité supraphysiologique de l'arginase 1, les MDSCs catabolisent et déplétent leur environnement en arginine, acide aminé essentiel à l'activation et la prolifération des

lymphocytes T (Kusmartsev et al., 2004) (Bronte et al., 2003b) (Bronte & Zanovello, 2005) (Ochoa et al., 2007) (Rodriguez et al., 2005), la bloquant ainsi via divers mécanismes incluant la diminution de l'expression de la chaine ζ du TCR (Rodriguez et al., 2002), la down regulation de l'expression de molécules impliquées dans la progression du cycle cellulaire comme la cycline D3 ou CDK4 (Rodriguez et al., 2007). La carence en arginine modifie également l'activité de la NOSi vers la synthèse de ROS comme l'anion superoxyde, qui peut rapidement se combiner au NO pour former des peroxynitrites, capables d'altérer les voies de signalisation et d'induire l'apoptose des lymphocytes T (Ochoa et al., 2007). De façon voisine, il a été récemment démontré que les MDSCs bloquent également l'activation des T en déplétant le microenvironnement tumoral en cystéine, autre aminoacide indispensable à l'activation des T, par un mécanisme de captation compétitive (vis-à-vis des DCs et des macrophages) de la cystine (précurseur de la cystéine) (Srivastava et al., 2010).

L'hyperexpression de la NOSi dans les MDSCs favorise la production de NO, impliqué dans l'inhibition lymphocytaire T notamment en bloquant la phosphorylation de JAK3 et STAT5 (Bingisser et al., 1998), l'inhibition de l'expression des molécules du CMH de classe II (Harari & Liao, 2004), et en favorisant l'apoptose lymphocytaire T (Rivoltini et al., 2002).

Les MDSCs génèrent également des ROS (Youn et al., 2008) (Kusmartsev et al., 2004) (Schmielau & Finn, 2001) (Kusmartsev et al., 2005) (Szuster-Ciesielska et al., 2004) (Waris & Ahsan, 2006) (Mantovani et al., 2003), dont la production semble fondamentale pour leur activité immunorégulatrice, dans la mesure où l'inhibition pharmacologique des ROS se traduit in vitro par l'abolition complète de l'action immunosuppressive des MDSCs (Kusmartsev et al., 2004) (Schmielau & Finn, 2001) (Szuster-Ciesielska et al., 2004). Cette production de ROS semble être sous la dépendance de multiples facteurs libérés par les tumeurs comme l'IL-3, l'IL-6, l'IL-10, le PDGFβ, le GM-CSF, le TGF-β (Sauer et al., 2001).

Plus récemment, la production d'oxydants tels les peroxynitrites par les MDSCs a été reliée à leur action immunorégulatrice. Dans plusieurs modèles précliniques, la présence de peroxynitrites, impliqués dans la nitration et la nitrosylation de certains acides aminés, est associée à la progression tumorale (Vickers et al., 1999) (Cobbs et al., 2003) (Bentz et al., 2000) (Ekmekcioglu et al., 2000) (Kinnula et al., 2004) (Nakamura et al., 2006). Il semble que la nitration de certaines protéines des lymphocytes T, notamment celle du TCR, empêchant ainsi leur interaction avec le complexe peptide- CMH (Nagaraj et al., 2007) en rapport avec la production de peroxynitrites par les MDSCs, soit impliquée dans leur inhibition dans un contexte de réponse immunitaire spécifique de l'antigène (Bronte et al., 2005) (Nagaraj et al., 2007) (Kusmartsev et al., 2005). L'inhibition de l'arginase 1 et de la NOSi est capable dans certains modèles de reverser ce phénomène (Bronte et al., 2005).

Il semble que les MDSCs granulocytaires exercent leur action essentiellement via la production de ROS (Youn et al., 2008) (Movahedi et al., 2008), alors que leurs homologues monocytaires utilisent plutôt le NO (Youn et al., 2008) (Movahedi et al., 2008), ces deux variétés exprimant des niveaux semblables d'arginase 1.

Certaines MDSCs semblent également capables de sécréter du TGF-β sous l'effet d'une stimulation par l'IL-13 (Terabe et al., 2003) (Fichtner-Feigl et al., 2008).

Les MDSCs sont également responsables de la down regulation de l'expression de la chaine ζ du TCR, sans laquelle la transmission des signaux d'activation en aval du TCR est impossible dans les CD4+ ou les CD8+ (Sinha et al., 2005a) (Baniyash, 2004) (Ezernitchi et al., 2006). Ce phénomène a pu être également observé chez des patients porteurs d'un cancer (Baniyash, 2004).

Plus récemment, il a également été montré que les MDSCs étaient capables de down réguler l'expression de la L-selectine (CD62L) sur les lymphocytes T, molécule essentielle au homing des CD4+ et CD8+ dans les ganglions lymphatiques pour y être activés par des antigènes, par exemple d'origine tumorale (Hanson et al., 2009).

Finalement l'activité suppressive des MDSCs apparaît pleiotropique, et les mécanismes moléculaires impliqués dans cette activité, hautement dépendant du contexte microenvironemental.

4. Moyens thérapeutiques pour cibler les MDSCs :

Il est devenu clair que le succès d'une approche thérapeutique du cancer incluant une immunothérapie ne se conçoit qu'en incluant l'élimination préalable des cellules immunorégulatrices, parmi lesquelles les MDSCs.

4.1 Favoriser la différenciation des cellules myéloïdes :

Les dérivés de la vitamine A, tels que l'acide rétinoïque, sont capables d'induire la différenciation de précurseurs myéloïdes en macrophages et en DCs (Gabrilovich et al., 2001) (Hengesbach & Hoag, 2004). Une expansion des MDSCs dans le sang et la rate peut être obtenue chez des animaux déficients en vitamine A (Kuwata et al., 2000) ou traités avec un antagoniste des récepteurs aux rétinoïdes (Walkley et al., 2002). A l'opposé, in vitro et in vivo, l'acide tout trans rétinoïque (ATRA) à des concentrations thérapeutiques est capable d'induire la différenciation de MDSCs (plus volontiers le contingent monocytaire, alors qu'il favorise plutôt l'apoptose des granulocytaires) en DCs et en macrophages (Almand et al., 2001) (Gabrilovich et al., 2001) (Kusmartsev et al., 2003). Il semble que ce processus de

différentiation passe par l'augmentation de synthèse du glutathion (via une augmentation de l'expression de la glutathion synthase), et la réduction de la production des ROS par les MDSCs (Nefedova et al., 2007), qui sont essentiels au maintient de l'immaturité des MDSCs. Du point de vue thérapeutique, le traitement d'animaux ou de patients porteurs de tumeur par ATRA réduit le nombre de MDSCs, et restaure une réponse T spécifique (Kusmartsev et al., 2003) (Mirza et al., 2006). La combinaison à une stratégie vaccinale antitumorale améliore et prolonge l'efficacité de l'immunothérapie dans plusieurs modèles précliniques (Kusmartsev et al., 2003).

4.2 Inhiber l'expansion des MDSC :

Quelques travaux se sont intéressés à l'inhibition des molécules jouant un rôle dans l'expansion des MDSCs. Ainsi, l'inhibition de l'interaction entre le SCF et son récepteur (KIT), se traduit par une diminution du nombre de MDSCs (Pan et al., 2008). Chez l'homme, le traitement par un anticorps monoclonal anti VEGF d'usage thérapeutique (bevacizumab) se traduit par la réduction d'une population de MDSCs CD11b+, VEGFR1+ (Kusmartsev et al., 2008), sans que l'effet sur la réponse T ait été étudié. Il faut toutefois signaler que l'inhibition du VEGF par une protéine de fusion (VEGF-trap) n'a pas d'effet ni sur le nombre de MDSCs, ni sur la réponse T dans un autre essai clinique (Fricke et al., 2007).

Toutefois, compte tenu du nombre important de molécules différentes capables d'expandre les MDSCs, il semble illusoire de vouloir contrecarrer ce phénomène en ne ciblant qu'une seule molécule. Pour cette raison, il pourrait être intéressant de cibler les molécules de convergences des voies d'expansion des MDSC tels que STAT3. Un certain nombre d'inhibiteurs pharmacologiques de STAT3 ont déjà été développés, sans avoir été testés jusqu'à maintenant chez l'homme. Le STA-21 et le S31-201 sont 2 inhibiteurs

pharmacologiques de STAT3 sélectionnés après un screening in silico, et dépourvus de toxicité sur des cellules non cancéreuses (Song et al., 2005a). Le JSI-124 est un inhibiteur des voies Jak2/STAT3, dont le mécanisme d'action exact n'est pas clairement connu, qui est capable de réduire significativement chez la souris le nombre de MDSCs (en induisant à la fois leur apoptose et leur différenciation), favorisant une meilleure réponse immunitaire antitumorale (Nefedova et al., 2005). Les modalités potentielles d'administration de ces molécules dans un cadre thérapeutique restent à définir dans la mesure où l'activation des voies STAT3 est nécessaire à l'hématopoïèse physiologique.

Quelques molécules à usage thérapeutiques chez l'homme ont déjà montré un potentiel intéressant sur l'accumulation des MDSCs : Chez des patients porteurs d'un cancer du rein, plusieurs études ont montré que le traitement par sunitinib, un inhibiteur pharmacologique de tyrosine kinase multicible, s'accompagne d'une réduction du nombre de MDSCs circulantes (Ko et al., 2009), notamment via l'inhibition de la voie STAT3 (Ko et al., 2009), se traduisant dans les MDSCs par une réduction de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogénèse (Kujawski et al., 2008).

De même, les biphosphonates, largement utilisés en cancérologie humaine, semblent capables dans des modèles précliniques de significativement réduire l'infiltration en cellules Gr1+ CD11b+ F4/80+ au sein du stroma tumoral, sans que le traitement au long court par pamidronate ou zolédronate ne soit toxique chez ces animaux (Melani et al., 2007).

4.3 Inhiber les fonctions suppressives des MDSC :

Bloquer les voies de signalisation aboutissant à la production des molécules impliquées dans les fonctions suppressives des MDSC permet également dans certains modèles la restauration d'une réponse antitumorale. L'inhibition pharmacologique par des antagonistes spécifiques de

l'arginase 1 ou de la NOSi se traduit effectivement dans plusieurs modèles par la restauration d'une réponse T antitumorale (Nagaraj et al., 2007) (Bronte et al., 2003b) (Bronte et al., 2005), sans que ces molécules puissent être utilisées chez l'homme du fait de leur toxicité potentielle. Plus facilement utilisable chez l'homme, un inhibiteur des phosphodiesterases de type 5 comme le sildenafil, est capable de diminuer l'expression de l'arginase 1 et de la NOSi. Un traitement par cette molécule s'est accompagné dans un travail récent de l'abolition des fonctions suppressives des MDSCs, associé à un ralentissement significatif de la croissance tumorale (Serafini et al., 2006). La restauration d'une prolifération lymphocytaire T a été constatée sur les PBMCs de patients porteurs d'un carcinome épidermoïde ORL ou d'un myélome et traités par le sildenafil (Serafini et al., 2006).

La nitroaspirine, initialement développée pour réduire la toxicité digestive de l'aspirine est un composé également capable d'effets immunomodulateurs expliquant en partie ses effets antitumoraux (De Santo et al., 2005). La nitroaspirine est à l'origine d'une forte inhibition de l'arginase 1 et de la NOSi dans les MDSCs, avec pour corollaire une importante diminution de la nitration des protéines présentes dans le microenvironnement tumoral, et de la production de peroxynitrites (De Santo et al., 2005).

Enfin, l'inhibition de la COX2, et donc de la production de PGE2, se traduit chez la souris par une down regulation de l'arginase 1 dans les MDSCs (Rodriguez et al., 2005) (Sinha et al., 2007b), par la restauration d'une réponse T et l'amélioration de l'efficacité thérapeutique d'une vaccination antitumorale (Zea et al., 2005) (Talmadge et al., 2007).

4.4 Eliminer les MDSC :

Certains agents de chimiothérapie semblent capables d'une action cytotoxique plus ou moins élective sur les MDSCs. C'est le cas de la gemcitabine, dont l'utilisation chez des souris

porteuses de tumeur se traduit par une diminution très importante du nombre de MDSCs (sans affecter dans les mêmes proportions le nombre de lymphocytes T et B) dans la rate des animaux traités, chez qui l'efficacité d'une immunothérapie est alors améliorée (Suzuki et al., 2005) (Ko et al., 2007).

Il faut signaler par contraste qu'un travail récent suggère une augmentation du nombre de MDSC chez des patientes ayant reçu une chimiothérapie par anthracyclines pour le traitement d'un cancer du sein (Diaz-Montero et al., 2009).

Très récemment, un travail mené chez l'animal montre que le Docétaxel, une molécule de chimiothérapie utilisé couramment chez l'homme dans le traitement des cancers du sein, du poumon ou de la prostate, est également capable d'exercer une cytotoxicité assez sélective sur les MDSCs, plus particulièrement sur les MDSCs de phénotype M2, et semble polariser les MDSCs infiltrants les tumeurs des animaux traités vers un phénotype de type M1, limitant ainsi les effets suppressifs des MDSCs sur les T CD8+ et CD4+ . Ces effets immunologiques du Docetaxel sur les MDSCs pourraient passer par une ihnibition de la voie STAT3. (Kodumudi et al., 2010).

Les MDSCs semblent donc constituer une population cellulaire de première importance dans le cancer par son implication dans l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire de l'hôte. Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de leur accumulation et de l'acquisition de leurs fonctions régulatrices semble absolument nécessaire afin de dégager de nouvelles voies thérapeutiques permettant de cibler ces cellules régulatrices.

Dans ce premier travail, nous avons cherché à mieux comprendre quels étaient les mécanismes moléculaires présidant d'une part à l'expansion des MDSCs, et d'autre part à l'acquisition de leurs fonctions suppressives en étudiant le rôle respectif au sein des tumeurs, des facteurs solubles libérés par les cellules tumorale, et des microvésicules d'origine cellulaire tumorale (exosomes).

5. Article # 1 :

« Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells »

Journal of Clinical Investigation. Février 2010.

Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells

Fanny Chalmin,[1,2,3] Sylvain Ladoire,[1,2,3,4] Grégoire Mignot,[1,2] Julie Vincent,[1,2,3] Mélanie Bruchard,[1,2,3] Jean-Paul Remy-Martin,[5] Wilfrid Boireau,[6] Alain Rouleau,[6] Benoit Simon,[6] David Lanneau,[1,3] Aurélie De Thonel,[1,3] Gabriele Multhoff,[7] Arlette Hamman,[1] François Martin,[1,2,3] Bruno Chauffert,[1,2,3,4] Eric Solary,[1,3] Laurence Zitvogel,[8] Carmen Garrido,[1,3] Bernhard Ryffel,[9] Christophe Borg,[5] Lionel Apetoh,[10] Cédric Rébé,[1,2,3,4] and François Ghiringhelli[1,2,3,4]

[1]INSERM U866, Dijon, France. [2]INSERM AVENIR Team, Dijon, France. [3]Faculty of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy, Dijon, France. [4]Anti-Cancer Centre Georges François Leclerc, Dijon, France. [5]INSERM U645, EFS Bourgogne-Franche Comté, University of Franche-Comté, Besançon, France. [6]FEMTO-ST Institute, University of Franche Comté, Besançon, France. [7]Department of Radiation Oncology, University Hospital, Klinikum rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany. [8]INSERM U805, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. [9]Laboratory of Molecular Immunology and Embryology, CNRS UMR6218, Orléans, France. [10]Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have been identified in humans and mice as a population of immature myeloid cells with the ability to suppress T cell activation. They accumulate in tumor-bearing mice and humans and have been shown to contribute to cancer development. Here, we have isolated tumor-derived exosomes (TDEs) from mouse cell lines and shown that an interaction between TDE-associated Hsp72 and MDSCs determines the suppressive activity of the MDSCs via activation of Stat3. In addition, tumor-derived soluble factors triggered MDSC expansion via activation of Erk. TDE-associated Hsp72 triggered Stat3 activation in MDSCs in a TLR2/MyD88-dependent manner through autocrine production of IL-6. Importantly, decreasing exosome production using dimethyl amiloride enhanced the in vivo antitumor efficacy of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide in 3 different mouse tumor models. We also demonstrated that this mechanism is relevant in cancer patients, as TDEs from a human tumor cell line activated human MDSCs and triggered their suppressive function in an Hsp72/TLR2-dependent manner. Further, MDSCs from cancer patients treated with amiloride, a drug used to treat high blood pressure that also inhibits exosome formation, exhibited reduced suppressor functions. Collectively, our findings show in both mice and humans that Hsp72 expressed at the surface of TDEs restrains tumor immune surveillance by promoting MDSC suppressive functions.

Introduction

Myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) have been identified in humans and mice as a population of immature myeloid cells with the ability to suppress T cell activation (1). In mice, MDSCs are uniformly characterized by the expression of the cell-surface antigens Ly-6C/G and CD11b (2), while in humans, MDSCs are typically $CD11b^+CD33^+HLA\text{-}DR^-$ (3–6). In tumor-bearing mice, these cells have been shown to markedly expand systemically when mice are inoculated with transplantable tumor cells or when tumors spontaneously develop in transgenic mice with tissue-restricted oncogene expression (7). In addition, an increased MDSC frequency was detected in the blood of patients with different types of cancers (4, 8–10). In mice and humans, MDSCs from tumor bearers induce antigen-specific MHC class I–restricted tolerance of $CD8^+$ T cells (11) and are one of the major suppressors of antitumor immunity. Given that MDSCs from naive mice were generally found to lack immunosuppressive properties, it has been proposed that MDSCs require activation signals from tumor cells to support their suppressive function on T cells (12).

Recent evidence suggests that the transcriptional factor Stat3 is constitutively activated in many mouse and human cancer cells. Activated Stat3 is not only involved in tumor cell survival but has also been proposed to be the main regulator of MDSC expansion (13–15). Indeed, tumor cells that constitutively express tyrosine 705–phosphorylated Stat3 (tyrosine 705–pStat3) were shown to release tumor-derived factors that induce MDSC accumulation (13, 16–19). However, these observations were challenged by the report of Kortylewski et al., in which the specific deletion of Stat3 in hematopoietic cells enhanced the presence of MDSCs in the tumor bed (20). Therefore, the exact role for Stat3 within MDSCs remains elusive.

Tumor-induced activation and expansion of MDSCs can be mediated by the release of soluble factors but also by microvesicles known as exosomes (21, 22). These microvesicles are endo-

Authorship note: Fanny Chalmin, Sylvain Ladoire, and Grégoire Mignot contributed equally to this work.

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists.

Citation for this article: *J Clin Invest.* 2010;120(2):457–471. doi:10.1172/JCI40483.

some-derived organelles of 50 to 150 nm in size, which are actively secreted through an exocytosis pathway used in cells under normal as well as pathologic conditions for receptor discharge and intercellular crosstalk (23). While tumor-derived exosomes (TDEs) were initially described to be immunostimulatory, recent reports have shown that they could induce MDSC expansion (24) or inhibit T cell function or dendritic cell differentiation (25).

While several groups have studied the role of tumor-derived factors accounting for MDSC expansion, the mechanisms dictating their immunosuppressive activity in vivo have not been fully addressed. Given the key importance of Stat3 in mediating immunosuppression, we assumed that Stat3, rather than mediating MDSC expansion, is actually responsible for the promotion of MDSC suppressive properties.

In this study, we report, using 3 different tumor cell lines, that TDEs triggered Stat3 activation and MDSC suppressive activity without inducing their expansion. In sharp contrast, while tumor soluble factors devoid of exosomes were indeed able to induce MDSC expansion, they did not trigger Stat3 activation and MDSC immunosuppressive functions. Mechanistically, we show in both mice and humans that Hsp72 expressed on exosome surface triggers Stat3 activation in MDSCs in a TLR2/MyD88-dependent manner through an autocrine production of IL-6. Targeting exosome production in vivo using dimethyl amiloride blunts the suppressive activity of MDSCs and enhances the efficacy of cyclophosphamide treatment in 3 different mouse tumor models. Dampening exosome production also diminishes immunosuppression in cancer patients. Altogether, our findings indicate that the immunosuppressive effect of tumor cells involves their capability of inducing functional MDSCs by releasing Hsp72-expressing exosomes.

Results

Tumor exosome release promotes Stat3 activation in MDSCs. We determined whether the activation of MDSC suppressive functions was mediated by tumor-derived soluble factors (TDSFs) or TDEs, both contained in the tumor cell supernatant (TCS) in 3 mouse tumor cell lines (EL4 thymoma, TS/A mammary carcinoma, and CT26 colon carcinoma), that release equivalent exosome quantities in culture medium (Supplemental Figure 1; supplemental material available online with this article; doi:10.1172/JCI40483DS1).

Importantly, we noted a complete dissociation between TDSF and TDE properties. TDSFs induce MDSC expansion through proliferation of myeloid precursors (Figure 1, A and B), while TDEs drive Stat3 phosphorylation (Figure 1C).

Stat3 activation by TDEs and not by TDSFs was also observed when using MDSCs purified from naive mice (Supplemental Figure 2). Moreover, TDEs could trigger Stat3 phosphorylation in a dose-dependent manner in purified MDSCs isolated from the spleen of naive mice (Figure 1D).

In order to better characterize the discrepant effects of TDEs and TDSFs in the biology of MDSCs, we then investigated the transduction signaling pathways activated by TDEs and TDSFs within MDSCs. In line with our previous results, stimulation of MDSCs with TDSFs induced an activation of Erk without an activation of Stat3 while TDEs only activated Stat3 (Figure 1E). Interestingly, we found that TDSFs contained some GM-CSF (Figure 1F) and that the addition of anti–GM-CSF blunted the effect of TDSFs on Erk activation (Figure 1G) and MDSC expansion (Supplemental Figure 3). We also studied NF-κB activation and found that TDEs induced a short but strong p65 activation while TDSFs induced a prolonged but modest p65 activation (Supplemental Figure 4).

Altogether, we demonstrated that TCS triggers 2 distinct molecular pathways in MDSCs. TDSFs trigger the activation of Erk, which results in the expansion of MDSCs, while TDEs trigger the activation of Stat3 without promoting MDSC expansion.

TDE-induced Stat3 activation determines MDSC suppressive functions. Since our results suggested that Stat3 was not involved in MDSC expansion, we sought to determine whether Stat3 was involved in MDSC immunosuppressive functions. First, we showed that only MDSCs from tumor-bearing mice harbored pStat3 (Figure 2A), with a higher level in monocytic ones (Supplemental Figure 5). MDSCs from tumor-bearing mice also exerted a significant immunosuppressive effect, while MDSCs from naive mice did not express Stat3 and did not have significant immunosuppressive functions (Figure 2B). In addition, Stat3 inhibition using selective inhibitors or siRNA blunted MDSC immunosuppressive effect in vitro (Figure 2C). Also, in vivo adoptive transfer of MDSCs from tumor-bearing mice could annihilate the effect of a tumor vaccine on the occurrence of lung metastases in a pStat3-dependent manner (Figure 2D). Importantly, the MDSC adoptive transfer had no effect on lung metastasis growth in unvaccinated mice or nude mice, thus confirming that this effect is dependent on T cells.

Finally, only MDSCs incubated in the presence of TDEs — but not those incubated in the presence of TDSFs — exerted suppressive functions on antigen-stimulated OT-1 T lymphocytes in vitro (Figure 2E) or were able to blunt IFN-γ production of tumor-specific CD8 and CD4 lymphocytes in the spleen of tumor-bearing mice in vivo (Figure 2F).

Altogether, these data demonstrate that TDEs through their capacity to activate Stat3 could mediate T cell–dependent immunosuppressive functions of MDSCs.

TDEs trigger pStat3 expression in MDSCs through production of IL-6. We then sought to determine the mechanisms triggering Stat3 activation. In TCS, we could not detect any presence of classical Stat3-activating factors such as SCF, PGE2, IL-10, and IL-6 (Supplemental Figure 6A). We could not detect significant levels of PGE2 in either TCSs or TDEs (Supplemental Figure 6B). We observed that incubation of purified MDSCs from the spleen of naive mice with TDEs — but not with TDSFs — induced the production of IL-6, a known Stat3 activator (26) (Figure 3A). Interestingly, besides IL-6, none of the already described Stat3-activating cytokines was detected (Supplemental Figure 7). To assess the role of IL-6 on Stat3 activation, we demonstrated that culture of MDSCs from naive mice with either recombinant IL-6 (rIL-6) or TDEs induced Stat3 phosphorylation (Figure 3B). The addition of blocking anti–IL-6 Ab to TDEs in MDSC culture completely blocked Stat3 phosphorylation, thus suggesting that IL-6 acts in an autocrine manner. To assess the in vivo relevance of this observation, we treated naive mice with 1 i.v. injection of either PBS, rIL-6, or TDEs. We observed that rIL-6 or TDEs induced similar levels of pStat3 in splenic MDSCs compared with the PBS control. In tumor-bearing mice, splenic MDSCs also harbored pStat3 and a single injection of IL-6 siRNA abolished this phosphorylation, thus demonstrating IL-6 dependence of pStat3 induction in MDSCs (Figure 3C).

In order to decrease the level of TDE release in tumor-bearing mice and its effect on IL-6–induced Stat3 activation, we used dimethyl amiloride (27), an inhibitor of the H^+/Na^+ and Na^+/Ca^{2+}

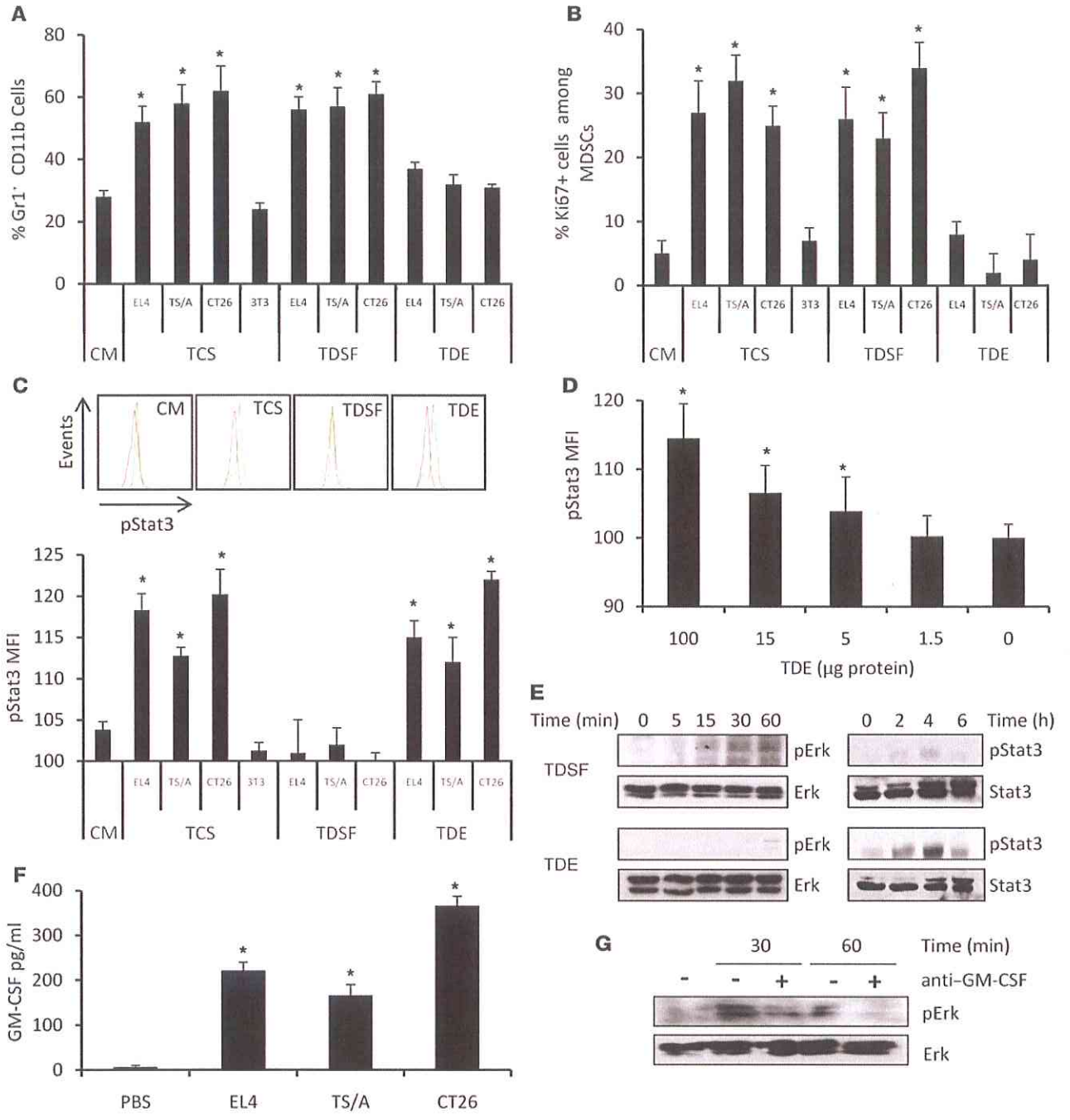


Figure 1

TDEs determine STAT3 activation, while TDSFs determine MDSC expansion. Bone marrow from naive mice was cultured 3 days in complete medium (CM) alone or with TCSs, TDEs, or TDSFs. (**A**) The percentage of Gr1$^+$CD11b$^+$ precursor cells ± SD was determined by flow cytometry. (**B**) The percentage of Ki67$^+$ cells ± SD in Gr1$^+$CD11b$^+$ cells was determined by flow cytometry. (**C**) pStat3 MFI in Gr1$^+$CD11b$^+$ cells was determined by flow cytometry. Data represent MFI ± SD ($n = 3$); inset shows representative FACS histogram. (**D**) Purified splenic MDSCs from naive mice were treated with increasing dosages of TDEs. pStat3 expression was determined by FACS analysis. Data represent MFI ± SD ($n = 3$). (**E**) Activation of Stat3 and Erk in MDSC clones stimulated by TDEs or TDSFs was determined by Western blotting. (**F**) GM-CSF production by tumor cells was determined by ELISA. (**G**) Activation of Erk by TDSFs plus anti–GM-CSF blocking Ab was assessed by Western blotting. *$P < 0.05$.

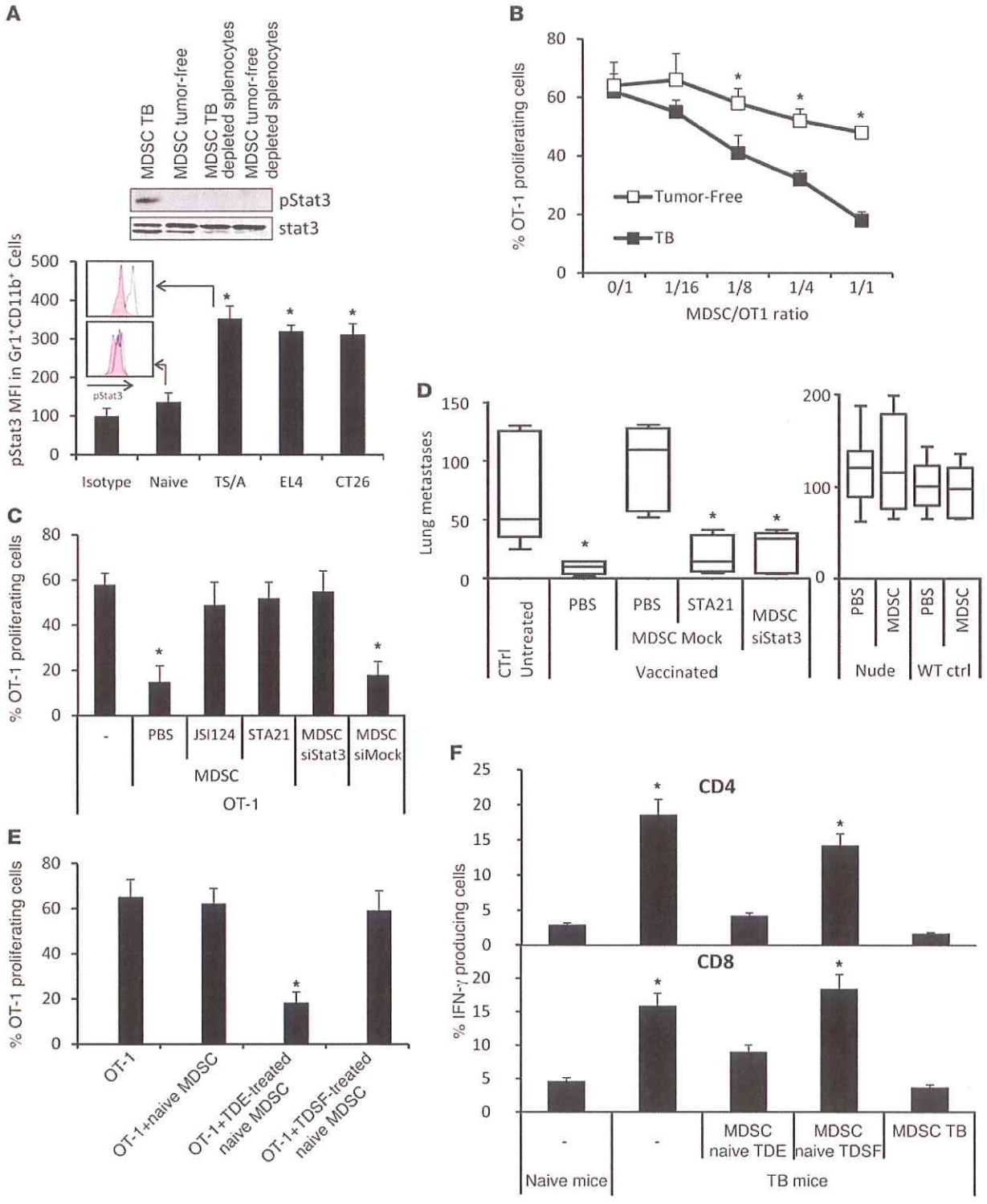

A
MDSC TB
MDSC tumor-free
MDSC TB depleted splenocytes
MDSC tumor-free depleted splenocytes
pStat3
stat3
pStat3 MFI in Gr1+CD11b+ Cells
Isotype
Naive
TS/A
EL4
CT26
B
% OT-1 proliferating cells
Tumor-Free
TB
MDSC/OT1 ratio
C
% OT-1 proliferating cells
PBS
JSI124
STA21
MDSC siStat3
MDSC siMock
MDSC
OT-1
D
Lung metastases
CTrl Untreated
PBS
PBS
STA21
MDSC siStat3
MDSC Mock
Vaccinated
PBS
MDSC
PBS
MDSC
Nude
WT ctrl
E
% OT-1 proliferating cells
OT-1
OT-1+naive MDSC
OT-1+TDE-treated naive MDSC
OT-1+TDSF-treated naive MDSC
F
% IFN-γ producing cells
CD4
CD8
Naive mice
TB mice
MDSC naive TDE
MDSC naive TDSF
MDSC TB

Figure 2
TDE-induced Stat3 activation determines MDSC suppressive functions. (**A**) Expression of pStat3 in MDSCs from naive and tumor-bearing mice (TB) was determined by Western blotting (upper panel) and FACS (lower panel). (**B**) CFSE-labeled OT-1 cells loaded with SIINFEKL and cultured alone or with MDSCs isolated from TB or naive mice at different MDSC/OT-1 ratios. Percentage of OT-1 proliferating cells was determined by flow cytometry ($n = 3$). (**C**) Peptide-loaded, CFSE-labeled OT-1 cells were cultured alone or with MDSCs isolated from TB mice treated with PBS, JSI124, STA21, or Stat3 siRNA. CFSE dilution was determined by flow cytometry ($n = 3$). (**D**) Nude or WT mice were vaccinated or not with frozen/thawed CT26 cells 1 week before i.v. injection of CT26 cells admixed or not with MDSCs isolated from TB and previously treated with STA21 or Stat3 siRNA. 2 weeks later, lung metastasis numbers were evaluated ($n = 5$ mice per group). For box and whisker plots, bottoms and tops of boxes show the 25th and 75th percentiles, respectively, and middle bands show the median; whiskers show extrema. (**E**) Peptide-loaded, CFSE-labeled OT-1 cells were cultured alone or with bone marrow–derived MDSCs of naive mice previously treated alone or with tumor cell whole supernatant or TDE or TDSF fractions. CFSE dilution was determined by flow cytometry ($n = 3$ mice per group). (**F**) TB mice were injected or not with MDSCs. These MDSCs were either from TB or naive mice and stimulated with PBS, TDEs, or TDSFs. 2 days later, spleen cells were harvested and restimulated in vitro with $CD3mAb^+$ dead tumor cells, then stained for intracellular CD4 and IFN-γ (upper panel) or CD8 IFN-γ (lower panel). $^*P < 0.05$. Error bars represent mean + SD.

channels, or omeprazole, a K^+/H^+ ATPase inhibitor. Both have been previously involved in exosome release (28, 29). In vitro exposure of tumor cells to dimethyl amiloride (DMA) or omeprazole and in vivo treatment of tumor-bearing mice with DMA or omeprazole reduced exosome release in culture medium and blood serum, respectively (Figure 3D). In vivo, while TDE injection induces IL-6 in sera of naive mice, DMA or omeprazole treatment decreased IL-6 serum levels in tumor-bearing mice (Figure 3E). Moreover, DMA or omeprazole treatment abolished pStat3 in MDSCs of tumor-bearing mice, as IL-6 siRNA injection did (Figure 3F). Finally, treatment of tumor-bearing mice with DMA abrogated the immunosuppressive effect of adoptively transferred MDSCs on the antitumor activity of a tumor vaccine (Figure 3G).

Altogether, these results indicate that TDEs trigger an IL-6–dependent acquisition of pStat3 on MDSC. DMA or omeprazole, by reducing exosome production, could abrogate in vivo Stat3 phosphorylation in MDSCs and their suppressor activity.

IL-6–induced pStat3 expression in MDSCs is TLR2-MyD88 dependent. Extracellular microbial components are recognized by TLRs that stimulate inflammation, but some mammalian cellular components can also stimulate TLRs (30), raising the possibility that these receptors have a role in response to danger signals released from tumor cells (31). TLRs are also the main inducers of IL-6 in myeloid cells (32). We thus explored the putative involvement of TLR family members in sensing TDEs. Splenic MDSCs from naive WT mice and mice deficient in TLR2, TLR4, or their adaptor proteins, MyD88 and TIR domain–containing adaptor-inducing interferon β (Trif), were examined for IL-6 production after stimulation with TDEs. TDE-induced IL-6 was fully dependent on TLR2 and MyD88 but not on TLR4 or Trif (Figure 4A). Similarly, Stat3 phosphorylation induced by TDEs was also fully dependent on TLR2 and MyD88 (Figure 4B). These observations were not biased by a different intrinsic capacity of transgenic mice to produce IL-6 or to activate Stat3 (Supplemental Figure 8). During EL4 tumor growth, $Gr\text{-}1^+CD11b^+$ cells accumulated at comparable levels in the spleen of WT and TLR signaling–deficient mice (Figure 4C). In contrast, pStat3 expression was fully dependent on TLR2 and MyD88 (Figure 4C). Moreover, MDSCs from tumor-bearing TLR2-deficient mice exhibited a drastically lower capacity to inhibit antigen-specific OT-1 proliferation than MDSCs from WT tumor-bearing mice (Figure 4D). Interestingly, EL4 growth was slightly but significantly decreased in TLR2-deficient mice (Figure 4E).

Altogether, these results demonstrate that in vitro and in vivo TDEs induce IL-6 production by MDSCs through activation of TLR2 and its adaptor MyD88, leading to Stat3 phosphorylation and the promotion of MDSC immunosuppressive functions.

Stat3 activation in MDSCs is dependent on Hsp72 expressed at the surface of TDEs. To identify the factor present on TDEs that could induce Stat3 phosphorylation and MDSC activation, we first screened the expression of known endogenous TLR2 ligands in TDEs, TDSFs, and whole-tumor cells by immunoblotting (32–38). TDSFs did not express any TLR2 ligands. TDEs from the 3 cell lines expressed Hsp72 and Hsc73 but did not express other known endogenous TLR2 ligands (Figure 5A). To eliminate the potential role of other microparticles copurified with exosomes, we checked to determine that Hsp72 was only present in exosomal fractions, and not in other microparticles (Supplemental Figure 9). Using TDE-coated beads, we showed that Hsp72, but not Hsc73, was detected on TDE cell surface, while it was not expressed on the surface of 3T3 exosomes (Figure 5B). This was confirmed by electronic microscopy with immunogold labeling (not shown). A physical interaction between TLR2 and Hsp72 was studied by surface plasmon resonance (Figure 5C) and involved hydrophobic interactions. In vitro, rHsp72 added to MDSC culture could trigger pStat3 expression and IL-6 production when MDSCs were obtained from WT mice but not from TLR2-deficient mice (Figure 5D and Supplemental Figure 10). Importantly, no production of TNF-α could be detected. At a molecular level, exposure of MDSCs to rHsp72 induced Stat3 phosphorylation and Stat3 and p65 transcriptional activity without activation of Erk (Supplemental Figure 11). IL-6–blocking Ab blunted rHsp72-dependent Stat3 phosphorylation, thus demonstrating that rHsp72 can trigger the TLR2-dependent IL-6/pStat3 pathway in MDSCs (Figure 5D). To eliminate the involvement of a potential contamination with endotoxins, we demonstrated that boiled Hsp72 could not induce IL-6 secretion and Stat3 phosphorylation in MDSCs; furthermore, we routinely tested for the absence of mycoplasms (Figure 5D and data not shown). Moreover, rHsp72 effect on pStat3 induction could be abrogated by adding an anti-Hsp72 Ab, while this treatment remained inefficient when pStat3 was induced by a bacterial TLR2 ligand (PAM3CSK4) (Figure 5D).

To confirm the specific role of Hsp72 in TDEs, we stably transfected CT26 cells with Hsp72 shRNA. Two clones (called H96 and H97) with a reduced Hsp72 expression in cells and TDEs were selected (Supplemental Figure 12). Exosomes from mock-transfected CT26 cells induced Stat3 phosphorylation and IL-6 production in a TLR2-dependent manner, and this effect could be blunted by addition of a blocking anti–IL-6 Ab or an anti-Hsp72 Ab (Figure 6A and data not shown). In contrast, TDEs obtained from H96 and H97 clones had a reduced capacity to trigger pStat3 and IL-6 production in MDSCs compared with TDEs from mock CT26.

In vivo, a single i.v. injection of TDEs from mock-transfected CT26 cells but not from H96 or H97 cells induced pStat3 expression in splenic MDSCs (Figure 6B). In a tumor setting, 15 days

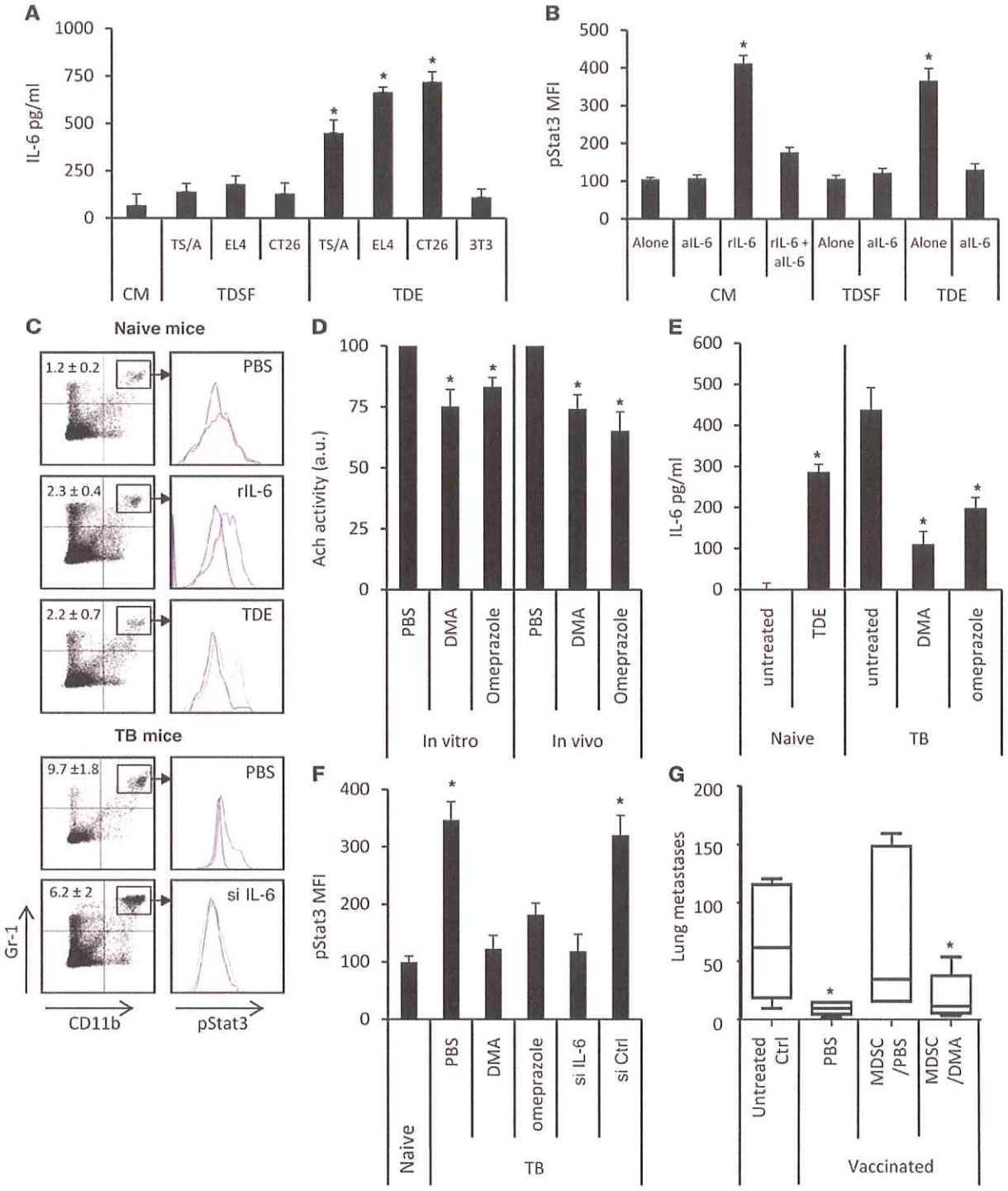

A
IL-6 pg/ml
1000
750
500
250
0
TS/A
EL4
CT26
TS/A
EL4
CT26
3T3
CM
TDSF
TDE
B
pStat3 MFI
500
400
300
200
100
0
Alone
aIL-6
rIL-6
rIL-6 + aIL-6
Alone
aIL-6
Alone
aIL-6
CM
TDSF
TDE
C
Naive mice
1.2 ± 0.2
PBS
2.3 ± 0.4
rIL-6
2.2 ± 0.7
TDE
TB mice
9.7 ±1.8
PBS
6.2 ± 2
si IL-6
Gr-1
CD11b
pStat3
D
Ach activity (a.u.)
100
75
50
25
0
PBS
DMA
Omeprazole
PBS
DMA
Omeprazole
In vitro
In vivo
E
IL-6 pg/ml
600
500
400
300
200
100
0
untreated
TDE
untreated
DMA
omeprazole
Naive
TB
F
pStat3 MFI
400
300
200
100
0
Naive
PBS
DMA
omeprazole
si IL-6
si Ctrl
TB
G
Lung metastases
200
150
100
50
0
Untreated
Ctrl
PBS
MDSC /PBS
MDSC /DMA
Vaccinated

Figure 3
TDEs trigger pStat3 expression in MDSCs through autocrine production of IL-6. MDSCs from naive mice were treated with PBS or with TDSFs or TDEs. (**A**) IL-6 concentration in the supernatant was determined by ELISA. (**B**) In some wells, rIL-6 or blocking anti–IL-6 mAb (aIL-6) were added. Data represent pStat3 MFI ± SD. (**C**) Naive mice were i.v. injected with PBS, EL4 TDEs, or rIL-6. EL4 TB mice were i.v. injected with PBS or IL-6 siRNA. 24 hours later, spleens were harvested. MDSC percentage (denoted) and pStat3 expression were determined by FACS on gated MDSCs. (**D**) EL4 cells were cultured in vitro for 24 hours and treated with PBS, DMA, or omeprazole. In vivo EL4 TB mice were injected daily with DMA for 1 week. Acetylcholine esterase activity was assayed in supernatant or sera. (**E**) IL-6 concentration in sera was determined by ELISA in naive mice, which received a single injection of PBS or EL4 TDEs (left), or in EL4 TB mice, which received 1 daily injection of PBS, DMA, or omeprazole for 1 week (right). (**F**) EL4 TB mice were injected with PBS alone or DMA, omeprazole, or IL-6 siRNA (si). Spleens were harvested 24 hours later, and pStat3 expression was determined by FACS. Data are shown as MFI ± SD. (**G**) Mice ($n = 5$) were vaccinated with frozen/thawed CT26 cells 1 week before i.v. injection of live CT26 admixed or not with MDSCs isolated from PBS- or DMA-treated CT26 TB mice. Twelve days later, lung metastasis number was evaluated. Each experiment was done in triplicate. For box and whisker plots, bottoms and tops of boxes show the 25th and 75th percentiles, respectively, and middle bands show the median; whiskers show extrema. $^*P < 0.05$.

after s.c. inoculation of mock-transfected CT26 or clones H96 or H97 transfected with Hsp72 shRNA, FACS analysis demonstrated that Hsp72 shRNA CT26 tumor-bearing mice harbored a drastically lower level of pStat3 in splenic MDSCs, compared with MDSCs from mice bearing mock-transfected tumors (Figure 6C). Accordingly, adoptive transfer of MDSCs isolated from Hsp72 shRNA CT26 tumor-bearing mice have no significant immunosuppressive effect and could not abrogate the antitumor efficacy of a tumor vaccine in contrast to MDSCs from mock-transfected CT26 tumor-bearing mice (Figure 6D). To rule out a potential direct effect of IL-6 produced by MDSCs on tumor cells, we showed that the transfection of tumor cells with siRNA gp130 (the IL-6R) did not inhibit the effect of MDSC adoptive transfer (not shown).

In conclusion, the immunosuppressive effects of MDSCs from tumor-bearing mice are induced by Hsp72 expressed at the surface of TDEs that triggers TLR2 signaling in MDSCs. This event induced an IL-6–dependent Stat3 phosphorylation within MDSCs and thus their immunosuppressive activity.

Exosome depletion by DMA restores the efficacy of cyclophosphamide by inhibiting MDSC functions. Given that TDEs are responsible for MDSC immunosuppressive function, we tested to determine whether DMA could restore the efficacy of cancer therapies by inducing exosome depletion. We previously demonstrated that the antitumor activity of low doses of the alkylating agent cyclophosphamide was related to its capability of inducing a T cell–dependent immune response through elimination of regulatory T cells rather than to its cytotoxic effect on tumor cells (39, 40). Cyclophosphamide reduces tumor growth and prolongs the survival of tumor-bearing immunocompetent WT mice, yet is ineffective in athymic nude mice (Supplemental Figure 13). In our 3 tumor models, DMA alone had little or no effect, while the association of DMA with cyclophosphamide demonstrated a synergistic effect and drastically reduced tumor growth compared with cyclophosphamide alone (Figure 7A). A comparable synergic effect was observed with combination of DMA and another immunotherapy, intratumoral CpG injection (Figure 7B). Combined therapy (cyclophosphamide plus DMA) was ineffective in nude mice, underlining the critical role of T cells for the efficacy of the combined treatment (Figure 7C).

To determine whether the antitumor effect of DMA was dependent on blocking the immunosuppressive function of MDSCs, we performed adoptive transfer of MDSCs from tumor-bearing mice after cyclophosphamide injection. Interestingly, transfer of MDSCs from tumor bearers completely abrogated the antitumor effect of DMA in the CT26 model (Figure 7D). In contrast, adoptive transfer of MDSCs from naive mice had no effect on tumor growth (not shown). Finally, to determine the role of tumor-derived Hsp72 in the therapeutic effect of DMA cyclophosphamide combination, we injected naive mice with mock-transfected or Hsp72 shRNA–transfected (clone H96 or H97) CT26 cells. As expected, we observed that, in mice bearing H96 or H97 tumors, cyclophosphamide alone had the same efficacy as cyclophosphamide plus DMA, demonstrating that the efficacy of DMA was strictly dependent on tumor Hsp72 expression by TDEs (Figure 7E).

Altogether, these data demonstrate that exosome depletion using DMA enhances the antitumor efficacy of cyclophosphamide. This synergic effect of DMA plus cyclophosphamide is dependent on T cells, MDSCs, and Hsp72.

Human TDEs dictate Stat3 activation in MDSCs through TLR2 and Hsp72. Human MDSCs were phenotypically determined by the expression of the common myeloid marker CD33 and MHC class II (3–6). We observed as previously reported (4, 8–10, 41) a significant increase in the frequency of MDSCs in the blood of metastatic cancer patients compared with healthy volunteers (Figure 8A). Consistent with the murine data, MDSCs from metastatic cancer patients exerted higher immunosuppressive function on T cells compared with MDSCs from healthy volunteers (Figure 8B).

In vitro, PBMCs from healthy volunteers were cultured 24 hours alone or in the presence of TDEs obtained from the H23 cell line, a lung adenocarcinoma that produced Hsp72-expressing TDEs (Supplemental Figure 14). H23 TDEs induced pStat3 expression in MDSCs, and this effect was abolished by inhibition of TLR2 and Hsp72 (Figure 8C). Treatment of PBMCs from healthy volunteers by H23 exosomes strongly inhibited T cell proliferation after nonspecific T cell triggering, and this immunosuppressive effect was significantly reduced after blockade of Hsp72 or TLR2 (Figure 8D).

DMA is not used in human therapy, but its analog amiloride, which exerts the same effect on exosome secretion (not shown), is currently used for treatment of edema or high blood pressure. In a series of 11 patients with colorectal metastatic cancer in whom amiloride was indicated for the treatment of high blood pressure, we obtained blood samples before and 3 weeks after the beginning of amiloride treatment and observed that amiloride reduced autologous serum capacity to induce phosphorylation of Stat3 in MDSCs (Figure 8E) and blunted MDSC suppressor functions (Figure 8F).

Altogether, these data demonstrated that human TDEs could activate human MDSCs and trigger their suppressive function in an Hsp72/TLR2-dependent manner. Moreover, blocking exosome formation in cancer patients with amiloride could possibly lead to the restoration of T cell functions.

Discussion

Our results identify a new mechanism that leads to an enhancement of tumor-associated MDSC immunosuppressive functions. First, we demonstrated that 2 distinct molecular pathways

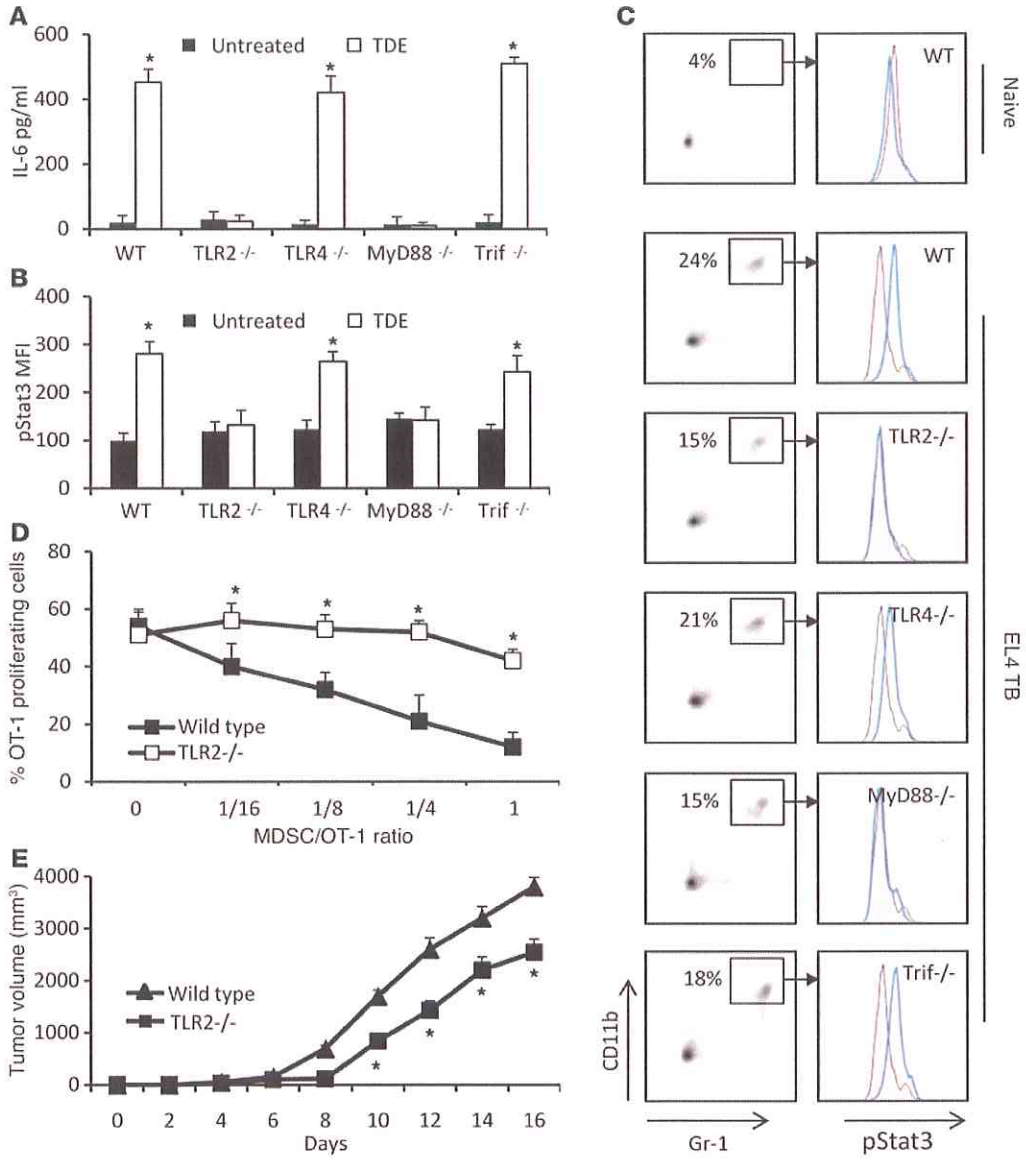


Figure 4

IL-6–induced pStat3 expression in MDSCs is dependent on the TLR2/MyD88 pathway. Purified MDSCs from WT or TLR2-, TLR4-, MyD88-, and Trif-deficient C57BL/6 tumor-free mice were cultured for 24 hours in complete medium supplemented or not with TDEs. IL-6 concentration in the supernatant was determined by ELISA (**A**), and pStat3 expression in cells was determined by FACS analysis (**B**). Data represent mean ± SD. (**C**) WT C57BL/6 mice or TLR2-, TLR4-, MyD88-, and Trif-deficient mice were s.c. injected with 1×10^6 EL4 cells. 3 weeks later, spleen cells were harvested, MDSC percentage was determined in spleen (denoted in left panels), and pStat3 expression was determined by FACS analysis on MDSC gated cells (right panel). (**D**) 2×10^5 OT-1 cells were labeled with CFSE, loaded with 10 μg/ml of SIINFEKL, and cultured 3 days alone or with different ratios of MDSCs from EL4 tumor-bearing WT mice or from EL4 tumor-bearing TLR2-deficient mice. Percentage of OT-1 proliferating cells was determined by flow cytometry. Each experiment was done in duplicate ($n = 3$ mice per group). (**E**) WT or *TLR2*$^{-/-}$ mice were injected s.c. with EL4 cells, and tumor growth was monitored. *$P < 0.05$.

account for MDSC expansion and activation. We then unraveled for what we believe is the first time that Stat3, rather than mediating MDSC expansion, actually promotes their immunosuppressive functions. At the molecular level, Hsp72 on TDEs, which binds to TLR2 on MDSCs, is the ligand that is responsible for their activation and the enhancement of their suppressive ability. Additionally, we showed that amiloride was able to interfere with our proposed mechanism leading to MDSC activation, thus restoring the efficacy of immunotherapy. We showed that our proposed mechanism leading to MDSC activation was also relevant in humans.

The literature clearly demonstrated that factors released by tumor cells could trigger Stat3 activation and expansion of MDSCs. Most reports suggested without clear demonstration that expansion of MDSCs may be due to Stat3 activation by tumor-derived factors. However, Kortylewski et al. (20) challenged this

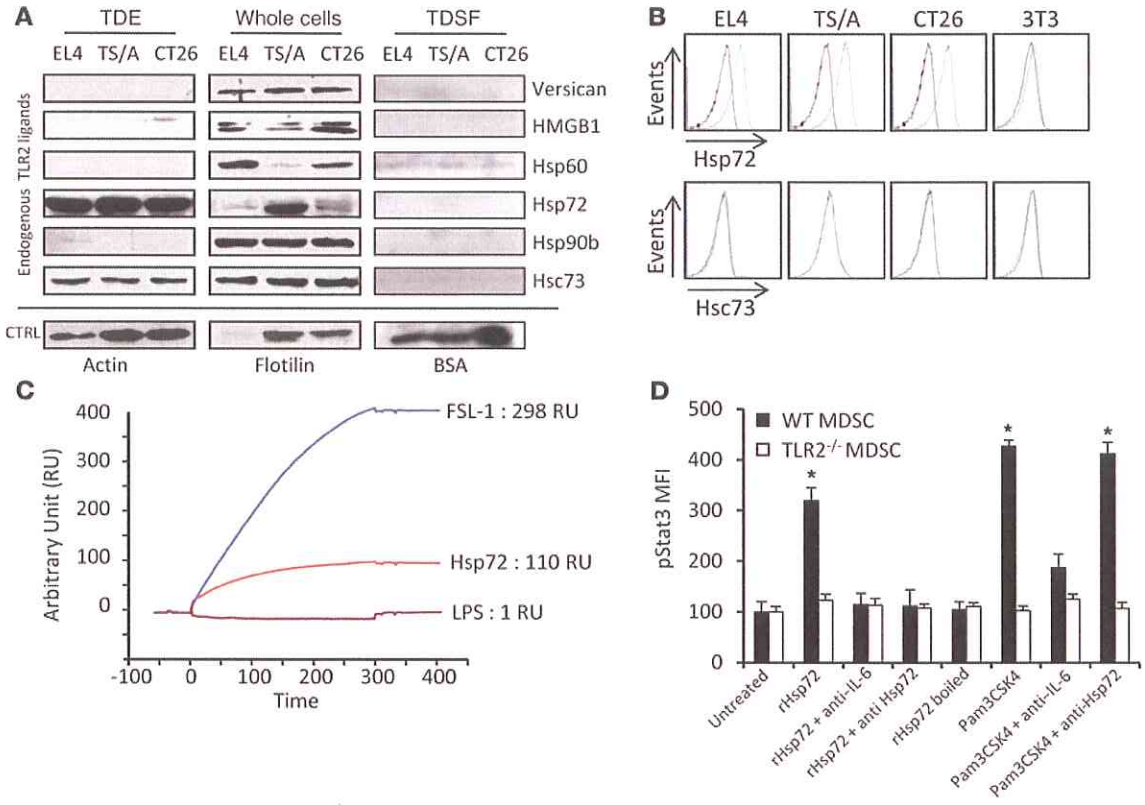


Figure 5

Hsp72 is expressed at the surface of TDEs and bound on TLR2. (**A**) Endogenous TLR2 ligand expression was investigated by immunoblots in TDEs, whole-cell lysates, and TDSFs from EL4, TS/A, and CT26 tumor cells. CTRL, control. (**B**) TDEs from EL4, TS/A, and CT26 tumor cells and exosomes from control 3T3 cells were coated on beads and labeled with control isotype or anti-Hsp72 or anti-Hsc73 Abs. Then FACS analysis was performed to determine expression of Hsp72 and Hsp73 at the surface of exosomes. One representative FACS histogram (blue line) is represented with its isotype control (pink area). (**C**) Surface plasmon resonance studying the binding of Hsp72 to TLR2 protein. FSL-1 (a bacterial TLR2 ligand) was used as positive control; LPS was used as negative control. (**D**) Purified myeloid cells from naive WT or TLR2-deficient C57BL/6 mice were cultured in complete medium supplemented or not as indicated. pStat3 expression was determined by FACS analysis on MDSC gated cells. Data represent MFI ± SD. $^*P < 0.05$.

hypothesis by showing that, in mice with specific deletion of Stat3 in hematopoietic cells, higher numbers of $Gr1^+$ $CD11b^+$ cells were found in the tumor bed. In the same line, other reports suggested in models where tumor cells could produce SCF that MDSC proliferation could be due to the activation of the SCF/Kit pathway (42, 43). Finally, the group from Ostrand-Rosenberg and a recent report from Xiang et al. demonstrated that PGE2 could be involved in MDSC activation and expansion (24, 44). Here, we provided evidence in 3 models in which neither SCF nor PGE2 were involved (Supplemental Figure 6) that Stat3 is not linked to MDSC expansion but implicated in their activation (Figure 1). In contrast, GM-CSF produced by tumor cells is involved in MDSC expansion through the activation of the Erk pathway.

Exosomes are endosome-derived microvesicles that are notably secreted by the tumor cells in their environment. Interestingly, TDEs are a source of shared tumor rejection antigens and in some conditions could induce a T cell–dependent immunity in mice and human tumor models (45, 46). Therefore, injection of a high amount of TDEs could represent a source of tumor-rejection antigens relevant for immunointerventions (21). However, as TDEs retain a large part of the protein repertoire of tumor cells, they could also trigger immunosuppression. Indeed, crucial components of the immune response, such as dendritic cells, are profoundly affected by the encounter with TDEs (25). Some TDEs could also express factors such as Fas ligand that induce apoptosis of CD8 T cells and may be involved in immune evasion (47). In our study, we demonstrate for what we believe is the first time that TDEs have another immunosuppressive capacity, which is triggered by Stat3 phosphorylation in MDSCs. Tumor-derived factors had been demonstrated to trigger MDSC accumulation from hematopoietic precursors (8, 48) and Stat3 phosphorylation (16, 17), but the tumor factors involved in these effects remained to be discovered. Here, we unraveled the capacity of TDEs to induce Stat3 phosphorylation and the acquisition of suppressive function in MDSCs (Figure 2). In a recent paper, Xiang et al. suggested that TDEs and exosome derived from tumor dissociation could induce MDSC expansion and Stat3 activation, but they did not test the effect of the TDSFs. Moreover, the effect of TDEs is correlated to their concentration of PGE2 and blunted by PGE2 inhibition, thus leading to the hypothesis that TDE effect was mainly the effect of PGE2 contained in exosomes. In our models, we provided evidence that no PGE2 was present in TDEs or TDSFs. So we could con-

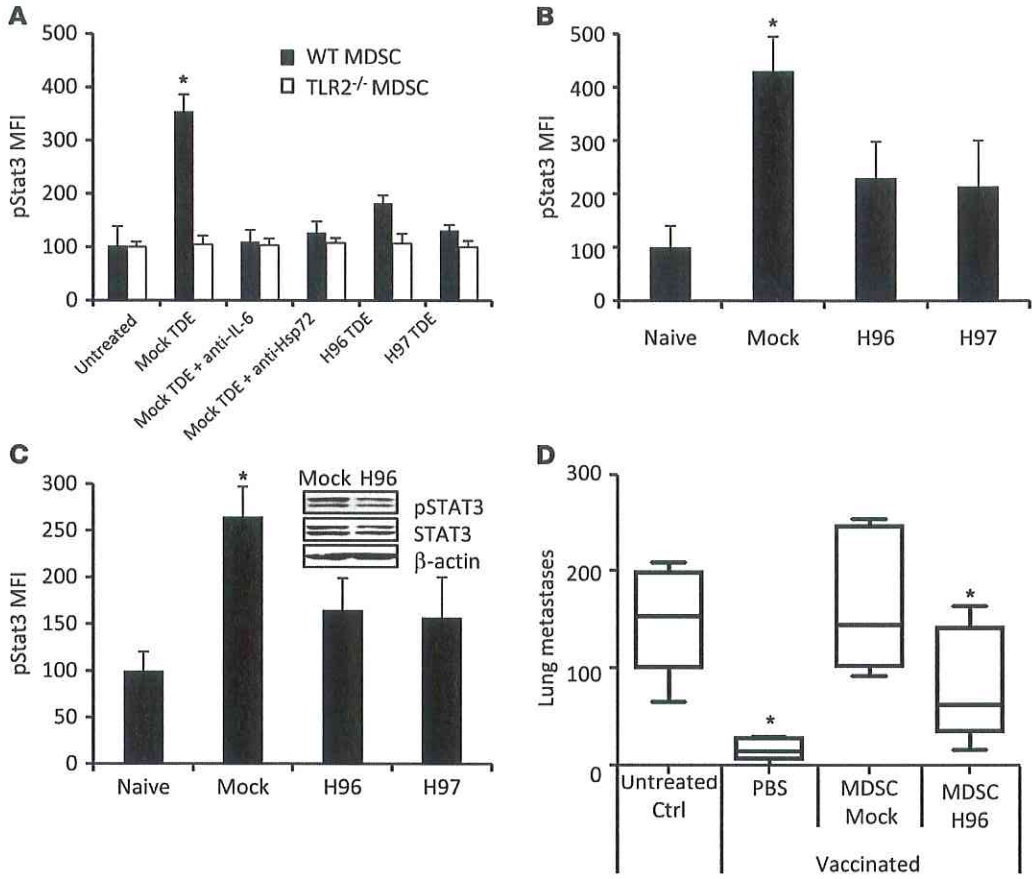


Figure 6

pStat3 expression in MDSCs is dependent on Hsp72 on TDEs. (**A**) Purified myeloid cells from naive WT or TLR2-deficient mice were either untreated or treated as indicated. (**B**) Naive mice were i.v. injected with TDEs from shRNA mock CT26 cells or Hsp72 shRNA CT26 clones H96 or H97. 18 hours later, spleen cells were harvested and pStat3 expression was determined by FACS. (**C**) Naive BALB/c mice were s.c. injected with 1×10^6 H96, H97, or mock CT26 cells. 2 weeks later, spleens were harvested and pStat3 expression determined by FACS. For **A–C**, pStat3 was determined by FACS analysis on MDSC gated cells. Data represent MFI ± SD. Experiments were performed in triplicate ($n = 3$ mice per group). Inset shows immunoblot of pStat3 expression in sorted MDSCs from mice bearing mock CT26 or Hsp72 shRNA CT26 clone H96. (**D**) Mice were vaccinated with frozen/thawed CT26 cells 1 week before i.v. injection of live CT26 cells admixed or not with MDSCs isolated from mice bearing shRNA mock-transfected or Hsp72 shRNA-transfected (clone H96) CT26 tumors. Twelve days later, lung metastasis numbers were evaluated. Experiments were performed in triplicate ($n = 5$ mice per group). For box and whisker plots, bottoms and tops of boxes show the 25th and 75th percentiles, respectively, and middle bands show the median; whiskers show extrema. *$P < 0.05$. Error bars represent mean + SD.

clude that the Hsp72/TLR2 pathway described here is a new pathway involved in MDSC activation. Hsp72 is a molecular chaperone present at elevated levels in various human tumors, and its expression often correlates with increased tumor cell proliferation, poor response to chemotherapy, and poor survival (49, 50). In addition to its classical intracellular localization, Hsp72 is also expressed on the plasma membrane of malignantly transformed cells or TDEs (51). Many reports also focused on the possible immunoadjuvant effect of Hsps, which enhance the maturation of dendritic cells (51) and NK cells (52), thus leading to immune-mediated protection (53). These results suggested that complexes of Hsps with peptides might represent a unique and efficient way to induce immunity, a hypothesis that was challenged by reports showing that Hsps can also downregulate an immune response in some autoimmune models such as rheumatoid arthritis in rats (54) and diabetes in mice (55). The mechanism proposed for the immunoregulatory function of Hsps involved the generation of IL-10–producing immunosuppressive T cells (56). In this regard, it is noteworthy that extracellular Hsp72 could also render APC resistant to adjuvant-induced maturation (57). In this study, we propose that Hsp72 expression in exosomes is detrimental for the antitumor response. To the best of our knowledge, this is the first study that provides a mechanistic explanation linking Hsp72 expression by tumor cells and the induction of immunosuppression in mice and humans. Hsp72 cytokine properties are well described and related to its capacity to bind to TLR4/CD14 complex (58) or TLR2 (59). Conflicting reports suggest that adjuvant Toll-dependent effects of Hsps are due to LPS or lipopeptide contamination (60). In our study, we performed physical measurement of the interaction between Hsp72 and TLR2 by surface plasmon resonance (Figure 5C). The in vivo immunosuppressive role of TDEs led us to search for drugs interfering with exosome secretion by tumor cells that might theoretically represent a strategy to restore tumor immunity and to impair tumor progression. A promising tool may be

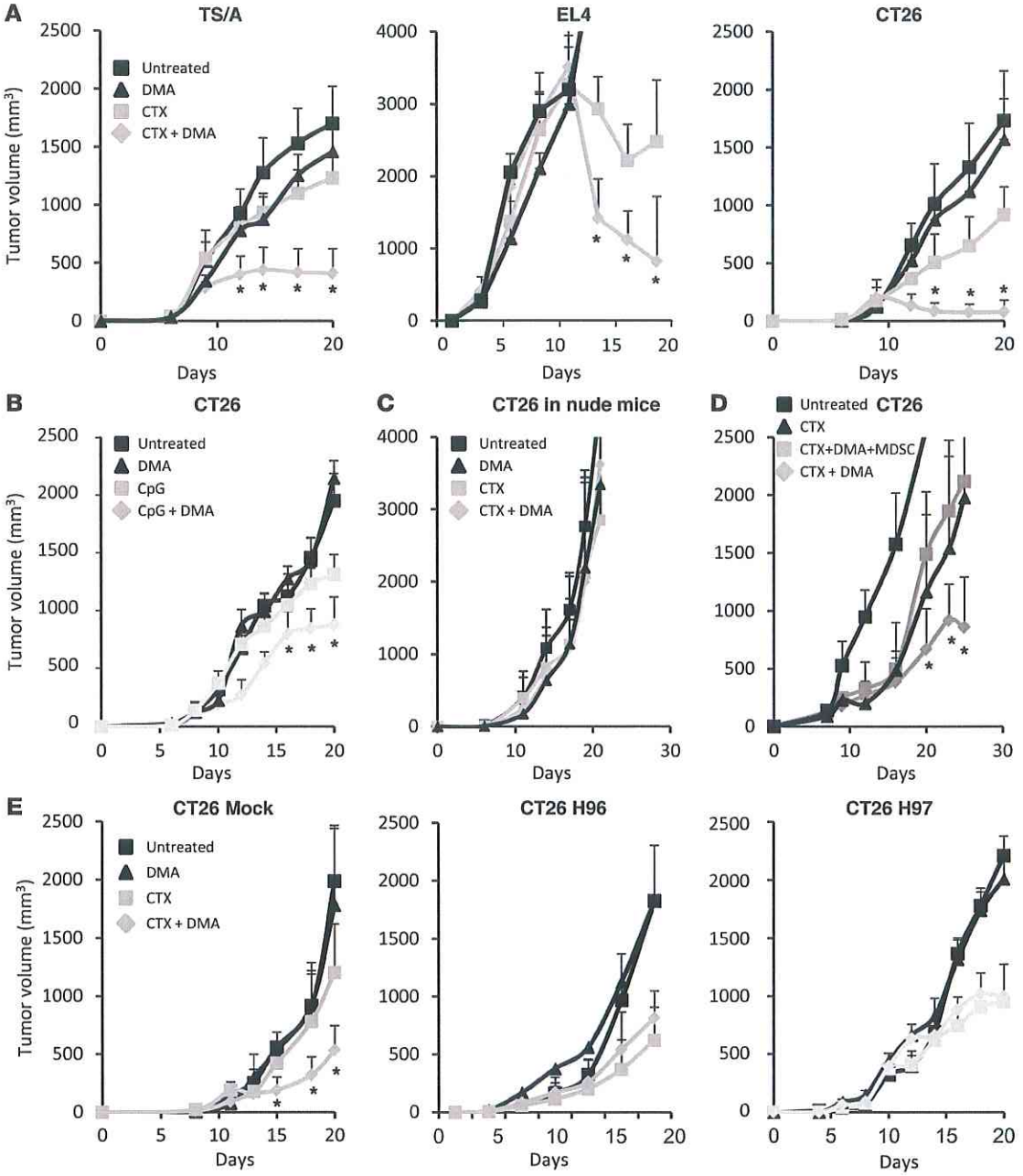


Figure 7

Exosome depletion restores the efficacy of immunotherapy. Immunocompetent mice (**A**) were injected s.c. with 1×10^6 CT26, TS/A, or EL4 cells. Mice were then either untreated or treated with 1 i.p. injection of 100 mg/kg cyclophosphamide (CTX), daily i.p. injection of DMA, or both. Mean tumor volume ± SD ($n = 6$ mice per group). (**B**) WT mice were injected as in **A** with CT26 and treated with intratumoral CpG 1668 injection (10 μg once a week) with or without DMA. (**C**) Nude mice were treated as in **A**. (**D**) BALB/c mice were injected s.c. with 1×10^6 CT26 cells. Mice were then either untreated or treated with 1 i.p. injection of cyclophosphamide or 1 i.p. injection of cyclophosphamide plus repeated daily i.p. injections of DMA with or without an i.v. adoptive transfer of 5×10^6 MDSCs from CT26 tumor-bearing mice. Data shown represent mean tumor volume ± SD ($n = 5$ mice per group). (**E**) BALB/c mice were injected s.c. with 1×10^6 mock-transfected (left panel) or Hsp72 shRNA–transfected (clone H96, middle panel; clone H97, right panel) CT26 cells. Mice were then either untreated or treated with 1 i.p. injection of cyclophosphamide, i.p. injection of DMA twice a week, or both. Mean tumor volume ± SD ($n = 6$ mice per group). Experiments were performed in duplicate. *$P < 0.05$.

represented by drugs such as DMA and its analog amiloride, which interfere with the activity of efflux pumps expressed on acidic vacuoles, such as Na+/H+ export, and associated to exosome secretion (61). DMA and amiloride reduce exosome secretion in vitro and in vivo (Figure 3D) and blunt Stat3 phosphorylation in MDSCs and their T cell–suppressive function in mouse cancer models (Figure 3, F and G) and in cancer patients (Figure 8, E and F). Moreover, in 3 mouse tumor models from 2 different mouse strains, DMA

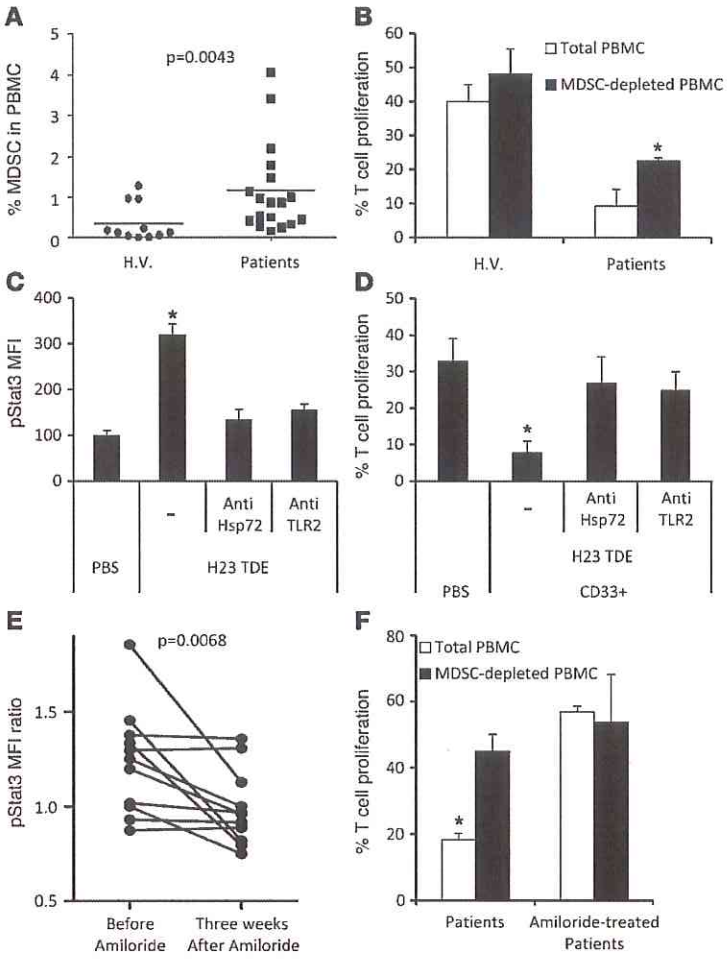


Figure 8

Exosomes produced by human cancer cell lines or metastatic cancer patients dictate Stat3 activation in MDSCs and their immunosuppressive function through TLR2 and Hsp72. (**A**) The frequency of MDSCs, defined as HLA-DR $CD33^+$ cells, is shown in the PBMCs of healthy volunteers (H.V.) ($n = 11$) and metastatic cancer patients ($n = 18$). Each plot is an individual measure, and the horizontal bar is the mean. (**B**) Immunosuppressive function of MDSCs from peripheral blood of healthy volunteers and metastatic cancer patients on stimulated T cell proliferation. T cell stimulation was induced by a mixture of anti-CD2, anti-CD3, and anti-CD28 beads ($n = 10$). (**C**) PBMCs from healthy volunteers were cultured for 24 hours in medium alone or medium containing TDEs from H23 cells with or without blocking TLR2 Abs or anti-Hsp72 polyclonal Abs (pAbs). pStat3 was determined by flow cytometry on MDSC gated cells ($n = 10$). (**D**) Immunosuppressive function of MDSCs from blood of healthy volunteers either untreated or treated with TDEs from H23 cells alone or with blocking TLR2 Abs or anti-Hsp72 pAbs ($n = 8$). (**E**) PBMCs from metastatic cancer patients were incubated overnight in serum-free medium supplemented with autologous serum or PBS. pStat3 expression in gated MDSC was determined by flow cytometry. pStat3 MFI ratio between PBS and serum condition was represented. The same patients were sampled before and after 3 weeks of amiloride treatment ($n = 11$). (**F**) Immunosuppressive function of MDSCs prepared from peripheral blood of metastatic cancer patients, treated with amiloride or not treated, on T cell proliferation stimulated as in **B**. $^*P < 0.05$. Error bars represent mean + SD.

enhances the antitumor efficacy of cyclophosphamide, an anticancer drug with cytotoxic and immunological properties (39).

In conclusion, we here describe an immunosuppressive pathway involved in tumor-induced tolerance in mice as well as in humans. This study supports the hypothesis that drugs interfering with exosome secretion such as amiloride may enhance the efficacy of current chemotherapies.

Methods

Cell culture

The mouse colon carcinoma CT26 cells, lymphoma EL4, embryo fibroblast NIH/3T3 cells, and human lung adenocarcinoma H23 were obtained from ATCC and mammary adenocarcinoma TS/A from Health Protection Agency Cultures Collections (HPACC). MSC cell lines were a gift from Vincenzo Bronte (Istituto Oncologico, Padova, Italy). All cells were grown in RPMI 1640 medium with glutamax-I (Lonza) supplemented with 10% (v/v) FBS (Lonza) and with Pen/Strep Amphotericin B (Lonza) in an atmosphere of 95% air and 5% CO_2 at 37°C. Absence of mycoplasma contamination was assayed every 2 weeks by PCR.

Mice

Female C57BL/6, BALB/c, and nude mice (aged 6 to 8 weeks) were obtained from the Centre d'élevage Janvier and from Charles River Laboratories. *TLR2*$^{-/-}$, *TLR4*$^{-/-}$, *MyD88*$^{-/-}$, and *TRIF*$^{-/-}$ C57BL/6 mice were provided by Bernhard Ryffel (CNRS UMR 6218, Orleans, France). These mice ere obtained from Shizuo Akira (Laboratory of Host Defense, Osaka, Japan) and crossed to C57BL/6 in UMR6218, Orleans, France. We obtained OT-1 TCR-transgenic mice (C57BL/6-Tg(TCRαTCRβ)1100mjb) from Christophe Borg (INSERM U645, Besancon, France).

To establish EL4, TS/A, and CT26 tumors, C57BL/6 and BALB/c mice were injected s.c. with 1×10^6 EL4, TS/A, or CT26 cells, respectively. Tumor size was measured with calipers and is presented as the multiplication of the 2 longest dimensions. Some tumor-bearing mice were treated with daily i.p. injections of 1 μmol/kg DMA (Sigma-Aldrich) or 20 mg/kg omeprazole and 1 i.p. injection of 100 mg/kg cyclophosphamide (Sigma-Aldrich) when tumors were about 25 mm^2. Some tumor-bearing mice were treated with weekly intratumoral injection of 0.5 mg/kg CpG (InvivoGen).

For vaccination experiments, naive mice were injected in footpads with 1×10^6 frozen/thawed CT26 cells. These cells were warmed 10 minutes at 42°C, then frozen in liquid nitrogen. One week after vaccination, mice were injected i.v. with 1×10^6 live CT26 cells, admixed or not with 5×10^6 MDSCs from DMA, PBS-treated tumor-bearing mice, MDSCs from 3-week-old shRNA mock CT26 tumor-bearing BALB/c mice or Hsp72 shRNA. After 12 days, lung metastasis number was determined. All animal experiments were approved by the local Animal Ethical Committee (Université de Bourgogne, Dijon, France).

MDSCs

Generation of cells from bone marrow progenitors. Bone marrow cells were obtained from the femurs and tibias of WT mice. Five million bone mar-

row cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 10 ng/ml GM-CSF or in the presence of 50% v/v control (from 3T3 fibroblasts) or TCS, ultracentrifugated TCS (TDSFs), or exosomes (TDEs) (50 μg/well). On day 5 of culture, cells were collected and analyzed by flow cytometry.

Cell isolation and functional assays. Single-cell suspensions were prepared from spleens, and red cells were removed using ammonium chloride lysis buffer. Gr-1$^+$ cells were isolated from spleens of tumor-bearing mice or naive mice by labeling the cells with PE Cy7 Ab to Gr-1, then using magnetic PE Cy7 beads and LS MACS columns (Miltenyi Biotec). CD11b$^+$ cells were isolated with anti-mouse CD11b beads (Miltenyi Biotech) according to the manufacturer's protocol. The Gr1$^+$ cells were cultured 24 hours in different conditions: supplementation with 50% of control 3T3 fibroblasts supernatant or TCSs, TDSFs, or TDEs (50 μg/well). Some cells were treated 24 hours or for indicated times with 1 μg/ml rHsp72 (Stressgen ESP555), 10 ng/ml rIL-6 (R&D Systems), 1 μg/ml Pam3CSK4 (InvivoGen), 0.25 μM JSI124 (Calbiochem), 30 μM STA21 (Biomol), 10 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich), 50 μg/ml poly(I:C) (InvivoGen), 1 μg/ml anti-IL-6 mAb (R&D Systems), or 5 μg/ml anti-Hsp72 pAb (Stressgen), 2 μg/ml anti-GM-CSF (Abcam).

Recombinant Hsp72 was tested for LPS contamination using Limulus amebocyte assay (Limulus amebocyte lysate QCL100; Cambrex). The level of endotoxin was less than the lowest control standard.

In functional assay, we used spleen cells from OT-1 mice. CD8$^+$ T cells were purified with CD8 microbeads (Miltenyi Biotec) and stained 10 minutes with CFSE (1 μM in PBS) at 37°C, then washed 3 times in complete medium. CD8$^+$ cells were cultured with specific peptide SIINFEKL (Bachem) (10 μg/ml) in the presence of MDSCs (1:1, 1:4, 1:8, 1:16 ratios). Three days later, proliferation of OT-1 cells was evaluated with CFSE dilution by flow cytometry.

Flow cytometry. For extracellular staining of immune markers, single-cell suspensions were prepared. Red cells were removed using ammonium chloride lysis buffer. We incubated 1×10^6 freshly prepared cells resuspended in RPMI 10% FBS with fluorochrome-coupled Abs to Gr1 and CD11b (eBioscience). Stat3–Alexa Fluor 488 and Ki67-FITC staining were carried out according to the manufacturer's protocol using the Cytofix/Cytoperm kit (BD Biosciences). All events were acquired by a BD Bioscience LSR-II device and analyzed with FlowJo (Tree Star). For IFN-γ intracellular staining, spleens and tumors were harvested and dissociated as usual. Leukocytes were then cultured in vitro in 3 different conditions: coated anti-CD3 alone, coated anti-CD3 and killed tumor cells; and coated plus soluble anti-CD3 (2 μg/ml), soluble anti-CD28 (2 μg/ml), and IL-2 (1000 UI/ml; Proleukin Chiron). Stimulation was maintained for 16 hours, with brefeldin A (GolgiPlug; BD) the last 4 hours. Cells were then harvested and stained for CD4, CD8, and intracellular IFN-γ using the BD protocol.

Human MDSCs. Human MDSCs were isolated as follows: PBMCs were obtained from heparinized blood samples from either healthy volunteers or patients suffering from breast, colon, or prostate cancer (samples were obtained with informed consent and according to the local Ethical Committee CPP EST from Dijon, France) by centrifugation (800 *g* for 30 minutes) on a density cushion, using lymphocyte separation medium (Eurobio). MDSCs were analyzed by flow cytometry after labeling and characterized by the CD33$^+$HLA DR CD3$^-$ phenotype in the monocytic/granulocytic morphometric gate. For Y705-pStat3 determination, PBMCs were incubated in AIM-V medium (GIBCO; Invitrogen) supplemented with components indicated in the figure legends for 18 hours. Then fixation and permeabilization were performed using BD Biosciences Phosflow standard protocol N°III for pStat3 level determination in the monocytic/granulocytic morphometric gate. The Abs used were purchased from BD Biosciences: anti–pY705-Stat3 PE conjugated (clone 4/P-STAT3), anti-human CD14 PE (M5E2), anti-human HLA-DR PerCP (L243 [G46-6]), anti-human CD3 FITC (HIT3a), and anti-human CD33 APC (WM53). Some cells were treated 24 hours with 5 μg/ml anti-Hsp72 pAb (Stressgen) or 20 μg/ml anti-TLR2 pAb (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

T cell proliferation was evaluated by CFSE dilution of CD33$^-$ cells alone or with CD33$^+$ (in the original ratio) activated with the Treg Suppression Inspector (Miltenyi Biotec).

Exosome isolation and labeling

48-hour supernatants of confluent tumor cells were collected and sequentially centrifuged (4°C) at 300 *g* for 10 minutes and then at 1200 *g* for 30 minutes. Exosomes were then pelleted at 100,000 *g* for 12 hours and washed once in PBS. The protein concentrations of exosomes were measured by Lowry assay (Bio-Rad). For some experiments, exosomes were further separated from other microparticles by centrifugation on a 30% sucrose/D20 cushion for 2 hours; these preparations were used to ascertain the presence of Hsp72 in the exosomal fraction and not in the other microparticles. For FACS staining, we bound the exosomes to surfactant-free white aldehyde-sulfate latex beads (3 μm; Invitrogen) and concentrated at 1×10^4 beads/μl. We incubated 200 μg TDEs with a 70 μl bead suspension for 10 to 15 minutes and then for 1 hour at room temperature in a final volume of 1 ml PBS. Beads were saturated for 30 minutes in glycine (100 mM) at room temperature, then washed twice with PBS supplemented by 3% of FBS. A classic staining was realized on exosomes with control isotype or anti-Hsp72 (provided by Gabriele Multhoff, Department of Radiation Oncology, University Hospital, Technische Universität München) or anti-Hsc73 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) Abs.

Electronic microscopy

Exosome preparations were stained with osmium tetroxide, then observed with a Hitachi H-7500 electronic microscope equipped with an AMT camera.

Quantitation of released exosomes

The amount of released exosomes was quantified by measuring the activity of acetylcholinesterase, an enzyme that is specifically present in these vesicles. Exosome fractions (25 μl) were suspended in 100 μl of PBS and incubated with 1.25 mM acetylthiocholine and 0.1 mM 5,5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) in a final volume of 1 ml. The change in absorbance at 412 nm was followed continuously. The data represent the enzymatic activity after 20 minutes of incubation.

Molecular biology

ELISA. ELISA kits were used to detect IL-6, IL-10 (BD Biosciences), VEGF, TNF-α, PGE2 (R&D Systems), and IL-1β (Biolegend) according to the manufacturers' protocol.

Western blotting. The following mouse mAbs were used: anti-β-actin (Sigma-Aldrich), anti-Hsc73, anti-Stat3 (Santa Cruz Biotechnology Inc.), anti-Hsp60 (Stressgen), and anti-flotillin (BD Biosciences). The following rabbit polyclonal Abs were used: anti-Hsp72, anti-Hsp90β (Stressgen), anti-versican, anti-HMGB1 (Abcam), anti-pStat3, anti-pErk, anti-Erk (Cell Signaling Technology), and anti-BSA (Sigma-Aldrich). Rat polyclonal anti-Grp94 (Stressgen) and goat polyclonal anti-tsg101 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) were also used. Secondary Abs HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse, swine anti-rabbit, and goat anti-rat immunoglobulins (Jackson ImmunoResearch) and polyclonal rabbit anti-goat immunoglobulins (Dako) were also used.

shRNA transduction

CT26 cells were transduced with MISSION Lentiviral Transduction Particles (Sigma-Aldrich) to silence Hsp72 or with negative control particles according to the manufacturer's instructions. One population trans-

duced with control particles (mock) and 5 transduced with 5 different shRNAs specific for Hsp72 (H95 to H99) were obtained, and 2 subclones (H96 and H97) were then selected after checking Hsp72 downregulation by Western blotting.

siRNA transfection

For in vivo experiments, Silencer Select Predesigned siRNA specific for murine IL-6 (forward: 5′-CUACCAAACUGGAUAUAAUtt-3′, reverse: 5′-AUUAUAUCCAGUUUGGUAGca-3′) or negative control siRNA (Applied Biosystems) were prepared with transfection reagent JetPEI (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions.

MDSCs were transfected in vitro with Silencer Select Predesigned siRNA specific for murine Stat3 (forward: 5′-GGGUGAAAUUGACCAGCAAtt-3′, reverse: 5′-UUGCUGGUCAAUUUCACCCaa-3′; and forward: 5′-GAGUUGAAUUAUCAGCUUAtt-3′, reverse: 5′-UAAGCUGAUAAUUCAACUCag-3′) or negative control siRNA (Applied Biosystems) with transfection reagent JetPEI (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions.

CT26 was transfected in vitro with Silencer Select Predesigned siRNA specific for murine IL-6st (forward: 5′-GGAAAAUCUUGGAUUAUGAtt-3′, reverse: 5′-UCAUAAUCCAAGAUUUUCCca-3′) or negative control siRNA (Applied Biosystems) with transfection reagent INTERFERin (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions.

SPR analysis

Design and fabrication of homemade chips compatible with Surface Plasmon Resonance have been performed as previously published with the help of the MIMENTO technological platform (Besançon, France) (62). Biacore experiments were performed with the Biacore 2000 apparatus at 25°C with a flow rate of between 2 and 30 μl/min.

Statistics

Results were analyzed with GraphPad Prism 5. Appropriated statistical tests were used according to the variance, matching pairs, and distribution. $P < 0.05$ was considered significant. Data are represented as mean ± SD.

Acknowledgments

This work was supported by special grants from the Fondation de France, the Association pour la Recherche sur le Cancer, the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, and the Ligue Nationale Contre le Cancer (Region Bourgogne). F. Chalmin was supported by the Conseil Régional Bourgogne/INSERM, J. Vincent by the Institut National contre le Cancer. G. Mignot was funded by the Association pour la Recherche sur le Cancer. C. Garrido and E. Solary lead teams supported by the "Ligue Nationale Contre le Cancer." L. Apetoh is supported by EMBO. The authors thank the flow cytometry facility of IFR Santé-STIC.

Received for publication October 9, 2009, and accepted in revised form December 2, 2009.

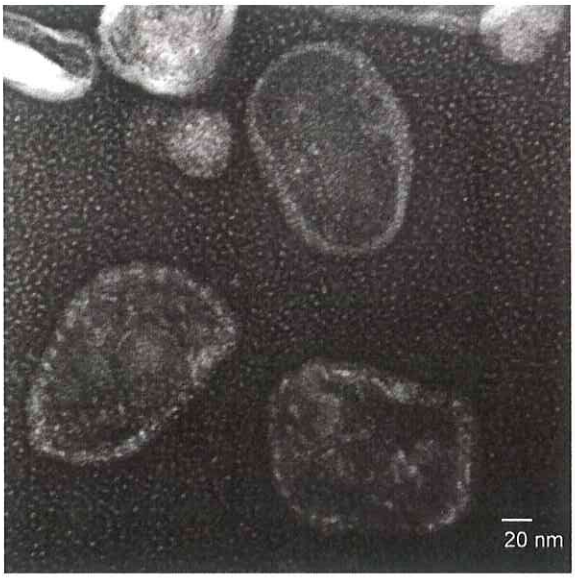
Address correspondence to: François Ghiringhelli, Centre de Recherche, INSERM U866, Facultés de médecine et de Pharmacie, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France. Phone: (33) 3-80-39-33-53. Fax: (33) 3-80-39-34-34; E-mail: fghiringhelli@cgfl.fr or francois.ghiringhelli@yahoo.fr.

1. Gabrilovich DI, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;67(1):425; author reply 426.
2. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol.* 2009;182(8):4499–4506.
3. Filipazzi P, et al. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol.* 2007;25(18):2546–2553.
4. Mirza N, et al. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res.* 2006;66(18):9299–9307.
5. Srivastava MK, et al. Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated *in vitro* by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2008;57(10):1493–1504.
6. Zea AH, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res.* 2005;65(8):3044–3048.
7. Tu S, et al. Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell.* 2008;14(5):408–419.
8. Almand B, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol.* 2001;166(1):678–689.
9. Diaz-Montero CM, et al. Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(1):49–59.
10. Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C, Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13(2 Pt 2):721s–726s.
11. Nagaraj S, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med.* 2007;13(7):828–835.
12. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009;9(3):162–174.
13. Nefedova Y, Fishman M, Sherman S, Wang X, Beg AA, Gabrilovich DI. Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;67(22):11021–11028.
14. Nefedova Y, et al. Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol.* 2004;172(1):464–474.
15. Cheng P, et al. Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med.* 2008;205(10):2235–2249.
16. Corzo CA, et al. Mechanism regulating reactive oxygen species in tumor-induced myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol.* 2009;182(9):5693–5701.
17. Wang T, et al. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med.* 2004;10(1):48–54.
18. Lieblein JC, et al. STAT3 can be activated through paracrine signaling in breast epithelial cells. *BMC Cancer.* 2008;8:302.
19. Gallina G, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest.* 2006;116(10):2777–2790.
20. Kortylewski M, et al. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med.* 2005;11(12):1314–1321.
21. Mignot G, Roux S, Thery C, Segura E, Zitvogel L. Prospects for exosomes in immunotherapy of cancer. *J Cell Mol Med.* 2006;10(2):376–388.
22. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):569–579.
23. van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G. Exosomes: a common pathway for a specialized function. *J Biochem.* 2006;140(1):13–21.
24. Xiang X, et al. Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer.* 2009;124(11):2621–2633.
25. Valenti R, et al. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res.* 2006;66(18):9290–9298.
26. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science.* 1994;264(5155):95–98.
27. Chen SH, et al. Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(12):1994–2003.
28. Iero M, et al. Tumour-released exosomes and their implications in cancer immunity. *Cell Death Differ.* 2008;15(1):80–88.
29. Savina A, Furlan M, Vidal M, Colombo MI. Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in K562 cells. *J Biol Chem.* 2003;278(22):20083–20090.
30. Leadbetter EA, et al. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature.* 2002;416(6881):603–607.
31. Apetoh L, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* 2007;13(9):1050–1059.
32. Kim S, et al. Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature.* 2009;457(7225):102–106.
33. Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):514–519.
34. Vabulas RM, et al. Endocytosed HSP60s use toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 to activate the toll/interleukin-1 receptor signaling pathway in innate immune cells. *J Biol Chem.* 2001;276(33):31332–31339.
35. Asea A, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.*

2002;277(17):15028–15034.
36. Vabulas RM, et al. HSP70 as endogenous stimulus of the Toll/interleukin-1 receptor signal pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(17):15107–15112.
37. Vabulas RM, et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem.* 2002;277(23):20847–20853.
38. Park JS, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem.* 2004;279(9):7370–7377.
39. Ghiringhelli F, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol.* 2004;34(2):336–344.
40. Roux S, et al. CD4CD25 Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. *J Clin Invest.* 2008;118(11):3751–3761.
41. Mandruzzato S, et al. IL4Ralpha+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. *J Immunol.* 2009;182(10):6562–6568.
42. Pan PY, et al. Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood.* 2008;111(1):219–228.
43. Ozao-Choy J, et al. The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. *Cancer Res.* 2009;69(6):2514–2522.
44. Sinha P, Clements VK, Fulton AM, Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007;67(9):4507–4513.
45. Andre F, et al. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet.* 2002;360(9329):295–305.
46. Wolfers J, et al. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med.* 2001;7(3):297–303.
47. Abusamra AJ, et al. Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35(2):169–173.
48. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol.* 2008;181(8):5791–5802.
49. Jaattela M. Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res.* 1999;248(1):30–43.
50. Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci.* 2006; 31(3):164–172.
51. Singh-Jasuja H, et al. The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol.* 2000;30(8):2211–2215.
52. Multhoff G. Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Int J Hyperthermia.* 2002;18(6):576–585.
53. Millar DG, et al. Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity *in vivo*. *Nat Med.* 2003; 9(12):1469–1476.
54. Kingston AE, Hicks CA, Colston MJ, Billingham ME. A 71-kD heat shock protein (hsp) from Mycobacterium tuberculosis has modulatory effects on experimental rat arthritis. *Clin Exp Immunol.* 1996;103(1):77–82.
55. Elias D, Markovits D, Reshef T, van der Zee R, Cohen IR. Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(4):1576–1580.
56. Prakken BJ, et al. Induction of IL-10 and inhibition of experimental arthritis are specific features of microbial heat shock proteins that are absent for other evolutionarily conserved immunodominant proteins. *J Immunol.* 2001;167(8):4147–4153.
57. Aneja R, Odoms K, Dunsmore K, Shanley TP, Wong HR. Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol.* 2006;177(10):7184–7192.
58. Asea A, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat Med.* 2000;6(4):435–442.
59. Galloway E, et al. Activation of hepatocytes by extracellular heat shock protein 72. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(2):C514–C520.
60. Tsan MF, Gao B. Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol.* 2009;85(6):905–910.
61. Gupta S, Knowlton AA. HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292(6):H3052–H3056.
62. Boireau W, Rouleau A, Lucchi G, Ducoroy P. Revisited BIA-MS combination: entire "on-a-chip" processing leading to the proteins identification at low femtomole to sub-femtomole levels. *Biosens Bioelectron.* 2009;24(5):1121–1127.

Supplemental figure 1

a



b

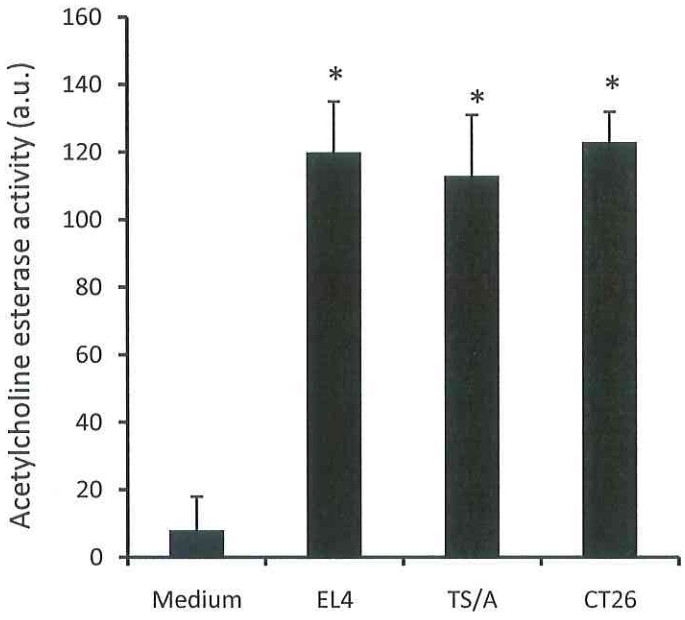


Figure S1

a : Picture from the ultracentrifuged pellet from culture supernatant of EL4.

b: Acetylcholine esterase activity in ultracentrifuged fraction (TDE).

Supplemental figure 2

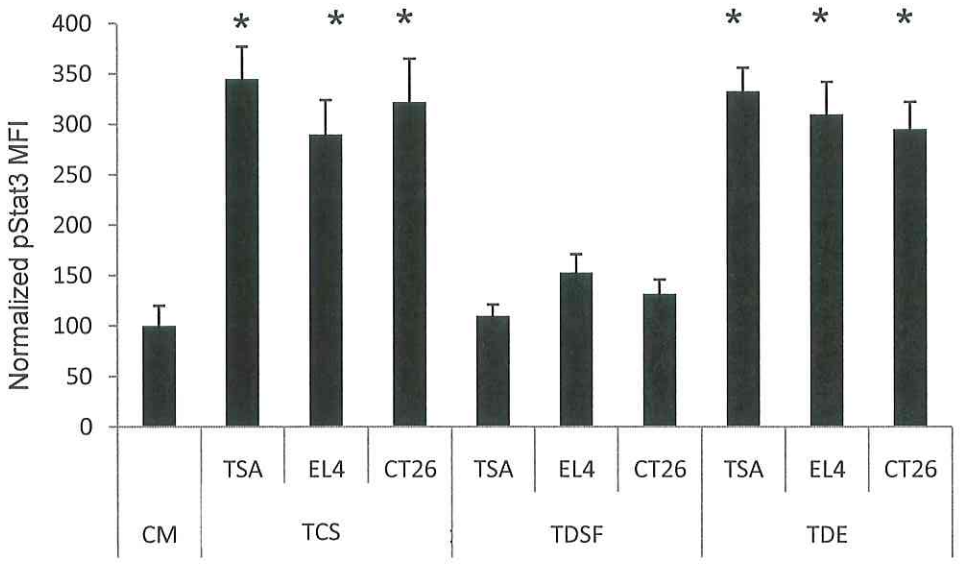


Figure S2 :Stat3 activation in purified MDSCs
Purified splenic MDSCs from naïve mice were treated with TCS or TDSF or TDE. pStat3 expression was determined by FACS analysis. Data are Mean ± s.d. fluorescence intensity (n=3)

Supplemental figure 3

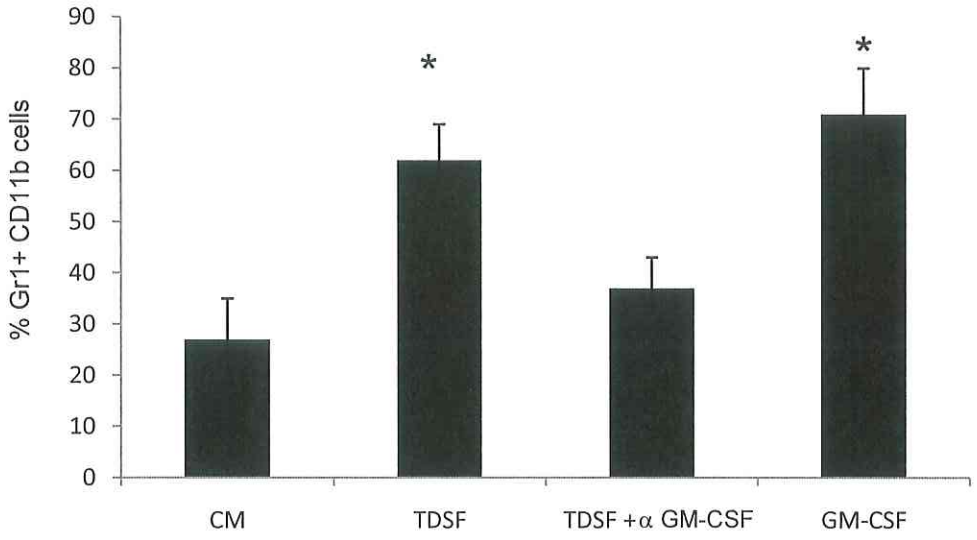


Figure S3. Expansion of MDSCs by GM-CSF
Bone marrow from naïve mice were cultured 3 days in complete medium alone or with TDSF or TDSF + blocking anti GM-CSF or rGM-CSF . The percentage of $Gr1^+$ $CD11b^+$ precursor cells ± s.d. was determined by flow cytometry.

Supplemental figure 4

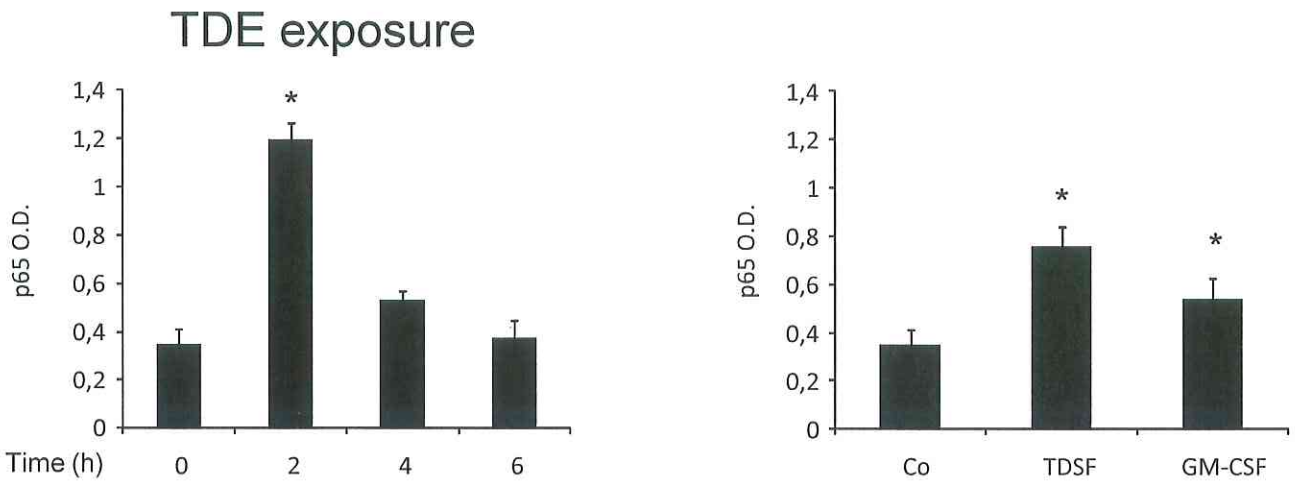


Figure S4. NFκB p65 transcriptional activition by TDE and TDSF
(Left panel) MDSC clone were stimulated with TDE for 2h, 4h or 6h . Then NFκB p65 transcriptional activity was determined with TransAm assay.
(Right panel) MDSC clone were stimulated with TDSF or GM-CSF for 2h. Then NFκB p65 transcriptional activity was determined with TransAm assay.

Supplemental figure 5

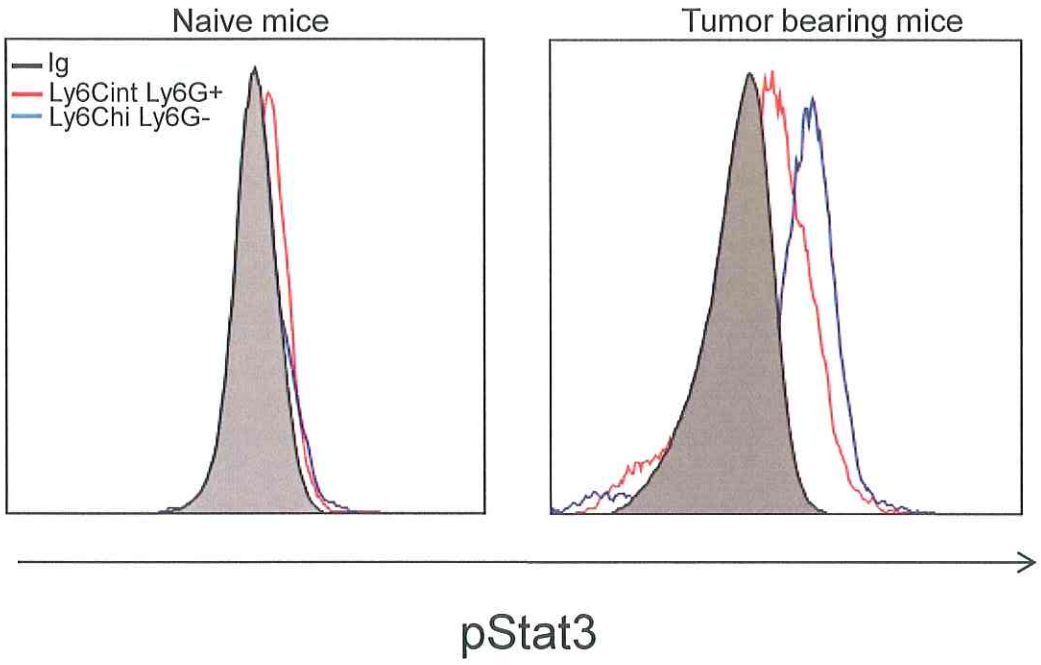


Figure S5 . pStat3 expression in MDSCs Subpopulations

MDSC from tumor-bearing mice were analysed for Ly6C Ly6G CD11b and pStat3 expression by cytometry.

Monocytic MDSC were characterized by $Ly6C^{high}Ly6G^{-}CD11b^{+}$; granulocytic MDSC by $Ly6C^{intermediate}$ $Ly6G^{+}$ $CD11b^{+}$.

Supplemental figure 6

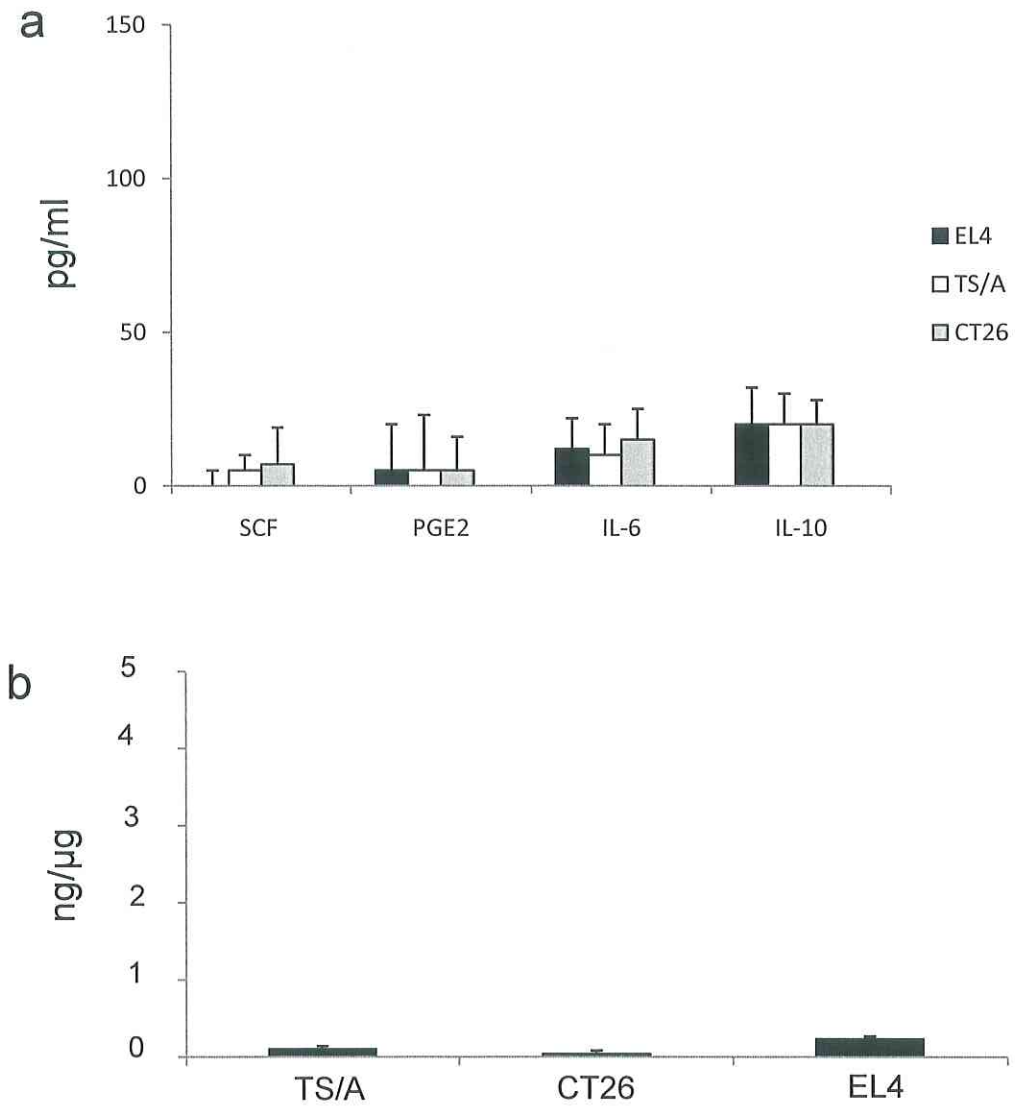


Figure S6. Cytokines production by tumor cells and TDE

A. Tumor cell supernatant SCF, PGE2, IL-10 and IL-6 were determined by ELISA.

B. PGE2 levels in TDE were determined by ELISA.

Supplementary figure 7

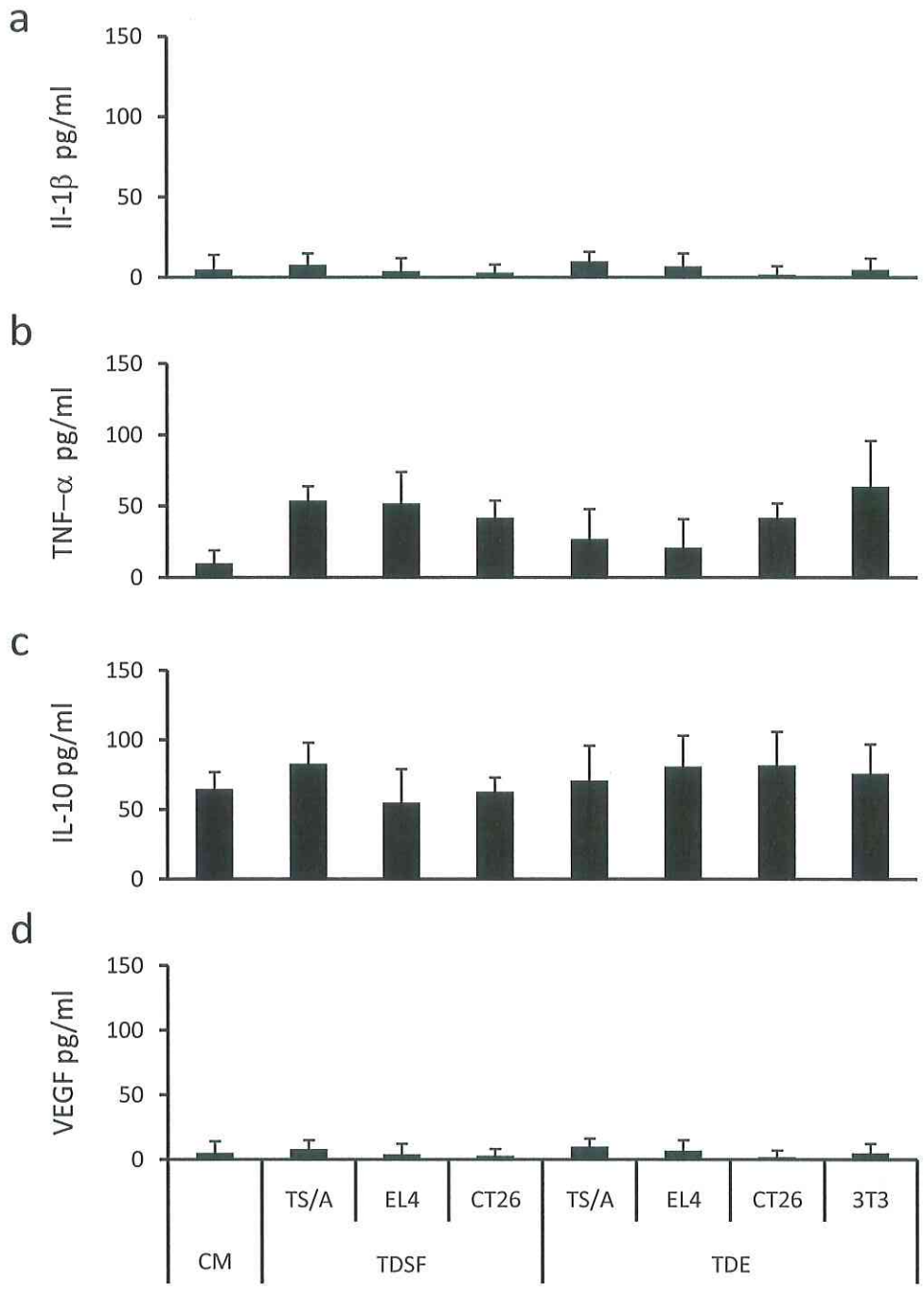


Figure S7. Cytokines production by MDSCs.
Purified MDSC from naïve mice were treated 24h with complete conditioned medium (CM) or soluble fraction (TDSF) or exosome (TDE) obtained from CT26, TS/A, EL4 and 3T3 cell cultures before and after ultracentrifugation (UC). IL-1β (a), TNF-α (b), IL-10 (c) and VEGF (d) concentrations were determined by ELISA.

Supplementary figure 8

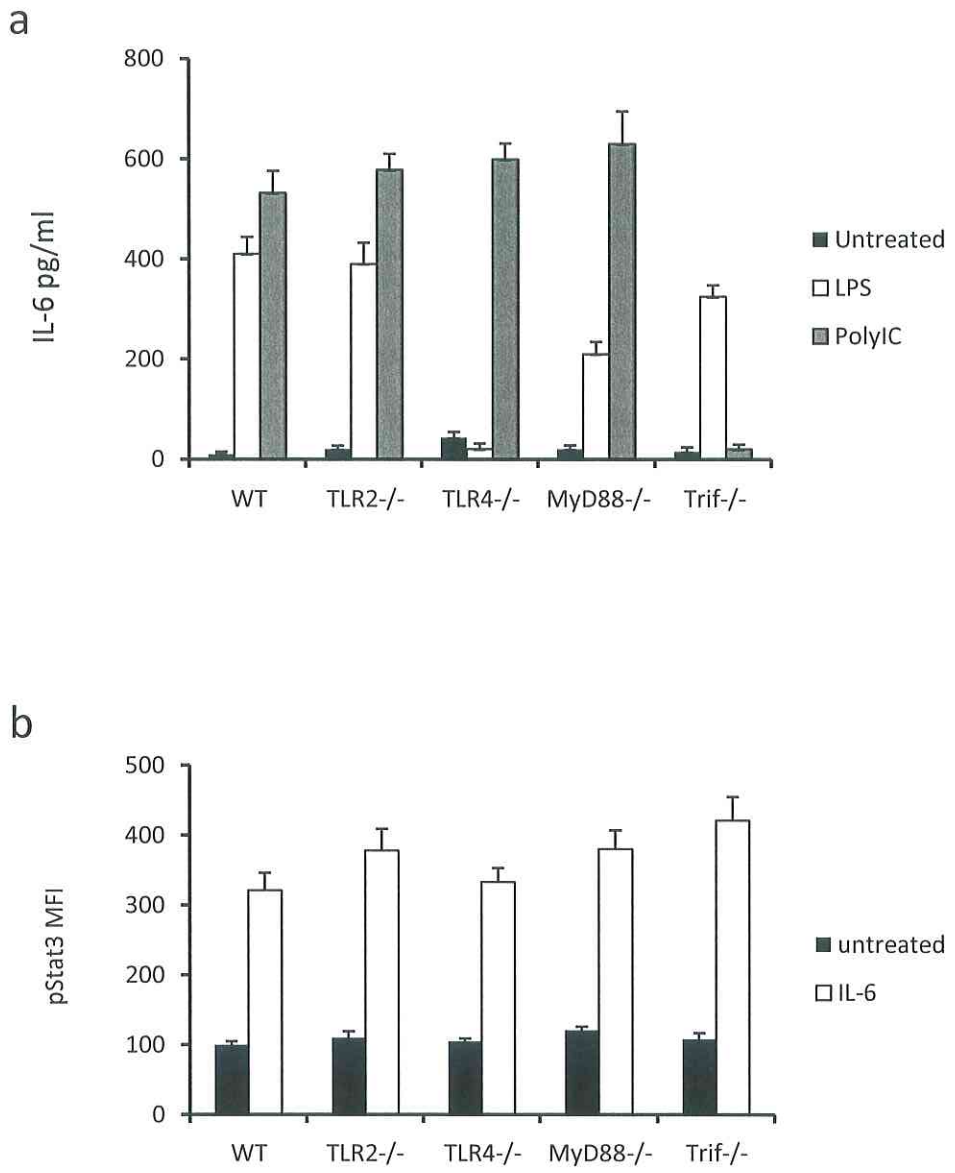


Figure S8. IL-6 production and pStat3 expression by MDSCs from wild type and TLR deficient mice

a. MDSCs from wild-type or TLR2-, TLR4-, MyD88- or TRIF-deficient tumor-free mice were cultured for 24h with PBS alone or supplemented with LPS (10 ng/mL) or Poly(I:C) (50µg/mL), then IL-6 concentrations were determined by ELISA in the supernatant.

b. MDSCs from wild-type or TLR2-, TLR4-, MyD88- or TRIF-deficient tumor-free mice were cultured for 24h with PBS alone or supplemented with rIL-6 (10ng/mL). pStat3 expression was determined by FACS analysis on MDSCs gated cells. MFI = mean fluorescence intensity ± s.d.

Supplemental figure 9

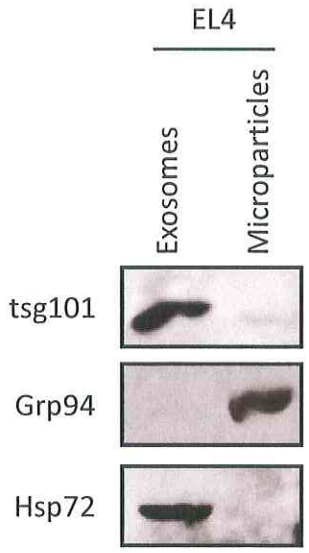


Figure S9. Expression of Hsp72, Tsg101 and Grp72 in exosome and other microparticules
EL4- exosome were separated from other microparticules by ultracentrifugation on 30% sucrose/D2O. Both fractions were blotted for tsg101 (exosomal protein), Grp94 (endoplasmic reticulum protein) and Hsp72.

Supplemental figure 10

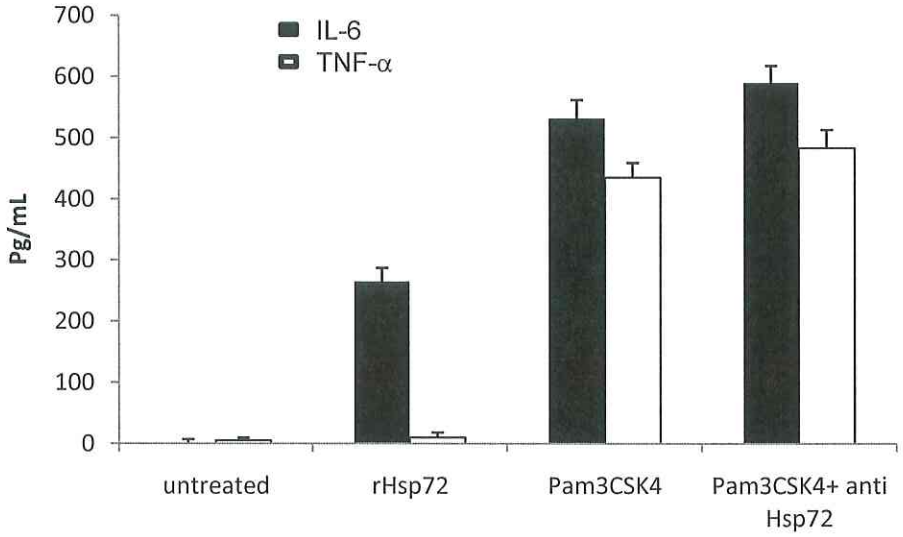


Figure S10. IL-6 and TNF-α production by MDSCs
Naïve MDSCs were stimulated 24h with rHsp72 or PAM3CSK4 or PAM3CSK4 plus a blocking anti Hsp72. IL-6 and TNF-α in the supernatant were determined by ELISA.

Supplemental figure 11

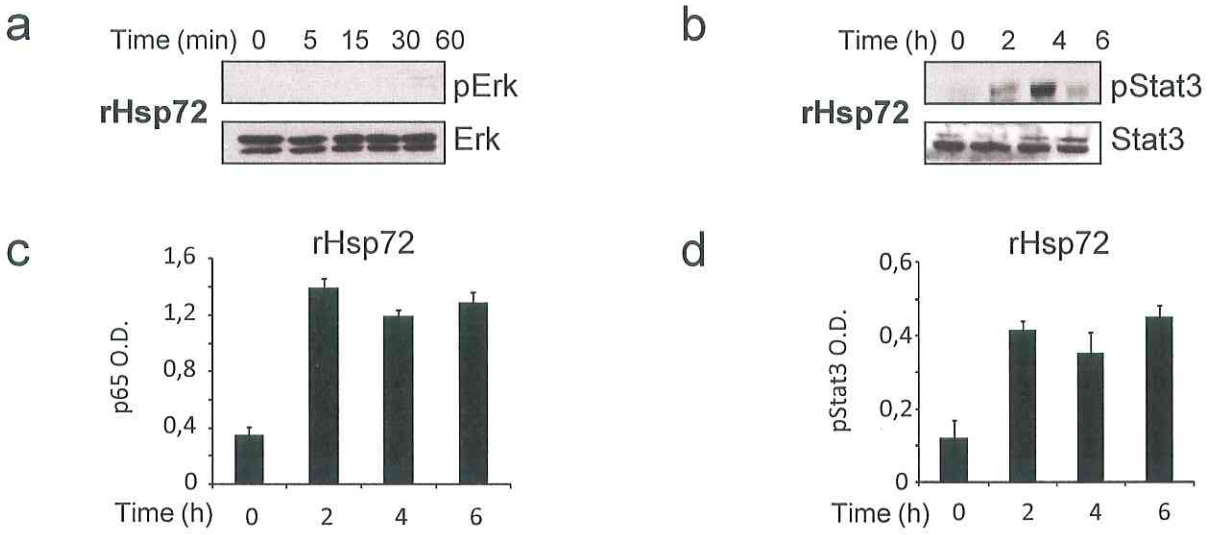


Figure S11. Erk ,Stat3 and NFκB activation by Hsp72 in MDSCs

MDSC clone were stimulated with rHsp72, pERK (a) and pStat3 (b) expression was determined western blotting.

MDSC clone were stimulated with rHsp72, then NFκB p65 (c) and Stat3 (d) transcriptional activity was determined with TransAm assay.

Supplemental figure 12

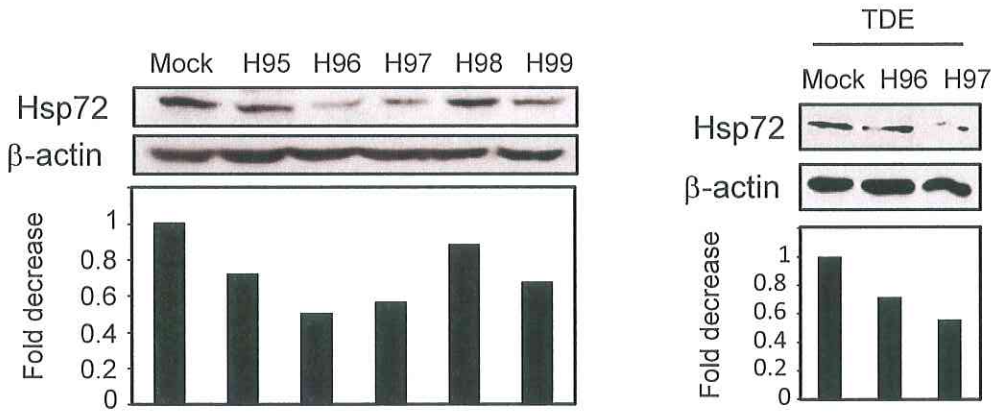


Figure S12. Hsp72 expression in CT26 clones transfected with ShRNA targeting Hsp72
Hsp72 expression was determined by western blotting in shRNA Mock CT26, and in 5 different shRNA Hsp72 CT26 clones. Hsp72 expression was also determined in TDE from shRNA Mock CT26 and shRNA Hsp72 CT26 clones H96 and H97.

Supplementary figure 13

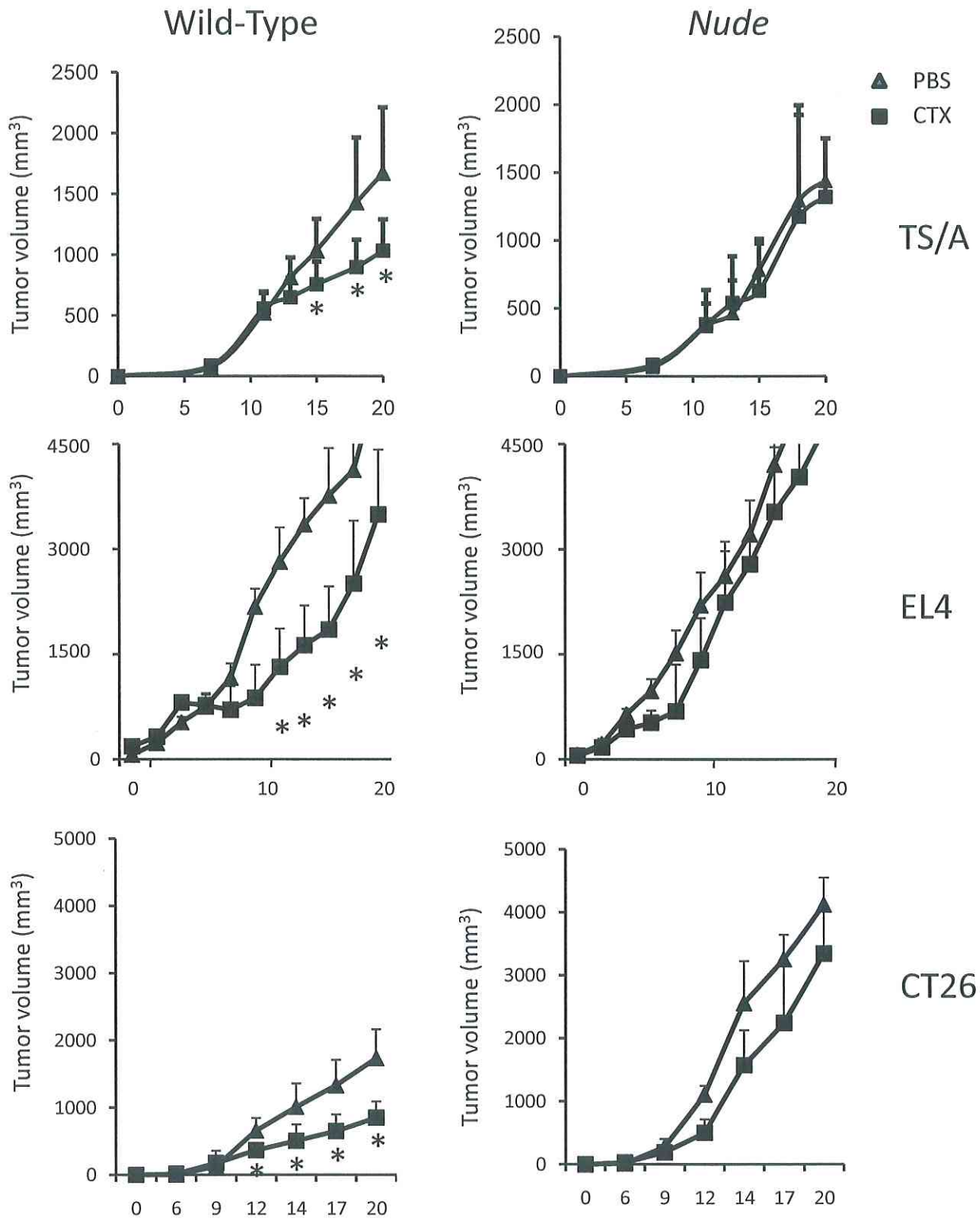


Figure S13. Tumor growth in wild type and *n ude* mice after cyclophosphamide treatment.
Wild-type and *nude* mice were subcutaneously injected with 1.10^6 TS/A, EL4 or CT26 tumor cells. 10 days later, mice were injected with PBS or cyclophosphamide (CTX) (100 mg/kg). Tumor volume was determined using a caliper.

Supplemental figure 14

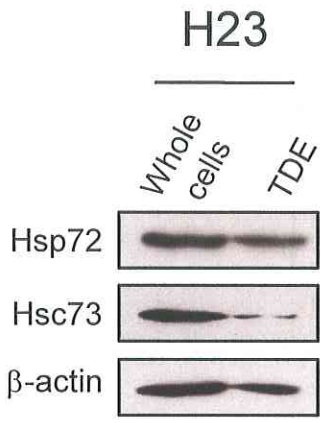


Figure S14.
Hsc73 and Hsp72 expression in H23 and H23 TDE was determined by western blotting.

6. Synthèse - Discussion:

Dans ce travail, nous mettons pour la première fois en évidence dans 3 modèles différents et chez l'homme la cascade des évènements moléculaires à l'origine de la phosphorylation de STAT3 dans les MDSCs et de l'acquisition des fonctions immunosuppressives de ces cellules.

Si pour expliquer l'expansion des MDSCs, le rôle des facteurs solubles d'origine tumorale comme la PGE2 ou le stem cell factor (SCF) a fait l'objet de nombreuses publications, les mécanismes moléculaires précis à l'origine de l'expansion et/ou des fonctions immunosuppressives de ces cellules sont en revanche régulièrement sujets à controverse. La phosphorylation de STAT3 induite dans les MDSCs par des facteurs tumoraux a été suggérée comme étant une voie de régulation majeure à l'origine de leur expansion (Nefedova et al., 2007) (Nefedova et al., 2004) (Cheng et al., 2008), mais sans démonstration formelle jusqu'ici. D'ailleurs, un travail récent de Kortylewski et al (Kortylewski et al., 2005) utilisant chez des souris porteuses de tumeur un système de KO conditionel STAT3 dans les cellules hématopoiétiques montre, outre que l'ablation de STAT3 dans les cellules hématopoiétiques s'accompagne d'une amélioration significative des fonctions des cellules dendritiques, des lymphocytes T, et des cellules NK dans un contexte tumoral, mais aussi que dans ce modèle, il existe une augmentation de l'accumulation de cellules Gr1+ CD11b+ infiltrant les tumeurs, allant donc à l'encontre d'un rôle important de STAT3 dans l'expansion des MDSCs.

Pour la première fois, nous démontrons avec ce travail le rôle prépondérant de l'activation de STAT3 dans les MDSCs non pas pour leur expansion, mais pour l'induction de leurs fonctions immunosuppressives. La base de cette démonstration repose sur l'étude dissociée des effets propres d'une part des facteurs solubles sécrétés par les tumeurs, et d'autre part des microvésicules d'origine cellulaires tumorales (exosomes) sur les

MDSCs. C'est ainsi que notre travail est le premier de la littérature à rapporter 2 voies moléculaires distinctes impliquées dans la biologie des MDSCs :

1) D'une part, le rôle des facteurs solubles d'origine tumorale contenus dans le surnageant tumoral ultracentrifugé, et impliqués dans le phénomène d'expansion des MDSCs, indépendamment de la phosphorylation de STAT3. Dans nos 3 modèles, le facteur majeur impliqué semble être le GM-CSF d'origine tumorale, qui est capable d'activer l'expansion des MDSC par la voie des MAP kinases et du facteur de transcription NF-κB. Ces mécanismes à l'origine de l'expansion des MDSCs n'impliquent pas la phosphorylation de STAT3.

2) D'autre part, le rôle des exosomes, impliqués dans l'acquisition des fonctions immunosuppressives des MDSCs, via la phosphorylation de STAT3. Cette voie d'activation des MDSCs, retrouvée dans nos 3 modèles est indépendante de l'activation de la voie des MAP kinases.

Dans un contexte de cancer, les exosomes sont habituellement considérés comme une source importante d'antigènes tumoraux susceptible d'induire une réponse immunitaire antitumorale (Andre et al., 2002) (Wolfers et al., 2001). Cependant, plusieurs travaux ont montré que les exosomes de cellules tumorales étaient également susceptibles d'induire l'inhibition des fonctions lymphocytaires T, l'inhibition de la différenciation des DCs (Valenti et al., 2006), ainsi que l'apoptose lymphocytaire T CD8 via l'expression de Fas-ligand (Abusamra et al., 2005). La capacité des exosomes de tumeurs à induire l'expansion de MDSCs et la phosphorylation de STAT3 a été également récemment mise en évidence par Xiang et al (Xiang et al., 2009). Cependant, dans ce travail, l'effet propre des facteurs solubles d'origine tumorale n'était pas étudié. D'autre part, les exosomes étudiés étaient issus de tumeurs animales établies et secondairement dissociées, contenant

donc également des exosomes issus des cellules du microenvironnement tumoral, potentiellement plus riche en PGE2, un facteur connu à l'origine du phénomène d'expansion des MDSCs (Sinha et al., 2007b). D'ailleurs dans ce travail, l'effet des exosomes sur les MDSCs était dépendant de leur concentration en PGE2, l'inhibition de la PGE2 abolissant les effets observés. Nos 3 modèles tumoraux (CT26, EL4 et TS/A) s'affranchissent de ce biais, puisque sans PGE2 dosable dans les exosomes ou le surnageant ultracentrifugé dérivé des tumeurs.

C'est ainsi que notre travail montre que les exosomes dérivés de cellules tumorales sont impliqués dans la phosphorylation de STAT3, mais pas dans l'expansion des MDSCs. Nous fournissons par ailleurs une explication mécanistique avec identification du facteur exosomal nécessaire à l'activation de STAT3, et aux fonctions immunosuppressives dans les MDSCs comme étant la Heat Shock Protein 72 (Hsp72), capable d'interagir avec TLR2 à la surface des MDSCs pour induire dans ces cellules une sécrétion autocrine d'IL-6, elle-même à l'origine de la phosphorylation de STAT3.

Nous confirmons par ailleurs in vivo ce mécanisme en montrant que les MDSCs issus de souris naïves et traitées avec des exosomes issus de lignées cancéreuses s'opposent à l'efficacité d'une vaccination anti tumorale chez l'animal, et que ce phénomène est aboli lors du renouvellement de l'expérience avec des exosomes issus de lignée KO pour Hsp72. Ce rôle délétère n'est probablement pas expliqué par un effet proangiogénique tumoral intrinsèque aux MDSCs, dans la mesure ou les MDSCs activées par les exosomes ne sécrètent pas dans nos modèles de VEGF ou de FGF, qui sont les 2 facteurs impliqués dans l'action proangiogénique des MDSCs (Kujawski et al., 2008), et que d'autre part leur rôle délétère sur la croissance tumorale ne s'observe pas chez les souris nudes, ou les souris non vaccinées, suggérant donc un rôle prépondérant dans le blocage de la réponse immunitaire. La protéine chaperonne Hsp72 est retrouvée en grande quantité dans de

nombreux types de tumeurs malignes, et son niveau d'expression est en général corrélé à des caractéristiques d'agressivité tumorale et un mauvais pronostic (Jaattela, 1999) (Calderwood et al., 2006), sans que les mécanismes explicatifs soient clairement décryptés. Classiquement, les Hsp sont plutôt considérés comme de bons immunoadjuvants, y compris dans le contexte de la réponse immunitaire antitumorale (Singh-Jasuja et al., 2000) (Multhoff, 2002) (Millar et al., 2003). Néanmoins elles semblent aussi capables d'inhiber la réponse immunitaire dans des modèles de maladies auto-immunes (Kingston et al., 1996) (Elias et al., 1990), en particulier Hsp72 (Aneja et al., 2006). Notre travail est le premier à proposer une hypothèse mécanistique dans un contexte tumoral chez l'animal et chez l'homme pour expliquer le rôle délétère de Hsp72 sur la réponse immunitaire. La littérature retrouve des études contradictoires sur les effets biologiques d'Hsp72, notamment sur ceux médiés par TLR2, certains travaux suggérant que les effets observés seraient en réalité ceux d'une contamination par des toxines comme le LPS (Tsan & Gao, 2009). Après nous être affranchi de ce risque par la recherche systématique d'une contamination par le LPS de nos réactifs, notre travail, grâce à une collaboration avec l'équipe de la plateforme de protéomique de Besançon a permis de montrer l'interaction physique entre Hsp72 et TLR2 par une approche de résonnance plasmonique de surface. Cette méthodologie a par ailleurs permis de montrer que l'interaction Hsp72-TLR2 était de nature hydrophobe, donc susceptible de ne pas être mise en évidence dans les expériences utilisant des milieux contenant des détergents.

Le rôle délétère de l'activation de la voie TLR2 dans le microenvironnement tumoral a été précédemment décrite par Kim et al (Kim et al., 2009), en rapport avec le versican, une molécule sécrété par certaines tumeurs. Le versican, en liant TLR2 est capable d'induire la sécrétion de TNF-α par les macrophages, dont dépend une partie de la métastasogénèse du modèle étudié, en l'occurrence le Lewis Lung Carcinoma (LLC). Notre travail montre

donc l'existence d'un nouveau ligand de TLR2 délétère pour la réponse immunitaire antitumorale, et indépendamment de la sécrétion de TNF-α, comme le montrent nos expériences.

Le lien entre exosomes de tumeurs et induction des propriétés immunosuppressives des MDSCs constaté dans notre travail ouvre de nouvelles voies de recherche pour le ciblage thérapeutique des MDSCs. Parmi celles-ci, nous nous sommes intéressés à une approche d'inhibition de la sécrétion d'exosomes par le diméthylamiloride (DMA), un inhibiteur de certaines pompes ioniques membranaires nécessaires à la sécrétion des exosomes (Gupta & Knowlton, 2007). In vitro, et chez l'animal porteur de tumeur, nos travaux montrent ainsi que le traitement par DMA diminue de façon significative la quantité d'exosomes produite par les cellules tumorales, que ceci s'accompagne d'une moindre phosphorylation de STAT3 dans les MDSCs et d'une diminution parallèle de leur capacité à inhiber la réponse T. De façon intéressante, l'amiloride est une molécule d'usage thérapeutique courant chez l'homme, puisqu'il s'agit d'un diurétique constituant le principe actif de plusieurs spécialités (Modamide®, Moduretic®). C'est ainsi que les mêmes effets biologiques ont été observés in vivo chez 11 patients porteurs de cancers avancés métastatiques et traités par Moduretic® pour des tableaux œdémateux.

De plus, dans nos 3 modèles tumoraux, le cotraitement par DMA des souris porteuses de tumeur améliore significativement l'effet antitumoral d'une chimiothérapie immunogène par cyclophosphamide, ou d'une immunothérapie par CpG, ouvrant ainsi des possibilités éventuelles à un traitement immunomodulateur des plus inattendus. Il s'agit du premier travail publié sur les effets potentiels antitumoraux de l'amiloride, en permettant de le relier à un effet biologique (diminution des exosomes).

Le ciblage thérapeutique des exosomes semble donc constituer une nouvelle approche pour briser les effets délétères des MDSCs sur la réponse immunitaire antitumorale. Nos travaux nous ont ensuite conduit à essayer de déterminer si parmi les molécules de chimiothérapie classiquement utilisés, certaines pouvaient avoir une action élective sur les MDSCs.

7. Article #2 :

"5-fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity".

Cancer Research. Avril 2010.

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

Microenvironment and Immunology

Cancer Research

5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell–Dependent Antitumor Immunity

Julie Vincent[1,2], Grégoire Mignot[1], Fanny Chalmin[1,2], Sylvain Ladoire[1,2,3], Mélanie Bruchard[1,2], Angélique Chevriaux[1,3], François Martin[1], Lionel Apetoh[4], Cédric Rébé[1,3], and François Ghiringhelli[1,2,3]

Abstract

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) accumulate in the spleen and tumor bed during tumor growth. They contribute to the immune tolerance of cancer notably by inhibiting the function of CD8 (+) T cells. Thus, their elimination may hamper tumor growth by enhancing antitumor T-cell functions. We have previously reported that some anticancer agents relied on T cell–dependent anticancer responses to achieve maximal efficacy. However, the effect of anticancer agents on MDSC has remained largely unexplored. In this study, we observed that gemcitabine and 5-fluorouracil (5FU) were selectively cytotoxic on MDSC. *In vivo*, the treatment of tumor-bearing mice with 5FU led to a major decrease in the number of MDSC in the spleens and tumor beds of animals whereas no significant effect on T cells, natural killer cells, dendritic cells, or B cells was noted. Interestingly, 5FU showed a stronger efficacy over gemcitabine to deplete MDSC and selectively induced MDSC apoptotic cell death *in vitro* and *in vivo*. The elimination of MDSC by 5FU increased IFN-γ production by tumor-specific CD8(+) T cells infiltrating the tumor and promoted T cell–dependent antitumor responses *in vivo*. Altogether, these findings suggest that the antitumor effect of 5FU is mediated, at least in part, by its selective cytotoxic action on MDSC. *Cancer Res; 70(8); 3052–61. ©2010 AACR.*

Introduction

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) have been identified as a population of immature myeloid cells with the ability to suppress T-cell activation in humans and mice (1–3). These cells accumulate in the blood, lymph nodes, bone marrow, and at tumor sites in many human cancers and animal tumor models, and inhibit both adaptive and innate immunity (4). They notably have the capacity to inhibit $CD8^+$ T cell antigen-specific reactivity by different mechanisms, mainly through their capacities to produce nitric oxide and radical oxygen species (5–7). MDSC are phenotypically characterized in mice by the expression of the cell surface antigens Ly-6C/G (both recognized by the Gr-1 antibody) and CD11b (2). A human counterpart of MDSC was proposed to lie in the $CD11b^+CD33^+CD14^-HLA\text{-}DR^-$ subset (8–11). Elimination of MDSC in mouse tumor models was shown to enhance antitumor responses, resulting in tumor regression. In this regard, strategies aimed at depleting MDSC *in vivo* using agents that target MDSC such as antibodies (12) or cytotoxic agents as gemcitabine have been shown to be the most promising (13–15). Gemcitabine is an antimetabolite chemotherapeutic agent implemented in the clinic since the 1990s and was previously reported to be capable of depleting MDSC in tumor-bearing mice (14).

We and others have previously reported that some anticancer agents, in addition to their direct cytotoxic effects on tumor cells, feature the ability to promote the activation of the immune system of the host, resulting in enhanced antitumor responses (16, 17). To investigate whether conventional anticancer agents were also able to affect the biology of MDSC, we designed an *in vivo* drug screening assay in which we tested the effect of anticancer agents on the proportion of MDSC within tumor-bearing mice. Our results show for the first time that 5FU was able to reduce the number of MDSC in tumor beds by triggering their apoptotic cell death. We also observed that 5FU-mediated MDSC depletion triggered an increase in IFN-γ production by tumor-specific $CD8^+$ T cells infiltrating the tumor bed and promoted a T-dependent antitumor effect. These results suggest that, beyond its direct cytotoxic effect

Authors' Affiliations: [1]INSERM Research Center 866, AVENIR Team; [2]Faculty of Medicine, University of Burgundy, [3]Anti-Cancer Center, Georges François Leclerc, Dijon, France; and [4]Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

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

J. Vincent and G. Mignot contributed equally to this work.

Corresponding Author: François Ghiringhelli, INSERM 7 Boulevard Jeanne d'Arc, Dijon 21000 France. Phone: 333-803-93353; Fax: 333-803-93434; E-mail: fghiringhelli@dijon.fnclcc.fr.

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

©2010 American Association for Cancer Research.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

on tumor cells, 5FU possesses immunogenic properties that rely on the *in vivo* elimination of MDSC.

Materials and Methods

Mice and cell lines. EL4, a thymoma cell line syngeneic of C57BL/6, were obtained from the American Type Culture Collection. MSC-1 and MSC-2 are immortalized MDSC cell lines obtained from BALB/c Gr-1$^+$ splenocytes and were given by V. Bronte (University of Padua, Padua, Italy). All cells were cultured in RPMI 1640 (Life Technologies) with 10% fetal bovine serum enriched with 0.4 mmol/L of sodium pyruvate, 4 mmol/L of HEPES, and antibiotics (penicillin, streptomycin, and amphotericin B). BALB/c, C57BL/6, and Nude mice were purchased from the Centre d'Elevage Janvier (Le Genest St. Isle, France), and used at 6 to 10 wk of age. TLR4$^{-/-}$ C57BL/6 mice were provided by Bernhard Ryffel (UMR 6218 CNRS, Orleans, France). Animals were all maintained according to Animal Experimental Ethics Committee Guidelines.

Tumor model. EL4 cells (2×10^5/100 μL PBS) were s.c. injected into the flank of mice. Mice were treated when tumor surface was ~100 mm^2. EL4 cancer cells were injected s.c. to C57BL/6 mice, *nude* mice, and TLR4$^{-/-}$ C57BL/6 mice. Tumor surfaces were measured thrice a week.

In vivo *chemotherapeutic treatments.* For *in vivo* experiments, mice received a unique injection of cyclophosphamide at 80 mg/kg of body weight, paclitaxel (36 mg/kg), raltitrexed (100 mg/kg), gemcitabine (120 mg/kg), doxorubicin (5 mg/kg), 5FU (50 mg/kg), or oxaliplatin (5 mg/kg). All drugs were administrated by i.p. injection, except for doxorubicin, which was injected i.v.

Isolation of MDSC from spleens and tumors. Spleens were mechanically dissociated and individual spleen cells obtained through a 70-μm cellular sieve, then centrifuged, counted and washed once with PBS. To maximize the presence of MDSC, single-cell suspensions prepared from the spleen of tumor-bearing mice were purified by magnetic selection of MDSC, using Gr1-phycoerythrin-cyanine 7 staining followed by anti–phycoerythrin-cyanine 7 magnetic beads (Miltenyi Biotec). Tumors were cut with scalpels in millimetric fragments that were then mechanically dissociated and passed through a 70-μm cellular sieve. Tumor cells were laid down on a leukocyte-separating cushion and centrifuged (1,000 × *g*, 20 min). Floating cells were collected, centrifuged, counted, and washed once with PBS.

Fluorescence-activated cell sorting analyses of Treg and MDSC. Five days after treatment with 5FU, cyclophosphamide, gemcitabine, oxaliplatin, or doxorubicin, tumor-bearing mice were sacrificed. Tumors and spleens were harvested and single cell suspensions were prepared. MDSC were stained with antibodies anti-CD11b, Ly-6C, and Ly-6G for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, they were analyzed by flow cytometry. Tregs were stained with anti-CD4, anti-CD25, and anti-CD3 monoclonal antibodies for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, they were permeabilized according to the manufacturer's protocol (Fix/Perm eBioscience), and stained with an anti-Foxp3 antibody (eBiosciences) for 20 min at 4°C. After one wash with cold PBS, cells were analyzed by flow cytometry.

Flow cytometry analyses. Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses were performed using phycoerythrin (PE) cyanine 7 (Cy7)–conjugated anti-Gr1, allophycocyanin (APC)-conjugated anti-CD11b, fluorescein isothiocyanate (FITC)–conjugated anti-Ly6C, PE-conjugated anti-Ly6G, peridinin-chlorophyll-protein (PerCP)–conjugated anti-CD4, APC-conjugated anti-CD3, PE-Cy7–conjugated anti-CD25, Efluor 450-conjugated anti-Foxp3, FITC-conjugated Annexin V, 7-aminoactinomycin D (7-AAD), APC-conjugated anti-B220, FITC-conjugated anti-CD11c, Alexa 700–conjugated anti-CMH2, PerCP–conjugated anti-CD8, 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), or Alexa 488–conjugated immunized rabbit serum. All antibodies were purchased from BD PharMingen or eBioscience. FITC-Flica caspase-3/7 apoptosis detection kits were purchased from Immunochemistry Technologies. FACS analyses were performed on a LSRII (BD Biosciences) using FACSDiva software (BD Biosciences) and analyzed with FlowJo (TreeStar).

Single cell suspension from tumors and spleens were centrifuged and saturated with 200 μL of PBS containing 2% mouse serum for 15 min at 4°C. After centrifugation, cells were stained for 20 min at 4°C with the following antibodies: CD11b, Ly-6C, and Ly-6G for MDSC; CD3, CD4, and B220 for lymphocytes; and CD11c, CD11b, CMH2, and CD8 for dendritic cells. All cells were stained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole or 7-AAD and analyzed by flow cytometry.

Intracellular stainings. For IFNγ intracellular staining, spleens, tumors, and tumor-draining lymph nodes were harvested and dissociated as reported above, 5 d after treatment. When MDSC were reinfused, they were injected i.v. 2 d after treatment. Leukocytes were then cultured *in vitro* in three different conditions: in anti-CD3–coated wells (0.1 μg/well of a 96-well tissue culture plate), in anti-CD3–coated wells with the addition of killed tumor cells (with a ratio of one killed tumor cell per two effectors), or in anti-CD3–coated wells with the addition of soluble anti-CD3 (2 μg/mL), soluble anti-CD28 (2 μg/mL), and interleukin-2 (1,000 UI/mL; Proleukin, Chiron). Stimulation was maintained for 16 h, with brefeldin A (BD GolgiPlug) for the last 4 h. Cells were then harvested and stained for CD4, CD8, and intracellular IFNγ using the manufacturer's recommendations.

Apoptosis assays. Purified MDSC were cultured for 24 h *in vitro* with varying doses of 5FU or gemcitabine. *In vivo*, tumor-bearing mice were treated with 5FU or gemcitabine. Tumors and spleens were harvested and dissociated as described previously and then stained as follows: (*a*) Annexin V/7-AAD: MDSC were washed twice with cold PBS and prepared according to the manufacturer's protocol (BD PharMingen). After staining for 15 min at room temperature with Annexin V and 7-AAD, cells were analyzed by flow cytometry; (*b*) Flica 3/7: cells were manipulated according to the manufacturer's protocol (ImmunoChemistry Technologies). Briefly, cells were cultured for 1 h in the presence of FAM-Flica after pretreatment with PBS or varying doses of 5FU. Cells were then washed and analyzed by flow cytometry in the presence of 7-AAD. In some experiments, cell death was measured using the phenazine methosulfate

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

(PMS)/3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay (Promega). In PMS/MTS experiments, cells were treated for 1 h with 5FU at varying concentrations in round-bottomed 96-well plates. PMS/MTS was added after 48 h and the plates were read at 540 nm.

Detection of calreticulin expression on tumor cells. EL4 cancer cells were cultured for 24 h in complete culture medium supplemented or not with doxorubicin, gemcitabine, or 5FU. Cells were stained as described elsewhere (18). Briefly, cells were saturated with 200 μL of PBS supplemented with 2% rabbit serum before being stained with a rabbit anti-calreticulin antibody for 20 min at 4°C. Cells were permeabilized or not with BD PharMingen, cells were incubated with anti-calreticulin rabbit antibody (AbCam) for 20 min at 4°C. Cells were then analyzed by flow cytometry.

Thymidilate synthase expression. Total RNA was extracted using Trizol (Invitrogen). One hundred to 300 ng of RNA was reverse-transcribed into cDNA using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, random primers, and recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (Promega). cDNA were quantified by real-time PCR using a SYBR Green Real-time PCR kit on a 7500 Fast detection system (Applied Biosystems). Relative mRNA levels were determined using the ΔCt method. Values were expressed relative to mouse cyclophilin A. The same results were obtained when normalized with mouse L32 and mouse hypoxanthine phosphoribosyltransferase (data not shown). The sequences of the oligonucleotides used in this study were as follows: mouse cyclophilin A (forward, 5′-GGCCGATGACGAGCCC-3′; reverse, 5′-TGTCTTTGGAACTTTGTCTGCAA-3′) and mouse thymidylate synthase (TS; forward, 5′-caatggatcccgagattttc-3′; reverse, 5′-gtcatcagggttggttttga-3′).

Statistical analysis. Tests used were Student's *t* test or Mann-Whitney test for parametric and nonparametric means comparison. All tests were performed with GraphPad Prism software.

Results

5FU selectively depletes MDSC. We tested the capacity of several cytotoxic agents used in conventional cancer chemotherapy to deplete MDSC *in vivo*. To this end, we used cyclophosphamide (an alkylant agent), doxorubicin (a topoisomerase II inhibitor), oxaliplatin (a platinum compound promoting DNA adducts), paclitaxel (a tubulin poison), gemcitabine (a deoxycytidine analogue that inhibits ribonucleotide reductase), and 5FU and raltitrexed [two antimetabolite agents that target thymidilate synthase (TS)]. These drugs were injected once in mice bearing 100 mm^2 EL4 thymoma subcutaneous tumors. In our model, MDSC were found to be abundant within the spleens and tumor beds of tumor-bearing mice before chemotherapeutic treatment (Fig. 1A), as previously described (19). Five days after injection of the cytotoxic agent, we observed that only gemcitabine and 5FU were able to significantly decrease the number of MDSC in both the spleen and tumor bed (Fig. 1A; see Supplementary Fig. S1). Interestingly, 5FU had a more drastic effect than gemcitabine in decreasing MDSC frequency in tumor-bearing hosts. It is noteworthy that 5FU did not alter the frequency of the other cell populations within the spleen, except for a non-significant tendency for B cells to increase, compensating the loss of MDSC (Fig. 1B).

MDSC have been described to encompass at least two cell populations: granulocytic cells, $Ly6G^{+}Ly6C^{int}$, and monocytic cells, $Ly6G^{-}Ly6C^{hi}$ (9, 10). We did not find any preferential action from either 5FU or gemcitabine on any MDSC subtype. Indeed, both drugs were similarly effective against granulocytic and monocytic MDSC (Fig. 1C). We also monitored the duration of MDSC depletion induced by 5FU, and found that the nadir was around day 5 posttreatment, then MDSC number increased following tumor growth (Fig. 1D).

Thus, we show that, among the seven cytotoxic agents assayed, only 5FU (and to a lesser extent gemcitabine) was able to lower MDSC number within the tumor bed and spleen of cancer-bearing hosts.

5FU triggers MDSC apoptosis. The disappearance of MDSC from tumors and spleens could possibly be explained by the direct cytotoxic effect of 5FU, which could preferentially trigger their death. We therefore tested whether MDSCs were undergoing apoptosis after 5FU treatment.

Because of spontaneous rapid death of *ex vivo* MDSC, we took advantage of immortalized MDSC cell lines (20). First, we cultured established murine MDSC cell lines in the presence of various concentrations of 5FU and evaluated MDSC cell death using both Annexin V/7-AAD labeling (Fig. 2A, left) and the detection of activated caspases-3 and -7 (Fig. 2A, right). Both methods showed that 5FU triggered MDSC apoptotic cell death in a dose-dependent manner. *In vivo*, we could also note an increase in the presence of activated caspases-3 and -7 in splenic MDSC from 5FU-treated tumor-bearing mice compared with untreated mice, although other immune cells were not killed by 5FU at this dose (data not shown). To our surprise, we also noted that 5FU *in vitro* at low concentrations was more toxic in MSC cell lines than in tumor cells. Indeed, a 20-fold to 50-fold higher concentration of 5FU was required to kill EL4 tumor cells relative to MSC (Fig. 2B). Of note, freshly sorted MDSC underwent spontaneous and rapid death, but surviving cells were also 5FU-sensitive (data not shown).

The cytotoxic action of 5FU was mediated by its metabolites which inhibit TS. Low expression of TS has been shown to be involved in 5FU sensitivity in tumor cells (21–23); therefore, we hypothesized that MDSC's sensitivity to 5FU might be related to lower TS expression. We then performed quantitative PCR on cell extracts to test TS expression (Fig. 2C). We found that MDSC and MSC cell lines expressed fewer TS than splenocytes or tumor cells, thus suggesting that MDSC sensitivity to 5FU may be linked to their low expression of TS. On the whole, these results show that *in vitro* and *in vivo* low concentrations of 5FU selectively induced MDSC apoptotic cell death.

5FU immunogenic effects are primarily attributable to MDSC depletion. Chemotherapeutic agents have been shown to alter the antitumor response (16). Specifically,

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

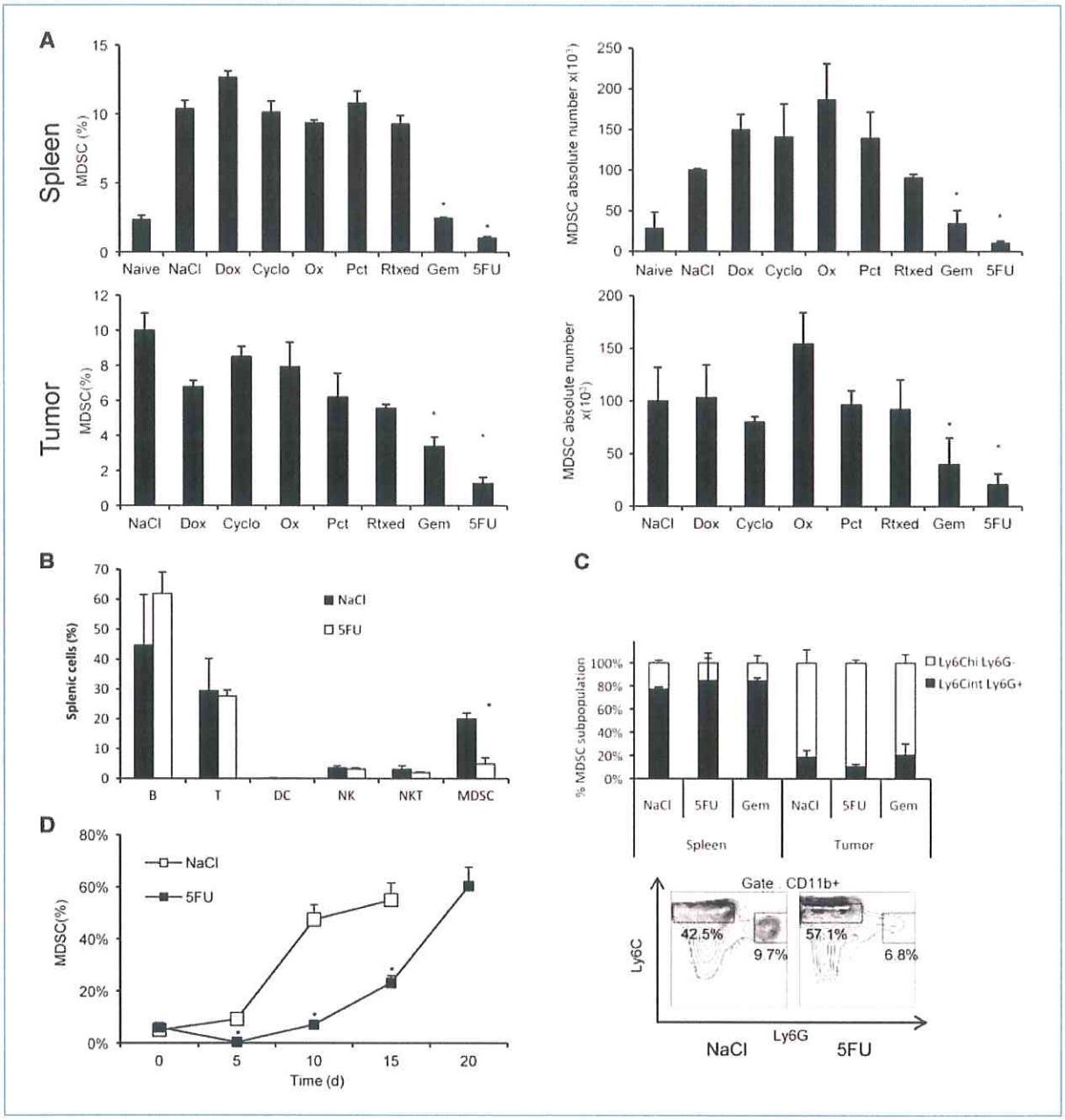


Figure 1. 5FU and gemcitabine eliminate MDSC *in vivo*. A, mice were tumor-free (Naïve) or inoculated s.c. with EL4 tumor cells. Five days after the indicated chemotherapy (NaCl, control mice; Dox, doxorubicin; CTX, cyclophosphamide; Ox, oxaliplatin; Pct, paclitaxel; Rtxed, raltitrexed; Gem, gemcitabine; 5FU, 5-fluorouracil), spleens and tumors were harvested and MDSC infiltration was determined by FACS analysis. Graphics show the percentage of splenic and tumor infiltration MDSC and the absolute number of MDSC in spleen and tumors. B, effect of 5FU on other splenic cell populations. C, the percentages of monocytic ($Ly6C^{hi}Ly6G^{-}$) and granulocytic ($Ly6C^{int}Ly6G^{+}$) subpopulation of MDSC after 5FU treatment was determined by FACS analysis. Bottom, representative FACS. D, tumor-bearing mice were treated or not with 5FU, and spleens were harvested at various posttreatment times. Graphic shows the percentage of splenic MDSC. Columns, mean; bars, SEM. The experiments were performed twice with similar results, $n = 4$ per group (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

some chemotherapeutic agents could promote Treg cell killing (24–26) or affect the biology of dendritic cells (27, 28). We therefore tested if, in addition to its action on MDSC, 5FU exerted some of these reported effects on the immune system. To this end, we first compared 5FU and cyclophosphamide for their ability to trigger regulatory T-cell depletion *in vivo*. Although cyclophosphamide administration led to a reduction in Treg numbers in the tumor bed and in the

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

spleen, 5FU had no such effect in the same setting (Fig. 3A). Similarly, we verified that 5FU (in contrast to mafosphamide) exerts no toxic effect on regulatory T cells *in vitro* (data not shown).

Cancer chemotherapy may also enhance the anticancer immune response by promoting the maturation of antigen-presenting cells. We thus tested the effect of a single systemic injection of 5FU, gemcitabine, or Gram-negative bacteria lipopolysaccharide on the maturation pattern of splenic dendritic cells. In this setting, although lipopolysaccharide induced a massive upregulation of CD86 and CD40, 5FU administration did not significantly alter the expression of those markers, ruling out a putative involvement of 5FU in inducing dendritic cell maturation (Fig. 3B).

We have previously shown that the *in vivo* efficacy of doxorubicin relied on its ability to trigger an "immunogenic" cell death of cancer cells. Treatment of tumor cells by doxorubicin leads to the cell surface exposure of calreticulin, which is responsible for tumor cell phagocytosis, and to the release of HMGB1, which is critical for the Toll-like receptor 4 (TLR4)–mediated cross-presentation of tumor antigens from dendritic cells to T cells (29). To test the ability of 5FU to trigger an immunogenic form of cell death *in vivo*, we first monitored the expression of cell surface calreticulin on EL4 cells treated

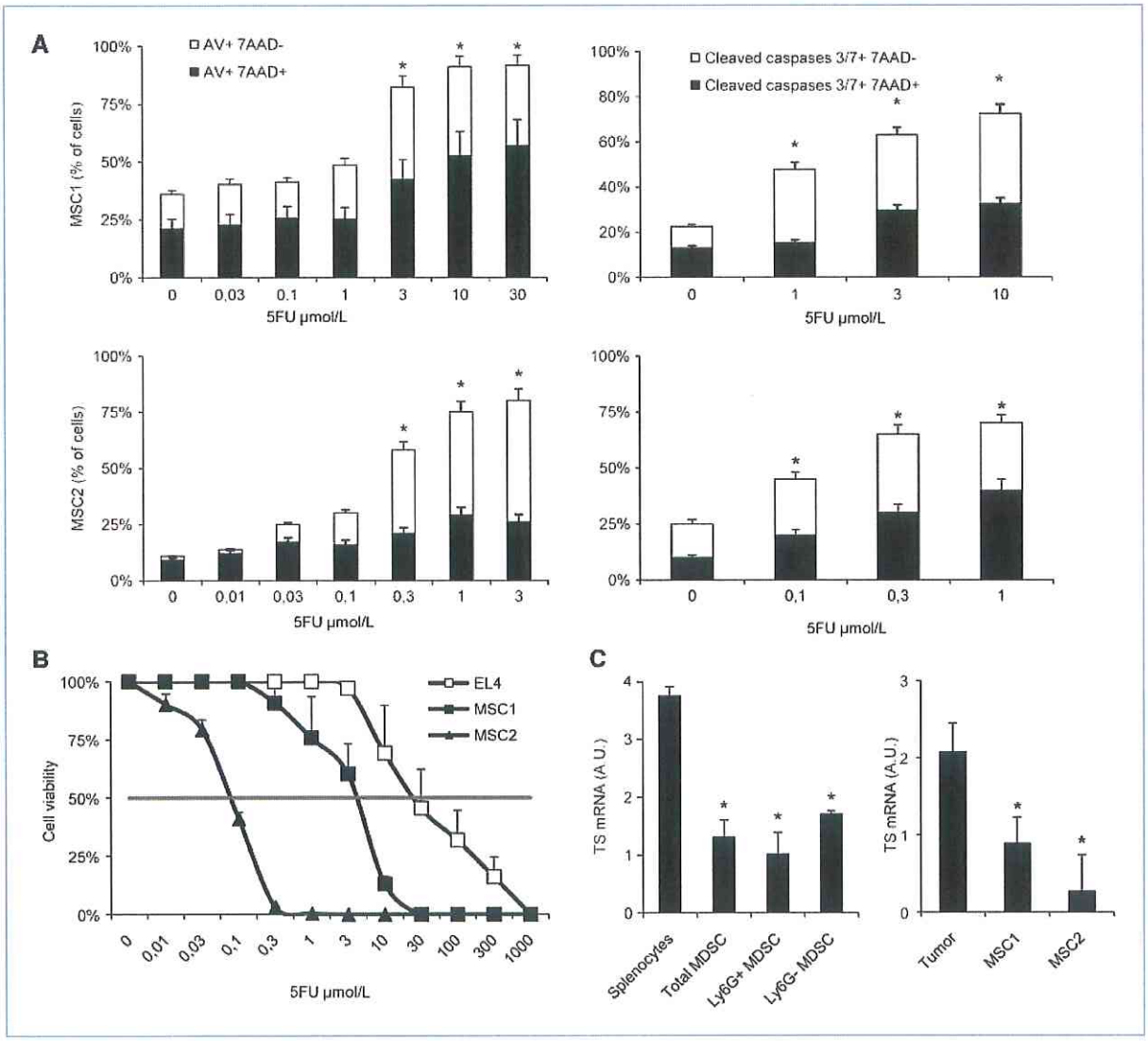


Figure 2. 5FU induces MDSC apoptosis. A, the effect of 5FU on MSC1 and MSC2 cell lines was tested *in vitro* for apoptosis induction. FACS analysis of Annexin V/7-AAD staining (left) or activated caspase-3/7-AAD (right) staining results, respectively, in MSC1 (top) or MSC2 (bottom). B, compared dose-effect relation of 5FU-induced cell death on MSC cell lines and EL4 tumor cell lines. The experiments were performed thrice with identical results. C, quantitative RT-PCR for TS was performed on extracts from the indicated cellular preparation. Total MDSC were prepared as usual, granulocytic ($Ly6G^+$) or monocytic ($Ly6G^-$) cells were sorted by FACS from spleens of tumor-bearing mice. The experiments were performed twice with similar results (*, $P < 0.05$).

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

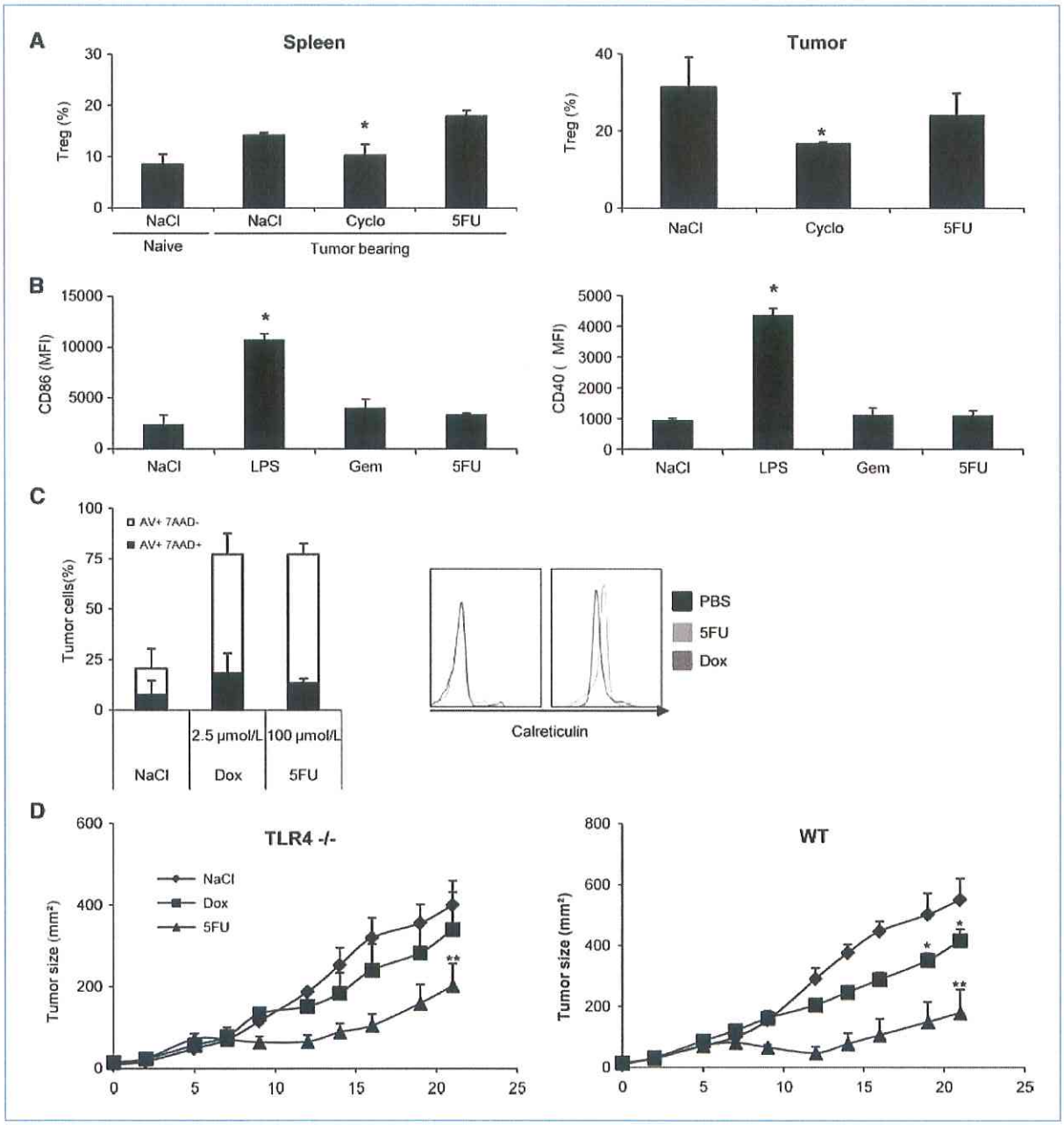


Figure 3. 5FU immunomodulatory effects are restrained to MDSC depletion. A, effect of 5FU or cyclophosphamide on Tregs. Mice bearing EL4 tumors either received no treatment (PBS) or one s.c. administration of cyclophosphamide (Cyclo) or 5FU. Splenic (top) or tumor-infiltrating (bottom) Tregs, respectively, 5 d after drug administration. B, effect of 5FU or gemcitabine on splenic dendritic cell maturation. Tumor-free mice received an injection of lipopolysaccharide (LPS), gemcitabine (Gem), or 5FU. Twenty-four hours after treatment, dendritic cells were isolated from the spleen and examined by flow cytometry after labeling with antibodies to CD86 (left) or CD40 (right). MFI, mean fluorescence index. C, tumor cells were treated with PBS, doxorubicin (Dox), or 5FU then mortality was evaluated with Annexin V/7-AAD labeling (left), membrane calreticulin presence was assayed by flow cytometry (right). D, effect of 5FU and doxorubicin on tumor growth in WT (right) or TLR4$^{-/-}$ (left) mice (n = 5 per group). The experiments were performed twice with identical results (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$).

with 5FU or doxorubicin as a positive control. Although doxorubicin treatment could trigger cell surface expression of calreticulin, we failed to show any significant upregulation of calreticulin by treating EL4 cells with 5FU (Fig. 3C). We then compared the effect of 5FU on EL4 tumor growth in wild-type (WT) and TLR4-deficient mice. Although the efficacy of doxorubicin was largely impaired in TLR4-deficient hosts, we observed that 5FU had a TLR4-independent

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

antitumor activity (Fig. 3D). These results suggest that the antitumor effects of 5FU cannot be explained by its ability to trigger an immunogenic form of tumor cell death. Altogether, these data show that the 5FU immune-mediated effects specifically rely on the elimination of MDSC.

5FU-induced specific activation of CD8+ T cells. As MDSC are known to inhibit antigen-dependent CD8+ T cell proliferation and Tc1 differentiation (3), we tested whether 5FU could affect Th1- or Tc1-specific polarization in tumor-bearing animals. To this end, leukocytes from the spleen, tumor-draining lymph nodes, and tumor bed from EL4 tumor-bearing mice treated or not with 5FU were stimulated either with dead EL4 tumor cells or nonspecifically with anti-CD3 plus anti-CD28 antibodies. We then performed intracellular staining for IFN-γ production. We did not detect any significant IFN-γ production by either $CD4^+$ or $CD8^+$ T cells obtained from spleen or draining lymph node of tumor-bearing animals, even after specific T-cell restimulation (data not shown). In contrast, antigen-specific restimulation of tumor-infiltrating $CD8^+$ T cells (but not $CD4^+$ T cells) produced detectable levels of IFN-γ, which was enhanced after 5FU treatment of EL4 tumor-bearing mice (Fig. 4A and B). Moreover, adoptive transfer of MDSC from tumor-bearing mice drastically impeded IFN-γ production by $CD8^+$ T cells (Fig. 4A and B). These data collectively suggest that the selective cytotoxic activity of 5FU on MDSC could locally enhance the Tc1 polarization of $CD8^+$ T cells.

5FU exerts an MDSC-dependent antitumor effect and acts synergistically with the depletion of regulatory T cells. We first treated WT or nude mice bearing a large EL4 tumor with gemcitabine or 5FU (Fig. 5A and B). These two treatments efficiently slowed down tumor growth in WT mice but exerted only a minor effect on tumor growth in nude mice (Fig. 5A and B). These data show that these chemotherapies depend on T cells to mediate their activity. In addition, we observed in WT mice bearing tumors that an adoptive transfer of MDSC from tumor-bearing mice 1 day after 5FU injection blunted the *in vivo* antitumor effect of 5FU (Fig. 5C). Altogether, these data suggest that 5FU exerts its activities through the elimination of MDSC and permits the restoration of T cell–dependent antitumor responses.

Tregs represent another population of immunosuppressive cells that exerts a major negative effect on antitumor immune response (25, 26, 30). We showed previously that a low dose of cyclophosphamide could deplete this population and restore latent antitumor immunity (25, 26). Cyclophosphamide had a T-dependent antitumor effect that was annihilated by an adoptive transfer of Treg cells (25, 30). These

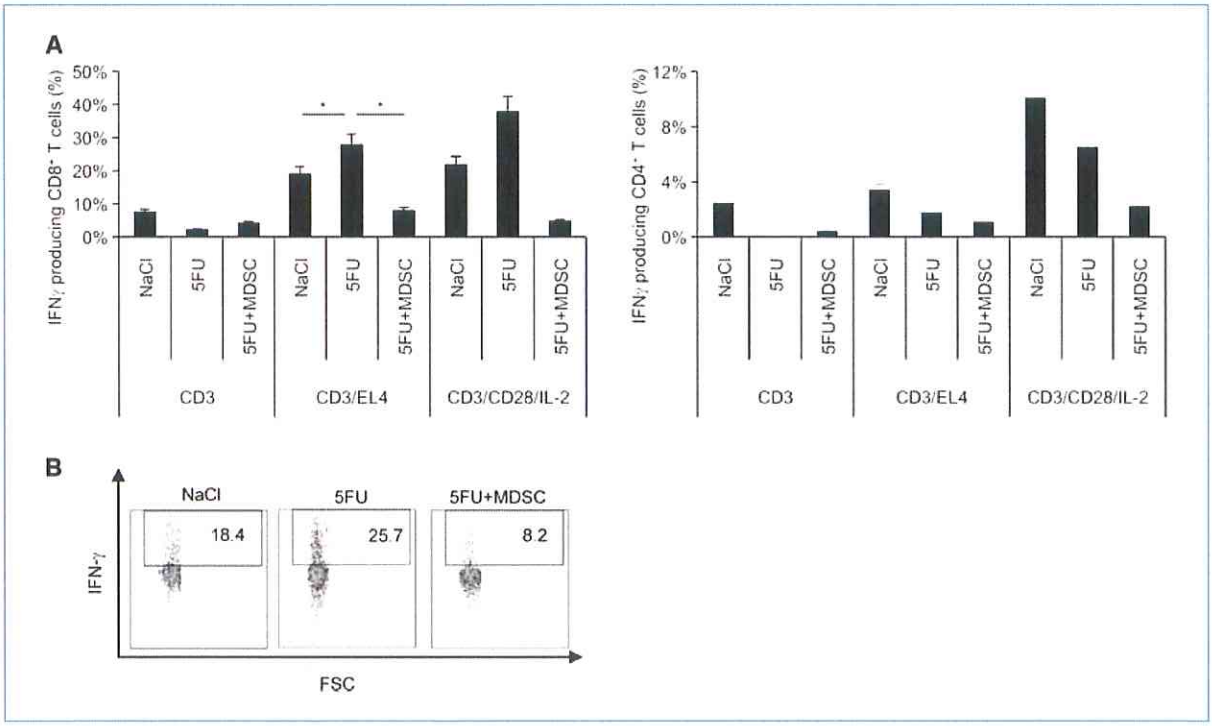


Figure 4. 5FU-induced specific activation of CD8+ T cells. A, EL4 tumor-bearing mice were treated with 5FU (or NaCl for controls; 50 mg/kg body weight) and injected (when indicated) with 5×10^6 MDSC isolated from the spleen of tumor-bearing mice. Tumor-infiltrating leukocytes isolated 5 d after 5FU treatment were stimulated with immobilized anti-CD3 alone, anti-CD3 plus killed EL4 cells, or anti-CD3 plus anti-CD28 for 12 h. IFN-γ production in tumor-infiltrating T CD8 (left) or T CD4 (right) lymphocytes, respectively. B, representative FACS showing the effect of 5FU treatment on IFN-γ production by $CD8^+$ T lymphocytes from EL4 tumor infiltrate and its modulation by passive transfer of MDSC. The experiments were performed thrice with identical results (*, $P < 0.05$).

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

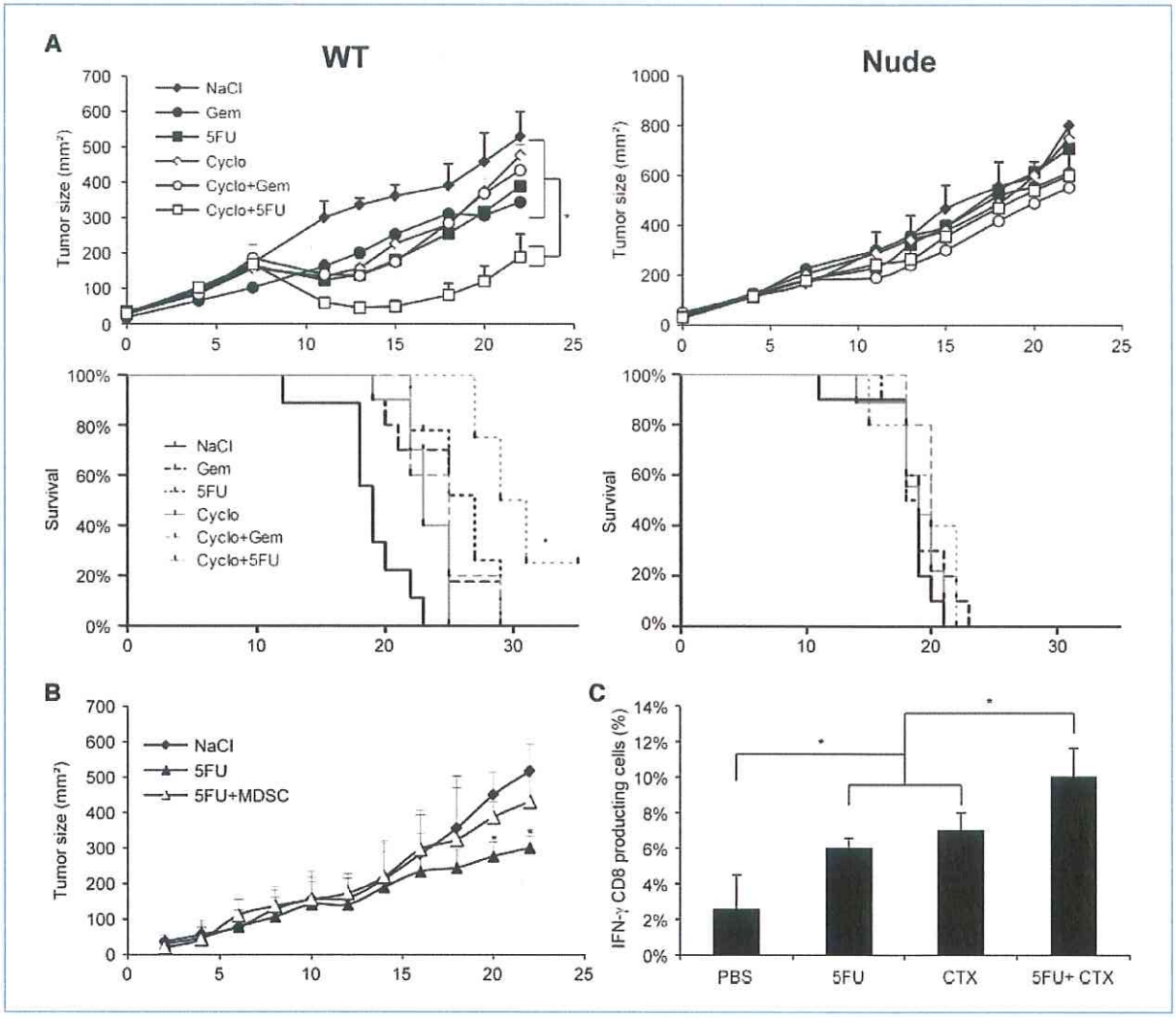


Figure 5. The antitumor effect of 5FU relies on MDSC. A, WT (left) or nude (right) mice were injected with 2 × 10^5 EL4 cells and treated when tumor reached 100 mm^2 with one s.c. injection of the indicated chemotherapy. WT (left) or nude (right) mice, respectively. Tumor growth was measured every 2 d (top) and survival was monitored (bottom; n = 10). B, WT mice were treated when tumor reached 200 mm^2 with one s.c. injection of 5FU (50 mg/kg) or 5FU plus an adoptive transfer of 5 × 10^6 splenic MDSC cells from tumor-bearing mice (n = 10). Top, tumor growth in each group; bottom, mice survival using Kaplan-Meier curves. The experiments were performed thrice with similar results. C, WT mice were injected with 2 × 10^5 EL4 cells and treated when tumor reached 100 mm^2 with the combination of 5FU (50 mg/kg) plus cyclophosphamide (CTX, 80 mg/kg), or 5FU alone or were left untreated. Cells isolated from tumor-infiltrating lymphocytes were stimulated with anti-CD3 plus dead EL4 cells. Histogram represents the percentage of IFN-γ–producing CD8 T cells in tumor-infiltrating CD8 T lymphocyte (n = 4). The experiments were performed twice with similar results (*, $P < 0.05$).

data provided the impetus to combine Treg and MDSC depletion to enhance T-cell functions and antitumor responses. The two combinations (cyclophosphamide plus gemcitabine and cyclophosphamide plus 5FU) showed a synergic effect in WT mice compared with monotherapies but had little or no effect on tumors growing in nude mice (Fig. 5A and B). Interestingly, the cyclophosphamide + 5FU combination showed a significantly superior antitumor effect compared with the cyclophosphamide + gemcitabine combination in immunocompetent mice, and mice survival was improved in the cyclophosphamide + 5FU group (P = 0.04, log rank test). In line with the *in vivo* results, we verified *ex vivo* that the combination of 5FU and cyclophosphamide enhanced the number of tumor-specific IFN-γ producing specific intratumoral CD8 T cells compared with monotherapies (Fig. 5D).

Altogether, these data show that cyclophosphamide and 5FU could exert a T-dependent synergistic antitumor effect and could lead to the cure of some animals bearing large tumors.

Discussion

The recognition that immune suppression is crucial to promote tumor progression, which might explain the failure of some cancer vaccines, has resulted in a paradigm shift

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

regarding approaches to cancer immunotherapy. It indeed becomes clear that successful cancer immunotherapy will only be achieved when associated with the elimination of suppressive cells (31–33). Two major immunosuppressive cell types are mainly involved in tumor-induced immunosuppression: Tregs and MDSC. The elimination of Treg cells using a low dosage of cyclophosphamide as a metronomic regimen proved its efficacy in many rodent models as well as in humans (25, 26, 30, 34–37). Many strategies have been tested to dampen the immunosuppressive actions of MDSC, including treatments designed to favor their differentiation, or to inhibit their expansion or their inhibitory function (13, 38). However, the most promising results have been obtained with the selective depletion of these cells. Some groups tested the *in vivo* administration of monoclonal antibodies against Gr-1, aimed at depleting Gr-1$^+$ MDSC. This treatment gave interesting results in restoring T cell antitumor activity, both in terms of general reduction of tumor progression and in terms of prevention of relapse (39, 40). Unfortunately Gr-1 is not a specific marker of MDSC as it is also expressed in granulocytes, implying the possibility that tumor-bearing hosts treated with such depleting antibodies might undergo opportunistic infections. This consideration emphasizes the interest of screening drugs aimed at selectively depleting MDSC. It was recently shown that several cytotoxic agents used for cancer chemotherapy not only featured a direct cytotoxic effect on tumor cells, but also featured an interesting side effect by eliminating leukocyte subpopulations involved in the suppression of antitumor immunity (35). However, up to now, only gemcitabine has been shown to be able to eliminate MDSC, one of the major cell populations involved in tumor tolerance (14, 15).

Here, we show for the first time that 5FU was also able to reduce the number of MDSCs not only in the spleen but also in the tumor bed. The effect of 5FU on MDSC was obtained at low doses and seemed to be selective as we did not observe any *in vivo* drop in T cells, B cells, or dendritic cell numbers. This effect was mediated by inducing the apoptotic death of MDSC with activation of caspase-3 and caspase-7 both *in vitro* and *in vivo*. The effect of 5FU lasted for ~10 days *in vivo*, and could be related to a lower TS expression in this cell type. Moreover, the effect of 5FU on MDSC seemed more pronounced than the effect of gemcitabine, thus suggesting that this agent could be more efficient in enhancing antitumor immunity.

MDSC are well known inhibitors of CD8$^+$ T cell activation (3). We showed here for the first time that 5FU induces MDSC depletion and could enhance the intratumoral CD8$^+$ T cell antigen-specific capacity to produce IFN-γ. This effect was reversed by adoptive transfer of MDSC thus providing the evidence that reinfused MDSC could migrate to the tumor and blunt T cell reactivity *in situ*. When monitoring tumor growth, we observed that its inhibition by 5FU was strictly dependent on T cells and was also completely hindered by MDSC transfer. Based on these results, we propose that most of the antitumor effect of 5FU could be explained by its capacity to eliminate MDSC and restore CD8$^+$ cell capacity to produce IFN-γ. Finally, we have shown that the association of Treg and MDSC depletion obtained with cyclophosphamide and 5FU, respectively, has a synergistic effect on the suppression of tumor growth. This data is of importance because it shows that therapies acting on tumor immunosuppression may be sufficient to restore T-cell function and obtain therapeutic effects. The antitumor activity obtained by the 5FU-cyclophosphamide association in our experimental tumor model strongly suggests that controlling tumor-induced tolerance is at least of equal importance as activating tumor immunity with a tumor vaccine for the purpose of obtaining immune eradication of cancers.

5FU, an analogue of uracil, the metabolites of which misincorporate in RNA and DNA and inhibit TS, is a cytotoxic agent widely used in the treatment of colorectal and breast cancers, as well as cancers of the aerodigestive tract (21). Its efficacy in cancer chemotherapy is currently considered to result directly from its toxic effect on tumor cells. Here, we report that 5FU could also hinder tumor growth by selectively destroying the tumor-associated MDSC, thus inhibiting their suppressive effect on the T cell–mediated control of the tumor. Even if this effect was briefly discussed in a very recent review (33), our report is the first one to actually bring up experimental evidence on the cytotoxic effect of 5FU on MDSC. Interestingly, in our experimental tumor model, the effect of 5FU on MDSC was predominant over its direct effect on tumor cells, thus explaining why the antitumor effect of 5FU is hampered by MDSC adoptive transfer. In summary, the results of our study would support the addition of 5FU to the expanding list of chemotherapeutic agents whose antitumor effects depend, at least in part, on their capability to enhance the anticancer immune response (16).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Grant Support

Fondation de France, ARC, Ligue Départementale Comité de Cote d'Or; ARC (G. Mignot); Conseil Régional Bourgogne/INSERM (F. Chalmin); and the European Molecular Biology Organization (L. Apetoh).

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

Received 10/06/2009; revised 01/12/2010; accepted 01/27/2010; published OnlineFirst 04/06/2010.

References

1. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. J Immunol 2009;182:4499–506.
2. Gabrilovich DI, Bronte V, Chen SH, et al. The terminology issue for myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res 2007;67:425, author reply 6.
3. Gabrilovich DI, Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nat Rev Immunol 2009;9:162–74.

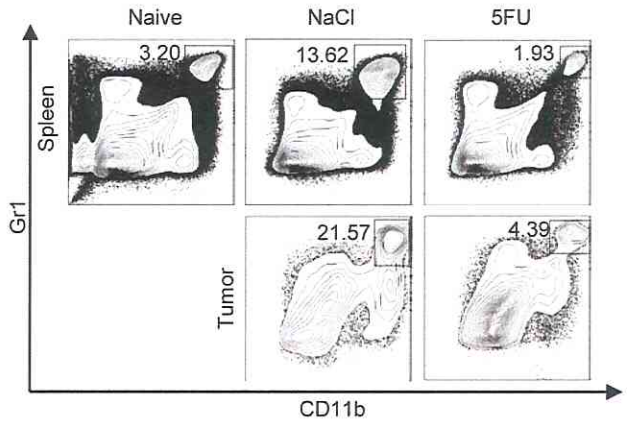
Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Published OnlineFirst April 13, 2010; DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-3690

4. Gallina G, Dolcetti L, Serafini P, et al. Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. J Clin Invest 2006;116:2777–90.
5. Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, et al. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. J Exp Med 2005;202:931–9.
6. Nagaraj S, Gupta K, Pisarev V, et al. Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. Nat Med 2007;13: 828–35.
7. Kusmartsev S, Gabrilovich DI. Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. J Leukoc Biol 2003;74: 186–96.
8. Mandruzzato S, Solito S, Falisi E, et al. IL4Rα+ myeloid-derived suppressor cell expansion in cancer patients. J Immunol 2009;182: 6562–8.
9. Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. J Immunol 2008; 181:5791–802.
10. Movahedi K, Guilliams M, Van den Bossche J, et al. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. Blood 2008;111: 4233–44.
11. Almand B, Clark JI, Nikitina E, et al. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. J Immunol 2001;166:678–89.
12. Bronte V, Serafini P, Apolloni E, Zanovello P, et al. Tumor-induced immune dysfunctions caused by myeloid suppressor cells. J Immunother 2001;24:431–46.
13. Marigo I, Dolcetti L, Serafini P, Zanovello P, Bronte V. Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. Immunol Rev 2008;222:162–79.
14. Suzuki E, Kapoor V, Jassar AS, Kaiser LR, Albelda SM. Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. Clin Cancer Res 2005;11:6713–21.
15. Ko HJ, Kim YJ, Kim YS, et al. A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. Cancer Res 2007;67:7477–86.
16. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. Nat Rev Immunol 2008;8:59–73.
17. Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. Trends Mol Med 2008;14:141–51.
18. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. EMBO J 2009;28:578–90.
19. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, et al. Membrane Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates pStat3 dependent immunosuppressive function of myeloid derived suppressor cells. J Clin Invest 2010:120.
20. Apolloni E, Bronte V, Mazzoni A, et al. Immortalized myeloid suppressor cells trigger apoptosis in antigen-activated T lymphocytes. J Immunol 2000;165:6723–30.
21. Longley DB, Harkin DP, Johnston PG. 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. Nat Rev Cancer 2003;3:330–8.
22. Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. Eur J Cancer 1995;31A:1299–305.
23. van Kuilenburg AB, De Abreu RA, van Gennip AH. Pharmacogenetic and clinical aspects of dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. Ann Clin Biochem 2003;40:41–5.
24. Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, et al. Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-β-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. J Exp Med 2005;202: 919–29.
25. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. Eur J Immunol 2004;34:336–44.
26. Roux S, Apetoh L, Chalmin F, et al. CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. J Clin Invest 2008;118:3751–61.
27. Tanaka H, Matsushima H, Nishibu A, Clausen BE, Takashima A. Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation. Cancer Res 2009;69:6987–94.
28. Shurin GV, Tourkova IL, Kaneno R, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. J Immunol 2009;183:137–44.
29. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nat Med 2007;13:1050–9.
30. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-β-dependent manner. J Exp Med 2005;202:1075–85.
31. Curiel TJ. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. J Clin Invest 2007;117:1167–74.
32. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2007;56:641–8.
33. Ugel S, Delpozzo F, Desantis G, et al. Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. Curr Opin Pharmacol 2009;9:470–81.
34. Lutsiak ME, Semnani RT, De Pascalis R, Kashmiri SV, Schlom J, Sabzevari H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. Blood 2005;105:2862–8.
35. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. Cancer Immunol Immunother 2009;58:1219–28.
36. Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, et al. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. J Exp Med 2005;201:1591–602.
37. Turk MJ, Guevara-Patino JA, Rizzuto GA, Engelhorn ME, Sakaguchi S, Houghton AN. Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. J Exp Med 2004; 200:771–82.
38. Serafini P, Meckel K, Kelso M, et al. Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. J Exp Med 2006;203:2691–702.
39. Bronte V, Chappell DB, Apolloni E, et al. Unopposed production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by tumors inhibits CD8+ T cell responses by dysregulating antigen-presenting cell maturation. J Immunol 1999;162:5728–37.
40. Terabe M, Matsui S, Park JM, et al. Transforming growth factor-β production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. J Exp Med 2003;198:1741–52.

Downloaded from cancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2010 American Association for Cancer Research

Supplementary Figure 1



Supplementary figure S1.

Representative FACS of the percentage of splenic and intratumoral MDSC determined by FACS analysis (Gr1 and CD11b double positive subset) in untreated EL4 tumor-bearing mice and mice treated five days before by 5FU or gemcitabine.

8. Synthèse - Discussion:

Dans ce travail, nous montrons donc après un screening de plusieurs agents de chimiothérapie cytotoxiques, que le 5-FU est capable d'avoir une action cytotoxique élective sur les MDSCs, et est ainsi capable de restaurer une réponse Th1 antitumorale.

Parmi l'ensemble des moyens possibles pour bloquer l'action des MDSCs dans un contexte tumoral, l'éradication sélective des MDSCs semble être l'approche la plus séduisante et la plus radicale. Jusqu'à présent, parmi les traitements d'usage courant, seule la gemcitabine a montré cette possibilité (Suzuki et al., 2005). Nos travaux confirment l'effet cytotoxique sélectif de la gemcitabine sur les MDSCs issues de la rate et des tumeurs en induisant l'apoptose de ces cellules. Parmi les autres classes d'agents de chimiothérapie testés (platine, taxane, anthracyclines, cyclophosphamide), seul le 5-Fluorouracile (5-FU), un médicament dont les métabolites ont pour principale cible la thymidilate synthase tumorale, possède la même propriété, avec en plus un effet plus marqué. Comme pour la gemcitabine, cet effet, à petites doses, est sélectif des MDSCs, sans diminution des autres variétés de globules blancs. Notre travail montre en outre que cet effet biologique observé pourrait être en rapport avec un faible niveau d'expression de la cible du 5-FU (la thymidilate synthase) dans les MDSCs, rendant compte de la nécessité de concentrations de 5-FU 20 à 50 fois supérieures pour tuer les cellules tumorales de notre modèle (le thymome EL4) par rapport aux concentrations cytotoxiques sur les MDSCs.

Le concept de chimiothérapie immunogène a récemment émergé, mettant en lumière qu'une partie des effets cytotoxiques des agents anticancéreux pouvait être médiée par les acteurs du système immunitaire (Zitvogel et al., 2008). Ce travail met ainsi en évidence un effet immunologique du 5-FU dans notre modèle, dans la mesure où les effets biologiques

du 5-FU sur les MDSCs s'accompagnent in vivo d'une restauration des capacités de sécrétion d'INF-γ par les lymphocytes T CD8+ infiltrant les tumeurs. Cet effet n'est pas dépendant d'une déplétion des lymphocytes T régulateurs, ni de l'induction de la maturation des DCs par le 5-FU, comme cela a pu être montré dans d'autres travaux pour d'autres drogues (Ghiringhelli et al., 2004) (Ghiringhelli et al., 2005b) (Roux et al., 2008) (Tanaka et al., 2009) (Shurin et al., 2009).

De même, si l'induction d'une mort immunogène des cellules cancéreuses (passant entre autre par la translocation d'une protéine : la calréticuline, à la membrane des cellules tumorales apoptotiques, a été décrite pour certains agents tels les anthracyclines, comme un évènement majeur pour l'induction d'une réponse antitumorale efficace, ce travail montre que les effets immunologiques induits par le 5-FU ne passent pas par ce mécanisme biologique. Au total, il semble donc que les effets observés sur les CD8+ infiltrant les tumeurs soient en rapport avec la diminution du nombre de MDSCs induite par le 5-FU. Cet effet peut d'ailleurs être contrecarré par le transfert passif de MDSCs à des souris porteuses de tumeurs, et traitées par 5-FU. Cette expérience, outre le fait de renforcer notre démonstration, semble également prouver que les MDSCs générées ex vivo sont capables de migrer au niveau du lit tumoral pour inhiber in situ les lymphocytes T.

La connaissance progressive des mécanismes d'immunosubvertion induits par les tumeurs pour progresser, a progressivement conduit à la conclusion que le préalable indispensable à une immunothérapie anticancéreuse efficace était probablement l'éradication première de la réponse régulatrice (Curiel, 2007) (Ghiringhelli et al., 2007) (Ugel et al., 2009). Les 2 acteurs cellulaires majeurs de celle-ci étant les Tregs et les MDSCs, il était logique d'essayer de combiner 2 traitements éradicateurs respectivement des Tregs (comme le cyclophosphamide) et des MDSCs (comme le 5-FU). In vivo, cette action est synergique,

à la fois sur l'augmentation de la synthèse d'INF-γ par les CD8+ infiltrant la tumeur, mais aussi sur la réduction de la croissance tumorale. Il faut noter là encore la supériorité de l'association cyclophosphamide-5-FU sur l'association cyclophosphamide-gemcitabine.

Ce travail est donc le premier à mettre en lumière un effet immunologique potentiel du 5-FU pour expliquer une partie de son activité antitumorale. Le 5-FU est ainsi avec la gemcitabine, le deuxième agent de chimiothérapie identifié comme ciblant électivement les MDSCs. Toutefois, nos travaux montrent une « supériorité immunologique » du 5-FU par rapport à la gemcitabine, en faisant donc un agent de choix pour l'éradication des MDSCs dans le cadre d'une stratégie immunothérapeutique.

Partie III. Foxp3

A. Le gène et la protéine Foxp3 dans le cancer

Article #3 :

Human Foxp3 and cancer. Oncogene. Juillet 2010

Oncogene (2010) 29, 4121–4129
© 2010 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/10
www.nature.com/onc

REVIEW

Human FOXP3 and cancer

F Martin[1], S Ladoire[1,2], G Mignot[1], L Apetoh[3] and F Ghiringhelli[1,2]

[1]*Equipe Avenir, INSERM UMR 866, University of Burgundy, Dijon, France;* [2]*Center G-F Leclerc, Dijon, France and* [3]*Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA*

FOXP3 is a transcription factor necessary and sufficient for induction of the immunosuppressive functions in regulatory T lymphocytes. Its expression was first considered as specific of this cell type, but FOXP3 can also be transiently expressed in T-cell antigen receptor-activated human nonregulatory T cells. Recent data indicate that FOXP3 is also expressed by some non-lymphoid cells, in which it can repress various oncogenes that are restored following FOXP3 deletion or mutation. This review summarizes major advances in (1) the understanding of Foxp3 functions in human regulatory T cells, (2) the prognostic significance of Foxp3-expressing T cells in human malignancies and (3) the significance of Foxp3 expression in human tumor cells.
Oncogene (2010) **29,** 4121–4129; doi:10.1038/onc.2010.174; published online 24 May 2010

Keywords: Foxp3; regulatory T cells; tumor immunity; tolerance; tumor suppressor gene

Introduction

FOXP3 belongs to the family of forkhead box (FOX) transcription factors that are characterized by a highly conserved forkhead (FKH) DNA-binding domain described as a winged helix. The forkhead gene product was initially identified in the fruit fly *Drosophila melanogaster* as factor required for the terminal pattern formation in the terminal regions of the embryo (Weigel *et al.*, 1989). Several members of the FOX family were later found to have crucial roles in various aspects of immune regulation (Coffer and Burgering, 2004). The *Foxp3* gene was first discovered by studying the scurfy mice bearing a lethal X-linked recessive immunodysregulation (Brunkow *et al.*, 2001). Foxp3 was found to be a master regulator in the development and function of regulatory T cells (Treg) (Schubert *et al.*, 2001; Fontenot *et al.*, 2003; Hori *et al.*, 2003). Tregs were initially defined as immunosuppressive $CD4^+$ T cells expressing constitutively the α-subunit of the interleukin (IL)-2 receptor (CD25) on their surface (Sakaguchi, 2000). The nuclear expression of FOXP3 is now considered as the most specific marker for these cells (Sakaguchi, 2005). However, FOXP3 can be expressed transiently on human nonregulatory $CD4^+$ T cells upon T-cell antigen receptor (TCR) activation. Furthermore, recent reports demonstrate that Foxp3 is also expressed in nonlymphocytic normal or cancer cells, suggesting that FOXP3 may have a broader role in cancer than initially thought.

In this review, we will underscore the role of human FOXP3 in a cancer setting.

Correspondence: Dr F Ghiringhelli, Avenir Team, University of Burgundy, 7 bd Jeanne d'Arc, Dijon, Burgundy 21000, France.
E-mail: fghiringhelli@dijon.fnclcc.fr
Received 9 March 2010; revised 10 April 2010; accepted 15 April 2010; published online 24 May 2010

General properties of human Foxp3

Human FOXP3 gene and protein

The *FOXP3* gene is well conserved in mammalians (Ziegler, 2006). The human *FOXP3* gene is located on the short arm of the X chromosome and consists of 11 translated exons encoding a protein of 431 amino acids (Lopes *et al.*, 2006). From the N terminus, it contains a proline-rich repressor domain required for repressing the expression of target genes, a zinc-finger, a leucine zipper motif, which allows FOXP3 homo- or heterodimerization, and finally the conserved DNA-binding forkhead domain (FKH) with two sites targeting FOXP3 localization to the nucleus at its C and N terminus (Lopes *et al.*, 2006) (Figure 1).

FOXP3 can be part of a large molecular complexes of ~600 kDa, together with histone deacetylases, histone acetyltransferases and other transcription factors such as Runx1 (Li *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 2007). It associates with several transcription factors, including the nuclear factor of activated T cells to inhibit the expression of IL-2 and other proinflammatory cytokines and dampen the effector functions of T-helper cells (Bettelli *et al.*, 2005; Rudensky *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006).

In contrast with mouse Treg, in which Foxp3 is only expressed as a full-length protein, human Treg express two major isoforms of FOXP3 in approximately equal amounts: a full-length isoform (FOXP3FL, apparent molecular weight: 58 kDa) that represents the ortholog of mouse Foxp3 and an alternative-splicing product lacking exon 3 (FOXP3Δ3, apparent molecular weight: 54 kDa) (Allan *et al.*, 2005). It should be emphasized that several reports refer to exon 3 as exon 2, because exon 1 is often not considered due to its position within the 5' untranslated region (Ebert *et al.*, 2008). *FOXP3* exon 3 (aa 72–106) encodes a domain that interacts with and inhibits retinoic acid receptor-related orphan receptors (ROR)α, which leads to the expression of

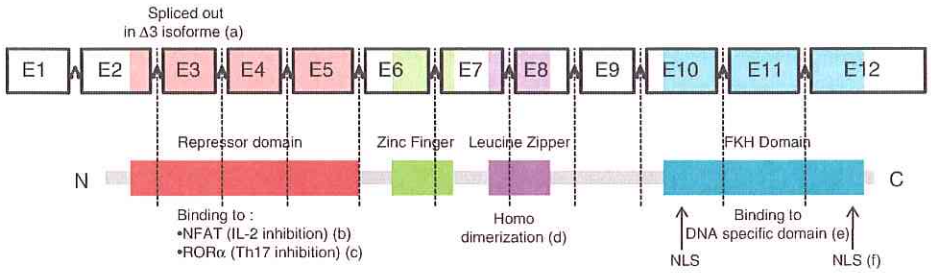


Figure 1 Structure of gene and protein, and principal functions of human FOXP3. (a) Exon 3 is spliced out in the short isoform of human *FOXP3* (Allan *et al.*, 2005). The N-terminal repression domain binds to and inhibits several transcription factors, including (b) nuclear factor of activated T cells (NFAT), leading to repression of IL-2 (Rudensky *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006) and (c) retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR)α, blocking transformation into Th17. (d) (Lopes *et al.*, 2006). (e) FOXP3 preferentially binds DNA as a dimer, when two paired FKH domains recognize tandem copies of a core DNA element (Koh *et al.*, 2009). (f) NLS: nuclear localization signals, located at the N- and C-terminals of the FKH domain (Lopes *et al.*, 2006).

genes that define Th17 cells. Thus, the full-length isoform but not FOXP3Δ3 negatively regulates Th17 differentiation (Du *et al.*, 2008).

Epigenetic regulation of Foxp3 expression

FOXP3 transcription is regulated by a promoter located immediately upstream to the *FOXP3* transcriptional start site. Other regulatory *cis*-elements located between the first noncoding exons or far upstream of the transcriptional start site (~5 kb) are referred to as the intronic or upstream enhancers, respectively. These regulatory elements receive signals provided by the TCR, but their subsequent activity is affected by the methylation of the CpG sites present in promoter and intronic enhancer sequences (Josefowicz and Rudensky, 2009; Lal and Bromberg, 2009). These CpG sites are largely methylated in FOXP3-negative $CD4^+$ T cells, but also in T cells that express weakly and transiently FOXP3 and are devoid of any regulatory activity. In contrast, these CpG sites are demethylated in Tregs expressing high and stable levels of FOXP3.

Regulation of FOXP3 expression

In mice, $Foxp3^+$ Tregs are generated in the thymus concomitantly with positive selection of conventional $CD4^+$ T cells. Treg differentiation requires TCR activation, involving presentation of self-antigenic peptides in association with class-II major histocompatibility complex molecules (Fontenot *et al.*, 2005). Costimulation through CD28 signaling is also required (Tai *et al.*, 2005). In humans, due to thymus involution after puberty, it is likely that the generation of Treg in the thymus is limited, at least in adults (Vukmanovic-Stejic *et al.*, 2006; Akbar *et al.*, 2007). However, circulating Treg numbers do not decrease during human life, suggesting that human Treg may not only stem from the thymus but also from the conversion of $CD4^+FOXP3^-CD25^-$ non-Tregs.

In mice, conversion of conventional $CD4^+$ T cells into Foxp3+ Treg can be obtained *in vitro*, but usually requires TCR activation in the presence of high concentrations of exogenous transforming growth factor (TGF)-β (Chen *et al.*, 2003). In contrast, TGF-β is not required for FOXP3 induction in human effector cells. The association of TCR and CD28 signaling is sufficient for inducing FOXP3 expression in human peripheral T cells, leading to an upregulation of CD25 expression and a decreased cell proliferation and IL-2 secretion (Walker *et al.*, 2005; Ziegler, 2006). Under these conditions, FOXP3 upregulation can be only transient and insufficient to confer immunosuppressive functions to activated T cells (Gavin *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007). However, authentic Treg with long-lasting FOXP3 expression and suppressive function can also be generated in the periphery. These extra-thymic Treg can be induced by an immune response specific to a cognate antigen, such as antigens provided by virus and bacteria, alloantigens or neoantigens from tumor cells, whereas Treg originated in thymus of the neonates mainly recognize self-antigens (Walker *et al.*, 2005; Akbar *et al.*, 2007).

FOXP3 expression is therefore not an absolute criterion for characterizing human FOXP3-expressing $CD4^+$ T cells as Treg. Recently, the group of Sakaguchi (Miyara *et al.*, 2009) used CD45RA, a marker of naive T cells nonexpressed by activated and memory T cells, for the characterization and isolation of three types of circulating human $CD4^+$ T cells expressing Foxp3: $CD45RA^+$ $Foxp3^{low}$ resting Treg and $CD45RA^-$ $Foxp3^{high}$ activated Treg, which were both suppressive *in vitro*, and $CD45RA^-$ $Foxp3^{low}$ nonsuppressive T cells that were effector cells secreting high amounts of IL-2 and interferonγ (IFNγ). Demethylation at a highly conserved region within the intronic enhancer of the *FOXP3* gene was found to be a more valuable criterion than the expression of FOXP3 protein itself for discriminating Treg from activated T cells, notably in cancer patients (Wieczorek *et al.*, 2009).

The stability and acetylation of FOXP3 dictates Treg plasticity

FOXP3 protein has a short half-life as it undergoes rapid polyubiquitination and proteasomal degradation. However, this process can be blocked by acetylation of FOXP3 lysine residues that prevents its ubiquitination (van Loosdregt *et al.*, 2010). Owing to FOXP3 instability or changes in its epigenetic control, Treg can lose FOXP3 expression and consequently immune suppressive activity (Wan and Flavell, 2007), thus

demonstrating the plasticity of the FOXP3 program. In particular, inflammatory condition, with the presence of high amounts of IL-6, fully converts differentiated Foxp3$^+$ Treg cell into Th17 cells (Xu *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008). This event is due to the capacity of STAT3 to downregulate the expression of FOXP3. Furthermore, adoptive transfer of Treg cells into lymphopenic hosts also leads to a loss of Foxp3 expression and their differentiation into so-called follicular T-helper cells (Tsuji *et al.*, 2009). Following FOXP3 downregulation, Treg can even exert effector cell activities including the production of IL-17 or IFNγ (Zhou *et al.*, 2009). This illustrates that stability of foxp3 expression is directly affecting the plasticity of Treg.

FOXP3 controls gene expression in Treg

FOXP3 is able to bind ~700 genes, of which a large number are up- or downregulated in FOXP3$^+$ T cells, suggesting that FOXP3 acts as both a transcriptional activator and a repressor (Zheng *et al.*, 2007). Binding of FOXP3 to the promoters and 5′ regulatory regions of *Ctla4* (encoding the immunomodulatory receptor CTLA-4) and *Il2ra* (encoding IL2 receptor-α, IL-2Rα; also called CD25) enhances their transcription, whereas binding of Foxp3 to the *Il2* and *Il7ra* promoters facilitates repression of these genes (encoding IL-2 and IL7 receptor-α, respectively). This dual activity of FOXP3 defines characteristic features of Treg cells, which have high expression of CTLA-4 and CD25, but low expression of IL-7R and lack IL-2 production. FOXP3 also binds to the *IFNg* locus, suppressing IFNγ expression (Chen *et al.*, 2006).

The molecular mechanisms by which FOXP3 controls gene expression in Treg cells involve interactions of FOXP3 with other transcription factors. For example, FOXP3 can interact with nuclear factor of activated T cells, preventing its binding to AP-1; FOXP3-nuclear factor of activated T-cell transcription factors act together to activate *Ctla4* and *Il2ra* and antagonize *Il2* expression dependent on nuclear factor of activated T cells and the transcription factor AP-1 (Wu *et al.*, 2006). Binding of FOXP3 to the *IL-2* and *IFN*γ genes induces active deacetylation of histone H3, a process that inhibits chromatin remodeling, impeding gene transcription. Conversely, binding of FOXP3 to the *Il2ra* and *Ctla4* promoters results in increased histone acetylation, enhancing gene transcription (Chen *et al.*, 2006).

Recently, Pardoll and colleagues (Pan *et al.*, 2009) demonstrated that FOXP3-dependent gene silencing involved in downregulation of IL-2 and IFNγ in mouse Treg is related to FOXP3 interaction with Eos, a zinc-finger transcription factor of the Ikaros family. Direct interaction of Eos and FOXP3 induces epigenetic chromatin modifications that result in gene silencing in Treg. An effect of the Eos–FOXP3 interaction in human Treg-mediated IL-2 and IFNγ downregulation remains to be investigated.

These FOXP3-dependent modifications of gene expression in Treg are therefore directly linked to their capacity to promote or repress an immune response and involve various mechanisms, such as the FOXP3-dependent CTLA4 overexpression on Treg, which interacts with CD80 and CD86 costimulatory signals on dendritic cells (Tang and Bluestone, 2008; Shevach, 2009).

Foxp3 and Tregs in human cancers

It is now well established that FOXP3-expressing Tregs (Sakaguchi *et al.*, 1995) are more abundant in the peripheral blood of cancer-bearing patients relatively to healthy subjects (Woo *et al.*, 2001; Liyanage *et al.*, 2002).

Immunolabeling of tumor sections with antibodies directed against FOXP3 has been used to determine Treg infiltration in human cancers. A series of commercially available antibodies are currently used for immunohistochemistry labeling (Roncador *et al.*, 2005; Woo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). Most human tumors are infiltrated by Treg, presenting as small cells, with lymphocytic morphology, and high FOXP3 labeling in their nucleus (Table 1). FOXP3$^+$ cells were sometimes localized in the vicinity of tumor cells, but rather predominant in the peripheral lymphoid-enriched areas (Curiel *et al.*, 2004; Mizukami *et al.*, 2008; Gobert *et al.*, 2009). The density of FOXP3$^+$ cells was reported to be significantly higher in malignant than in normal tissue (Bates *et al.*, 2006; Hiraoka *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2006; Mizukami *et al.*, 2008). However, it should be noted that all tumor-infiltrating FOXP3$^+$ cells were not inevitably Tregs because TCR activation of conventional T cell may be sufficient for inducing FOXP3 transient expression without suppressive properties, as discussed above.

Relation between Foxp3$^+$ T cells infiltrating cancer and clinical prognosis

As FOXP3 Tregs are immunosuppressive cells, their abundance in tumor infiltrates is expected to be associated with an unfavorable clinical prognosis. Indeed, many studies reported that increased Treg infiltration in tumor bed predicted reduced survival in cancer-bearing patients (Table 1). In neoadjuvant breast cancer chemotherapy, we found a close relationship between complete histological response and the absence of FOXP3 cells (Ladoire *et al.*, 2008). However, no significant relation between Treg infiltration and prognosis was found in patients bearing kidney cancer (Siddiqui *et al.*, 2007). Paradoxically, a high density of FOXP3$^+$ T-cell infiltration was correlated with a better locoregional control of the tumor in patients with head and neck carcinoma (Badoual *et al.*, 2006). Similarly, high numbers of tumor-infiltrating FOXP3$^+$ Treg are associated with improved overall survival in patients with follicular B cells (Carreras *et al.*, 2006) or Hodgkin's lymphoma (Alvaro *et al.*, 2005). Recently, analysis of a large series of patients with stage II or stage III colorectal carcinoma showed that high density of FOXP3$^+$ T cells in tumor tissue was associated with

Table 1 FOXP3$^+$ Tcell infiltration in human tumors. Prognostic value

Malignancy	*N pts*	*Prognostic value*
Breast carcinoma (Bates *et al.*, 2006)	237	Unfavorable
Breast carcinoma (Gobert *et al.*, 2009)	191	Unfavorable
Colorectal carcinoma (Salama *et al.*, 2009)	967	Favorable
Cervix carcinoma (Jordanova *et al.*, 2008)	115	Unfavorable
Esophagus carcinoma (Yoshioka *et al.*, 2008)	122	Not significant
Gastric carcinoma (Mizukami *et al.*, 2008)	80	Unfavorable (*)
Head & neck carcinoma (Badoual *et al.*, 2006)	84	Favorable
Hepatocellular carcinoma (Gao *et al.*, 2007)	302	Unfavorable
Kidney carcinoma (Siddiqui *et al.*, 2007)	170	Not significant
Lymphoma (B cell) (Carreras *et al.*, 2006)	98	Favorable
Lymphoma (Hodgkin) (Alvaro *et al.*, 2005)	257	Favorable
Ovary carcinoma (Curiel *et al.*, 2004)	104	Unfavorable
Pancreatic carcinoma (Hiraoka *et al.*, 2006)	198	Unfavorable

Intratumoral infiltration of FOXP3$^+$ T cells in various human malignancies. Relation with the vital prognosis. N pts: number of patients. (*) according to intratumoral localization of FOXP3$^+$ T cells.

improved survival (Salama *et al.*, 2009). We believe that the interaction between the different components of the tumor microenvironment and the diversity of signals provided by the tumor cells can explain these discrepancies in the prognostic studies relying on the presence of Treg in tumor infiltrates.

FOXP3$^+$ Treg accumulation in human cancers

The mechanisms leading to FOXP3$^+$ Treg accumulation in the cancer microenvironment have been reviewed (Zou, 2006). (1) Treg from the thymus, lymph nodes, bone marrow and peripheral blood express CC-chemokine receptor 4 (CCR4) and can be attracted by the abundant expression of CC-chemokine ligand 22 (CCL22, a CCR4 ligand) produced by cancer cells and tumor-infiltrating macrophages (Curiel *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2006; Mizukami *et al.*, 2008; Gobert *et al.*, 2009). (2) Even if Treg are refractory to proliferation when activated by antibodies against CD3 and CD28 *in vitro*, they could proliferate actively when located in the tumor stroma, probably under the effect of IL-2 released in the tumor microenvironment and TCR activation by dendritic cells recognizing tumor-specific antigens (Gobert *et al.*, 2009). In experimental tumor models, we demonstrated that a subset of immature myeloid dendritic cells was recruited in the tumor and induced an active proliferation of Treg through TGF-β expression (Ghiringhelli *et al.*, 2005). (3) Conventional nonregulatory CD4$^+$ T cells can be converted into Treg cells in the tumor. In experimental tumors, this conversion can be induced by TGF-β, a cytokine often present at a high level in the tumor microenvironment (Zou, 2006). A similar mechanism may take place in human tumors. For example, a human lung cancer cell line could trigger dendritic cells to produce TGF-β1 and induce the differentiation of CD4$^+$ T cells into Treg (Dumitriu *et al.*, 2009).

FOXP3$^+$ Treg and cancer treatment

Experimental data obtained with rodent tumor models demonstrate that Treg reduction can dampen tumor growth and increase the efficacy of tumor immunotherapy (Ghiringhelli *et al.*, 2004). The effects and limitation of targeting Treg in the treatment of cancer was recently reviewed (Zou, 2006; Curiel, 2008). In this study, we will discuss two strategies used for the selective depletion in Treg that have been recently evaluated in clinical trials: fusion proteins associating a toxin with a ligand of a Treg surface marker and cyclophosphamide.

Denileukin diftitox or ONTAK, a recombinant IL-2 diphtheria toxin conjugate that was initially implemented for the treatment of CD25-overexpressing hematopoietic malignancies, is selectively eliminating Treg due to their constitutive expression of the IL-2 receptor α-subunit CD25 (Manoukian and Hagemeister, 2009). In several clinical trials, denileukin diftitox was administered in patients with metastatic carcinoma or melanoma (Dannull *et al.*, 2005; Zou, 2006; Mahnke *et al.*, 2007; Morse *et al.*, 2008; Rasku *et al.*, 2008). A reduction of circulating FOXP3$^+$ Treg was generally obtained, but very few clinical responses were observed. LMB-2 is another recombinant immunotoxin that is a fusion of a single-chain Fv fragment from an anti-CD25 monoclonal antibody with a truncated form of the bacterial *Pseudomonas* exotoxin A. LMB-2 induced a selective reduction in circulating CD4$^+$FOXP3$^+$ T lymphocytes from patients with metastatic melanoma. However, it did not enhance the immune response after cancer vaccination, or induce any clinical objective response (Powell *et al.*, 2007).

In rodent models, we observed that administration of a low dose cyclophosphamide selectively decreases the number of circulating Treg in cancer-bearing animals and strongly enhances the tumor response to immunotherapy (Ghiringhelli *et al.*, 2004; Taieb *et al.*, 2006; Roux *et al.*, 2008). These preclinical results were later confirmed by other investigators (Liu *et al.*, 2007). It was also shown that administration of low dosages of cyclophosphamide not only decreases the number of Treg, but reduces their expression of Foxp3 and their suppressive potential (Lutsiak *et al.*, 2005). Consequently, cyclophosphamide can be counted among the recently reported category of anticancer immunogenic chemotherapies (Haynes *et al.*, 2008; Zitvogel and Kroemer, 2008). These results provided impetus to use repetitive but low doses of orally administered cyclophosphamide ('metronomic treatment') for 30 consecutive days in patients with advanced metastatic tumors, which did not respond anymore to conventional chemotherapy. Even at this late stage of the disease, a selective decrease of circulating Treg was observed in all the nine treated patients with a restoration of peripheral T-cell proliferation and innate tumor cell killing activities. No objective clinical response could be measured, but the treatment was well tolerated and a stabilization of the disease was observed in some patients (Ghiringhelli *et al.*, 2007). Meanwhile, another team administered metronomic low dose oral cyclophosphamide for patients with hormone-resistant prostate cancer.

The treatment was considered as well tolerated and an objective clinical or biological (PSA) response was observed in 34.5% of the patients (Lord *et al.*, 2007).

FOXP3 expression in human cancer cells

Foxp3 protein expression was thought to be restricted to the lymphocyte lineage (Fontenot *et al.*, 2005). However, this expression was recently demonstrated in nonhematopoietic cells of various kinds and also in cancers cells of a nonhematopoietic origin, raising questions about its role in carcinogenesis and the immune response in these different locations.

FOXP3 expression in normal and cancerous human cells
Foxp3 expression in noncancerous epithelial cells was investigated in $Rag2^{-/-}$ mice, which are notably devoid of T lymphocytes, and in mice with the *Scurfy* mutation that deletes Foxp3 expression (Chen *et al.*, 2008). This study revealed expression of Foxp3 mRNA and protein in the nuclei of epithelial cells in the breast, lung and prostate, but not in the liver, kidney and intestine.

In humans also, FOXP3 mRNA or protein were recently reported to be expressed in a variety of normal and cancerous cells in addition to Treg. When FOXP3 expression was compared in human cancer cells and in their normal homologs, two opposite situations were found. In the first one, FOXP3 expression was restricted to the tumor cells. Normal pancreatic duct cells were devoid of FOXP3 expression, but FOXP3 was detected by immunohistochemistry in human pancreatic cancer cells (Hinz *et al.*, 2007). Cancer cell staining was cytoplasmic in most patients, whereas in others, it was predominantly nuclear. Interestingly, FOXP3-expressing pancreatic cancer cell lines strongly inhibited the proliferation of anti-CD3/anti-CD28-stimulated T cells without impeding their activation, suggesting that FOXP3 expression in cancer cells might trigger a mechanism of immune evasion. FOXP3 was also found to be expressed by human melanoma cells but was not detected in normal melanocytes (Ebert *et al.*, 2008). Reverse transcription–PCR confirmed the presence of *FOXP3* transcripts in melanoma cells that expressed the two isoforms found in human Treg, including the full-length variant. Immunohistochemistry with anti-FOXP3 on melanoma tissue sections showed a nuclear labeling of melanoma cells. FOXP3 was widely expressed in human melanoma cell lines.

In contrast, FOXP3 was expressed in normal epithelial cells of human breast and prostate, but downregulated in the corresponding cancer cells. The levels and isoforms of the *FOXP3* transcripts were analyzed in a panel of primary normal human mammary epithelial cells, and in malignant breast cancer cell lines (Zuo *et al.*, 2007b). *FOXP3* transcripts with the same two isoforms as found in Treg were observed in noncancerous epithelial cells. Many cancer cell lines expressed detectable level of *FOXP3*, although they did not express the full-length transcript but rather transcript with exon 3, exon 4 and/or exon 8 deletion. Protein detection using immunohistochemistry demonstrated that about 80% of normal breast samples expressed FOXP3 in the epithelial cell nuclei, whereas 20% of cancerous tissues only showed nuclear staining. In some tumor samples, fluorescence *in situ* hybridization demonstrated a complete deletion of the *FOXP3* locus. FOXP3 expression was also investigated in normal and cancerous human prostatic epithelial cells (Wang *et al.*, 2009). FOXP3 nuclear staining of epithelial cells was observed in all samples of normal prostate tissues tested, but only in 30% of the prostate cancer samples. In these cancer samples, *FOXP3* cDNA harbored genetic mutations or deletions.

Antioncogenic effect of FOXP3
In human breast and prostate, the overwhelming difference between normal and cancerous epithelial cells in FOXP3 expression strongly suggests a relationship between FOXP3 downregulation and cancer development (Wang *et al.*, 2009). *FOXP3* gene is located on the X chromosome. In mammals, both male and female cells carry only one active X chromosome, because males have only one X chromosome and in females one of the X chromosomes undergoes inactivation by transcriptional silencing. This inactivation is initiated early in embryonic stem-cell differentiation, the choice of the inactivated X chromosome is random and heritable through subsequent rounds of cell division, leading female tissues to a mosaic of cells where either the paternal or the maternal X chromosome is active. Owing to this X-chromosome unisomy, a single genetic hit can transform a cell if it damages a tumor suppressor gene located on the X chromosome (Spatz *et al.*, 2004; Medema and Burgering, 2007). As reported above, FOXP3 was often altered in human breast or prostate cancers, undergoing deletion or mutations. Recently, three reports demonstrated that FOXP3 was a tumor suppressor gene in the breast and prostate. Wild-type FOXP3 from normal cells, but not mutated FOXP3 from cancer cells, bound to and repressed two oncogenes involved in mammary carcinogenesis, *HER-2* and *SKP2* (Zuo *et al.*, 2007a, b) and oncogene *c-MYC* involved in prostate carcinogenesis (Wang *et al.*, 2009). The FKH DNA-binding domain of FOXP3 interacted with motifs in the promoter of these oncogenes. *HER-2* is a member of a family of genes encoding transmembrane receptors for growth factors. Between 15 and 20% of invasive breast cancers overexpress HER-2 and have a worse prognosis than HER-2-negative tumors, a greater resistance to conventional chemotherapy, but a high sensitivity to Trastuzumab, a humanized monoclonal antibody against HER-2 (Burstein, 2005). The S-phase kinase-associated protein SKP2 is involved in the ubiquitination and degradation of the cdk-inhibitor p27 and has an oncogenic potential in breast epithelial cells. SKP2 is overexpressed in nearly 50% of breast carcinomas (Signoretti *et al.*, 2002). *C-MYC* is involved with *ras* in prostate carcinogenesis (Thompson *et al.*, 1989) and is overexpressed in 80% of the prostate cancer samples. A significant correlation was observed between FOXP3

downregulation and HER-2 and SKP2 or cMYC overexpression in breast and prostate cancer cells (Zuo *et al.*, 2007a, 2007b; Wang *et al.*, 2009).

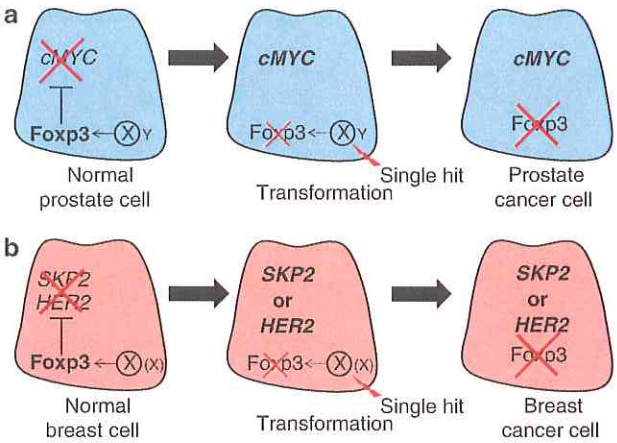


Figure 2 Tumor suppressor properties of FOXP3. In addition of Treg, FOXP3 can be expressed in noncancerous cells, such as epithelial cells of the prostate (**a**) or the breast (**b**), where it binds to and represses various oncogenes, such as c-MYC, HER-2 and SKP-2. As *FOXP3* gene is located on chromosome X, which is unique in the prostate cells, but also in each mammary cells due to the random X inactivation, a single hit is sufficient for inducing FOXP3 deletion, mutation or downregulation. Consequently, oncogenes are released and can induce cellular transformation. Unlike normal cells, cancer cells overexpress the oncogenes required for their transformation, but do not express FOXP3, or only at low amounts or as a nonfunctional protein.

In short, when expressed in breast and prostate cancer cells, *FOXP3* gene may act as a tumor suppressor by repressing various oncogenes. However, due to its location on the X chromosome, it is also an appropriate target for a single hit process that will suppress its expression or function, release the repressed oncogenes and initiate transformation (Figure 2). Interestingly, transfection of the full-length *FOXP3* cDNA in human breast or prostate cancer cell lines repressed colony formation, thus further demonstrating a tumor suppressor role for FOXP3 (Zuo *et al.*, 2007b; Wang *et al.*, 2009).

Nuclear or cytoplasmic FOXP3 expression in cancer cells

FOXP3 is constitutively expressed in the nucleus of human Treg. A nuclear localization of FOXP3 was also reported for most human normal and cancer cells expressing this factor (Zuo *et al.*, 2007b; Ebert *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009). However, a predominant cytoplasmic FOXP3 labeling was reported for human pancreatic cancer cells (Hinz *et al.*, 2007). In a recent work dealing with two large series of breast cancer specimens, immunohistological FOXP3 staining was localized predominantly in the tumor cell cytoplasm, whereas a few specimens showed only nuclear staining (Merlo *et al.*, 2009). Finally, in a series of 103 human breast cancers selected for HER-2 oncogene overexpression, FOXP3 was observed in cancer cells of 59 specimens, but only with a cytoplasmic localization, without any nuclear extension (Figure 3) (Ladoire *et al.*,

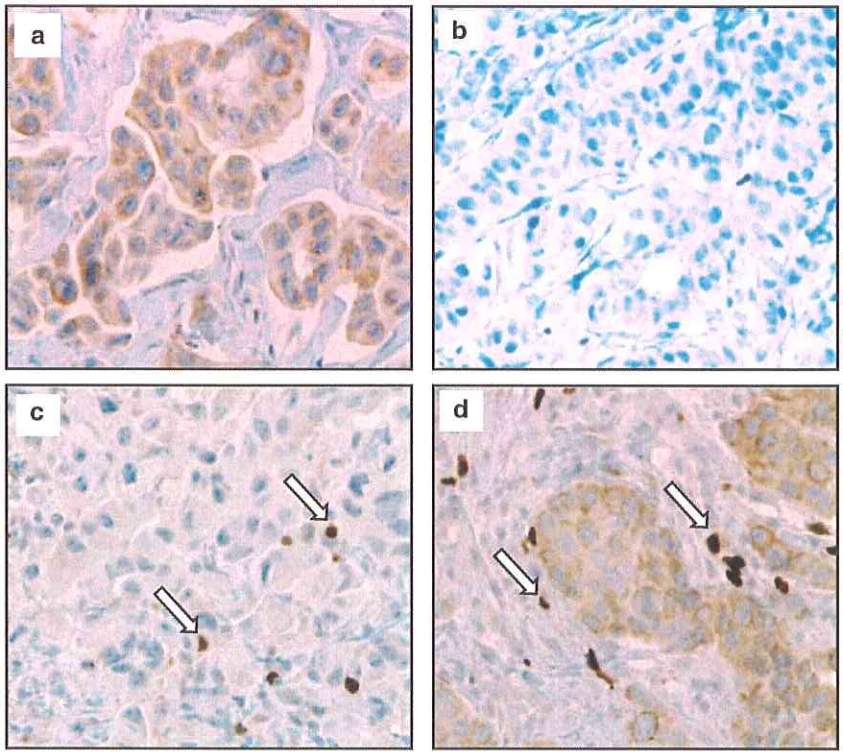


Figure 3 Immunohistochemical Foxp3 staining of paraffin-embedded breast cancer-overexpressing HER2. Representative results are shown for (**a**) cytoplasmic FOXP3 labeling of tumor cells. (**b**) Tumor stained with isotype-matched control antibody. (**c**, **d**) Tumor specimens containing intensely labeled regulatory T cells (white arrows) and tumor cells without (**c**) or with (**d**) cytoplasmic FOXP3 staining. Mouse anti-human FOXP3 mAb 236A/E7 was used for FOXP3 staining. Magnification $\times 20$.

2010). At present, it is difficult to interpret the significance of this cytoplasmic localization, which could be due to a mutation or a deletion of the nuclear localization signals surrounding the FKH domain of FOXP3. Wang *et al.* (2009) observed that three of the four FOXP3 mutants obtained from human pancreatic carcinomas disrupted their translocation into nuclei but localized in the cytoplasm.

Effect of DNA-damaging agent and p53 on FOXP3 expression in cancer cells

Mechanisms that regulate FOXP3 expression in tumor cells remain largely unexplored. A recent report demonstrated that FOXP3 expression is increased in some human breast and colon carcinoma cell lines on exposure to DNA-damaging agents, such as doxorubicin, etoposide and cisplatin (Jung *et al.*, 2010). Interestingly, this increase in FOXP3 expression was documented only in cell lines expressing wild-type p53. FOXP3 knockdown blunted the p53-mediated growth inhibitory response to DNA-damaging agents, thus implicating FOXP3 as a key determinant of cell fate in p53-dependent DNA-damage responses.

Conclusion

Initially considered as a stable and reliable marker of CD4 and CD25-expressing Treg, Foxp3 should now be considered in a more critical approach, particularly in its relationship with human cancers. An accumulation of FOXP3$^+$ T cells is observed in the immune infiltrate of many cancer types, but its relationship with the clinical prognosis could be beneficial or detrimental according to the type of malignancies considered. In contrast to their mouse homologs, human conventional CD4$^+$ T cells can express transiently FOXP3 without acquiring immunosuppressive properties on TCR activation, and could thus represent a part of the tumor-infiltrating FOXP3$^+$ T cells.

FOXP3 can also be expressed in varieties of normal or malignant cells outside Treg. This expression is usually moderate, can be nuclear and/or cytoplasmic and the role of FOXP3 in these cells remains largely undetermined. However, at least in breast and prostate epithelial cells, FOXP3 has the role of a tumor suppressor repressing several major oncogenes. *FOXP3* gene damaging, facilitated by its localization on the X chromosome, release oncogenic activity and carcinogenesis.

Thus, FOXP3 is a multifaceted factor of cancer biology, having a tumor-enhancing role through Treg and their effect on tumor tolerance, but also suppressing carcinogenesis as a potent repressor of several oncogenes.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

Akbar AN, Vukmanovic-Stejic M, Taams LS, Macallan DC. (2007). The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nat Rev Immunol* **7**: 231–237.

Allan SE, Passerini L, Bacchetta R, Crellin N, Dai M, Orban PC *et al.* (2005). The role of 2 FOXP3 isoforms in the generation of human CD4+ Tregs. *J Clin Invest* **115**: 3276–3284.

Alvaro T, Lejeune M, Salvado MT, Bosch R, Garcia JF, Jaen J *et al.* (2005). Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* **11**: 1467–1473.

Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay Nel H *et al.* (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res* **12**: 465–472.

Bates GJ, Fox SB, Han C, Leek RD, Garcia JF, Harris AL *et al.* (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol* **24**: 5373–5380.

Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 5138–5143.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paeper B, Clark LB, Yasayko SA *et al.* (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* **27**: 68–73.

Burstein HJ. (2005). The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* **353**: 1652–1654.

Carreras J, Lopez-Guillermo A, Fox BC, Colomo L, Martinez A, Roncador G *et al.* (2006). High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. *Blood* **108**: 2957–2964.

Chen C, Rowell EA, Thomas RM, Hancock WW, Wells AD. (2006). Transcriptional regulation by Foxp3 is associated with direct promoter occupancy and modulation of histone acetylation. *J Biol Chem* **281**: 36828–36834.

Chen GY, Chen C, Wang L, Chang X, Zheng P, Liu Y. (2008). Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following *in vivo* depletion of FoxP3-expressing cells. *J Immunol* **180**: 5163–5166.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N *et al.* (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* **198**: 1875–1886.

Coffer PJ, Burgering BM. (2004). Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. *Nat Rev Immunol* **4**: 889–899.

Curiel TJ. (2008). Regulatory T cells and treatment of cancer. *Curr Opin Immunol* **20**: 241–246.

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P *et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **10**: 942–949.

Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D *et al.* (2005). Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest* **115**: 3623–3633.

Du J, Huang C, Zhou B, Ziegler SF. (2008). Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3. *J Immunol* **180**: 4785–4792.

Dumitriu IE, Dunbar DR, Howie SE, Sethi T, Gregory CD. (2009). Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **182**: 2795–2807.

Ebert LM, Tan BS, Browning J, Svobodova S, Russell SE, Kirkpatrick N *et al.* (2008). The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res* **68**: 3001–3009.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**: 330–336.

Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. (2005). Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* **22**: 329–341.

Gao Q, Qiu S, Fan J, Zhou J, Wang X, Xiao Y *et al.* (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol* **25**: 2586–2593.

Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A *et al.* (2006). Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 6659–6664.

Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C *et al.* (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol* **34**: 336–344.

Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F *et al.* (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother* **56**: 641–648.

Ghiringhelli F, Puig PE, Roux S, Parcellier A, Schmitt E, Solary E *et al.* (2005). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med* **202**: 919–929.

Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, Bachelot T, Goddard-Leon S, Arfi V *et al.* (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res* **69**: 2000–2009.

Haynes NM, van der Most RG, Lake RA, Smyth MJ. (2008). Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept. *Curr Opin Immunol* **20**: 545–557.

Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH, Ammerpohl O, Grussel S, Sipos B *et al.* (2007). Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res* **67**: 8344–8350.

Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res* **12**: 5423–5434.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**: 1057–1061.

Jordanova E, Gorter A, Ayachi O, Prins F, Durrant L, Kenter G *et al.* (2008). Human leukocyte antigen class I, MHC class I chain-related molecule A, and CD8+/regulatory T-cell ratio: which variable determines survival of cervical cancer patients? *Clin Cancer Res* **14**: 2028–2035.

Josefowicz SZ, Rudensky A. (2009). Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance. *Immunity* **30**: 616–625.

Jung DJ, Jin DH, Hong SW, Kim JE, Shin JS, Kim D *et al.* (2010). Foxp3 expression in p53-dependent DNA damage responses. *J Biol Chem* **285**: 7995–8002.

Koh KP, Sundrud MS, Rao A. (2009). Domain requirements and sequence specificity of DNA binding for the forkhead transcription factor FOXP3. *PLoS One* **4**: e8109.

Ladoire S, Arnould L, Mignot G, Coudert B, Rébé C, Chalmin F, Vincent J *et al.* (2010). Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* (in press).

Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B *et al.* (2008). Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res* **14**: 2413–2420.

Lal G, Bromberg JS. (2009). Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* **114**: 3727–3735.

Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Bembas K, Tao R *et al.* (2007). FOXP3 interactions with histone acetyltransferase and class II histone deacetylases are required for repression. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 4571–4576.

Liu JY, Wu Y, Zhang XS, Yang JL, Li HL, Mao YQ *et al.* (2007). Single administration of low dose cyclophosphamide augments the antitumor effect of dendritic cell vaccine. *Cancer Immunol Immunother* **56**: 1597–1604.

Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G regulatory T cells *in vivo*: kinetics of Treg depletion and alterations in immune functions *in vivo* and *in vitro*. *Int J Cancer* **120**: 2723–2733.

Manoukian G, Hagemeister F. (2009). Denileukin diftitox: a novel immunotoxin. *Expert Opin Biol Ther* **9**: 1445–1451.

Medema RH, Burgering BM. (2007). The X factor: skewing X inactivation towards cancer. *Cell* **129**: 1253–1254.

Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML, Malventano C, Triulzi T, Menard S *et al.* (2009). FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol* **27**: 1746–1752.

Miller AM, Lundberg K, Ozenci V, Banham AH, Hellstrom M, Egevad L *et al.* (2006). CD4+CD25high T cells are enriched in the tumor and peripheral blood of prostate cancer patients. *J Immunol* **177**: 7398–7405.

Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A *et al.* (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* **30**: 899–911.

Mizukami Y, Kono K, Kawaguchi Y, Akaike H, Kamimura K, Sugai H *et al.* (2008). Localisation pattern of Foxp3+ regulatory T cells is associated with clinical behaviour in gastric cancer. *Br J Cancer* **98**: 148–153.

Morse MA, Hobeika AC, Osada T, Serra D, Niedzwiecki D, Lyerly HK *et al.* (2008). Depletion of human regulatory T cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood* **112**: 610–618.

Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T *et al.* (2007). Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* **446**: 685–689.

Pan F, Yu H, Dang EV, Barbi J, Pan X, Grosso JF *et al.* (2009). Eos mediates Foxp3-dependent gene silencing in CD4+ regulatory T cells. *Science* **325**: 1142–1146.

Powell Jr DJ, Felipe-Silva A, Merino MJ, Ahmadzadeh M, Allen T *et al.* (2007). Administration of a CD25-directed immunotoxin, LMB-2, to patients with metastatic melanoma induces a selective partial reduction in regulatory T cells *in vivo*. *J Immunol* **179**: 4919–4928.

Rasku MA, Clem AL, Telang S, Taft B, Gettings K, Gragg H *et al.* (2008). Transient T cell depletion causes regression of melanoma metastases. *J Transl Med* **6**: 12.

Roncador G, Brown PJ, Maestre L, Hue S, Martinez-Torrecuadrada JL, Ling KL *et al.* (2005). Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level. *Eur J Immunol* **35**: 1681–1691.

Roux S, Apetoh L, Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Puig PE *et al.* (2008). CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. *J Clin Invest* **118**: 3751–3761.

Rudensky AY, Gavin M, Zheng Y. (2006). FOXP3 and NFAT: partners in tolerance. *Cell* **126**: 253–256.

Sakaguchi S. (2000). Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell* **101**: 455–458.

Sakaguchi S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* **6**: 345–352.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells

expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25) Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* **155**: 1151–1164.
Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D *et al.* (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol* **27**: 186–192.
Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. (2001). Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* **276**: 37672–37679.
Shevach EM. (2009). Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* **30**: 636–645.
Siddiqui SA, Frigola X, Bonne-Annee S, Mercader M, Kuntz SM, Krambeck AE *et al.* (2007). Tumor-infiltrating Foxp3-CD4+CD25+ T cells predict poor survival in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**: 2075–2081.
Signoretti S, Di Marcotullio L, Richardson A, Ramaswamy S, Isaac B, Rue M *et al.* (2002). Oncogenic role of the ubiquitin ligase subunit Skp2 in human breast cancer. *J Clin Invest* **110**: 633–641.
Spatz A, Borg C, Feunteun J. (2004). X-chromosome genetics and human cancer. *Nat Rev Cancer* **4**: 617–629.
Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol* **6**: 152–162.
Taieb J, Chaput N, Schartz N, Roux S, Novault S, Menard C *et al.* (2006). Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J Immunol* **176**: 2722–2729.
Tang Q, Bluestone JA. (2008). The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* **9**: 239–244.
Thompson TC, Southgate J, Kitchener G, Land H. (1989). Multistage carcinogenesis induced by ras and myc oncogenes in a reconstituted organ. *Cell* **56**: 917–930.
Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T *et al.* (2009). Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3+ T cells in gut Peyer's patches. *Science* **323**: 1488–1492.
van Loosdregt J, Vercoulen Y, Guichelaar T, Gent YY, Beekman JM, van Beekum O *et al.* (2010). Foxp3 protein stabilization. *Blood* **115**: 965–974.
Vukmanovic-Stejic M, Zhang Y, Cook JE, Fletcher JM, McQuaid A, Masters JE *et al.* (2006). Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations *in vivo*. *J Clin Invest* **116**: 2423–2433.
Walker MR, Carson BD, Nepom GT, Ziegler SF, Buckner JH. (2005). De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 4103–4108.
Wan YY, Flavell RA. (2007). Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* **445**: 766–770.
Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, Huizinga TW, Toes RE. (2007). Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* **37**: 129–138.
Wang L, Liu R, Li W, Chen C, Katoh H, Chen GY *et al.* (2009). Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer Cell* **16**: 336–346.
Weigel D, Jurgens G, Kuttner F, Seifert E, Jackle H. (1989). The homeotic gene fork head encodes a nuclear protein and is expressed in the terminal regions of the *Drosophila* embryo. *Cell* **57**: 645–658.
Wieczorek G, Asemissen A, Model F, Turbachova I, Floess S, Liebenberg V *et al.* (2009). Quantitative DNA methylation analysis of FOXP3 as a new method for counting regulatory T cells in peripheral blood and solid tissue. *Cancer Res* **69**: 599–608.
Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G *et al.* (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res* **61**: 4766–4772.
Woo YL, Sterling J, Crawford R, van der Burg SH, Coleman N, Stanley M. (2008). FOXP3 immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded tissue: poor correlation between different antibodies. *J Clin Pathol* **61**: 969–971.
Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC *et al.* (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **126**: 375–387.
Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. (2007). Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta. *J Immunol* **178**: 6725–6729.
Yang XO, Nurieva R, Martinez GJ, Kang HS, Chung Y, Pappu BP *et al.* (2008). Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity* **29**: 44–56.
Yoshioka T, Miyamoto M, Cho Y, Ishikawa K, Kadoya M, Li L *et al.* (2008). Infiltrating regulatory T cell numbers is not a factor to predict patient's survival in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* **98**: 1258–1263.
Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. (2007). Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* **445**: 936–940.
Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez-Llordella M, Ashby M *et al.* (2009). Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells *in vivo*. *Nat Immunol* **10**: 1000–1007.
Ziegler SF. (2006). FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* **24**: 209–226.
Zitvogel L, Kroemer G. (2008). The dilemma of anticancer therapy: tumor-specific versus immune effects. *Blood* **112**: 4364–4365.
Zou W. (2006). Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol* **6**: 295–307.
Zuo T, Liu R, Zhang H, Chang X, Liu Y, Wang L *et al.* (2007a). FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2. *J Clin Invest* **117**: 3765–3773.
Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W *et al.* (2007b). FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell* **129**: 1275–1286.

B. Foxp3 et lymphocytes T régulateurs

Une fois initiée, la réponse immunitaire doit permettre une éradication efficace des agents pathogènes, tout en évitant le développement d'une réponse auto-immune. Il existe donc des mécanismes de régulation, à la fois centraux et périphériques pour maintenir la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi. Les lymphocytes T suppresseurs, qui comprennent les lymphocytes T régulateurs (Tregs), les cellules T régulatrices de type 1 (Tr1) et celles de type 3 (Th3) constituent une pierre angulaire majeure pour cette contre régulation vitale.

Les Tr1 et les Th3 acquièrent des fonctions régulatrices après stimulation antigénique dans un environnement cytokinique particulier. Les Tr1 constituent une population lymphocytaire T à fonction régulatrice capable d'inhiber les fonctions des cellules T effectrices, indépendamment d'un contact intercellulaire, via leur sécrétion de quantités élevée d'IL-10 et de TGFβ. Elles se différencient également des Tregs par l'absence d'expression du facteur de transcription Foxp3 (Groux et al., 1997). Les cellules Th3 expriment fortement Foxp3, et exercent leur activité régulatrice via la sécrétion de TGFβ-1. La population la plus étudiée, et celle qui semble avoir le rôle le plus important dans le cancer reste cependant le Treg.

1. Origine des Tregs :

La possibilité de l'existence d'une population lymphocytaire régulatrice a été soulevée initialement dans les années 70 (Gershon & Kondo, 1970). La preuve directe de l'existence d'une telle population lymphocytaire impliquée dans la tolérance au soi a été apporté plus tard par l'induction de phénomènes auto-immuns chez la souris après élimination d'une fraction des lymphocytes T CD4+ (Morrissey et al., 1993) (Sakaguchi et al., 1985). La reconstitution de la population cellulaire éliminée prévient le développement des ces pathologies. Au milieu des années 90, la découverte d'un des marqueurs de surface de cette population, le CD25 (chaine α du récepteur à l'IL-2), permet de différencier, au moins fonctionnellement, la

population de lymphocytes T CD4+ à fonction régulatrice, des autres populations T (Sakaguchi et al., 1995). Ces données montrent que l'élimination des cellules T CD4+ CD25+ (représentant 5 à 10% des lymphocytes T CD4 chez la souris ou chez l'homme), permet de rompre la tolérance au soi, et ainsi d'initier l'apparition de maladies auto-immunes. Par la suite, plusieurs populations de T régulateurs (naturels, nTreg, ou induits iTregs) ont été décrits chez l'homme comme chez la souris.

Les lymphocytes T CD4+ CD25+régulateurs naturels (nTregs) naissent dans le thymus et constituent une population spécifique des Ag du soi (Papiernik et al., 1998). Le transfert de thymocytes CD4+ déplétés en cellules CD25+ conduit en effet au développement de maladies auto-immunes chez la souris athymique. Ces thymocytes CD4+CD25+ présentent in vitro et in vivo des fonctions suppressives équivalentes à celles des cellules T CD4+ CD25+ périphériques (Itoh et al., 1999). L'identification de telles cellules dans la population des thymocytes suggère que ces cellules sont éduquées durant la sélection négative. Ce processus débute lors de l'induction de l'expression de Foxp3 (principal facteur de transcription des Tregs) dans une sous population de thymocytes ayant un TCR αβ avec une forte affinité pour les complexes CMH-peptide du soi exprimés par les DCs médullaires (Picca et al., 2006). Cette forte affinité du TCR pour des peptides autologues associée à une costimulation via CD28 contribue à la spécification du lignage régulateur par l'induction de l'expression de Foxp3 dans ces thymocytes (Kim & Rudensky, 2006). Chez l'homme, les corpuscules de Hassal de la médullaire thymique sécrètent la TSLP (thymic stromal lymphopoietine), impliquée dans la migration et l'activation de DCs immatures capables alors d'exprimer les molécules de costimulation nécessaire à l'expression de Foxp3 dans les futurs Tregs (Hanabuchi et al., 2010). L'induction de Foxp3 aboutit à la modulation de l'expression de plusieurs centaines de gènes, permettant entre autres d'aboutir au phénotype, et à la fonctionnalité des Tregs. Après leur production dans le thymus, les nTregs migrent en

périphérie, où ils reçoivent divers signaux de survie et ne prolifèrent qu'en présence d'IL-2 exocrine sécrétée par les populations T effectrices. L'IL-2 est nécessaire à l'expansion et l'homéostasie des Tregs (Bayer et al., 2005), vraisemblablement en jouant plutôt sur leur maintient périphérique (Setoguchi et al., 2005). In vitro, l'IL-2 est impliquée dans la prolifération et le maintient des fonctions régulatrices des Tregs.

Les iTregs se développent quand à eux en périphérie à partir de lymphocytes T naïfs ou de nTregs sous l'influence de diverses cytokines dont les plus importantes semblent être l'IL-10 et le TGFβ (Toda & Piccirillo, 2006) (Wan & Flavell, 2007).

2. Les marqueurs spécifiques des Tregs :

Chez le rat, la souris et chez l'homme, l'un des premiers marqueurs identifiés exprimé à la surface des lymphocytes T CD4+ à fonction suppressive est le récepteur α de l'interleukine-2 (CD25). Ces lymphocytes T CD4+ CD25+ à fonction régulatrice semblent être les seuls à exprimer de manière constitutive CTLA-4 et GITR (Tumor-necrosis factor superfamily member glucocorticoid-induced TNF receptor ou TNF receptor family related protein 18, TNFRSF18), 2 molécules impliquées dans les fonctions régulatrices. Plus récemment, le facteur de transcription Foxp3 a été mis en évidence comme un marqueur encore plus spécifique des lymphocytes T régulateurs et ayant un rôle capital pour sa fonction suppressive.

Foxp3 : A l'heure actuelle, Foxp3 est considéré comme le marqueur le plus spécifique des Treg. En 1982, un nouveau syndrome d'immunodéficience lié au chromosome X, responsable d'une pathologie auto-immune atteignant les organes endocrines et le tube digestif, et d'infections rapidement mortelles a été caractérisé chez l'homme, le syndrome IPEX (**I**mmune **D**ysregulation, **P**olyendocrinopathy, **E**nteropathy, **X**-linked syndrome) (Powell et

al., 1982). Ultérieurement, une lignée de souris appelée Scurfy a été décrite et caractérisée par une mutation récessive liée à l'X, létale quelques semaines après la naissance chez les mâles, et responsable d'une suractivation des lymphocytes T avec sécrétion de cytokines proinflammatoires chez la femelle (Godfrey et al., 1991). Le gène défectif chez ces souris a été appelé Foxp3. Il s'agit d'un facteur de transcription de la famille des Forkhead/winged-helix (Brunkow et al., 2001). Son orthologue humain a aussi été caractérisé et sa mutation est à l'origine du syndrome IPEX (Bennett et al., 2001) (Wildin et al., 2001). Foxp3 joue un rôle capital dans le développement et dans la fonction suppressive des lymphocytes T régulateurs (Fontenot et al., 2003) (Khattri et al., 2003). Foxp3 n'est pas exprimé dans les lymphocytes T à fonction Th1 ou Th2. La transfection de Foxp3 dans des lymphocytes T CD4+ CD25- naïfs les transforme en lymphocytes T CD4+ CD25+ à fonction régulatrice. Du point de vue moléculaire, Foxp3 peut se comporter comme un répresseur transcriptionel, supprimant les fonctions effectrices des cellules T en se liant physiquement à NF-κB et à NFAT, deux facteurs de transcription ayant un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération et la sécrétion de cytokines des lymphocytes T. Foxp3 agit comme co-répresseur de ces facteurs en bloquant leur capacité à induire la transcription de multiples cytokines telles que l'IL-2, l'IL-4 et l'IFN-γ (Bettelli et al., 2005; Wu et al., 2006). Les interactions avec le stroma thymique induisent dans les Tregs en développement un programme transcriptionel parallèlement à l'expression de Foxp3, qui va dans un deuxième temps stabiliser ce programme pour maintenir les fonctions suppressives de ces cellules (Gavin et al., 2007) (Lin et al., 2007).

Les voies moléculaires impliquées dans l'expression de Foxp3 sont encore largement méconnues, mais il semble que l'activation du facteur de transcription STAT3, en réponse à une costimulation CD28 soit critique pour l'expression de Foxp3, et ainsi pour la différenciation, la conversion périphérique et le maintient des fonctions suppressives des Tregs (Pallandre et al., 2007).

Actuellement, l'expression de FOXP3 semble être le meilleur marqueur moléculaire des Tregs. Néanmoins, il faut noter que l'on trouve aussi l'expression de cette molécule dans certains lymphocytes T CD8+ régulateurs (Bienvenu et al., 2005) ainsi que dans les populations de lymphocytes T CD4+ CD25- convertis en lymphocytes T régulateurs par différents stimuli (Taams & Akbar, 2005). Foxp3 peut être transitoirement exprimé dans certaines population lymphocytaires T activées (Hoffmann et al., 2009), mais seule une expression à la fois forte et durable confère au lymphocyte T des fonctions régulatrices (Allan et al., 2008) (Hoffmann et al., 2009).

CD25: Récepteur α de IL-2, CD25 est le meilleur marqueur, avec Foxp3, pour caractériser les lymphocytes T régulateurs aussi bien chez les rongeurs que chez l'homme. Son utilisation est facile chez le rongeur car la quasi-totalité des lymphocytes T CD4+ CD25+ sont des cellules régulatrices. Chez l'homme son utilisation est plus complexe car seule la population cellulaire exprimant fortement CD25 est constituée de lymphocytes T régulateurs et sa caractérisation en cytométrie de flux par rapport aux lymphocytes non régulateurs exprimant moins CD25 repose sur des critères arbitraires.

GITR : GITR (**G**lucocorticoid-**I**nduced **T**NF receptor family **R**elated gene) est constitutivement exprimé à la surface des lymphocytes T régulateurs (McHugh et al., 2002) (Shimizu et al., 1999) dont il semble être un bon marqueur. Sur le plan fonctionnel, l'engagement du signal GITR *in vitro* entraîne une abolition des fonctions immunosuppressives des lymphocytes T CD4+ CD25+. L'injection d'un anticorps agoniste de GITR induit des gastrites auto-immunes chez la souris. L'engagement du signal GITR casse donc la tolérance immunitaire médiée par les T régulateurs (Shimizu et al., 1999). Cependant, l'implication de GITR dans les fonctions immunosuppressives des nTregs reste

controversée dans la mesure ou les nTregs issus de souris GITR-/- restent parfaitement capables d'inhiber la réponse cellulaire T (Ronchetti et al., 2004).

Neuropiline 1: La neuropiline 1 est un récepteur ayant un rôle dans le guidage des axones, l'angiogénèse et l'activation des lymphocytes T. La neuropiline 1 est exprimée de manière constitutive par les lymphocytes T CD4+ CD25+ à fonction régulatrice exprimant fortement Foxp3 (Bruder et al., 2004). Par contre, l'expression de la neuropiline par les lymphocytes T non suppresseurs activés est faible. La neuropiline pourrait donc être un marqueur utile pour distinguer les lymphocytes CD4+ CD25+ régulateurs des lymphocytes CD4+ non régulateurs exprimant CD25 à la suite de leur activation (Bruder et al., 2004).

LAG-3 (CD223) : Produit du Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG-3), CD223, un homologue de CD4 capable de se lier aux molécules de classe II du CMH, est exprimé par les lymphocytes T activés et les cellules NK. CD223 est aussi présent à la surface des Tregs et pourrait jouer un rôle dans leur fonction régulatrice (Huang et al., 2004) notamment dans la régulation de l'homéostasie de la population T contrôlée par les Treg (Workman & Vignali, 2005). CD223 est donc un marqueur possible des Treg et contribue à leur activité immunosuppressive.

CD45 : Les anticorps reconnaissant les isoformes résultant de l'épissage alternatif de la protéine tyrosine phosphatase CD45 ont aussi été utilisés, chez les rongeurs et chez l'homme, pour caractériser, en association avec CD25, les CD4+ CD25+ régulateurs. Chez l'homme les Tregs expriment préférentiellement l'isoforme RO (Baecher-Allan et al., 2001), marqueur des lymphocytes T activés ou mémoires, et pas ou peu l'isoforme caractérisant préférentiellement les lymphocytes T CD4+ naïfs, CD45RA (Baecher-Allan et al., 2001). Il en est de même chez

les rongeurs : les Treg n'expriment pas CD45RB chez la souris (Kuniyasu et al., 2000), ni CD45RC chez le rat (Stephens & Mason, 2000). Cependant, une expression identique de CD45 est observée dans les lymphocytes T CD4+ non régulateurs récemment activés. Il existe donc 2 populations de Tregs : des Tregs de phénotype naïfs (CD45RA+, $Foxp3^{low}$) qui constituent la plupart des nTregs trouvés en périphérie (Miyara et al., 2009) (Ito et al., 2008) (Fritzsching et al., 2006) à l'état quiescent (Miyara et al., 2009), et qui peuvent secondairement proliférer après stimulation de leur TCR, upréguler l'expression de Foxp3, et se convertir en Tregs « mémoires » de phénotype CD45RO+, $Foxp3^{high}$ qui possèdent une activité proliférative (Miyara et al., 2009) et suppressive plus marquée, et une tendance à l'anergie (Baecher-Allan et al., 2001) en partie expliquée par une plus grande sensibilité à l'apoptose, après leur stimulation (Fritzsching et al., 2005) (Ashley & Baecher-Allan, 2009). Le terme « mémoire » semble toutefois inadapté dans la mesure où ces cellules subissent un renouvellement rapide (Vukmanovic-Stejic et al., 2006). Il semble plus correct de les considérer comme des Tregs « effecteurs ».

ICOS : (Inductible T cell Costimulator) n'est exprimé que par les Tregs effecteurs. En réalité, seule une fraction de ces cellules expriment ICOS, et seule cette fraction est à même de downréguler l'expression de CD86 par les DCs, alors que les Tregs ICOS+ et ICOS- sécrètent des quantités similaires de cytokines immunorégulatrices (TGFβ, IL10) (Ito et al., 2008).

3. Action des Tregs sur les acteurs cellulaires de l'immunité :

3.1 Effet des Tregs sur les lymphocytes T CD4+ et sur les lymphocytes T CD8+:

Chez la souris, les cellules CD4+CD25+ fraîchement isolées de la rate n'ont pas d'activité suppressive sur les lymphocytes T. Par contre, après une stimulation de leur TCR spécifique

via une cellule dendritique présentant le peptide dont le Treg est spécifique, ou une stimulation non spécifique via un anticorps anti CD3, les Tregs deviennent capables d'inhiber la prolifération et la sécrétion de cytokine des lymphocytes T CD4+ et CD8+ de manière non spécifique de l'antigène (Thornton & Shevach, 1998) (Thornton & Shevach, 2000) (Piccirillo & Shevach, 2001). Cette activité suppressive correspond notamment à l'induction d'une apoptose lymphocytaire CD4 par privation de cytokine, essentiellement d'IL-2 (Pandiyan et al., 2007). *In vitro,* les Tregs inhibent les lymphocytes T par contact direct, sans intervention des cytokines. Cependant, s'il est clair que les Tregs sont capables de bloquer la prolifération des CD4 et des CD8, ainsi que leur capacité à secréter des cytokines aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Walker et al., 2003), il semble qu'ils ne puissent agir *in vivo* que sur la fonction cytotoxique des CD8 (Chen et al., 2005). Chez l'homme, la démonstration directe de l'effet suppresseur des Tregs *in vivo* n'a pas été faite. Les fonctions de ces cellules n'ont donc été étudiées qu'*in vitro*. Les Tregs humains fraîchement isolés du sang sont capables d'inhiber la prolifération et la sécrétion d'IFN-γ des lymphocytes T CD4+ ou CD8+ d'une manière non spécifique de l'antigène (Jonuleit et al., 2001). Cette inhibition nécessite comme chez la souris un contact direct et semble médiée par une molécule exprimée à la surface des Tregs. Comme chez la souris, la fonction suppressive des Tregs humains semble nécessiter leur préactivation via une stimulation de leur TCR (Dieckmann et al., 2002).

3.2 Effet des Tregs sur les NKT

Les Tregs humains isolés du sang périphérique sont capables d'inhiber *in vitro* la sécrétion de cytokines par les NKT lorsqu'ils sont stimulés par une cellule dendritique allogénique (Azuma et al., 2003). De même les Tregs peuvent inhiber *in vitro* la cytotoxicité des NKT contre une cellule cible. Le mécanisme par lequel les Tregs inhibent les NKT reste encore à élucider.

3.3 Effet des Tregs sur les cellules NK

Lorsque la tumeur induit une accumulation de Tregs, ceux-ci inhibent les fonctions NK *in vivo*. In vitro, l'interaction Treg-NK dépend de l'expression du TGF-β à la surface des Tregs, nécessite un contact direct entre cellules Tregs et NK, et implique au moins en partie une régulation négative de l'expression de NKG2D à la surface des NK. Ces mécanismes ont été confirmés *in vivo* chez la souris (Ghiringhelli et al., 2005a).

3.4 Effet des Tregs sur les cellules dendritiques

Les Tregs sont capables de diminuer l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 des cellules dendritiques (Cederbom et al., 2000).

Chez l'homme, les Tregs sont capables d'inhiber la maturation des cellules dendritiques dérivées de monocytes du sang périphérique cultivées en présence de GM-CSF et d'IL-4. Les Tregs diminuent l'expression des molécules de costimulation par les cellules dendritiques et augmentent leur sécrétion d'IL-10 (Misra et al., 2004).

Il semble donc que les Tregs puissent bloquer la maturation des cellules dendritiques, ce qui suggère un mode complémentaire d'inhibition de la réponse immunitaire. Du fait de leur expression de CTLA-4 (cf infra), les Tregs pourraient se lier aux cellules dendritiques exprimant les molécules de costimulation B7, induisant ainsi la production de l'enzyme indoléamine 2,3 dioxygénase par les cellules dendritiques (Fallarino et al., 2003). Cette enzyme catabolise le tryptophane en kynurénine et la présence de faibles concentrations de tryptophane dans le milieu et/ou la présence de catabolites du tryptophane inhibent les lymphocytes T effecteurs.

3.5 Effets des Tregs sur les autres cellules de l'immunité :

Plus récemment, les Tregs ont été montrés également capables d'inhiber certains acteurs cellulaires de l'immunité innée, comme le macrophage. C'est ainsi que dans des modèles précliniques de lymphome, la déplétion en Tregs s'accompagne d'une augmentation de l'infiltration tumorale en macrophages. En absence de Tregs, ces macrophages infiltrants les tumeurs voient leurs propriétés tumoricides significativement augmenter (Galani et al., 2010). Il semble que les Tregs soient également capables d'inhiber les fonctions proinflammatoires des Th17 de manière STAT3 dépendante. Ainsi, dans un modèle murin de KO conditionel STAT3 sous la dépendance de Foxp3, les souris développent une réponse Th17 excessive et meurent de maladie inflammatoire de l'intestin (Chaudhry et al., 2009)

4. Mécanismes moléculaires immunosuppresseurs mis en jeu par les Tregs :

Avant d'exercer une activité suppressive, le Treg doit d'abord être activé, ce qui nécessite une stimulation via le TCR et les récepteurs de costimulation dont le rôle reste controversé, mais aussi un signal via les récepteurs de l'IL-2. Une fois activé, le Treg peut alors exercer son effet régulateur. Plusieurs mécanismes régulateurs ont été décrits.

4.1 Molécules impliquées dans l'activation et/ou la prolifération des Tregs :

Rôle du TCR et de la reconnaissance antigénique : Comme les autres lymphocytes T CD4, les Tregs peuvent être activées par l'intermédiaire de leur TCR qui reconnaît un peptide associé à une molécule de classe II du CMH. Les Tregs humains doivent être activés via leur TCR pour exercer leurs fonctions régulatrices (Sakaguchi et al., 2010). Cependant, une fois activée, le Treg exerce son activité suppressive indépendamment de l'antigène dont il est spécifique, donc sans réactivation par l'intermédiaire du TCR. L'interaction entre la cellule Treg et le complexe peptide antigénique-molécule de classe II du CMH peut être initiée dans le thymus où elle intervient dans la sélection, la maturation et la prolifération des populations

T regulatrices (Gavin & Rudensky, 2003). En périphérie aussi les Tregs doivent être activés pour être fonctionnels. *In vitro*, il est nécessaire de préactiver les Tregs de souris en utilisant par exemple un anticorps anti CD3 pour que ces cellules exercent un effet suppresseur (Thornton et al., 2004). *In vivo* l'activation ne semble pas toujours nécessaire (Walker et al., 2003).

Rôle de l'IL-2 : L'IL-2 est nécessaire à l'expansion et l'homéostasie des Tregs (Suzuki et al., 1995) (Bayer et al., 2005), vraisemblablement en jouant plutôt sur leur maintient périphérique (Setoguchi et al., 2005) (Fontenot et al., 2005). In vitro, l'IL-2 est impliquée dans la prolifération et le maintient des fonctions régulatrices des Tregs.

Les récepteurs de costimulation : A coté des cytokines, certaines molécules de costimulation jouent un rôle clé pour le développement et l'homéostasie des nTregs. C'est ainsi que le nombre de thymocytes CD4+ CD25+ et le nombre de lymphocytes T périphériques CD4+ CD25+ est significativement diminué chez les animaux déficients en CD28, B7, CD40 ou CD40L (Salomon et al., 2000) (Tang et al., 2003), une diminution attribuée à l'altération des interactions entre T et cellules stromales, normalement exigée pour la génération de nTregs (Tai et al., 2005). Si l'expression de CD28 semble nécessaire pour la génération et l'homéostasie des Tregs elle ne semble en revanche pas avoir d'effet sur leur fonction régulatrice intrinsèque (Takahashi et al., 2000) (Thornton et al., 2004).

PD-1 est le récepteur de B7-H1 (= PDL1), une molécule de co-signalisation du même type que CD80 et CTLA-4. Il semble que l'interaction PD1-PDL1 ait un rôle dans la fonction suppressive des Tregs. Le développement de maladies auto-immunes en absence de PD1 suggère son implication dans le maintient de la tolérance au soi (Sharpe et al., 2007). Par

ailleurs, le blocage de PD-1 par un anticorps bloquant inhibe les fonctions suppressives des Tregs (Gray et al., 2002). Dans le cancer de l'ovaire, les DCs du microenvironnement tumoral expriment B7-H1, induisant la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T (Curiel et al., 2003).

Rôle des cellules dendritiques : Les Tregs fraîchement isolés d'une souris ou d'un homme semblent être des cellules non prolifératives et n'acquérant des fonctions immunosuppressives qu'après une stimulation via le TCR. Les cellules présentatrices d'antigène paraissent donc jouer un rôle important dans l'activation et la fonctionnalité des Tregs. Ainsi, les cellules dendritiques matures exprimant les molécules de costimulation CD80 et CD86, sont capables d'induire la prolifération des Tregs aussi bien *in vitro* que *in vivo*. (Yamazaki et al., 2003) (Tarbell et al., 2004).

Un dialogue complexe semble donc s'établir entre les cellules dendritiques et les Tregs assurant un contrôle de la réponse immunitaire à différents niveaux. Ces interactions pourraient suivre le schéma suivant: des signaux traduisant la présence d'un agent pathogène (LPS par exemple) activent la cellule dendritique, induisent sa maturation et la rendent capable d'activer les T effecteurs. La réponse immunitaire qui en résulte détruit une partie des tissus autologues, libérant ainsi des auto-antigènes présentés par des cellules dendritiques matures. Ces auto-antigènes induisent la prolifération et l'activation de Tregs qui inhibent les T effecteurs, limitant ainsi la réponse immunitaire. En même temps les Tregs inhibent les cellules dendritiques qui sont redevenues sensibles aux Tregs probablement en raison de la diminution des facteurs (CD40 et LPS) qui stimulaient la résistance des cellules dendritiques aux Tregs. Les Tregs prolifèrent, augmentent leur expression de CTLA-4, diminuent l'expression de CD80 et CD86 à la surface des cellules dendritiques (Oderup et al., 2006). Ces cellules se mettent à produire de l'IL-10 et moins d'IL-12. Parallèlement, CTLA-4 induit la production de l'indoléamine 2,3 dioxygénase dans les cellules dendritiques inhibant ainsi

les lymphocytes T effecteurs et induisant probablement la production de lymphocytes Tr1 et Th3 (Grohmann et al., 2002). Ces mécanismes assurent ainsi le rétrocontrôle de la réponse immunitaire qui permet d'éviter l'auto-immunité. Les Tregs semblent également capables de tuer directement les CPA (Zhao et al., 2006).

Dans un contexte de cancer, les DCs plasmocytoïdes (pDCs), et les DCs myéloïdes exprimant B7-H1 sont capables d'induire la sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes T infiltrant la tumeur (Curiel et al., 2003) (Zou et al., 2001).

4.2 Mécanismes moléculaires d'action sur les acteurs cellulaires de l'immunité

A la différence d'autres lymphocytes immunosuppresseurs comme les Tr1 et les Th3, les lymphocytes T CD4+ CD25+ exprimant Foxp3 peuvent inhiber leur cible par contact direct. (Jonuleit et al., 2001) (Dieckmann et al., 2002). Après contact intercellulaire, les Tregs sont capables, en induisant dans ces cellules l'uprégulation d'AMPc intra cellulaire, d'inhiber la prolifération des T et leur production d'IL-2 (Bopp et al., 2007) mais aussi de tuer directement les autres lymphocytes T activés par la perforine ou le granzyme (Gondek et al., 2005) (Cao et al., 2007) (certains Tregs peuvent par les mêmes mécanismes avoir une action cytolytique sur les NK (Cao et al., 2007).

Il est donc vraisemblable que les cellules Tregs expriment à leur surface des molécules immunosuppressives dont le type peut varier en fonction du contexte immunologique.

CTLA-4: CTLA-4 est, avec CD28, l'un des deux récepteurs classiques des molécules de costimulation B7, CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2). CTLA-4 se distingue de CD28 par son affinité beaucoup plus élevée pour les ligands B7 et par son effet inhibiteur sur la réponse immunitaire. Contrairement à CD28 dont l'expression est constitutive, CTLA-4 n'est exprimé par la majorité des lymphocytes T que lorsqu'ils sont activés, mais les lymphocytes T

régulateurs sont la seule population lymphocytaire à exprimer CTLA-4 de manière constitutive. Cette expression est essentiellement intracellulaire mais les Tregs peuvent aussi exprimer faiblement CTLA-4 à leur surface surtout en cas d'activation (Takahashi et al., 2000) (Fallarino et al., 2003) (Jonuleit et al., 2001). CTLA-4 joue un rôle important dans la fonction immunosuppressive des lymphocytes T régulateurs. Un anticorps anti CTLA-4 peut lever l'effet inhibiteur des lymphocytes T régulateurs *in vitro* (Takahashi et al., 2000). Par ailleurs, l'engagement de CTLA-4 induit une expression accrue de TGF-β et du TGF-βRII à la surface des Treg (Chen et al., 2003). CTLA-4 pourrait aussi intervenir indirectement dans l'interaction entre Treg, T effecteur et cellule dendritique : les Tregs, via CTLA-4, peuvent downreguler l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 par les DCs (Wing et al., 2008) (Onishi et al., 2008), et induire dans les cellules dendritiques exprimant CD80 l'expression de l'indoléamine 2,3-dioxygénase, perturber ainsi le métabolisme du tryptophane et inhiber la fonction des lymphocytes T effecteurs (Fallarino et al., 2003).

TGF-β : Les lymphocytes T régulateurs pourraient en effet non seulement produire du TGF-β soluble, mais aussi exprimer à leur surface du TGF-β dans sa forme active ainsi que le récepteur TGF- β RII (Chen & Wahl, 2003). Un anticorps bloquant le TGFβ inhibe les fonctions suppressives des lymphocytes T régulateurs (Nakamura et al., 2001). La localisation du TGF- β à la surface des Treg pourrait expliquer la nécessité d'un contact direct pour mettre en évidence son effet immunosuppresseur.

L'injection d'anticorps anti TGF- β chez l'animal bloque l'effet protecteur d'une injection de lymphocytes T CD4+ CD25+ régulateurs sur le développement de la colite inflammatoire (Read et al., 2000). De plus, les lymphocytes T CD8+ d'animaux transgéniques exprimant un dominant négatif du TGF- β RII à la surface de leurs lymphocytes sont résistants à l'effet immunosuppresseur des lymphocytes T régulateurs *in vitro*. *In vivo*, en l'absence de contrôle

par le TGF- β exprimé à la surface des Tregs, ces lymphocytes T CD8+ induisent un diabète auto-immun insulinodépendant (Green et al., 2003).

Le TGF- β a non seulement un rôle direct d'effecteur de tolérance mais semble aussi impliqué dans le maintien de la fonction suppressive des Tregs. Le TGF- β est en effet nécessaire au maintien par les Tregs de l'expression de Foxp3 (Marie et al., 2005).

IL-10 : Une autre cytokine immunosuppressive, l'IL-10, n'est pas essentielle pour l'effet inhibiteur des Tregs *in vitro* (Shevach, 2002) mais pourrait jouer néanmoins un rôle *in vivo,* dans la mesure où sa neutralisation abolit *in vivo* les fonctions immunosuppressives des Tregs dans des modèles murins (Powrie et al., 1996) (Hesse et al., 2004). Dans des modèles de colite inflammatoire, les lymphocytes T CD4+ CD25+ sécrètent de l'IL-10 dont dépend leur effet immunosuppresseur (Asseman et al., 2003).

D'autres mécanismes inhibiteurs ont été récemment mis en lumière :

Ainsi les Tregs possèdent les ectonucléases CD39 et CD73, capables de dégrader l'ATP du milieu extracellulaire, et ainsi de supprimer l'un des principaux signaux danger susceptible d'activer les DCs (Deaglio et al., 2007). Le métabolite généré, l'adénosine, semble par ailleurs en lui-même d'avoir un rôle biologique immunorégulateur.

Les Tregs sont également capables de libérer et/ou d'exprimer à leur surface des quantités importantes de galectine1, dont l'expression est augmentée après stimulation de leur TCR. Après liaison à ses récepteurs, cette molécule induit une diminution de la prolifération, de la sécrétion de cytokines et l'apoptose des T activés (Garin et al., 2007).

Plus récemment, il a été montré que les nTregs étaient également capables de sécréter de l'IL-35, qui semble nécessaire à leur activité suppressive (Collison et al., 2007).

Le Treg convertit les autres lymphocytes T en lymphocyte régulateurs : le concept de tolérance infectieuse :

Bien que les lymphocytes T régulateurs agissent par contact direct *in vitro,* l'IL-10 et le TGF-β jouent aussi un rôle important dans les phénomènes de tolérance *in vivo*. Il se pourrait donc que les cellules sécrétrices de TGF- β (Th3) et les cellules sécrétrices d'IL-10 (Tr1) aient aussi un rôle important dans les mécanismes de tolérance induits par les lymphocytes T CD4+ CD25+ régulateurs. En fait, les Tregs peuvent non seulement inhiber les fonctions effectrices des lymphocytes par contact direct, mais ces cellules sont aussi capables d'induire des fonctions suppressives chez des lymphocytes T CD4+ conventionnels d'une manière dépendante d'un contact intercellulaire. Ce processus a été appelé « tolérance infectieuse» par analogie avec le phénomène similaire décrit *in vivo* au cours de la transplantation allogénique (Jonuleit et al., 2002) (Dieckmann et al., 2002).

A l'inverse des lymphocytes T régulateurs naturels, ces lymphocytes dont les fonctions régulatrices sont ainsi acquises agissent indépendamment du contact intercellulaire et semblent appartenir à deux populations distinctes dans leur capacité à produire des cytokines: l'une exprimant l'intégrine α4β7 a la capacité de se localiser dans les muqueuses où elle sécrète localement de l'IL-10 pour prévenir les phénomènes auto-immuns ; l'autre population exprime l'intégrine α4β1, et se localise dans les zones tissulaires inflammatoires où elle contrôlerait l'inflammation en produisant du TGF-β et en inhibant ainsi les réponses immunitaires excessives potentiellement pathogènes (Stassen et al., 2004).

5. Rôle des Tregs dans les cancers.

Une intervention de lymphocytes T régulateurs dans les cancers a été évoquée il y a plus de 30 ans, notamment par le groupe de Gershon (Gershon et al., 1974). Au cours des années 80, des résultats expérimentaux concordants obtenus dans plusieurs modèles animaux de tumeurs

immunogènes ont permis à North et à ses collaborateurs d'apporter la preuve formelle d'une immunosuppression induite par des lymphocytes T CD4+ bloquant la réponse immunitaire antitumorale naturelle ou consécutive à une immunothérapie. Le transfert passif de lymphocytes T venant des animaux porteurs de cancer induit aussi une abolition de l'immunité antitumorale (North & Bursuker, 1984) (North & Dye, 1985). L'élimination de cette population de lymphocytes T permet par contre d'induire la régression tumorale spontanément ou après une immunothérapie spécifique inefficace en présence des T CD4+ suppresseurs. Malgré 10 ans de travaux cohérents et prometteurs, ces résultats sont tombés dans un relatif oubli.

C'est seulement à la fin des années 90 que ces cellules immunosuppressives bloquant la réponse immunitaire contre le cancer ont été caractérisées comme des lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+. Leurs caractéristiques et leurs fonctions ont été mises en évidence dans des modèles expérimentaux et chez les patients porteurs d'un cancer.

5.1 Rôle des Tregs dans les tumeurs expérimentales :

De nombreuses études montrent que dans des modèles animaux, la proportion de Tregs est augmentée, et que leur déplétion ou leur inhibition permet la restauration d'une immunité anti tumorale (Linehan & Goedegebuure, 2005). Les Tregs s'accumulent dans la rate et les ganglions lymphatiques drainant la tumeur d'une façon proportionnelle au volume tumoral (Ghiringhelli et al., 2004). Des travaux récents montrent que en plus des cellules inflammatoires, de nombreux facteurs solubles présent dans le microenvironnement tumoral sont capables d'induire cette accumulation (Liyanage et al., 2006) comme la Cox2 et la PGE2 (Bergmann et al., 2007), CD70 (Yang et al., 2007), la galectine 1 (Juszczynski et al., 2007) le TGFβ (Liu et al., 2007b), l'indoléamine 2,3 dioxygénase (Curti et al., 2007), qui favorisent l'activation périphérique des nTregs ou l'induction de iTregs à partir de lymphocytes T

périphériques (Linehan & Goedegebuure, 2005). C'est ainsi que l'accumulation de Tregs chez des souris porteuses de tumeurs peut s'observer y compris chez des souris thymectomisées, et après une déplétion CD25 (Valzasina et al., 2006). Les Tregs primés dans les ganglions de drainage ont les mêmes propriétés régulatrices que les nTregs et reconnaissent des Ag tumoraux (Hiura et al., 2005). Des lymphocytes T régulateurs reconnaissant des complexes CMH-peptide d'origine tumoral sont capables de supprimer l'activité de lymphocytes CD8+ anti tumoraux de manière non spécifique de l'antigène et indépendante des cytokines (Fu et al., 2000). En plus de la conversion périphérique de T CD4+ CD25- en Tregs, le recrutement de ces cellules par les tumeurs semble consécutif à un tropisme tumoral des Tregs via une sécrétion tumorale de CCL22, dont le récepteur CCR4 est fortement exprimé par les Tregs infiltrant les tumeurs dans ces mêmes modèles (Curiel et al., 2004) (Gobert et al., 2009). Enfin l'augmentation du nombre de Tregs pourrait résulter de leur prolifération *in vivo* après leur activation par les antigènes de tumeurs dont ils sont spécifiques comme le suggérait déjà North (North & Awwad, 1990). Dans des modèles précliniques de cancer colique et de mélanome, l'accumulation de Tregs est due à leur prolifération *in vivo*. *In vivo* comme *in vitro* cette prolifération dépend des cellules dendritiques immatures infiltrant les organes lymphoïdes drainant les tumeurs. Les cellules tumorales sont capables d'induire la production de TGF-β biologiquement actif par ces cellules dendritiques. Cette production de TGF-β rend ces cellules dendritiques capables d'induire la prolifération des Tregs (Ghiringhelli et al., 2005b).

Par ailleurs, les travaux expérimentaux menés chez l'animal semblent montrer que les Tregs sont les acteurs majeurs de la perte de la « concomitant tumor immunity » (rejet d'un inoculum tumoral à un site distant de la tumeur primitive (Turk et al., 2004) constatée dans des tumeurs considérées comme peu immunogènes (Lin et al., 2009).

Dans la plupart de ces modèles précliniques, L'injection d'un anticorps dirigé contre CD25 prévient la croissance tumorale chez la souris (Onizuka et al., 1999). La déplétion des cellules CD4+ CD25+ de ganglions drainant une tumeur induit une augmentation des capacités cytotoxiques anti-tumorales de ces lymphocytes *in vitro* et *in vivo* (Tanaka et al., 2002b). L'effet de la déplétion en lymphocytes CD25+ est renforcé par une déplétion concomitante en lymphocytes exprimant CTLA-4 et par une immunothérapie (Sutmuller et al., 2001). La déplétion en Tregs permet aussi de potentialiser l'effet d'une immunothérapie ou de potentialiser l'effet d'une vaccination par les cellules dendritiques (Steitz et al., 2001). Dans la plupart de ces modèles, cette prévention n'est obtenue que si la déplétion en Tregs est effectuée avant l'injection des cellules tumorales et/ou immédiatement après celle-ci. La déplétion en lymphocytes T CD25+ n'est donc pas suffisante pour permettre le rejet de tumeurs établies.

5.2 Rôle des Tregs dans les cancers humains :

Un rôle des lymphocytes T régulateurs dans la tolérance induite par les tumeurs humaines est évoqué depuis de nombreuses années (Von Roenn et al., 1987). L'importance des T régulateurs CD4+ CD25+ dans les cancers humains semble avoir été mise en évidence pour la première fois en montrant que les lymphocytes T CD25+ provenant des ganglions de patients porteurs de mélanome étaient capables d'inhiber une réponse immunitaire *in vitro* (Chakraborty et al., 1990). Ultérieurement une augmentation du nombre de lymphocytes Tregs par rapport à des sujets sains a été retrouvée dans le sang, la tumeur et/ou les ganglions de drainage des tumeurs de patients porteurs de nombreux types de cancers différents, métastasés ou non (Ha, 2009). Comme chez la souris, leur nombre est corrélé à la masse tumorale (Ichihara et al., 2003), et pour certaines tumeurs opérables, la proportion de Tregs redevient comparable à celle de sujets sains après exérèse chirurgicale (Kono et al., 2006).

Ces lymphocytes gardent une fonction régulatrice *in vitro* puisqu'ils sont capables d'inhiber une alloréaction lymphocytaire. Il existe donc chez des patients atteints de cancers variés une augmentation des lymphocytes T régulateurs, analogue à celle constatée chez les rongeurs porteurs de tumeur. L'effet de ces Tregs sur les cellules effectrices de la réponse immunitaire a été peu étudié chez les patients atteints de cancer. Des lymphocytes Tregs capables d'inhiber les lymphocytes T cytotoxiques lysant les cellules tumorales ont été mis en évidence chez un patient porteur d'un cancer colique (Somasundaram et al., 2002). Chez des patients porteurs de mélanome métastatique, il est possible d'isoler dans le sang des Tregs spécifiques d'antigènes tumoraux. In vitro, ces cellules sont capables de supprimer la réponse T lymphocytaire autologue via un contact intercellulaire (Vence et al., 2007). Plus récemment des Tregs isolés du sang de patients porteurs de cancer de prostate ont montré in vitro une activité immunosuppressive plus importante que les Tregs de patients sans cancer, et la possibilité in vivo de favoriser la croissance tumorale en inhibant les TILs (Rozkova et al., 2009). Dans le cancer de l'ovaire, les Tregs s'accumulent dans le microenvironnement tumoral et sont capables d'inhiber la cytotoxicité et la production de cytokines des T CD8+ spécifiques de la tumeur in vitro et in vivo (Curiel et al., 2004). Ce chimiotactisme des Tregs est médié dans ce contexte par la libération de CCL22 par la tumeur de l'ovaire (Curiel et al., 2004), mais aussi dans les cancers du sein (Gobert et al., 2009) et les épanchements pleuraux néoplasiques (Qin et al., 2009). Chez des patients porteurs de cancer du sein et du pancréas, les Tregs isolés de la tumeur et des ganglions de drainage sécrètent du TGFβ et de l'IL-10, et bloquent in vitro la prolifération des T CD8+ (Liyanage et al., 2002).

Chez des patients porteurs de GIST, lorsque la tumeur induit une accumulation de Tregs ceux-ci inhibent les fonctions NK *in vivo*. In vitro, l'interaction Treg-NK dépend de l'expression du TGF-β à la surface des Tregs, nécessite un contact direct entre Treg et NK et implique au

moins en partie une régulation négative de l'expression de NKG2D à la surface des NK. Ces mécanismes ont été confirmés *in vivo* chez la souris (Ghiringhelli et al., 2005a).

6. Moyens thérapeutiques pour cibler les Tregs :

Diminuer le nombre ou les fonctions des Tregs dans un contexte de tumeur maligne apparait donc logique pour favoriser la réponse immunitaire anti tumorale.

La déplétion en Tregs induite par un anticorps anti CD25 se traduit par un rejet des tumeurs chez la souris (Onizuka et al., 1999) (Shimizu et al., 1999). De même, parmi les cytotoxiques d'usage courant, le cyclophosphamide, particulièrement à faible dose (schéma « métronomique ») exerce une cytotoxicité élective sur les Tregs et facilite leur élimination, participant à la restauration de la prolifération lymphocytaire T, et à la restauration de la cytotoxicité des CD8 et des NK chez la souris (Ghiringhelli et al., 2004; Ghiringhelli et al.) et chez l'homme (Ghiringhelli et al., 2007). Dans divers modèles précliniques, l'administration de cyclophosphamide, et le déplétion en Tregs qui l'accompagne, augmente l'efficacité d'une immunothérapie (Ghiringhelli et al., 2004), ou d'une vaccination avec des DCs (Nair et al., 2007). Cet effet assez spécifique du cyclophosphamide sur les Tregs pourrait être en rapport avec le faible stock d'ATP présent dans les Tregs, et donc à une moindre capacité de ces cellules à éliminer les métabolites actifs du cyclophosphamide, par des voies impliquant la présence d'ATP, comme celle du glutathion (Zhao et al., 2010), ou a une plus grande sensibilité à l'apoptose liée a l'expression de Foxp3 (Roux et al., 2008). Les Tregs semblent en effet présenter un très faible stock intracellulaire d'ATP en raison d'une part de la faible expression d'un micro RNA (miR-142-3p) (Zhao et al., 2010) qui normalement s'oppose à l'expression de l'adenylate cyclase (catalysant la transformation de l'ATP en AMPc), et d'autre part, de l'expression d'ectonucléases (CD39 et CD73) transformant l'ATP extra

cellulaire en adénosine, et donc favorisant l'efflux d'ATP par le Treg (Lazarowski et al., 2003).

De même, l'administration d'un anticorps bloquant CTLA4 est capable d'inhiber la croissance de certaines tumeurs peu immunogènes (Leach et al., 1996), particulièrement en association avec un cotraitement par un anti-CD25 (Sutmuller et al., 2001). Chez l'homme, l'administration d'un anti CTLA4 (MDX-010 : Medarex) s'accompagne d'une diminution transitoire des Tregs dans le sang (O'Mahony et al., 2007). Ce traitement pourrait aussi rendre les T effecteurs résistants aux Tregs (Menard et al., 2008). Chez des patients préalablement vaccinés, il permet d'augmenter la réponse immunitaire anti tumorale (Hodi et al., 2003), et d'observer des réponses tumorales objectives (Phan et al., 2003). Dans le mélanome malin métastatique, une récente étude de phase III montre l'efficacité d'un traitement par anti-CTLA4 après échec de la chimiothérapie (Hodi et al., 2010).

La dinileukin difitox (Ontak) est une protéine de fusion IL-2 – toxine diphtérique, qui va donc être internalisée après liaison de l'IL-2 à son récepteur CD25, favorisant l'apoptose de la cellule via l'action de la toxine diphtérique (Foss, 2000). Il s'agit d'un médicament approuvé par la FDA aux Etats Unis pour le traitement des lymphomes T cutanés CD4+ CD25+ (Tiemessen et al., 2006). Ce traitement réduit le nombre de Tregs et améliore le contrôle tumoral en association avec une immunothérapie dans des modèles précliniques (Knutson et al., 2006) et chez l'homme (Dannull et al., 2005).

Le blocage ou l'inhibition de multiples facteurs du microenvironnement potentiellement impliquées dans la génération et/ou les fonctions suppressives des Tregs, ont ainsi montré des résultats très préliminaires, mais encourageant dans des modèles précliniques. C'est ainsi que le blocage du VEGF est capable de diminuer le nombre de Tregs infiltrant les tumeurs dans

des modèles précliniques de mélanome et de cancer du colon (Li et al., 2006). L'inhibition de la Cox2 réduit l'expression de Foxp3, limite l'infiltration tumorale en Tregs, et freine la croissance tumorale dans des modèles de cancer bronchique (Sutmuller et al., 2001). L'inhibition pharmacologique de STAT3 diminue les fonctions suppressives des Tregs (Pallandre et al., 2007).

La constatation d'un effet favorisant l'accumulation et la prolifération des Tregs par les œstrogènes a amené une équipe à étudier l'effet immunomodulateur d'une hormonothérapie par létrozole (inhibiteur de l'aromatase) chez des patientes porteuses d'un cancer du sein (Generali et al., 2009). Le traitement par létrozole s'accompagne d'une diminution significative du nombre de Treg qui est par ailleurs corrélée à la réponse au traitement.

7. Tregs et pronostics des cancers humains :

La présence d'une forte infiltration tumorale en cellules immunitaires, notamment en lymphocytes T (TILs), est souvent considéré comme un facteur de bon pronostic dans de nombreux types tumoraux comme les cancers du sein, de l'ovaire, de l'œsophage, du colon, du rein, de la prostate, du poumon (Pages et al., 2010).

Il faut mentionner l'existence dans la littérature d'études contradictoires sur le rôle pronostic des infiltrats immunologiques montrant l'absence de lien pronostic, voire un lien pronostic inverse (Stewart & Tsai, 1993) (Sheu et al., 1999) (Nakano et al., 2001). La meilleure connaissance des différentes populations cellulaires composant le microenvironnement tumoral, et de leurs fonctions respectives permet de mieux apprécier la valeur pronostique potentielle de chacune d'entre elle. C'est ainsi que des études plus récentes ont mis évidence le rôle pronostic prédominant de certaines populations lymphocytaires parmi les TILs comme les T CD8+ (Naito et al., 1998) ou les T mémoires (Pages et al., 2005) vis-à-vis de la survie

sans récidive et globale des patients. Compte tenu de leur rôle dans l'inhibition d'une réponse immunitaire antitumorale, la présence d'une quantité importante de Tregs (établi en immunohistochimie par la présence de cellules avec un marquage Foxp3, et ayant une morphologie de lymphocytes) dans la tumeur a souvent été rapporté comme un facteur de mauvais pronostic dans des variétés différentes de cancer (Martin et al., 2010). Le cancer colorectal semble toutefois constituer un exemple inverse, dans lequel une forte infiltration tumorale en cellules T Foxp3+ est associée à un pronostic à long terme plus favorable (Salama et al., 2009)

De façon intéressante, des travaux menés dans le cancer de l'ovaire (Sato et al., 2005) et le cancer du foie (Gao et al., 2007) ont montré que plus que la présence de Tregs ou de lymphocytes T CD8, c'est la balance entre l'infiltrat en cellules effectrices (CD8+) et en cellules régulatrices (Foxp3+), qui déterminait le mieux le pronostic des patients. Ainsi, dans ces larges séries rétrospectives, plus l'infiltrat tumoral en CD8 est important et associé à un faible infiltrat Foxp3, et meilleur est le pronostic.

Cependant, toutes ces études établissent un lien entre qualité et/ou quantité des infiltrats lymphocytaires tumoraux et pronostic à un moment donné de l'histoire clinique du patient, sans tenir compte de l'influence possible du traitement antinéoplasique sur la réponse immunitaire antitumorale et donc des infiltrats lymphocytaires tumoraux. Il existe pourtant des arguments de plus en plus solides pour penser que les traitements comme la chimiothérapie sont susceptibles d'influer la qualité de la réponse immunitaire de l'hôte vis-à-vis de la tumeur (cf infra).

En pratique clinique, l'administration d'une chimiothérapie néoadjuvante, c'est dire délivrée avant l'exérèse chirurgicale de la tumeur donne la possibilité au pathologiste et au clinicien d'avoir accès à la tumeur avant de débuter le traitement (sur la biopsie diagnostique par exemple) et après administration du traitement (lors de l'examen de la pièce opératoire). Nous

avons souhaité mettre à profit ce type de stratégie utilisé couramment dans le cancer du sein pour analyser l'évolution de la qualité de l'infiltrat tumoral lymphocytaire T, et son impact pronostic éventuel chez des patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante pour un cancer du sein.

Nous nous sommes essentiellement attachés à décrire la modulation de l'infiltrat tumoral en lymphocytes T CD8+ et en lymphocytes T régulateurs.

8. **Article # 4 :**

"Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells"

Clinical Cancer Research. Avril 2008.

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy of Breast Carcinoma Is Associated with the Disappearance of Tumor-Infiltrating Foxp3$^+$ Regulatory T Cells

Sylvain Ladoire,[1,2] Laurent Arnould,[1] Lionel Apetoh,[3] Bruno Coudert,[1] Francois Martin,[2] Bruno Chauffert,[1,2] Pierre Fumoleau,[1] and François Ghiringhelli[1,2,3]

Abstract

Purpose: T-cell infiltration is associated with good tumor prognosis in many cancers. To assess the capacity of neoadjuvant chemotherapy to affect T-cell infiltration in breast cancer, we evaluated CD3 and CD8 infiltrates, and the Foxp3 immunosuppressive T cells.

Experimental Design: CD3$^+$, CD8$^+$, and Foxp3$^+$ cell infiltrates were detected by immunohistochemistry in a series of 56 breast cancer patients before and after the end of neoadjuvant chemotherapy.

Results: Poor prognostic factors (negative hormonal receptors, high tumor grade, and nodal involvement) were associated with a significantly higher number of CD3, CD8, and Foxp3 infiltrates before the beginning of chemotherapy. Chemotherapy resulted in a decrease in Foxp3 infiltrates, whereas the level of CD8 and CD3 infiltrates remained unchanged. Pathologic complete responses (pCR) had a drastic decrease of Foxp3$^+$ cells, whereas these cells remained elevated in nonresponders. A cutoff criterion that combined high CD8 infiltration and no Foxp3 cell infiltration on surgical specimens is associated with pCR with a sensitivity of 75% and a specificity of 93%. The infiltrate of cytotoxic TiA1 and granzyme B – positive cells was dramatically enhanced after chemotherapy only in patients with pCR. By multivariate analysis, association of a high CD8 infiltration and no Foxp3 infiltration on final histologic specimens were independently associated with pCR.

Conclusion: These findings indicate that pCR to neoadjuvant chemotherapy is associated with an immunologic profile combining the absence of immunosuppressive Foxp3 cells and the presence of a high number of CD8 T cells and cytotoxic cells. These results argue for the induction of an antitumor immune response by chemotherapy.

Many patients with local breast cancer are suitable candidates for neoadjuvant chemotherapy, with the aim of facilitating conservative surgery of the tumor and initiating early systemic treatment of micrometastases. Moreover, this approach provides an opportunity to assess tumor chemosensitivity to the preoperative regimen by measuring the residual disease obtained on surgical specimen. Pathologic complete response (pCR) after neoadjuvant chemotherapy has been described as a strong indicator of survival, justifying its use as a surrogate marker of chemosensitivity (1). Although chemotherapy mainly acts directly by cytotoxic effect on tumor cells, the chemotherapy-induced tumor cell death also has the ability to harness the host's immune system to fight against its tumor. A recent study showed the involvement of Th1 antitumor responses in anticancer chemotherapy in mice (2), and also in breast cancer patients treated with anthracycline-based chemotherapy (3, 4). Interestingly, in these breast cancer patients, a polymorphism in the immune gene *Toll-like receptor 4* was an independent factor of poor prognosis in response to chemotherapy (5). Thus, clinically used anticancer agents seem to also mediate their cytotoxic effects through the immune system (6).

Spontaneous tumor immunity also influences tumor prognosis. High T-cell infiltration and CD8 infiltrate have been linked to a better prognosis in colon carcinoma and in ovarian cancer (7, 8). These data strongly suggest that tumor infiltration by CD8 cytotoxic effectors could control tumor growth and account for a better prognosis. By contrast, human tumors also promote accumulation of CD4$^+$CD25$^+$ immunosuppressive regulatory T cells (Treg) in the tumor bed or in the blood. These cells are known as the key contributor to maintenance of immune tolerance, preventing emergence of organ-specific autoimmune diseases (9). These cells constitute ~2% to 3% of CD4$^+$ human blood T cells and could be characterized by the specific expression of the transcription factor Foxp3 (10). Patients with various types of cancer have higher numbers of

Authors' Affiliations: [1]Centre Régional de Lutte Contre le Cancer and [2]Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale CRI-866, Faculty of Medicine, Dijon, France; and [3]Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

Received 9/28/07; revised 11/26/07; accepted 12/15/07.

Grant support: Ligue contre le Cancer comité de Côte d'Or and comité de la Nièvre.

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

Requests for reprints: François Ghiringhelli, Centre Georges Francois Leclerc, Centre de Recherche INSERM 866, Faculté de Médecine, 7 boulevard Jeanne D'Arc, 21000 Dijon, France. Phone: 33-3-80-39-33-53; Fax: 33-3-80-39-34-34; E-mail: francois.ghiringhelli@wanadoo.fr.

©2008 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

Tregs in peripheral blood than healthy donors (11), and high levels of Treg tumor infiltration have been reported in hepatocellular (12), lung (13), ovarian (14), gastric, esophageal (15), and recently in breast cancer (16). Emerging evidence suggests that Treg cells have an important immunopathologic role in human tumor growth by suppressing endogenous tumor-associated antigen-specific T-cell immunity (14). Furthermore, three recent studies show that Treg infiltrates influence tumor prognosis in ovarian, gastrointestinal stromal tumor, and breast cancer (14, 17, 16).

Although histologic changes after neoadjuvant chemotherapy of breast cancer have been previously reported, *in situ* effects of chemotherapy on tumor/host immune system interactions remains unclear. A direct action of chemotherapy on Treg blood number has been suggested in HER2+ breast tumor treated by trastuzumab-based chemotherapy (18). Nevertheless, to our knowledge, the effect of breast cancer chemotherapy on tumor-infiltrated cytotoxic CD8 and suppressor Foxp3 T cells remains unknown.

The aim of the present study was therefore to examine the evolution of tumor-infiltrating $CD8^+$ T cell and $Foxp3^+$ cells through neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Importantly, this study reveals a strong relationship between T-cell infiltrate and complete histologic response.

Materials and Methods

Patients, treatment, and histology. Our series included 56 consecutive patients treated in our institution (Centre Regional de Lutte Contre le Cancer Dijon, Dijon, France) between January 2004 and May 2005 for operable breast carcinoma with preoperative chemotherapy followed by surgery and radiotherapy. After obtaining informed consent and approval by the Regional Ethical Committee for Medical Research (Comité Consultatif pour la Protection des Patients dans la Recherche Biomédicale de Côte d'Or), the diagnosis was established by a core needle biopsy. Histologic type was defined according to the WHO classification. Histoprognostic grade was defined according to the modified Bloom and Richardson method. The steroid hormone receptor estrogen receptor and progesterone receptor status was determined using enzymo-immunoassays (Abbott Diagnostics). The Herceptest scoring method was used for determination of c-erbB-2 status, considering only 3-grade score as determining HER-2–positive tumors.

Chemotherapy was done using an anthracycline-based regimen: FEC 100 (epirubicin 100 mg/m^2, cyclophosphamide 500 mg/m^2, and 5-fluorouracil 500 mg/m^2) or CEX (epirubicin 100 mg/m^2, cyclophosphamide 500 mg/m^2, and capecitabine 900 mg/m^2, day 1-14); taxane regimens were used sequentially (with docetaxel 100 mg/m^2) with anthracyclines-based chemotherapy. Patients with HER-2–positive tumors were treated with trastuzumab (2 mg/kg) associated with chemotherapy by docetaxel 100 mg/m^2 or by docetaxel 75 mg/m^2 + carboplatin AUC 6.

Surgery was done 2 to 3 wk after the last cycle of chemotherapy. Histologic response was determined on surgical specimens according to the Chevallier (19) and Sataloff classification (20). Breast tissue without residual malignant epithelial cell and associated with no microscopic evidence of invasive cancer in axillary specimens (Sataloff TA/NA or TA/NB, or Chevallier 1) was considered as pCR.

Immunohistochemical labeling. Immunohistochemistry used monoclonal antibodies against the pan T-cell marker CD3 (Ventana), the cytolytic T-cell marker CD8 (Dako), and Foxp3 (Abcam). Labeling was

Table 1. Patient and tumor characteristics

	Total cases	pCR group	NR group
Total cases	56	12	44
Age			
Mean ± SD	49.9 ± 8	47.6 ± 9.6	50.3 ± 8
Median (range)	51.5 (30-67)	49 (30-60)	49 (35-67)
Tumor size			
Mean ± SD	4.4 ± 1.7	4.6 ± 1.4	4.7 ± 2
Median (range)	4 (1-8)	3.9 (2-5)	4.5 (1-8)
Initial clinical tumor status			
T_1	1	0	1
T_2	33	7	26
T_3	17	4	13
T_4	5	1	4
Initial clinical node status			
N_0	17	4	13
N_1	31	5	26
N_2	6	2	4
N_3	2	1	1
Tumor grade			
1	4	0	4
2	33	5	28
3	19	7	12
HER overexpression (immunohistologic analysis)	20	8	12
Estrogen receptor			
Positive	37	4	33
Negative	19	8	11
Progesterone receptor			
Positive	27	2	25
Negative	29	10	19
Chemotherapy			
Anthracycline-based regimen	25	3	22
Anthracycline and taxane regimen	11	2	9
Trastuzumab and taxane regimen	20	7	13

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

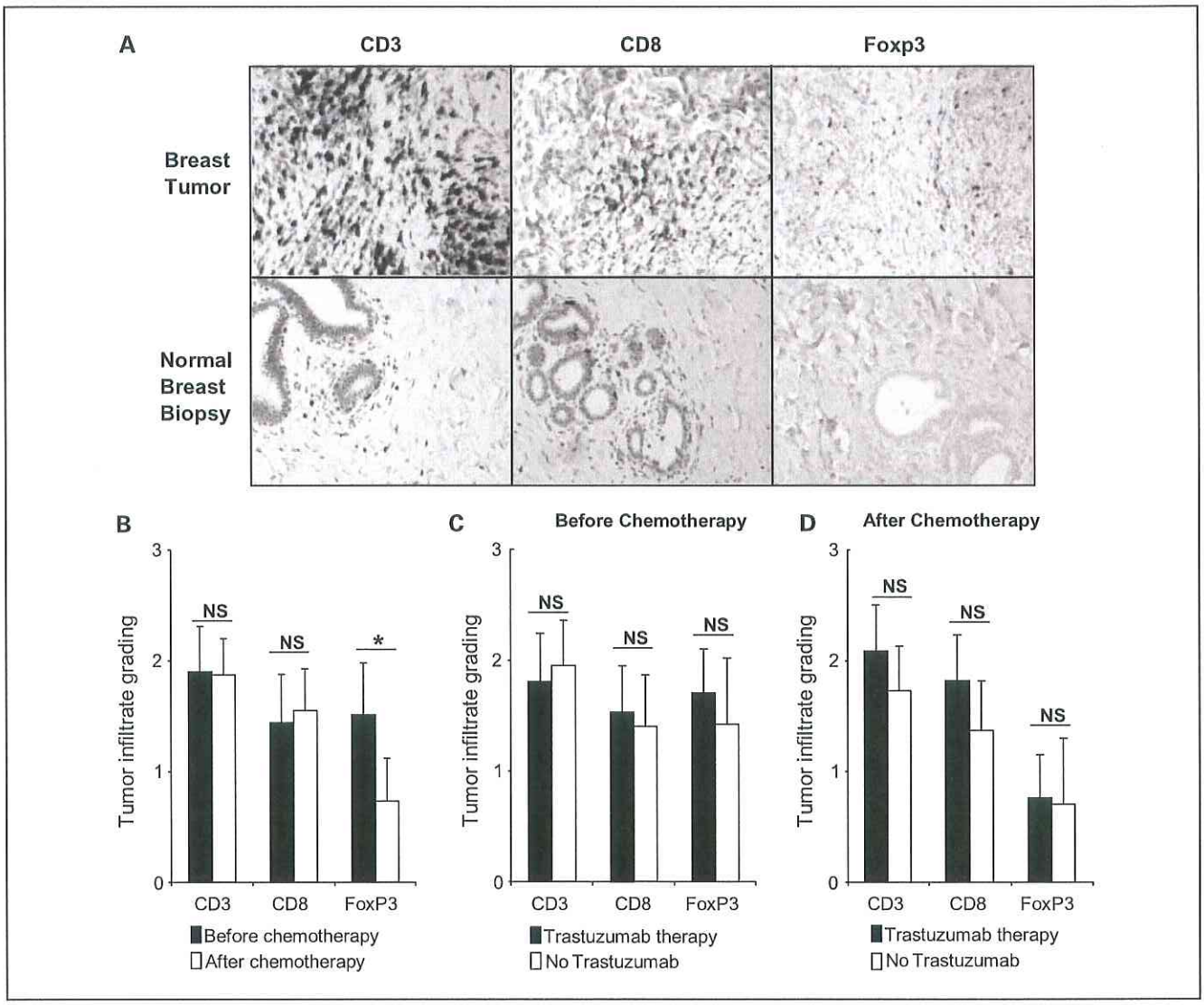


Fig. 1. Evolution of the immune infiltrate. *A,* immunohistochemical staining with CD3, CD8, and Foxp3 antibody in breast cancer tumor (*top*) and normal breast (*bottom*). *B,* evolution of CD30$^+$, CD8$^+$, and Foxp3$^+$ tumor cell infiltration into breast tumor before and after neoadjuvant chemotherapy. *C,* CD3$^+$, CD8$^+$, and Foxp3$^+$ tumor cell infiltration into breast tumor before and after neoadjuvant chemotherapy according to the chemotherapeutic regimen (trastuzumab or no trastuzumab). Statistical analysis was done with the Mann-Whitney *U* test. NS, nonsignificant. *, $P \leq 0.05$.

detected using the Dako Envision system (Dako). The stained arrays were counterstained with hematoxylin and mounted in Aquamount (Dako).

Positive and negative staining controls were carried out with paraffin tonsil sections using Foxp3 monoclonal antibody and an isotype-matched negative control antibody.

Potential cytolytic cells were stained with Granzyme B (Dako) and TiA1 (Immunotech).

Quantification of T cells. To evaluate the extent of lymphocytic infiltration, a grading system for semiquantitative scoring of lymphocytic infiltration based on the system established by Black et al. (21) was used. In our system, grade 0 corresponds to absence of lymphocytes and grades 1 to 3 correspond to increasing degrees of lymphocytic infiltration from a few scattered cells (grade 1) to marked infiltrate that mimics a lymphoid organ (grade 3). A modified scoring system was used for Foxp3$^+$ cells. We assessed at least 10 fields at high-power magnification (×200): grade 0 corresponds to absence of Foxp3 cells; grade 1 corresponds to the presence of 1 to 3 Foxp3 cells in less than three fields; grade 2 corresponds to the presence of 1 to 3 Foxp3 cells in more than three fields; and grade 3 corresponds to the presence of more than 3 Foxp3 cells in more than three fields. For all these labels, the levels of lymphocytic infiltration were evaluated by two independent pathologists. For each location, all cases in which scores differed by more than one grade on the semiquantitative scoring were reexamined and a consensus score was reached.

Statistical analyses. The association of variables was evaluated with the χ^2 test or with the Fisher's exact test if required. The Mann-Whitney *U* test was used to compare noncontinuous variables as appropriate. Initial clinical size; nodal status; histologic grade; initial estrogen receptor and progesterone receptor status; HER2 status; chemotherapy regimen; and level of CD3$^+$, CD8$^+$ T cells and Foxp3$^+$ lymphocytic infiltration at each biopsy were tested in univariate analysis. A P value <0.05 was considered significant.

A multivariate logistic regression model was also done to analyze the independent factors associated with these markers. Forward stepwise model selection was used to build the logistic regression model. Statistical analysis was done using XLSTAT software (Addinsoft) and Medcalc (Medcalc Software).

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

Table 2. Correlation analyses between the number of tumor-infiltrating T cells and clinicopathologic data before and after neoadjuvant chemotherapy (Mann-Whitney *U* test)

Categories	CD3 immune profile (mean ± SD)	*P*	CD8 immune profile (mean ± SD)	*P*	Foxp3 immune profile (mean ± SD)	*P*
A. Before neoadjuvant chemotherapy						
Age						
<50	1.9 ± 0.9	0.9	1.5 ± 0.8	0.6	1.6 ± 1	0.5
>50	1.9 ± 1		1.4 ± 1		1.4 ± 1.1	
T						
<40 mm	1.8 ± 1	0.3	1.5 ± 1	0.9	1.4 ± 1.1	0.5
>40 mm	2 ± 0.9		1.5 ± 0.9		1.6 ± 1.1	
N						
0	1.7 ± 1.1	0.05	1.1 ± 0.8	0.05	1.1 ± 1	0.05
+	2.1 ± 0.9		1.9 ± 1		1.9 ± 1	
Tumor grade						
1 + 2	1.7 ± 0.9	0.01	1.3 ± 0.9	0.03	1.2 ± 0.9	0.01
3	2.3 ± 1		1.8 ± 0.8		2 ± 1.1	
Estrogen receptor						
0	2.1 ± 1	0.4	1.8 ± 0.9	0.05	2 ± 1	0.02
+	1.8 ± 0.9		1.4 ± 1		1.3 ± 0.9	
Progesterone receptor						
0	2 ± 1	0.5	1.8 ± 1.1	0.04	1.7 ± 1.2	0.04
+	1.8 ± 0.8		1.1 ± 0.8		1 ± 0.9	
HER						
0	1.9 ± 0.9	0.7	1.4 ± 0.9	0.2	1.7 ± 1	0.3
+	1.9 ± 0.9		1.6 ± 0.9		1.4 ± 1.2	
B. After neoadjuvant chemotherapy						
Age						
<50	1.8 ± 0.8	0.6	1.6 ± 1	0.5	0.6 ± 0.9	0.6
>50	1.9 ± 0.8		1.5 ± 0.8		0.5 ± 0.8	
T						
<40 mm	1.8 ± 0.8	0.7	1.4 ± 1	0.2	0.6 ± 0.8	0.2
>40 mm	1.9 ± 0.9		1.7 ± 0.8		0.9 ± 1	
N						
0	1.7 ± 1	0.1	1.5 ± 1.1	0.98	0.5 ± 0.7	0.5
+	2 ± 0.7		1.5 ± 0.8		0.8 ± 1	
Tumor grade						
1 + 2	1.7 ± 0.8	0.04	1.2 ± 0.7	0.004	0.7 ± 0.9	0.9
3	2.2 ± 0.8		2 ± 0.9		0.7 ± 0.9	
Estrogen receptor						
0	2.2 ± 0.7	0.04	2.1 ± 0.8	0.001	0.9 ± 0.9	0.2
+	1.7 ± 0.8		1.2 ± 0.8		0.7 ± 0.9	
Progesterone receptor						
0	2.2 ± 0.7	0.01	1.8 ± 0.9	0.05	0.7 ± 0.9	0.7
+	1.6 ± 0.8		1.2 ± 0.8		0.8 ± 1	
HER						
0	1.7 ± 0.8	0.05	1.3 ± 0.0	0.05	0.7 ± 0.9	0.9
+	2.1 ± 0.9		1.9 ± 0.9		0.7 ± 0.8	
Chemotherapy						
Trastuzumab + taxane	2.2 ± 0.8	0.04	2 ± 0.7	0.04	0.7 ± 0.8	0.9
Other treatment	1.7 ± 0.8		1.3 ± 0.6		0.8 ± 0.7	

Results

Patient characteristics. Patient and tumor characteristics are reported in Table 1. Most patients presented with T_2 or T_3 tumors and had clinically detectable axillary lymph node involvement at diagnosis. One third of patients presented with a high tumor grade or an overexpression of Her2/Neu protein.

Preoperative chemotherapy was given every 3 weeks for a total of six cycles, and consisted of an anthracycline-based regimen in 25 cases (46%), taxane regimens used sequentially with anthracyclines-based chemotherapy in 11 cases (20%), and trastuzumab with taxane in 20 patients (34%).

Classic histologic analysis of surgical specimens revealed a pCR in 12 cases (21.4%). This pCR was achieved in 40% (8 of 20) of tumors overexpressing HER2, but in only 4 of the 36 patients (11%) with HER2-negative tumor ($P = 0.01$).

Analysis of T-cell infiltrates during treatment. In normal breast tissue, there were few CD3 and CD8 cells. Foxp3 cells were almost absent from normal tissue. By contrast CD3, CD8, and Foxp3 cells were found in higher density in breast invasive carcinoma (Fig. 1A).

After neoadjuvant chemotherapy, CD3 and CD8 infiltrates remained stable, whereas $Foxp3^+$ cell numbers significantly decreased on surgical specimens ($P = 0.01$; Fig. 1B).

These results argue for a differential reaction of intratumoral conventional T cells compared with intratumoral Foxp3 cells in response to chemotherapy. Interestingly, this observation was independent of chemotherapeutic regimen,

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

namely trastuzumab therapy or anthracycline-based therapy (Fig. 1C).

We assessed the association between T-cell infiltrates and classic prognostic factors. At the initial histologic examination, higher tumor grade, positive nodal status, and negative hormonal receptor expression were significantly associated with higher CD8 and Foxp3 infiltrates (Table 2A). At the final histologic analysis, only high CD8 and CD3 infiltration remained associated with poor prognostic factors (Table 2B).

Altogether, these data suggest that high initial T-cell infiltrate, whatever the type (CD3, CD8, or Foxp3), was correlated with classic poor prognosis factor. Chemotherapy, whatever the regimen, has a specific effect on Foxp3 infiltrate and decrease the number of Foxp3 tumor-infiltrated cells.

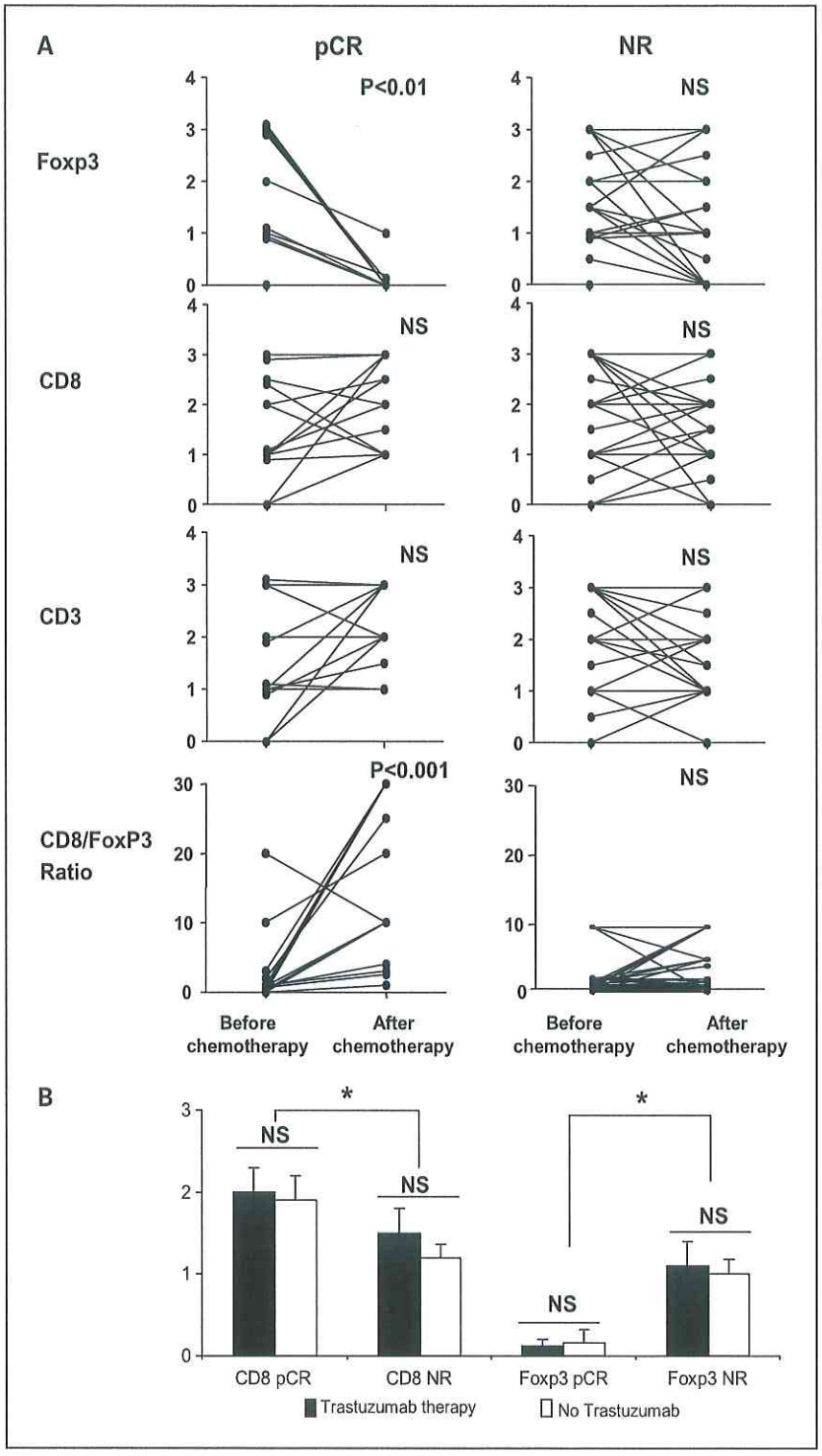


Fig. 2. Evolution of the immune infiltrate according to histologic response. *A*, evolution of $CD3^+$, $CD8^+$, and $Foxp3^+$ tumor cell infiltration into breast tumor and evolution of CD8/Foxp3 ratio before and after neoadjuvant chemotherapy, according to the pathologic response (pCR $n = 12$ or NR $n = 44$). Whereas CD3 and CD8 infiltration levels remain stable in both pCR and NR patients, Foxp3 infiltration is decreased in pCR patients only. *B*, $CD8^+$ and $Foxp3^+$ tumor cell infiltration after neoadjuvant chemotherapy according to the pathologic response (pCR or NR), and according to the chemotherapeutic regimen (trastuzumab or no trastuzumab). Statistical analysis was done with the Mann-Whitney *U* test. *, $P \leq 0.05$.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

Comparative analysis of pathologic complete responders and nonresponders. Chemotherapy decreases Foxp3 immunosuppressive infiltrate but maintains CD8 effectors, arguing for a positive role of chemotherapy on local antitumor immunity. We hypothesized that if these immunologic modifications were involved in increased antitumor effects and better tumor prognosis, they would be associated with complete pathologic response on final surgical specimens.

By univariate analysis, classic prognostic factors (high tumor grade and preoperative chemotherapy with trastuzumab) were found predictive of pCR (not shown).

Higher CD8 infiltrate before and after chemotherapy was associated with pCR ($P = 0.037$ and $P = 0.026$, respectively). Foxp3 initial infiltrate was not predictive of pCR, but at the final histologic analysis, pCR patients had a significantly lower number of Foxp3 cells (and often none) than nonresponders (NR; $P = 0.003$). Interestingly, trastuzumab therapy did not modify this observation, suggesting that final Foxp3 and CD8 infiltrate were associated with pCR regardless of the type of chemotherapy (Fig. 2B). Evolution of immune infiltrate dramatically differed between pCR and NR patients: pCR patients were characterized by disappearance of Foxp3 infiltrate and an increase of CD8/Foxp3 ratio, whereas NR patients had a stable level of Foxp3 cells and of the CD8/Foxp3 ratio (Fig. 2A). Indeed, in 11 of 12 patients with pCR, no Foxp3 cells were found in the final histologic sample, whereas only 19 of 44 poor responders were free of Foxp3$^+$ cell infiltrate at the same time point ($P = 0.01$).

Finally, a combined immunologic criterion that associated grade 2 or more CD8 infiltrate and the absence of Foxp3 infiltrate on surgical specimens was found to be strongly associated with pCR and predicted pCR with a sensitivity of 75% and a specificity of 93%. None of the 13 patients considered as very poor responders (defined by a TD/ND or TD/NC or TC/ND Sataloff's score or Chevallier 4 on surgical specimen) featured this immunologic profile. Multivariate analysis confirmed that only histologic high grade, trastuzumab therapy, and the combined immunologic criterion were independent predictors of pCR (Table 3).

Chemotherapy induces cytotoxic response in pCR patients. Synthesis of cytolytic granules, which contain some toxic protein such as granzyme B, is critical for CD8$^+$ T-cell cytotoxic functions. TiA1 is also a 17 kDa cytoplasmic granule–associated protein expressed in cells possessing potential cytolytic activity (22). Therefore, to further characterize the effect of chemotherapy onto cytotoxic function of immune cells, we analyzed the T-cytotoxic response, assessed by expression of cytolytic granule-associated protein by infiltrating CD8$^+$ T in matched pCR and NR patient.

Whereas tumor infiltrates weakly expressed these proteins before chemotherapy, we observed a strong accumulation of granzyme B and TiA1-expressing cells after chemotherapy but only in pCR patient (Fig. 3). This observation supports the hypothesis that chemotherapy could induce cytotoxic immune response in pCR patients.

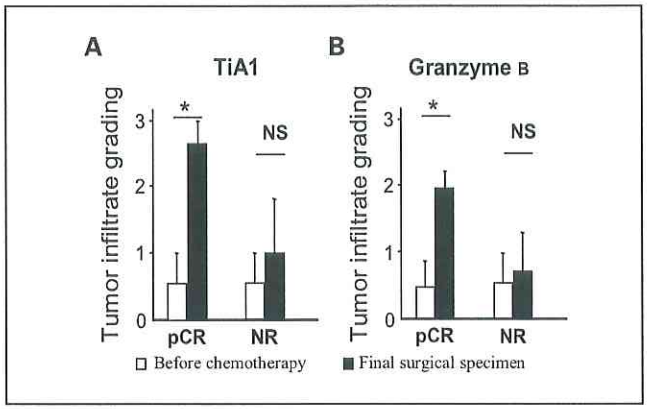


Fig. 3. Evolution of the cytotoxic immune infiltrate. Cytotoxic immune response characterized by accumulation of TiA1 and granzyme B – positive cells into breast tumor before and after chemotherapy in pCR ($n = 5$) and NR patients ($n = 5$). Statistical analysis was done with the Mann-Whitney U test. *, $P \leq 0.05$.

Discussion

This study highlights the importance of the immune system in the prognosis of localized breast cancer and the interaction between chemotherapy and the immune system in this setting.

The presence of tumor-infiltrating T lymphocytes is considered as a marker of host immune response to tumor antigens, and has been shown to correlate with outcome in melanoma (23), prostate (24), renal cell (25), esophageal (26), colorectal (27), and ovarian carcinomas (8, 28). In ovarian cancer, Zhang et al. (8) reported that the presence of CD3$^+$ tumor-infiltrating T lymphocytes correlates with improved outcome, whereas Curiel et al. (14) underline the negative role of Treg cells among tumor-infiltrating T lymphocytes by demonstrating an inverse correlation between Treg cell infiltration in ovarian carcinoma and overall survival. In a recent study done on epithelial ovarian cancer, Sato et al. (28) showed that neither intraepithelial CD3$^+$ nor Treg cell tumor-infiltrating T lymphocytes alone were associated with survival, but that a high intraepithelial CD8$^+$/Treg ratio, as in our study, was associated with improved outcome. Nevertheless, none of these studies focused on immune response induced by chemotherapy, and our study is the first to show that Foxp3 regulatory T-cell infiltration and Foxp3/CD8 ratio after neoadjuvant chemotherapy is strongly associated with pCR.

Table 3. Multivariate analyses (logistic regression) for patient pCR

	Categories	HR (95% CI)	*P*
Tumor grade	1 + 2 vs 3	19.9 (1.3-315.1)	0.03
Trastuzumab therapy	0 vs +	18.9 (1.2-308.7)	0.04
Combined immune variable	Foxp3 0 and CD8 ≥2 vs Foxp3 >0 or CD8 <2	99.9 (5.8-1727.9)	0.0015

Abbreviations: HR, hazard ratio; 95% CI, 95% confidence interval.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

As previously reported, we observed that breast tumors were highly infiltrated with CD8 and Foxp3 T cells compared with normal breast tissue (16, 29). Moreover, there was an association between aggressive phenotype and T-cell infiltration. These results are in line with those obtained by Bates (16) in a population of breast cancer patients treated by surgery followed by adjuvant treatment. In this study, only a high Treg infiltrate was associated with shorter survival, making it possible to identify patients at risk of relapse after 5 years. In our study, we showed that Treg infiltrate, and also CD8 infiltration, is associated with classic markers of poor prognosis in breast cancer.

In our patients, although CD3 and CD8 infiltrates remained stable during the treatment, the Foxp3 infiltrate strongly decreased, suggesting a higher sensitivity of Treg cells to the chemotherapeutic regimen than conventional T cells. These data are in line with our previous report demonstrating an elective cytotoxic effect of a cyclophosphamide metronomic regimen on Treg subset (30). Some other authors have shown the ability of paclitaxel and anthracycline to enhance antitumor immune response in mouse breast carcinoma model through Treg depletion (31).

Furthermore, we observed in our study a dichotomy between complete responders and other patients. Although the Foxp3 infiltrate remained stable in the NR patient, it was almost abolished in the pCR group. As trastuzumab could modify antitumor immune response (32), our results could be biased by the higher incidence of trastuzumab-treated patients in the pCR group. Nonetheless, we did not observe any difference in lymphocyte infiltrate between HER2-overexpressing tumors and other tumors. Moreover, the immunologic profiles of HER2-negative and HER2-overexpressing patients who achieved a pCR were similar, suggesting that immune reaction was not dependent on HER2 expression and trastuzumab treatment, but depends more generally on the administration of chemotherapy. Perez et al. (18) showed that trastuzumab, but not other therapies, induced a decrease in Treg blood number in metastatic breast cancer patients with objective response. The discrepancy with our study may result from the difference in tumor stage and also from the anatomic compartment studied. In fact, Treg biology may change between blood Treg and tumor infiltration Treg.

The use of a combined criterion associating the absence of Foxp3 infiltrate with high CD8 infiltration reinforced our data. This combined criterion discriminates with a good sensitivity and specificity the pCR group from the NR group, suggesting that when chemotherapy is effective and eliminates the tumor, an associated immune response is present, mediated by CD8 T cells relieved from the control of immunosuppressive Foxp3 cells. These results suggest that chemotherapy induces an immune response in pCR patients that may enhance efficacy of the treatment. To confirm this hypothesis, we examined markers of T-cell cytotoxicity before and after the treatment. In this manner, we could determine that cytotoxic capacity of T cells is only enhanced in complete responders, when Treg cells have disappeared.

It is noteworthy that in this model of neoadjuvant chemotherapy in breast carcinoma, we confirm our previous data obtained in an adjuvant setting (5), which showed that the antitumor effect of chemotherapy is partially mediated by an immunologic effect.

In conclusion, we show here for the first time that an immunologic signature consisting of the absence of Foxp3 cells and the presence of a high number of CD8 T cells on final surgical biopsy of breast tumor treated by neoadjuvant chemotherapy is associated with pCR. Our data suggest that immunologic effects triggered by chemotherapy may participate in the complete remissions induced by the antitumor treatments.

References

1. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol 1999;17:460–9.
2. Lake RA, van der Most RG. A better way for a cancer cell to die. N Engl J Med 2006;354:2503–4.
3. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. J Exp Med 2005;202:1691–701.
4. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med 2007;13:54–61.
5. Apetoh L Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nat Med 2007;13:1050–9.
6. Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy—a practical partnership. Nat Rev Cancer 2005;5:397–405.
7. Pages F, Berger A, Camus M, et al. Effector memory Tcells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med 2005;353:2654–66.
8. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral Tcells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. N Engl J Med 2003;348:203–13.
9. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, et al. Foxp3$^+$ CD25$^+$ CD4$^+$ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev 2006;212:8–27.
10. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells. Nat Immunol 2003;4:330–6.
11. Wolf AM, Wolf D, Steurer M, Gastl G, Gunsilius E, Grubeck-Loebenstein B. Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. Clin Cancer Res 2003;9:606–12.
12. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2005;65:2457–64.
13. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. Cancer Res 2001;61:4766–72.
14. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med 2004;10:942–9.
15. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. Clin Cancer Res 2003;9:4404–8.
16. Bates GJ, Fox SB, Han C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. J Clin Oncol 2006;24:5373–80.
17. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-β-dependent manner. J Exp Med 2005;202:1075–85.
18. Perez SA, Karamouzis MV, Skarlos DV, et al. CD4$^+$CD25$^+$ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. Clin Cancer Res 2007;13:2714–21.
19. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P. Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. Am J Clin Oncol 1993;16:223–8.
20. Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. J Am Coll Surg 1995;180:297–306.
21. Black MM, Speer FD, Opler SR. Structural representations of tumor-host relationships in mammary carcinoma; biologic and prognostic significance. Am J Clin Pathol 1956;26:250–65.
22. Anderson P. TIA-1: structural and functional studies on a new class of cytolytic effector molecule. Curr Top Microbiol Immunol 1995;198:131–43.
23. Ladanyi A, Somlai B, Gilde K, Fejos Z, Gaudi I, Timar J.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-4491

T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. Clin Cancer Res 2004;10:521–30.

24. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, Syrjanen K. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. Eur J Cancer 1994;30A:1797–803.

25. Nakano O, Sato M, Naito Y, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. Cancer Res 2001;61:5132–6.

26. Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. Cancer Res 2001;61:3932–6.

27. Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al. $CD8^+$ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. Cancer Res 1998;58:3491–4.

28. Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial $CD8^+$ tumor-infiltrating lymphocytes and a high $CD8^+$/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2005;102:18538–43.

29. Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. J Immunol 2002;169:2756–61.

30. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes $CD4^+CD25^+$ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. Cancer Immunol Immunother 2007;56:641–8.

31. Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. Cancer Res 2001;61:3689–97.

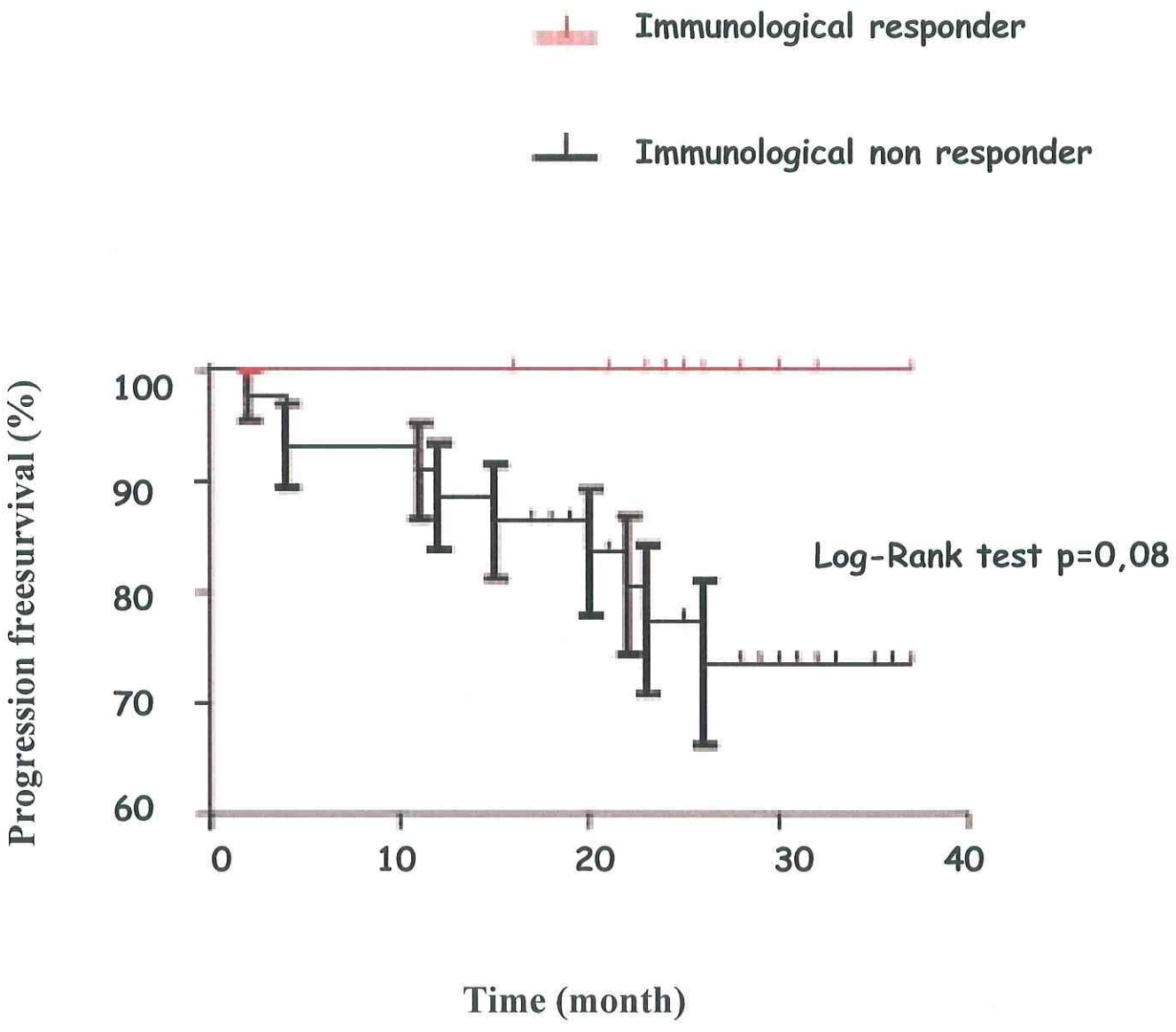
32. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, et al. Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? Br J Cancer 2006;94:259–67.

Downloaded from clincancerres.aacrjournals.org on January 22, 2011
Copyright © 2008 American Association for Cancer Research

9. Appendice 1 :

Appendice 1:

Survival according to immunological profile (n=56)



10. Synthèse-Discussion:

Ce travail fait en immunohistochimie sur coupes de tumeurs inclues en paraffine met en lumière de nouvelles données sur l'importance du système immunitaire (et notamment des Tregs) pour le pronostic des cancers du sein localisés, et des liens de celui-ci avec la chimiothérapie. Le contexte thérapeutique de chimiothérapie néoadjuvante constitue donc un modèle d'étude particulièrement intéressant permettant de juger des effets sur les cellules tumorales et le stroma, de la chimiothérapie administrée, puisque celle ci est réalisée tumeur en place, avant la chirurgie. Dans le cancer du sein, les effets de la chimiothérapie sur les cellules tumorales ont fait l'objet de multiples travaux, y compris d'ordre pronostic (Chevallier et al., 1993) (Sataloff et al., 1995). C'est ainsi que après chimiothérapie néoadjuvante, l'existence d'une réponse histologique complète (RHC) sur la pièce opératoire représente un indicateur puissant de chimiosensibilité de la tumeur, et constitue actuellement un facteur majeur de pronostic favorable dans ce contexte (Kuerer et al., 1999). Par opposition les effets in situ de la chimiothérapie sur les cellules du microenvironnement tumoral, et en particulier sur les infiltrats lymphocytaires tumoraux sont peu décrits.

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'évolution de la qualité de l'infiltrat tumoral en lymphocytes T CD8+ et en lymphocytes T régulateurs Foxp3+ au cours du déroulement de la chimiothérapie néoadjuvante de 56 patientes traitées pour un cancer du sein. Ces patientes bénéficiaient d'une biopsie initiale pour affirmer le diagnostic, d'une biopsie précoce après 1 cure (dans le cadre d'une étude thérapeutique), et d'une chirurgie mammaire après réalisation de 6 cures de chimiothérapie. Les marquages immunohistochimiques pour CD3, CD8 et Foxp3 ont été réalisés sur les prélèvements de tumeur à chacune de ces 3 étapes, chez toutes les patientes. Le marquage CD3 nous a permis de vérifier que les cellules reconnues par notre Ac anti Foxp3 étaient bien d'origine lymphocytaire. Nous avons tenu dès la mise en œuvre de ce travail à réaliser une évaluation simple, en utilisant une technique d'evaluation semi-

quantitative (0, 1, 2 ou 3 +) des différents infiltrats lymphocytaires, afin de proposer un grading facilement reproductif pour des études ultérieures. A la lecture de ces multiples échantillons tumoraux, la constatation d'une très grande hétérogénéité en termes de quantité de cellules marquées d'un champ microscopique à l'autre nous a par ailleurs conduits à proposer pour chaque échantillon et chaque marquage, une valeur d'infiltration globale, tenant compte de l'ensemble de l'analyse microscopique de l'échantillon. A ces 2 égards, notre approche s'oppose aux études réalisées par tumor micro-array (TMA), qui dans la plupart des cas sont quantitatives (débouchant sur un seuil de valeur toujours différent d'une étude à l'autre), et qui ne tiennent compte que d'un petit échantillon de tissus tumoral, parfois sans cellules du microenvironnement.

Nous avons ainsi pu constater avec ce travail que la plupart des cancers du sein sont (contrairement au tissu mammaire non tumoral) assez richement infiltrés par des lymphocytes, y compris des Tregs. L'étude de l'évolution des infiltrats lymphocytaires tumoraux lors du déroulement de la chimiothérapie néoadjuvante montre qu'alors que l'infiltrat en lymphocytes T CD8+ reste stable, l'infiltrat en lymphocytes T régulateurs diminue significativement. Ceci pourrait donc plaider pour un effet différentiel de la chimiothérapie sur les CD8+ et les Tregs. De façon intéressante, nous n'avons pas mis en évidence de différence concernant cette diminution des Tregs entre les patientes traitées par un protocole contenant du cyclophosphamide (chimiothérapie ayant une cytotoxicité préférentielle sur les Tregs par rapport aux autres globules blancs), et les patientes traitées par taxane-trastuzumab, donc sans cyclophosphamide. Le comportement des tumeurs surexprimant HER2 et traitées par trastuzumab dans cette série, est le même du point de vue des infiltrats lymphocytaires que les tumeurs sans surexpression d'HER2. Ceci est en faveur d'un phénomène général de la chimiothérapie sur l'infiltrat en Treg. D'autres études ont d'ailleurs montré la capacité des taxanes ou des anthracyclines à améliorer la réponse

immunitaire antitumorale dans des modèles précliniques de cancer du sein (Machiels et al., 2001), mais sans jamais s'intéresser aux Tregs.

Nous avons donc cherché à savoir si cet effet théoriquement positif de la chimiothérapie s'accompagnait d'une réponse tumorale favorable, et en particulier d'une RHC. C'est ainsi que notre travail montre clairement que toutes les tumeurs ne sont pas affectées par cette diminution de l'infiltrat tumoral en Tregs. Seule les patientes ayant obtenues une RHC ont une diminution significative de l'infiltrat en Tregs sur la pièce opératoire et ont en général une absence totale de ces cellules dans le lit tumoral. La diminution de l'infiltrat en Tregs n'est pas significative chez les patientes chez qui il reste de la tumeur après chimiothérapie.

Concernant l'infiltrat en lymphocytes T CD8+ sur la pièce opératoire, celui-ci est significativement plus important chez les patientes avec une RHC, par rapport aux mauvaises répondeuses. Ceci traduit probablement un rôle de la réponse CD8 sur l'effet antitumoral de la chimiothérapie.

En s'intéressant au rapport entre infiltrats en CD8 et en Tregs, par analogie aux travaux précédemment publiés notamment dans le cancer de l'ovaire, et le carcinome hépatocellulaire (Sato et al., 2005) (Gao et al., 2007), nous avons considéré sur les différentes biopsies, une balance CD8/Treg « favorable » comme associant forte infiltration CD8+ (2 ou 3+) et absence d'infiltrat Foxp3+ (0+). Ce score immunologique combiné sur la pièce opératoire est fortement corrélé à l'obtention d'une RHC, avec une bonne sensibilité et une excellente spécificité. Aucune des patientes présentant une absence totale de réponse voire une progression tumorale après chimiothérapie n'avait une balance CD8/Foxp3 favorable.

Il faut signaler que ni le niveau d'infiltrat en Treg, ni notre score combiné ne permettent dans cette étude de prédire la RHC à partir du prélèvement histologique initial, ni à partir de celui fait précocement après une cure, n'en faisant donc pas (pour l'instant) des marqueurs prédictifs de la réponse escomptée, et donc pas des outils d'aide à la décision thérapeutique

avant traitement. Ces résultats (pour les Tregs) s'opposent à ceux de Bates obtenus peu de temps auparavant sur une large série de cancer du sein traités par chimiothérapie adjuvante, et dans laquelle une forte infiltration tumorale initiale en Tregs (évaluée comme nous en immunohistochimie, avec le même anticorps) constituait un facteur de mauvais pronostic pour la survie sans rechute pour les tumeurs RH+ (Bates et al., 2006). Les explications résident peut être dans le fait que notre série comporte peu de tumeurs RH+, et que nos patientes ont des tumeurs significativement plus volumineuses (biais inévitable des séries incluant des patientes « néoadjuvantes »).

En analyse multivariée, dans notre étude, seuls le grade tumoral élevé, le traitement par trastuzumab, et notre score immunologique combiné étaient significativement associés à l'obtention d'une RHC. Ces résultats suggèrent que lorsqu'une chimiothérapie est efficace en termes d'éradication des cellules tumorales, une réponse immunologique favorable, médiée par des lymphocytes T CD8+ libérés du contrôle immunosuppressif des Tregs, est associée. Nos résultats suggèrent ainsi que la chimiothérapie pourrait être capable d'induire une réponse immunitaire antitumorale favorable chez les patientes qui vont obtenir une RCH, pouvant ainsi participer à l'efficacité du traitement. C'est ainsi que des études immunohistochimiques complémentaires à la recherche de marqueurs d'une réponse CD8 cytotoxiques comme TiA1 et le Granzyme B (Anderson, 1995) (Ladanyi et al., 2004), et conduites sur les mêmes prélèvements tumoraux, nous ont permis de montrer une induction significative de ces marqueurs chez les patientes présentant une RHC. Il faut signaler que les résultats de ce travail, mené dans le contexte de chimiothérapie néoadjuvante, vont dans le même sens que d'autres travaux récents dans le cancer du sein en contexte de chimiothérapie adjuvante et laissant supposer qu'une part des effets positifs de la chimiothérapie sont médiés par le système immunitaire (Apetoh et al., 2007b) (et cf partie C).

Ces travaux montraient donc pour la première fois qu'une signature immunologique favorable associant forte infiltration en CD8 et faible infiltration en Tregs pouvait être associée après chimiothérapie néoadjuvante à une réponse favorable et donc potentiellement à un meilleur pronostic à long terme. A l'époque de la publication de ce travail, nous n'avions pas mis en évidence d'effet de cette signature immunologique sur la survie des patientes. Notre recul à l'époque était insuffisant, et la série comportait un faible effectif. Néanmoins, malgré ces points en notre défaveur, l'étude de la survie sans récidive des 56 patientes de la série montrait déjà en 2008 une nette tendance favorable pour les patientes ayant une signature immunologique favorable (donnée non publiée appendice 1).

Ces résultats encourageants nous ont donc amenés à poursuivre nos investigations dans ce même contexte de chimiothérapie néoadjuvante, afin d'explorer le concept de chimiothérapie immunogène dans le cancer du sein à travers l'étude des infiltrats lymphocytaires T CD8 et T régulateurs, et de leur éventuel rôle pronostic à long terme.

C. Foxp3 et le concept de Chimiothérapie Immunogène :

Pour des raisons historiques, la recherche de nouvelles molécules de chimiothérapie a systématiquement négligé la possibilité que le système immunitaire puisse contribuer à l'efficacité du médicament. C'est ainsi que depuis le milieu des années 70, le screening des nouvelles drogues et la validation de leur efficacité passe par des modèles animaux de xénogreffes de tumeurs humaines….dans des souris immunodéficientes (Kelland, 2004).

Pourtant il existe un faisceau d'argument pré cliniques et cliniques laissant à penser à une participation du système immunitaire dans l'action de certains traitements anticancéreux, soit parce qu'ils sont capables d'induire une mort cellulaire immunogène, soit par ce qu'ils sont capables de stimuler directement les effecteurs du système immunitaire.

1. Effets particuliers des traitements antitumoraux sur le système immunitaire :

La plupart des traitements anticancéreux peuvent être considérés comme des immunosuppresseurs. C'est le cas de la plupart des cytotoxiques, dont certains comme le cyclophosphamide ou le methotrexate sont d'ailleurs utilisés à des fins immunosuppressives dans certaines maladies inflammatoires (Weiner & Cohen, 2002) (Weinblatt et al., 1985). C'est également le cas des corticoïdes, utilisés dans les hémopathies malignes et en tant que traitement de support antiémétique avec la plupart des protocoles de chimiothérapie pour le traitement des tumeurs solides, et qui sont responsables de l'inhibition de sécrétion de cytokines inflammatoires (Galon et al., 2002), de l'inhibition fonctionnelle des DCs (Rozkova et al., 2006), des lymphocytes T (particulièrement des TH1), et des cellules NK (Chiossone et al., 2007).

Par ailleurs, la mort cellulaire induite par la plupart des agents cytotoxique est généralement d'origine apoptotique, une modalité considérée classiquement comme non immunogène,

même si la littérature manque de réel argument en ce sens (Zitvogel et al., 2004). Le phénomène apoptotique recouvre sans doute en fait plusieurs type de mort, moléculairement et biochimiquement différentes, dont certaines pourraient être immunogènes (Obeid et al., 2007a).

Progressivement, des preuves supplémentaires de l'existence d'une contribution du système immunitaire à l'efficacité des traitements anticancéreux.

C'est ainsi que l'existence de polymorphismes génétiques touchant des gènes impliqués dans la réponse immunitaire semblent affecter la réponse aux traitements anticancéreux. C'est le cas pour les polymorphismes de l'IL-10 dans les lymphomes (Lech-Maranda et al., 2004), de l'IL-18 dans les cancers de l'ovaire (Bushley et al., 2004), ou de l'IL-1β et/ou de son récepteur dans les cancers digestifs (Graziano et al., 2005) (Graziano et al., 2009). Par ailleurs, il semble que les polymorphismes des récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines affecte la réponse tumorale aux traitements par divers anticorps monoclonaux comme le rituximab dans les lymphomes malins non hodgkinien de type folliculaire (Weng & Levy, 2003), le trastuzumab dans le cancer du sein (Musolino et al., 2008), ou le cetuximab dans le cancer colorectal (Bibeau et al., 2009), vraisemblablement par une moindre efficacité de l'ADCC.

Concernant les traitements classiques, l'existence d'un effet abscopal de la radiothérapie est connu de longue date : Ainsi l'irradiation exclusive de la tumeur primitive est capable d'induire une réponse associée au niveau d'autres sites tumoraux, notamment métastatiques. Il est vraisemblable que cet effet soit en partie médié par le système immunitaire, notamment via l'induction par l'irradiation d'un répertoire antigénique tumoral plus large (par synthèse, puis dégradation de nouvelles protéines tumorales, et stimulation de leur apprêtement par le CMH I) (Reits et al., 2006). Par ailleurs, l'irradiation tumorale est capable de stimuler au

niveau du site irradié l'activation et l'infiltration lymphocytaire T (Garnett et al., 2004) (Lugade et al., 2005) (Takeshima et al., 2010).

Il faut d'ailleurs signaler que, comme les radiations ionisantes, la plupart des agents thérapeutiques agissant par le biais de dommages à l'ADN sont susceptibles de stimuler le système immunitaire, via l'induction par ce biais de ligands de NKG2D (Gasser et al., 2005), capables donc de générer une réponse NK, NKT et lymphocytaire Tγδ et CD8.

L'effet immunosuppresseur de certains cytotoxiques, comme le cyclophosphamide passe par une déplétion lymphocytaire profonde (Dudley et al., 2002). Pourtant, une lymphoablation est susceptible de stimuler le système immunitaire via divers mécanismes incluant l'éradication des Tregs (North, 1982), la restauration de capacité de présentation de l'antigène ou de sécrétion de cytokines permettant une augmentation de l'activité CD8 lors de la reconstitution lymphoïde (North, 1982). La lymphodépletion permet également dans certains modèles de stimuler le homing des T, et leur prolifération dans la tumeur (Dudley et al., 2005). Ces phénomènes ont été mis à profit, parfois avec succès pour améliorer l'efficacité d'une immunothérapie dans des études humaines (Dudley et al., 2005) (Gattinoni et al., 2005).

Si les fortes doses de cyclophosphamide sont associées à une lymphoablation, de petites doses, éventuellement en administration répétée ou continue (schéma métronomique), sont associées à une stimulation de la réponse immunitaire antitumorale, essentiellement par cytotoxicité sur les Tregs (Glaser, 1979) (Ghiringhelli et al., 2007).

De développement plus récent, les taxanes (paclitaxel et docetaxel) sont devenues en quelques années des traitements majeurs dans la prise en charge des cancers du sein, du poumon, de l'ovaire, ou de la prostate. Leur mécanisme d'action principal réside bien sur dans l'inhibition de la polymérisation des microtubules du cytosquelette, empêchant la formation du fuseau mitotique. Cependant, le paclitaxel constitue (chez la souris) un ligand de TLR4 susceptible de contribuer à l'activation des DCs et des macrophages (Byrd-Leifer et al., 2001). La

paclitaxel a par ailleurs été décrit comme étant capable d'inhiber les macrophages intra tumoraux de type M2 (Mullins et al., 1999). Une récente étude humaine conduite chez des patientes porteuses de cancers du sein localisés, a mis en évidence qu'une chimiothérapie par taxanes s'accompagnait d'une augmentation des fonctions lymphocytaires T et NK par rapport aux patientes traitées sans taxane (Carson et al., 2004).

De même, la gemcitabine, un analogue nucléosidique couramment utilisée pour le traitement des tumeurs du pancréas, du sein, de la vessie ou du poumon, est capable en plus de son activité cytotoxique directe, de réduire le nombre de MDSC (Suzuki et al., 2005), de stimuler la présentation d'antigènes tumoraux par les DCs (Nowak et al., 2003a), permettant ainsi en association à une stimulation de CD40, de guérir des tumeurs établies chez des animaux (Nowak et al., 2003b). Chez l'homme, diverses stratégies d'immunothérapies peuvent être renforcées en synergie avec l'administration de gemcitabine, chez des patients porteurs de cancers du pancréas (Plate et al., 2005), du poumon (Levitt et al., 2004) ou du colon (Correale et al., 2005).

Un autre anti-métabolite, le 5-Fluorouracile (5-FU), molécule de base du traitement des cancers colorectaux, est capable in vitro de facilité la captation et la présentation d'antigènes tumoraux par les DCs (Galetto et al., 2003). Ainsi, dans des modèles pré cliniques, l'injection intra tumorale de DCs à la suite d'une chimiothérapie systémique par 5-FU se traduit par l'éradication de la tumeur primitive, mais aussi des métastases à distance, de façon dépendante des lymphocytes T (Tanaka et al., 2002a). Plusieurs lignées de cellules cancéreuses coliques traitées par le 5-FU voient par ailleurs leur expression membranaire de Fas et d'ICAM1 augmenter, et ainsi leur sensibilité à la lyse par les CTLs.

Enfin, comme pour la gemcitabine, les travaux de notre équipe ont montré que le 5-FU était capable d'exercer une cytotoxicité assez sélective sur les MDSC, contribuant ainsi à la restauration d'une réponse immunitaire antitumorale (Vincent et al., 2010).

A coté de la radiothérapie et des agents cytotoxiques d'action classique, certaines thérapeutiques ciblées semblent également susceptibles d'exercer un effet immunomodulateur :

C'est le cas par exemple comme nous l'avons vu précédemment de certains agents anti-angiogéniques comme le sunitinib, ou le bevacizumab sont capables de s'opposer à l'expansion des MDSCs. C'est aussi le cas aussi de l'imatinib, une des premières thérapie ciblée, ayant révolutionné le pronostic de la leucémie myéloïde chronique (LMC) et des tumeurs stromales gastro intestinales (GIST). Certains patients porteurs de GIST voyaient en effet une efficacité du traitement alors même que la cible (la presence d'un récepteur Kit ou PDGFR muté) était absente. L'imatinib est en effet capable de bloquer KIT au niveau des DCs, favorisant ainsi l'activation des NK par les DCs (Fernandez et al., 1999) (Borg et al., 2004). C'est ainsi que chez les patients traités par imatinib pour une GIST, la quantité d'INFγ produite par les NK constitue un facteur de bon pronostic (Borg et al., 2004).

2. Mécanismes généraux à l'origine d'une mort cellulaire immunogène :

A côté de ces effets particuliers de certains traitements, les mécanismes généraux par lesquels la mort de cellules tumorales est capable de stimuler la réponse immunitaire anti tumorale sont de mieux en mieux connus, grâce notamment à l'apport des travaux de l'équipe de L. Zitvogel à l'Institut Gustave Roussy. De façon générale, ces effets trouvent leur source dans la capacité des cellules présentatrices d'antigènes (notamment les DCs) à présenter efficacement aux lymphocytes T des antigènes tumoraux provenant des cellules détruites par le traitement, et capables d'être immunogènes, c'est-à-dire de susciter efficacement leur processing et leur présentation, la maturation de DCs capable d'exercer une costimulation, pour *in fine* influencer favorablement la polarisation de la réponse immunitaire (Lake & Robinson, 2005).

L'exposition de la calréticuline à la surface des cellules tuées, peut stimuler la phagocytose de telles cellules (« eat me signal »), probablement via une interaction avec le CD91 (Gardai et al., 2005). La mort induite par certains agents comme les anthracyclines ou les radiations ionisantes s'accompagne d'une translocation précoce de la calreticuline du réticulum à la membrane au début du processus apoptotique (Obeid et al., 2007a). L'expression de la calreticuline à la membrane de cellules cancéreuses préalablement traitées par anthracyclines ou irradiation est fondamentale pour la reconnaissance et la phagocytose de ces cellules par les DCs, et l'induction d'une réponse antitumorale T dépendante (Casares et al., 2005), qui peut être abolie par l'extinction de l'expression de la calréticuline via un siRNA (Obeid et al., 2007a) (Obeid et al., 2007b). C'est également ainsi que d'autres agents comme la mitomycine C ou l'étoposide, dont l'activité cytotoxique ne s'accompagne pas de l'exposition de la calreticuline à la membrane, sont incapable de générer une mort immunogène (Obeid et al., 2007a). Ce phénomène peut être réversé par le cotraitement des cellules cancéreuses avec des inducteurs pharmacologiques de la calréticuline (Obeid et al., 2007a).

La constatation dans des modèles précliniques que les effets antitumoraux des radiations ionisantes, des anthracyclines, mais aussi de l'oxaliplatine (Tesniere et al., 2010) sont plus importants chez des souris immunocompétentes que chez des souris sans système immunitaire, a amené les mêmes équipes à rechercher le lien unissant immunité innée et adaptative dans l'induction d'une réponse immunitaire antitumorale. C'est ainsi que le rôle prépondérant de la signalisation via les Toll Like Receptor (TLR) a été mis en évidence. En particulier, la déficience en TLR4 ou en sa molécule adaptatrice d'aval MyD88 est capable d'abroger la réponse induite par les anthracyclines ou l'irradiation par rapport aux animaux immunodéficients (Apetoh et al., 2007b) (Apetoh et al., 2007a). En réalité, les DCs d'animaux déficients en TLR4 sont incapables de présenter efficacement les antigènes tumoraux des cellules tuées (Apetoh et al., 2007a) (Apetoh et al., 2007b). L'explication mécanistique

pourrait résider dans une plus grande vitesse de fusion entre phagosome et lysosome (dont le ralentissement est normalement médié par la voie TLR4 (Shiratsuchi et al., 2004) dans les animaux TLR4 -/-, aboutissant donc à la dégradation lysosomale rapide du matériel phagocyté, incluant les antigènes tumoraux. De fait, le traitement des animaux par un inhibiteur de l'activité lysosomale, comme la chloroquine, permet de compenser in vivo la perte de TLR4 en termes de réponse à la chimiothérapie (Apetoh et al., 2007a) (Apetoh et al., 2007b).

Des études additionnelles ont montré que le ligand crucial de TLR4 dans le contexte, était la protéine HMGB1 (High Mobility Group Box 1), une proteine nucléaire libéree par les cellules tuées en fin du processus apoptotique. L'extinction ou l'inhibition d'HMGB1 dans des cellules tumorales préalablement traitées par les anthracyclines aboli la présentation des antigènes tumoraux par les DCs in vitro et in vivo (Apetoh et al., 2007a) (Apetoh et al., 2007b).

Chez l'homme, il existe un polymorphisme inactivateur de TLR4, réduisant la liaison HMGB1-TLR4. In vitro, les DCs de ces patients sont moins aptes à présenter efficacement des antigènes tumoraux à des CTLs que les DCs de patients porteurs de 2 allèles sauvages. L'étude génétique rétrospective de 280 patientes traitées par chimiothérapie adjuvante à base d'anthracyclines pour un cancer du sein révèle que la présence de l'allèle muté de TLR4 est un facteur indépendant de rechute (Apetoh et al., 2007b).

Cependant, il faut noter que l'addition de calréticuline ou d'HMGB1 aux cellules cancéreuses est insuffisante à elle seule pour stimuler l'apprètement et la présentation des antigènes tumoraux par les DCs (Sancho et al., 2009), ce qui implique la nécessité de signaux et d'interaction supplémentaires entre DCs et cellules tumorales tuées.

La même équipe a récemment montré que l'un de ces signaux additionnels passe vraisemblablement par la libération d'ATP par les cellules tuées, pouvant lier dans le

microenvironement tumoral le récepteur P2X7 sur les DCs et ainsi activer dans ces cellules le complexe proteique de l'inflammasome, constitué par l'assemblage de NLRP3, ASC, et la caspase 1. L'activation de la caspase 1 permet le clivage de son principal substrat, la pro-IL-1β, en IL-1β, dont la présence est cruciale pour le priming des lymphocytes T CD8+ Th1, producteurs d'INF-γ, et principaux acteurs de la réponse immunitaire antitumorale efficace (Ghiringhelli et al., 2009). De façon interessante, chez l'homme l'existence d'un polymorphisme constitutionel de P2X7 rend compte d'une moindre affinité du récepteur pour l'ATP, et d'une moindre libération d'IL-1β par les monocytes humains ainsi stimulés (Gu et al., 2001) (Sluyter et al., 2004). L'étude de ces polymorphismes sur une cohorte de 225 patientes traitées par chimiothérapie adjuvante par anthracyclines pour un cancer du sein localisé, a montré une survie sans rechute significativement moins bonne pour les patientes porteuses d'un variant allèlique rendant compte d'une perte de fonction de P2X7, et ce facteur constituait un paramètre indépendant de mauvais pronostic en analyse multivariée (Ghiringhelli et al., 2009).

Nos travaux initiaux, évoquant la possibilité d'une participation du système immunitaire à l'efficacité antitumorale des agents de chimiothérapie dans le cancer du sein (dans un modèle de chimiothérapie néoadjuvante) nous ont amené à poursuivre nos investigations sur une nouvelle série indépendante de patientes avec un triple objectif :

1) Confirmer sur une série indépendante l'association entre obtention d'une réponse histologique complète et notre signature immunologique favorable (Foxp3 faible + CD8 élevé).
2) Pouvoir vérifier sur une série de patientes plus importante, et avec un plus grand recul, l'effet pronostic potentiel de la signature immunologique CD8/Foxp3 sur la pièce opératoire, en termes de survie sans rechute et même de survie globale.

3) Enfin étudier le rôle propre du trastuzumab sur la modulation de cette réponse immunitaire in situ, en restreignant notre étude à une population de patientes traitées pour un cancer du sein surexprimant HER2 par chimiothérapie néoadjuvante, comportant ou non du trastuzumab.

   En effet, plusieurs travaux montrent qu'en plus de son effet modulateur de la voie oncogénique HER2, les effets cytotoxiques du trastuzumab semblent également médiés en partie par le système immunitaire, notamment via le phénomène d'ADCC (Arnould et al., 2006). Néanmoins, les effets immunologiques du trastuzumab sur l'infiltration des tumeurs en lymphocytes T CD8+ et en lymphocytes T régulateurs n'est pas décrit dans la littérature.

3. **Article # 5 :**

« In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. »

Journal of Pathology. 2011

In Situ Immune Response after Neoadjuvant Chemotherapy for Breast Cancer Predicts Survival

Running title: In Situ Immune Response in breast cancer

Sylvain Ladoire[1,2*] Grégoire Mignot[2*], Sandrine Dabakuyo[3], Laurent Arnould [4], Lionel Apetoh[2], Cedric Rébé [2], Bruno Coudert[1], Francois Martin[2], Marie Hélène Bizollon[5], André Vanoli[6], Charles Coutant[7], Pierre Fumoleau[1] Franck Bonnetain[3] and François Ghiringhelli[1,2,]

1. Department of Medical Oncology, Georges François Leclerc Center, Dijon, France

2. Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale. Avenir Team INSERM. CRI-866 University of Burgundy, Dijon, France

3. Biostatistics and Epidemiological Unit, EA 4184 Georges François Leclerc Center, Dijon, France

4. Department of Pathology and Biology of Tumors. Georges François Leclerc Center, Dijon, France

5. Department of Pathology. Chalons sur Saone. France

6. Department of Medical Oncology. Sainte Marie Private Hospital, Chalon sur Saone, France.

7. Department of Gynecology and Obstetrics, Hôpital Tenon, Assistance Publique des Hôpitaux de Paris Paris, France

* SL and GM share co-authorship.

Corresponding author, Requests for reprints:

François Ghiringhelli. Centre Georges François Leclerc, Centre de Recherche INSERM 866. Faculté de Médecine, 7 Boulevard Jeanne d'Arc 21000 DIJON. Phone: 33-3-80-39-33-53 ; Fax: 33-3-80-39-34-34. Email: fghiringhelli@cgfl.fr,

This is an Accepted Article that has been peer-reviewed and approved for publication in *The Journal of Pathology*, but has yet to undergo copy-editing and proof correction. Please cite this article as an "Accepted Article"; DOI: 10.1002/path.2866

Abstract:

Accumulating preclinical evidence suggests that anticancer immune responses contribute to the success of chemotherapy. However, the predictive value of tumor infiltrating lymphocytes after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer remains unknown. We hypothesized that the nature of the immune infiltrate following neoadjuvant chemotherapy would predict patient survival. In a series of 111 consecutive HER2 and a series of 51 non HER2 overexpressing breast cancer patients treated by neoadjuvant chemotherapy, we studied by immunohistochemistry tumor infiltration by FOXP3 and CD8 T lymphocytes before and after chemotherapy. Kaplan-Meier analysis and Cox modeling were used to assess relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS). A predictive scoring system using American Joint Committee on Cancer (AJCC) pathologic staging and immunological markers was created. Association of high CD8 and low FOXP3 cell infiltrates after chemotherapy was significantly associated with improved RFS (p=0.02) and OS (p=0.002), and outperformed classical predictive factors in multivariate analysis. A combined score associating CD8/FOXP3 ratio and pathological AJCC staging isolated a subgroup of patients with a long-term overall survival of 100%. Importantly, this score also identified patients with favorable prognosis in an independent cohort of HER2 negative breast cancer patients. These results suggest that immunological CD8 and FOXP3 cell infiltrate after treatment is an independent predictive factor of survival in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy and provides new insights into role of the immune milieu and cancer.

Key words: immunre response, cancer, HER2, breast, survival, FOXP3, CD8

Introduction:

Neoadjuvant chemotherapy has become a standard therapeutic strategy for localized breast cancer with the aim of facilitating conservative surgery. Use of neoadjuvant chemotherapy has allowed oncologists to assess treatment response, and to tailor treatment. Pathologic complete response (pCR) after neoadjuvant chemotherapy has been described as a strong indicator of chemosensitivity, justifying its use as a surrogate marker of survival (1). Chemotherapy is known to mainly act directly by cytotoxic effect on tumor cells. In HER2 overexpressing tumor, trastuzumab, an anti HER2 monoclonal antibody, has drastically improved patient prognosis in adjuvant and neoadjuvant (2-5) setting when combined with chemotherapy. Trastuzumab kills cancer cells by blocking intracellular transduction signals, but also restrain their growth by activating the host's immune system through antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) (6-7). Studies on Fc gamma receptor polymorphisms support the essential role of ADCC in the clinical effect of trastuzumab (8).

Human tumors impede anticancer immune response by multiple immunosuppressive mechanisms. Tumors promote the accumulation of $FOXP3^+$ immunosuppressive regulatory T cells (Tregs) (9). In cancer patients, Tregs accumulation is linked to a poor prognosis in various cancer types such as hepatocellular (10) , lung (11), ovarian (12) , gastric, esophageal (13) , and in breast cancer (14-16). In this respect, trastuzumab was shown to induce a decrease in Tregs frequency in responder patients but not in non responder, thus restoring immune anticancer responses (17). These data suggest that the prognosis of patients treated with trastuzumab for $HER2^+$ breast cancer may be affected by the nature of the patient immune response before and/or after chemotherapeutic treatment. We have previously reported that a favorable CD8/ FOXP3 cell (high CD8 combined with low FOXP3) infiltration within the tumor bed after neoadjuvant chemotherapy was strongly associated with pCR (18). However, the link between CD8/FOXP3 ratio in cell infiltrates after chemotherapy

and long-term outcome has not been yet investigated. Here we tested the hypothesis that CD8 and FOXP3 cell infiltrates impact on RFS and OS in a series of HER-2 overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapies including or not trastuzumab.

Material and Methods :

Patients: We retrospectively studied cancer-tissue specimens from 660 patients who underwent neoadjuvant chemotherapy for non-metastatic breast cancer at the Georges Francois Leclerc Cancer Center, Dijon, and Sainte Marie Private Hospital, Chalon sur Saone France, from January, 1981, to November, 2008. In all these patients, HER2 status was determined using the Herceptest scoring method, considering only 3-grade score as determining HER-2–positive tumors. For patients with 2grade score, a chromogenic in situ hybridization was performed to determine HER2 overexpression. According to this test we only recruited in this study the 111 consecutive HER2-overexpressing breast cancers. A second cohort of fifty-one consecutive patients, treated with anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy for HER2 negative tumor between 2002 and 2005 in Georges Francois Leclerc Cancer Center was used for validation of the scoring system developed in this work The study was approved by the ethical local committee, and patients gave written inform consent for the use of samples from their tumors for future investigations at the time of the diagnosis. Histoprognostic grade was defined according to the modified Bloom and Richardson method. The steroid hormone receptors status were determined using enzymo-immunoassays (Abbott Diagnostics).

Chemotherapy treatment consisted of an anthracycline-based regimen from 1977 to 2000: FEC 100 (epirubicin 100 mg/m^2, cyclophosphamide 500 mg/m^2, and 5-fluorouracil 500 mg/m^2) or FAC (adriamycine 50 mg/m^2, cyclophosphamide 500 mg/m^2, and 5-fluorouracil 500 mg/m^2). From 2001 to 2007, the regimen consisted in trastuzumab (2 mg/kg/week)

associated with chemotherapy by docetaxel 100 mg/m^2 or by docetaxel 75 mg/m^2 + carboplatin AUC 6. The chemotherapy regimen was FEC 100 for all patients in the HER2 negative cohort. After six cycles of chemotherapy, breast surgery (conservative whenever possible) and axillary node dissection were mandatory 3 to 5 weeks after the last cycle. Adjuvant radiotherapy was administrated in all patients and postsurgical hormonal therapy was administrate d in patients with hormone receptor–positive tumors. Histological response was determined on surgical specimens using AJCC pathologic staging. Breast tissue without residual malignant epithelial invasive tumor, and associated with no microscopic evidence of tumor cell in axillary specimens, was considered as pathological complete response (pCR).

Immunohistochemical labelling: The sample used before to determine Foxp3 and CD8 infiltration before chemotherapy was the diagnosis macro-core biopsies and the sample used to assess CD8 and Foxp3 expression after chemotherapy is the pathological sample. Immunohistochemistry used monoclonal antibodies against the T-cell marker CD8 (Dako), and the Treg cell marker FOXP3 (Abcam ab22509). Antigen retrieval was carried out by heating slides for 15 minutes at 95°C in 1 mmol/L EDTA. Labeling was detected using the Dako Envision system (Dako). The stained arrays were counterstained with hematoxylin and mounted in Aquamount (Dako). Positive and negative staining controls were carried out with paraffin tonsil sections using FOXP3 and CD8 monoclonal antibody and an isotype-matched negative control antibody.

Quantification of T cells: Levels of lymphocytic infiltration were evaluated by two independent physicians (FG and SL). A ll samples were previously anonimyzed and blinded to the clinicopathologic data. On the slide, the number of stained cells was analyzed using a semiquantitative ordinal scale ranging from 0 to 3. Grade 0 corresponds to absence of lymphocytes and grades 1 to 3 correspond to increasing degrees of lymphocytic infiltration

from a few scattered cells (grade 1) to marked infiltrate that mimics a lymphoid organ (grade 3). For each antibody, this scale was established after the analysis the whole slide for macro-core biopsy and 20 high power fields (40X) for pathological sample slides and concerned only the number of infiltrating stained cells, whatever the intensity of the staining. Most infiltrated cells are mainly in adjacent stroma and not directly in the tumor bed. The score reflect the mean infiltration found in this adjacent stroma in the whole slide. A representative slide for each grade for Foxp3 and CD8 are depicted in figure 1. The results of the analyses conducted by each independent pathologist were subsequently compared. Discrepancies between the two observers were reviewed jointly to reach a consensus. The Kappa coefficient of correlation between the observers was 94%. For each patient, the CD8/FOXP3 ratio was determined as favorable (high CD8 and low FOXP3 infiltration), or unfavorable (low CD8 or high FOXP3 infiltration). Indeed , favourable prognosis means CD8 score of 2 or 3 and Foxp3 score of 0 or 1. Unfavourable prognosis means CD8 score of 0 or 1 or Foxp3 score of 2 or 3.

Statistical analyses: Baseline continuous variables were described as means, standard deviations (SD), medians and ranges, while qualitative variables were described as frequencies and percents. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis until the date of death (all causes). Alive patients were censored at the last follow-up. Relapse free survival (RFS) was calculated from the date of diagnosis until the date of relapse (local or metastatic). Alive or dead patients without relapse were censored at the last follow-up. Follow-up was calculated using reverse Kaplan Meier method. OS and RFS probabilities were estimated using Kaplan-Meier method and were compared by the log-rank test. The hazards ratios (HR) with 95% confidence interval (CI) were calculated using univariate Cox proportional hazards regression modeling. All variables with a univariate Cox p value = 0.20 were eligible for multivariate analyses. Correlations between co-variables were firstly tested for eligible variables. To prevent collinearity, when two variables were significantly

correlated, one variable was retained according to its clinical relevance or to the value of the likelihood ratio. Finally, multivariate Cox proportional hazards regression modeling was applied to assess to independent prognosis effect for OS and RFS. Estimates from the Cox regression for RFS were used to create a scoring system according to the following formula: Score=? ßiXi, were ß is the coefficient of the Cox multivariate proportional hazards regression modeling for each Xi prognostic factor. The reference prognostic scoring system [19] for breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy was applied to our population and then compared to our scoring system. Scoring systems performances were quantified using Akaike information criterion (AIC). Smaller AIC value indicates a better model. The discriminatory capacity was tested using the Harrell's concordance index. Harrell's C statistics estimates the proportion of correct predictions. Result of the Harrell's C index varied from 0.5 (no discrimination) to 1 (perfect discrimination). To assess the stability of the multivariate Cox model, bootstrapping was performed using 1000 replications generated from the original sample.All reported p values are two sided. The statistical significance level was set at $p < 0.05$. Analyses were performed using STATA (version 11.0).

Results:

Patient characteristics:

Patient and tumor characteristics are reported in Table 1. In HER2 overexpressing tumor cohort 79% of patients presented with IIB/IIIA or IIIB stage and 73% had clinically detectable axillary lymph node involvement at diagnosis. Half of patients presented with high tumor grade and/or negative estrogen receptor. Neoadjuvant chemotherapy was given every 3 weeks for a total of 6 cycles, and consisted of an anthracycline-based regimen in 48 cases (43%), and trastuzumab + taxane-based regimen in 63 cases (57%). Classic histological analysis of surgical specimens revealed a pCR in 33 cases (30%) (19/63 (39%) in the group treated with trastuzumab + taxane and 8/48 (16%) in the group treated with anthracycline-

based regimen. Before chemotherapy 64% of tumor biopsies had high CD8 infiltrate (grade 2 or 3) and 57% of the tumor were high invaded by Foxp3 cells (grade 2 or 3). After chemotherapy we observed a higher number of tumor highly invaded by CD8 (82%) and less tumor infiltrated with Foxp3 cells (39%). Clinical and immunohistological characteristic of the HER2 negative cohort are also presented in Table 1. In this second cohort we observed a similar decrease in the number of sample highly invade by Foxp3 cells (51% to 26%) but we did not observe modification in the number of sample highly invaded by CD8 cells (59% to 51%)

Association of outcomes with clinical and immunological findings:

Median OS and RFS were respectively 183 months and 115 months in the HER2 overexpressing cohort. Univariate Cox proportional analysis indicated that neither age > 50, initial tumor stage, axillary nodal involvement, high tumor grade, negative estrogen receptor, CD8, nor FOXP3 tumor infiltrates before chemotherapy were associated with an increased risk of relapse (RFS) or death (OS). By contrast, the pathologic stage after chemotherapy using AJCC staging system ($p<0.0001$) Trastuzumab-based chemotherapy ($p= 0.012$), low $FOXP3^{+}$ lymphocytes infiltration after chemotherapy ($p=0.036$) and high CD8 lymphocytes infiltration after chemotherapy ($p<0.0001$) were associated with a better RFS (Table 2). The combined immunological score associating high CD8 infiltrate and low FOXP3 infiltrate (favourable CD8/FOXP3 ratio (18) was also strongly associated with pCR (HR: 6.28 [2.42-16.27] $p<0.0001$), and with better RFS ($P<0.0001$). Interestingly, Harrell's C statistic demonstrates that CD8/FOXP3 ratio and pathological stage upon AJCC are the most discriminative values (0.65 and 0.71 respectively) to predict RFS. Univariate Cox proportional analysis also demonstrated that AJCC pathologic stage ($p<0.0001$) trastuzumab-based chemotherapy ($p= 0.001$), high CD8 lymphocytes infiltration after chemotherapy

(p=0.001), and favourable CD8/FOXP3 ratio (p=0.008) were associated with a better OS (Table 3).

Surprisingly, the CD8/FOXP3 ratio remained associated with better RFS and OS in both the anthracycline (p=0.01) and trastuzumab (p=0.011) groups and also in patients with (p=0.003) or without (p=0.042) pathological complete response (Figure 2). Multiva riate Cox regression model showed that only pathological AJCC stage (p=0.016, and p=0.027) and CD8/FOXP3 ratio (p=0.002, and p=0.02) were independently associated with improved RFS and OS respectively in the whole population (Tables 2 and 3). Importantly CD8/FOXP3 ratio outperformed classical predictive factors such as chemotherapy regimen or pCR. Harrell's C statistics were 0.78 for RFS and 0.815 for OS, indicating an excellent discrimination by multivariate models. After bootstrapping, only pathological AJCC stage (P=0.02) and CD8/FOXP3 ratio score (P=0.01) remained independently associated with RFS (Table 2).

Pathologic and Immunologic Scoring System:

To generate a predictive scoring system model for patient outcomes after neoadjuvant chemotherapy, we selected the two significant variables independently associated with RFS in the multivariate Cox model (pathological AJCC stage and CD8/FOXP3 ratio). We name this score Pathologic -Immunologic scoring system (PathIm). There was no significant interaction (p=0.10) among these two factors retained in the model. Because Beta coefficients for the factors retained in the model were all of similar magnitude, binary indicators were assigned to presenting final pathologic stages and CD8/FOXP3 ratio. For the PathIm scoring system, 3 groups of patients with scores ranging from 0 to 2 were identified. Higher scoring were associated with decreased RFS, and OS (Figure 3), whatever chemotherapy received (anthracyclines vs trastuzumab), and response to neoadjuvant treatment (pCR vs non-pCR). Interestingly, all patients with minor residual tumor associated and with favorable

CD8/FOXP3 ratio harbored long term RFS and OS of nearly 100% (Figure 3). We compared the new PathIm score to the previous gold standard score published by Jeruss et al (19) that associated initial AJCC stage, final AJCC stage on surgical specimen, tumor biological feature including presence of estrogen receptors and tumor grade. Within our population of HER2 overexpressing breast carcinomas, Harrells'C statistic demonstrates that our PathIm score provides an enhanced discrimination of different predictive groups than the one of Jeruss et al (0.75 versus 0.58).

Since our results suggested that the ensuing immune response dictate prognosis of HER2 overexpressing breast cancer patients either in trastuzumab or anthracyline-treated patients, independently of the received therapy, we wondered if this phenomenon was dependent on the breast cancer molecular subtype. So we decided to validate our scoring system on an independent cohort of 51 consecutive patients with HER-2 negative breast cancer patients treated with anthracyclines. Univariate Cox proportional analysis showed that only final AJCC stage on surgical specimen and CD8/FOXP3 ratio on surgical specimen were associated with a better RFS (Table 4 and figure 4A and B). In line with our expectations, PathIm Score also predicted RFS as illustrated by the Kaplan-Meier survival curves (p=0.02) (Figure 4C). The PathIm Score that combines pathologic and immunological in situ markers features a superior predictive value for breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy.

Discussion:

Our findings show that the in situ immune response induced after neoadjuvant chemotherapy may help to determine the prognosis of breast cancer patients. We demonstrated for the first time that a high CD8/FOXP3 ratio is a novel independent predictive factor associated with improved relapse-free and overall survival in breast cancer. Importantly, a scoring system

combining pathological AJCC stage and immune response identifies a population of patients with long term overall survival of 100%.

In a previous exploratory study (18), performed on a small heterogeneous series we demonstrated that favourable CD8/Foxp3 ratio on surgical sample is associated with complete histological response. In addition we observed an increase of cytotoxic T cells only in immunological responder patient, thus suggesting a link between immune response and clinical response. Although, complete pathological response is not an optimum surrogate marker to predict survival (Kuerer JCO 99). In this previous article due to the lack of power we were not able to determine if CD8/foxp3 ratio is linked to the prognosis in term of RFS and OS. So we think that this new study brings some new important information as RFS and OS are the only clinically relevant readout. In addition, Harrell'C score for pathological complete response demonstrated its weak predicator power to determine RFS and OS compared to the immunological score. So these data clearly indicate that immunological score outperform the predictive value of pathological complete response and may have some clinical implication if these results were reproduced prospectively. Finally, we also propose a new scoring system that includes the combination of the analysis of pathological response using AJCC score and Foxp3/CD8 ratio and demonstrate for the first time that combination of both information are complementary and strengthen the determination of the prognosis.

Several studies have previously shown that the immune system participates to the elimination of tumor cells (20, 21). Thus, the presence of tumor-infiltrating T lymphocytes, especially $CD8^+$ T cells, has been considered as a marker of host immune response against tumor antigens and has been shown to correlate with favorable outcome in various cancer types (22-32). Trastuzumab, through its IgG1 humanized Fc portion, is able to act as an autologous antibody (33), and activate ADCC by natural killer cells (6, 34). Tumor samples from patients

previously treated with trastuzumab show a significant increase in $CD8^+$ and $CD4^+$ cells, demonstrating that it can activate different mechanisms able to recruit lymphocytes in the tumor site (6). Recently it was shown that trastuzumab in case of clinical good response could induce a decrease in blood Treg number. Treg evolution could in this case serve as a valuable surrogate marker for assessing the response to trastuzumab therapy (17). These data corroborate our finding that low number Foxp3 cells in tumor bed after chemotherapy influence outcome, and may also focus on the importance of monitoring the kinetic of regulatory T cells infiltration during chemotherapy.

Human tumors promote the accumulation of $CD4^+FOXP3^+$ immunosuppressive Treg cells that suppress endogenous tumor associated antigen-specific T-cell immunity (12), and thus negatively influence tumor prognosis (12, 35), notably for breast cancer (14, 36). Interestingly, in ovarian and hepatocellular carcinoma, a high CD8+/Treg ratio before therapy was associated with improved outcome, suggesting that a local immune balance favorable to $CD8^+$ T effectors, relieved from the control of immunosuppressive $FOXP3^+$ cells, may participate to a better tumor control (32, 37). However, no data are provided on the predictive impact of this ratio after a chemotherapeutic treatment.

In this regard, recent studies from our group have demonstrated that chemotherapy could relieve immunosuppression and induce T cell dependent antitumor responses in mice, but also in breast and colorectal cancer patients (38-41). These fundamental works make us hypothesis that the chemotherapy effect on immune system might be required for complete eradication of tumor cells (42). However, despite these accumulating preclinical evidences, no clinically relevant biomarker that can be used in the context of clinical trials has yet been identified.
We focused our research on HER2 overexpressing breast cancer patients treated or not with trastuzumab to look if this drug was associated with a more favorable in situ immune

response. Surprisingly, favorable immune infiltrates correlated with prognosis not only in patients treated with trastuzumab, but also in those treated with anthracycline alone, suggesting that the predictive value of the immune response is not specifically linked to the drug used. We might hypothesis, that some difference might be due to treatment's ability to harness the host's immune system to eliminate cancer cells.

Pathologic response after neoadjuvant chemotherapy has been described as a strong predictive factor for survival, justifying its use for patient's risk stratification after neoadjuvant treatment for breast cancer. However, the prognosis of non pCR patients has not been extensively studied. According to our PathIm scoring system, RFS and OS were considerably affected by adding the immunological information to the final pathological stage. Specifically, patients achieving minor post treatment residual disease associated with favorable immunological infiltration (high CD8/FOXP3 ratio) had 96% 5-years RFS and a 100% 5-years OS. More interestingly even in patients that did not achieved pCR, our PathIm score also determines a subgroup of patients with favorable immunological infiltration, harboring a 5-year RFS and OS of 100%. Moreover, our PathIm score classifies patients in the same 3 predictive groups patients treated with anthracyclines, or trastuzumab-based chemotherapy. These results demonstrated that all patients who experienced a major response or pCR are not the same with respect to their expected outcome. One possible explanation may be the presence of persistent immuno-resistant cancer cells who might induce the relapse.

However, as it was unclear whether our observation was restricted to HER2 overexpressing breast carcinoma or was a general feature of breast cancer, we performed an external validation of PathIm score on an independent cohort of patients with non-HER2 overexpressing breast carcinoma. Interestingly, in these patients receiving neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy, PathIm score still classified patients in 3 predictive

groups, and isolated the same favorable group of patient with long term survival, thus leading to the conclusion that the predictive value of immune infiltrates depends on the administration of a chemotherapy capable to induce an efficient host's antitumor immune response.

While this study has some limitations due to its retrospective design and the few number of patients, our results stem from a cohort of only one molecular subtype of breast cancer, indeed HER2 overexpressing tumor and the results have been internally validated for RFS using bootstrap analysis. In addition, an external validation has been performed in an independent data set with a different subtype of breast cancer.

In conclusion, this study highlights the importance of the immune system and its interaction with chemotherapy for the prognosis of localized breast cancer, suggesting that precise evaluation of local immune response could be useful for predicting prognosis in the context of neoadjuvant chemotherapy. The PathIm scoring system derived from our data allows the assessment of patient predictive after neoadjuvant chemotherapy by including post-treatment pathologic staging and post-treatment immunological infiltrates profile. Addition of immunological infiltrates signature to final pathologic stage allowed for further refinement of the current predictive scoring system, thus selecting a subgroup of patients with long-term survival after neoadjuvant treatment. Thus, if validated prospectively, our scoring system could be easily incorporated into clinical patient care as well as into stratification schema for future clinical trials with neoadjuvant chemotherapy.

Funding: Fondation de France, Ligue Contre le Cancer, ARC , INSERM, INCA.

Contributors

FG and SL were involved in the conception and design of the study. BC, PF, AV, MHB, LA were involved in the provision of study material and patients. FG, SL, GM, FM, SD, FB did the data analysis and interpretation. SD, FB were in charge of the statistical part of the study. FG, SL, GM, CO and LA wrote the report. All authors approved the final version.

Conflicts of interest

All the other authors declared that they have no conflicts of interest.

References:

1. Kuerer HM, Newman LA, Smith TL, et al. Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. J Clin Oncol 1999; 17:460-9.
2. Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005; 353:1673-84.
3. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. N Engl J Med 2005; 353:1659-72.
4. Buzdar AU, Ibrahim NK, Francis D, et al. Significantly higher pathologic complete remission rate after neoadjuvant therapy with trastuzumab, paclitaxel, and epirubicin chemotherapy: results of a randomized trial in human epidermal growth factor receptor 2-positive operable breast cancer. J Clin Oncol 2005; 23:3676-85.
5. Untch M, Rezai M, Loibl S, et al. Neoadjuvant treatment with trastuzumab in HER2-positive breast cancer: results from the GeparQuattro study. J Clin Oncol; 28:2024-31.
6. Namura K, Shimizu C, Hojo T, et al. Fc{gamma}R2A and 3A polymorphisms predict clinical outcome of trastuzumab in both neoadjuvant and metastatic settings in patients with HER2-positive breast cancer. Ann Oncol. 2010 Nov 25.
7. Spector NL, Blackwell KL.Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. J Clin Oncol. 2009; 27:5838-47.
8. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. J Clin Oncol 2008; 26:1789-96.
9. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 2003; 4:330-6.

10. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Res 2005; 65:2457-64.

11. Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, et al. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. Cancer Res 2001; 61:4766-72.

12. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med 2004; 10:942-9.

13. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, et al. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. Clin Cancer Res 2003; 9:4404-8.

14. Bates GJ, Fox SB, Han C, et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. J Clin Oncol 2006; 24:5373-80.

15. Mahmoud SM, Paish EC, Powe DG, et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3(+) infiltrating cells in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 2010.

16. de Kruijf EM, van Nes JG, Sajet A, et al. The predictive value of HLA class I tumor cell expression and presence of intratumoral Tregs for chemotherapy in patients with early breast cancer. Clin Cancer Res 2010; 16:1272-80.

17. Perez SA, Karamouzis MV, Skarlos DV, et al. CD4+CD25+ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. Clin Cancer Res 2007; 13:2714-21.

18. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, et al. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. Clin Cancer Res 2008; 14:2413-20.

19. Jeruss JS, Mittendorf EA, Tucker SL, et al. Combined use of clinical and pathologic staging variables to define outcomes for breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy. J Clin Oncol 2008; 26:246-52.

20. Zitvogel L, Kroemer G. The immune response against dying tumor cells: avoid disaster, achieve cure. Cell Death Differ 2008; 15:1-2.

21. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. Immunol Rev 2007; 220:47-59.

22. Pages F, Berger A, Camus M, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N Engl J Med 2005; 353:2654-66.

23. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. N Engl J Med 2003; 348:203-13.

24. DeNardo DG, Coussens LM. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. Breast Cancer Res 2007; 9:212.

25. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. Eur J Cancer 1992; 28A:859-64.

26. Schmidt M, Bohm D, von Torne C, et al. The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. Cancer Res 2008; 68:5405-13.

27. Ladanyi A, Somlai B, Gilde K, et al. T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. Clin Cancer Res 2004; 10:521-30.

28. Vesalainen S, Lipponen P, Talja M, et al. Histological grade, perineural infiltration, tumour-infiltrating lymphocytes and apoptosis as determinants of long-term prognosis in prostatic adenocarcinoma. Eur J Cancer 1994; 30A:1797-803.

29. Nakano O, Sato M, Naito Y, et al. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. Cancer Res 2001; 61:5132-6.

30. Schumacher K, Haensch W, Roefzaad C, et al. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. Cancer Res 2001; 61:3932-6.

31. Naito Y, Saito K, Shiiba K, et al. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. Cancer Res 1998; 58:3491-4.

32. Sato E, Olson SH, Ahn J, et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 2005; 102:18538-43.

33. Kute TE, Savage L, Stehle JR, Jr., et al. Breast tumor cells isolated from in vitro resistance to trastuzumab remain sensitive to trastuzumab anti-tumor effects in vivo and to ADCC killing. Cancer Immunol Immunother 2009; 58:1887-96.

34. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. Clin Cancer Res 2004; 10:5650-5.

35. Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. J Exp Med 2005; 202:1075-85.

36. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N, et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer Res 2009; 69:2000-9.

37. Gao Q, Qiu SJ, Fan J, et al. Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. J Clin Oncol 2007; 25:2586-93.

38. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. J Exp Med 2005; 202:1691-701.

39. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. Nat Med 2007; 13:54-61.

40. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. Nat Med 2007; 13:1050-9.

41. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. Nat Med 2009; 15:1170-8.

42. Lake RA, Robinson BW. Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. Nat Rev Cancer 2005; 5:397-405.

Figure Legends:

Figure 1: Representative slides of FOXP3 and CD8 labelling.

Figure 2: Kaplan-Meier curves for RFS (left), and OS (right) stratified according to favorable or unfavorable CD8/Foxp3 ratio in (A) whole population, (B) patients treated with anthracyclines, (C) patients treated with trastuzumab, patients (D) with or (E) without pathologic complete response (pCR) after neoadjuvant chemotherapy. P values were calculated using the log-rank test.

Figure 3: Kaplan-Meier curves for RFS (left), and OS (right) stratified according to Pathologic/Immunologic score (PathIm score) in (A) whole population, (B) patients treated with anthracyclines, (C) patients treated with trastuzumab, patients (D) with or (E) without pathologic complete response (pCR) after neoadjuvant chemotherapy. P values were calculated using the log-rank test.

Figure 4: Kaplan-Meier curves for RFS stratified according to favorable or unfavorable CD8/Foxp3 ratio before treatment (A) and after treatment (B) in the validation cohort. Kaplan-Meier curves for RFS stratified according to Pathologic/Immunologic score (PathIm score) in the validation cohort (C).

Table 1: *Patient and tumor characteristics (n=152) from cohort 1 and cohort 2*

	Cohort 1: 111 patients HER2+++		Cohort 2: 51 patients HER2-		
	N	%	N	%	p
Age					
<50	61	55	27	53	
=50	50	45	24	47	0.94
AJCC initial stage					
0/I/IIA	23	21	12	23	
IIB/IIIA/IIIB	88	79	39	77	0.84
CD8 infiltration before CT					
high	71	64	30	59	
low	40	36	21	41	0.65
Foxp3 infiltration before CT					
high	63	57	26	51	
low	48	43	25	49	0.60
CD8/Foxp3 ratio before CT					
favorable	32	29	20	39	
unfavorable	79	71	31	61	0.25
Axillary nodal status					
Positive	81	73	35	69	
Negative	30	27	16	31	0.70
Tumor grade					
I+II	60	54	35	68	
III	51	46	16	32	0.11
Estrogen receptor					
Positive	53	48	35	68	
Negative	58	52	16	32	0.02
Chemotherapy					
Trastuzumab-Docetaxel	63	57	0	0	
Anthracycline	48	43	51	100	<0.0001
Pathological complete response					
Yes	33	30	9	17	
No	78	70	42	83	0.15
AJCC pathological stage					
0/I/IIA	65	58	33	65	
IIB/IIIA	46	42	18	35	0.57
CD8 infiltration after CT					
high	91	82	26	51	
low	20	18	25	50	0.0001
Foxp3 infiltration after CT					
high	43	39	11	26	
low	68	61	40	74	0.048
CD8/Foxp3 ratio after CT					
favorable	55	49	17	33	
unfavorable	56	51	34	67	0.08
PathIm score					
0	40	36	17	33	
I	40	36	17	33	
II	31	28	17	33	0.78
Relapse					
Yes	42	38	10	20	
No	69	62	41	80	0.03
Death					
Yes	27	24	7	14	
No	84	76	44	86	0.18

AJCC: American Joint Committee for Cancer

CT: Chemotherapy

Table 2: *Univariate (n=111) and Multivariate (n= 111) analyses for factors associated with relapse free survival in patients treated with neoadjuvant chemotherapy.*

Bootstrap: 1000 replications

	Univariate HR	95%CI	p	Harrells' C	Multivariate HR	95%CI	p	Bootstrapping 95%CI and p value
AJCC pathological stage								
0/I/IIA	1				1			
IIB/IIIA	4.53	[2.31-8.88]	<0.0001	0.710	2.56	[1.20-5.48]	0.016	[1.14-5.72] 0.016
CD8/Foxp3 ratio after CT								
favorable	1				1			
unfavorable	4.34	[2.04-9.09]	<0.0001	0.652	3.35	[1.54-7.27]	0.002	[1.30-8.62] 0.002
Chemotherapy								
Trastuzumab-Docetaxel	1				1			
Anthracycline	2.31	[1.20-4.43]	0.012	0.624	1.45	[0.71-2.95]	0.313	[0.71-2.94] 0.313
CD8 infiltration after CT								
high	1							
low	3.85	[2.00-7.14]	<0.0001	0.618				
Foxp3 infiltration after CT								
high	1							
low	0.52	[0.28-0.96]	0.036	0.569				
AJCC initial stage								
0/I/IIA	1							
IIB/IIIA/IIIB	1.6	[0.67-3.80]	0.29	0.55				
CD8 infiltration before CT								
high	1							
low	1.20	[0.63-2.27]	0.56	0.51				
Foxp3 infiltration before CT								
high	1							
low	1.35	[0.73-2.50]	0.34	0.52				
CD8/Foxp3 ratio before CT								
favorable	1							
unfavorable	1.13	[0.57-2.27]	0.71	0.51				
Estrogen receptor								
Positive	1							
Negative	1.39	[0.74-2.56]	0.302	0.561				
Tumor grade								
I+II	1							
III	0.99	[0.54-1.82]	0.976	0.501				
Pathologic complete response								
Yes	1							
No	2.32	[1.04-5.26]	0.04	0.592				
Harrell's C statistic								0.78
AIC								329

Table 3: *Univariate (n=111) and Multivariate (n= 111) analyses for factors associated with overall survival in patients treated with neoadjuvant chemotherapy.*

Bootstrap: 1000 replication

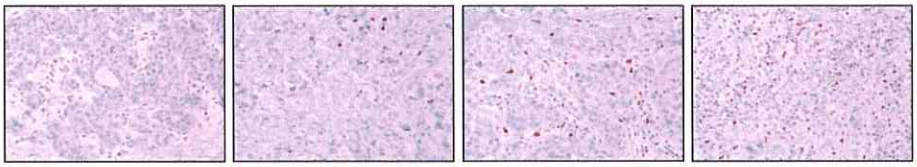
	Univariate HR	95%CI	p	Harrells'C	Multivariate HR	95%CI	p	Bootstrapping 95%CI and p value
AJCC pathological stage								
0/I/IIA	1				1			
IIB/IIIA	6.39	[2.41-16.92]	<0.0001	0.740	3.15	[1.14-8.70]	0.027	[0.005-2136] 0.730
CD8/Foxp3 ratio after CT								
favorable	1				1			
unfavorable	3.33	[1.37-8.33]	0.008	0.611	2.97	[1.19-7.43]	0.020	[0.21-41.37] 0.417
Chemotherapy								
Trastuzumab-Docetaxel	1				1			
Anthracycline	11.04	[2.57-47.36]	0.001	0.717	7.74	[1.74-34.33]	0.007	[5^{E}-10-1.20^{E} 11] 0.864
CD8 infiltration after CT								
high	1							
low	3.85	[1.75-8.33]	0.001	0.627				
Foxp3 infiltration after CT								
high	1							
low	0.60	[0.27-1.29]	0.197	0.532				
AJCC initial stage								
0/I/IIA	1							
IIB/IIIA/IIIB	1.37	[0.47-4.01]	0.562	0.55				
CD8 infiltration before CT								
high	1							
low	1.04	[0.45-2.41]	0.93	0.50				
Foxp3 infiltration before CT								
high	1							
low	0.75	[0.33-1.67]	0.48	0.56				
CD8/Foxp3 ratio before CT								
favorable	1							
unfavorable	1.08	[0.46-2.56]	0.85	0.54				
Estrogen receptor								
Positive	1							
Negative	1.15	[0.53-2.50]	0.724	0.544				
Tumor grade								
I+II	1							
III	1.45	[0.67-3.15]	0.342	0.543				
Pathologic complete response	1							
Yes	3.33	[1.02-11.1]	0.047	0.613				
No								
Harrell's C statistic								0.815
AIC								188

Table 4: *Univariate (n=51) analyses for factors associated with relapse free survival in patients treated with neoadjuvant chemotherapy in the validation cohort*

	Univariate HR	95%CI	p
AJCC pathological stage			
0/I/IIA	1		
IIB/IIIA	4.5	[1.3-16.6]	0.02
CD8/Foxp3 ratio after CT			
favorable	1		
unfavorable	3.6	[1.1-12.5]	0.04
CD8 infiltration after CT			
high	1		
low	2.98	[0.9-9.7]	0.07
Foxp3 infiltration after CT			
high	1		
low	0.4	[0.09-1.75]	0.22
AJCC initial stage			
0/I/IIA	1		
IIB/IIIA/IIIB	1.2	[0.3-4.80]	0.8
CD8 infiltration before CT			
high	1		
low	1.26	[0.38-4.1]	0.7
Foxp3 infiltration before CT			
high	1		
low	0.8	[0.25-2.6]	0.71
CD8/Foxp3 ratio before CT			
favorable	1		
unfavorable	1.13	[0.57-2.27]	0.71
Estrogen receptor			
Positive	1		
Negative	1.13	[0.32-4]	0.24
Tumor grade			
I+II	1		
III	0.73	[0.2-4.5]	0.62
Pathologic complete response			
Yes	1		
No	1.8	[0.5-6.6]	0.4

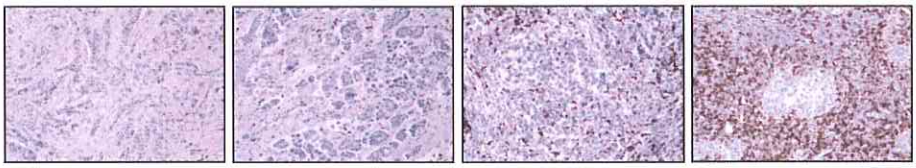
Figure 1:

Foxp3 infiltrates



Grade 0 Grade 1 Grade 2 Grade 3

CD8 infiltrates



Grade 0 Grade 1 Grade 2 Grade 3

Figure 2: RFS and OS according to CD8/Foxp3 ratio.

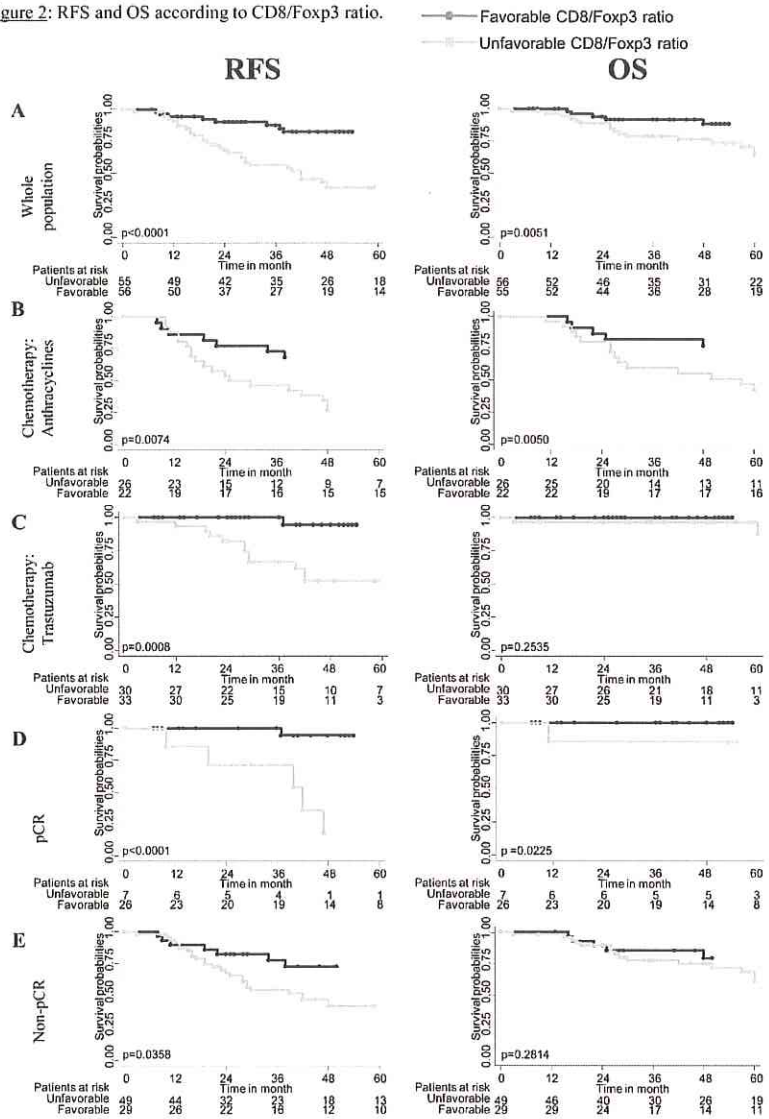


Figure 3: RFS and OS according to PathIm score:

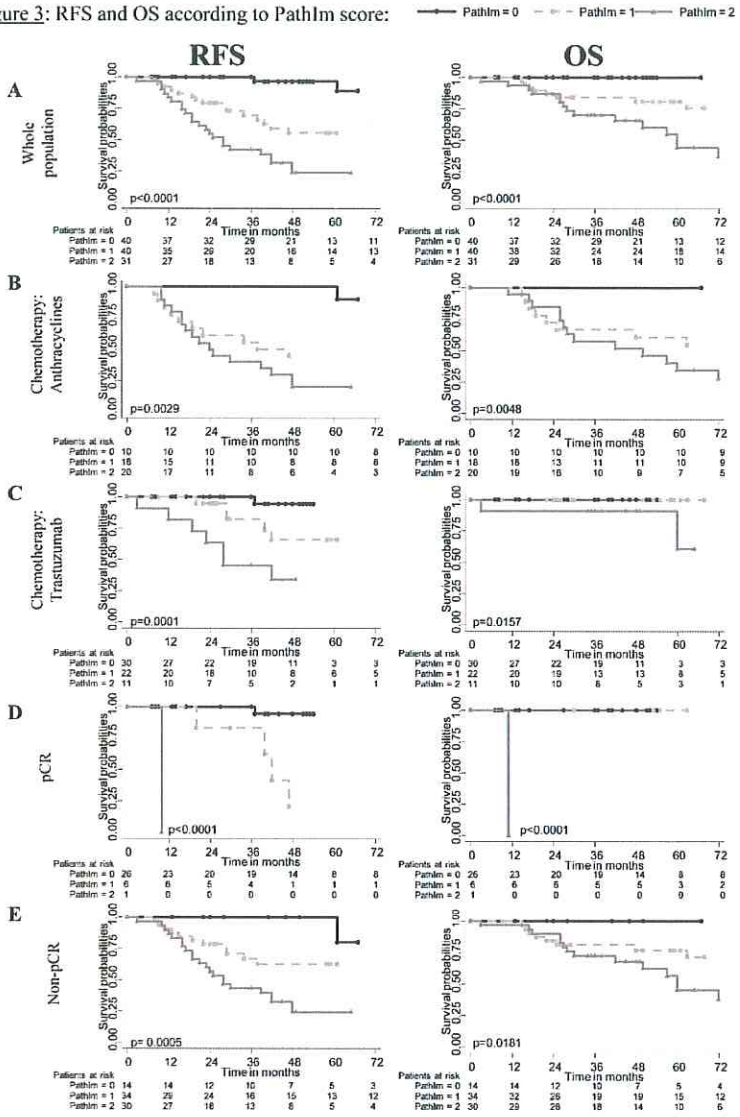
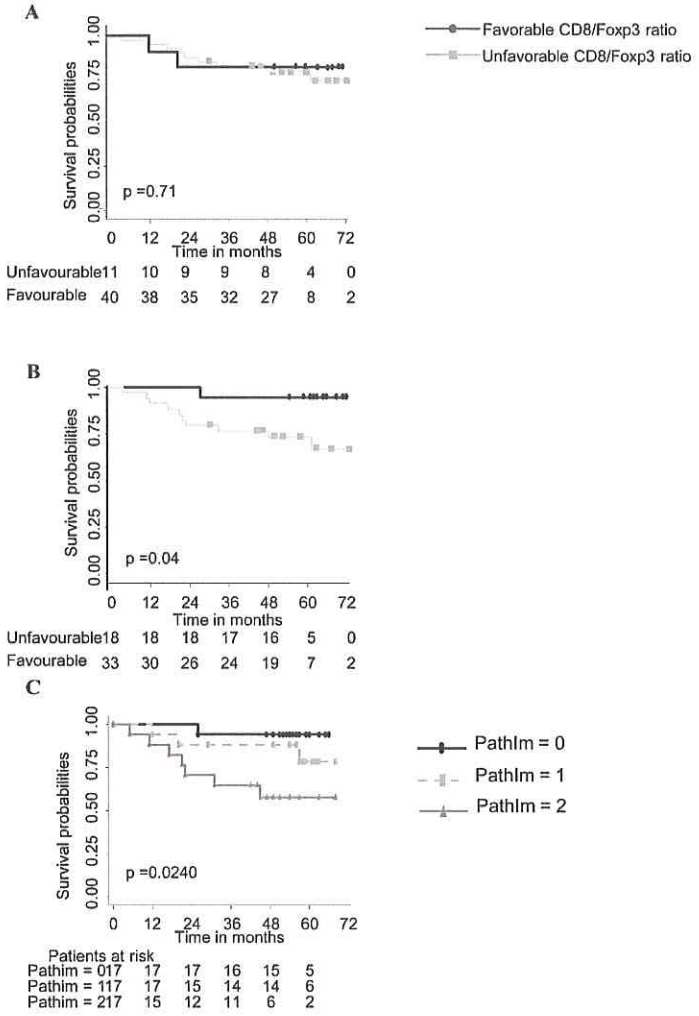


Figure 4.


A
Survival probabilities
0.00 0.25 0.50 0.75 1.00
p =0.71
0 12 24 36 48 60 72
Time in months
Unfavourable11 10 9 9 8 4 0
Favourable 40 38 35 32 27 8 2
Favorable CD8/Foxp3 ratio
Unfavorable CD8/Foxp3 ratio
B
Survival probabilities
0.00 0.25 0.50 0.75 1.00
p =0.04
0 12 24 36 48 60 72
Time in months
Unfavourable18 18 18 17 16 5 0
Favourable 33 30 26 24 19 7 2
C
Survival probabilities
0.00 0.25 0.50 0.75 1.00
p =0.0240
0 12 24 36 48 60 72
Time in months
Patients at risk
Pathim = 017 17 17 16 15 5
Pathim = 117 17 15 14 14 6
Pathim = 217 15 12 11 6 2
PathIm = 0
PathIm = 1
PathIm = 2

4. Synthèse – Discussion :

Cette étude, basée comme notre étude princeps (Ladoire et al., 2008) sur l'évaluation immunohistochimique des infiltrats tumoraux en lymphocytes T CD8+ et en lymphocytes T régulateurs Foxp3+ avant et après chimiothérapie néoadjuvante, a donc été réalisée à partir des prélèvements tissulaires tumoraux de 111 patientes présentant une tumeur surexprimant HER2. Les patientes traitées avant 2001 avaient donc reçu une chimiothérapie néoadjuvante sans trastuzumab (chimiothérapie à base d'anthracyclines), alors que les patientes traitées après 2001 avaient reçu une chimiothérapie comportant du trastuzumab (en association avec un taxane).

Les effets cytotoxiques du trastuzumab passent bien sûr par l'inhibition pharmacologique de l'activité de sa cible : le récepteur HER2 (Spector & Blackwell, 2009), mais parallèlement à ce blocage de la transduction de signaux oncogéniques, plusieurs travaux sont en faveur d'une activation du système immunitaire des patients par le trastuzumab, contribuant ainsi probablement à une partie de son activité antitumorale. C'est ainsi que les tumeurs de patientes traitées par du trustuzumab voient leur infiltration en cellules NK, et en lymphocytes T exprimant des marqueurs de cytotoxicité significativement augmentée par rapport aux tumeurs de patientes comparables mais non traitées par le trastuzumab, laissant entrevoir la possibilité de l'implication de la cytotoxicité cellulaire dépendante de l'anticorps (ADCC) (Arnould et al., 2006). Des études préliminaires humaines chez des patientes recevant du trastuzumab dans le cadre de traitements néoadjuvants ont par ailleurs montré que son mécanisme d'action via le système immunitaire était précoce, et possiblement le mécanisme d'action prépondérant pour expliquer son action antitumorale (Gennari et al., 2004). C'est ainsi que l'intensité de l'ADCC est corrélée chez l'homme à l'efficacité du trastuzumab (Varchetta et al., 2007), et que des polymorphismes inactivateurs du récepteur au fragment Fc des immunoglobulines situé sur les NK sont associés à une moins bonne efficacité et une

moins bonne survie sans rechute après traitement par le trastuzumab (Musolino et al., 2008). L'effet du trastuzumab sur les Tregs a été peu étudié. Néanmoins, 2 études humaines récentes montrent que les patientes traitées par trastuzumab voient leur nombre de Tregs dans le sang diminuer (Perez et al., 2007) (Horlock et al., 2009), et que cette diminution est associée à l'obtention d'une réponse objective (Perez et al., 2007). Aucune étude ne s'est cependant intéressée dans la littérature aux effets du trastuzumab sur la modulation des Tregs dans le stroma tumoral. L'éventualité que le pronostic des patients traités par trastuzumab puisse être modifié par la qualité de leur réponse immunitaire après administration du traitement nous a conduit à étudier l'impact d'une chimiothérapie comportant du trastuzumab sur les infiltrats tumoraux en CD8+ et en Tregs, par comparaison à des patientes porteuses de la même maladie, mais traitées avec une chimiothérapie sans trastuzumab.

Nous confirmons dans ce travail, sur une série indépendante de la première publiée (Ladoire et al., 2008), l'association significative entre signature immunologique favorable sur la pièce opératoire (association d'une forte infiltration en CD8+ et d'une faible infiltration en Treg) et obtention d'une réponse histologique complète. De plus, le nombre plus important de patientes, et un suivi médian de 60 mois nous donnent l'opportunité dans ce travail d'étudier l'impact pronostic potentiel de notre signature immunologique sur la survie : comme le laissait entrevoir notre travail princeps, nous avons observé que les patientes présentant après chimiothérapie néoadjuvante une signature immunologique favorable au niveau du lit tumoral, avaient une survie sans récidive, mais également une survie globale significativement plus importante par rapport aux autres. La signature immunologique favorable apparaissait dans notre série comme un nouveau facteur indépendant de survie sans récidive, et même de survie globale en analyse multivariée, aux côtés de la taille du résidu tumoral sur la pièce opératoire, et du type de chimiothérapie (le fait d'avoir reçu du trastuzumab pour le traitement d'une tumeur HER2+++ étant bien sur de meilleur pronostic).

Mais, surtout, l'effet pronostic favorable en termes de survie sans récidive s'observait aussi bien dans le groupe des patientes obtenant une réponse histologique complète, que dans le groupe de patientes présentant la persistance d'un reliquat tumoral après chimiothérapie néoadjuvante. Ceci nous semble d'une importance considérable, dans la mesure où à l'heure actuelle, le principal facteur pronostic identifié pour les patientes traitées en situation néoadjuvante est l'obtention d'une RCH (Kuerer et al., 1999). Néanmoins, il n'est pas rare d'observer des rémissions longues où définitives chez des patientes n'ayant pas obtenu une RCH sur la pièce opératoire, et au contraire d'observer des rechutes métastatiques chez des patientes ayant pourtant obtenu une RCH à l'issue de la chimiothérapie néoadjuvante. Il existe donc actuellement un besoin de biomarqueurs supplémentaires pour affiner le pronostic de ces patientes, et éventuellement guider des indications de traitements supplémentaires, indépendamment de l'obtention d'une RCH, pour les patientes de mauvais pronostic. Notre signature immunologique, est simple, reproductible, peu couteuse, et pourrait constituer un outil supplémentaire dans le futur. Néanmoins, le résultat de la chimiothérapie néoadjuvante sur les cellules tumorales reste un facteur pronostic d'importance dans ce contexte. Ainsi, l'obtention d'une RCH apparait dans notre étude significativement associée à une meilleure survie sans récidive et globale, mais seulement en analyse univariée. Des méthodes plus fines d'évaluation de la qualité de la réponse ont été proposées comme les classifications de Chevallier (Chevallier et al., 1993) et de Sataloff (Sataloff et al., 1995), utilisées en Europe. L'évaluation du résidu tumoral par la classification TNM de l'American Joint Committee of Cancer (AJCC) a montré son utilité, en affinant le pronostic des patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante, par rapport à une simple distinction RHC *versus* pas de RHC (Carey et al., 2005). Cet outil a récemment été utilisé, en association avec des facteurs de biologie tumorale simples comme le grade, et l'expression des récepteurs hormonaux, par l'équipe du MD Anderson, qui a mis en évidence avec cet outil clinico-pathologique 7

groupes de patientes de pronostic différent sur leur cohorte de 932 patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante (Jeruss et al., 2008). Pour ces 2 dernières raisons, il nous a semblé opportun d'évaluer la classification TNM AJCC sur la pièce opératoire de nos patientes, en utilisant le même cutoff pronostic que dans les 2 précédentes publications citées, c'est-à-dire stades I/IIA=bon pronostic, et IIB/IIIA= mauvais pronostic. C'est ainsi qu'au même titre que notre signature immunologique, et que le type de chimiothérapie reçue, le stade TNM AJCC sur la pièce opératoire ressort en analyse multivariée comme un facteur pronostic indépendant de survie sans progression et de survie globale.

En revanche, l'application sur notre cohorte de l'outil d'évaluation du pronostic mis au point par l'équipe du MD Anderson ne permettait pas de faire clairement ressortir des groupes de patientes de pronostic significativement différents (logrank p=0.58). Ceci s'explique peut être par le faible nombre de patientes HER2+++ dans la série américaine (19% de l'ensemble des patientes), ayant donc pu amener à la construction d'un outil d'évaluation pronostic non adapté à ce sous type moléculaire. Il nous a donc semblé utile d'aller plus loin, et d'essayer de bâtir un outil alternatif basée sur notre cohorte, et incorporant les 2 variables impliquées de façon majeure dans le pronostic de nos patientes : notre signature immunologique et le stade TNM AJCC sur la pièce opératoire.

Les coefficients β de ces 2 variables dans les modèles multivariés étant de même amplitude, la même pondération a été appliquée à chacune d'entre elles, aboutissant donc à l'obtention d'un score immunologique et pathologique (score PathIm) pour chaque patiente, allant de 0 (signature immunologique et stade TNM favorable) à 2 (signature immunologique et stade TNM défavorable). Les 3 groupes de patientes ainsi définis montrent des pronostics à long terme significativement différents pour la survie sans récidive et la survie globale, non seulement dans la population globale, mais aussi parmi les patientes ayant obtenu une RCH, celles n'ayant pas obtenu une RCH, celles ayant reçu une chimiothérapie avec trastuzumab et

celles n'ayant pas reçu de trastuzumab. De façon remarquable, en terme de survie globale, notre score PathIm isole un sous groupe de patientes avec une survie globale à 5 ans de 100%, non seulement dans la population globale, mais aussi quelque soit le type de chimiothérapie reçue, et aussi bien chez les patientes ayant obtenu une RCH, que celles n'ayant pas obtenu une RCH à l'issue de la chimiothérapie néoadjuvante.

Parallèlement à ce groupe de patientes d'excellent pronostic, les patientes présentant un résidu tumoral important sur la pièce opératoire, associé à une signature immunologique défavorable ont clairement le plus mauvais pronostic avec une survie sans récidive à 5 ans de seulement 24% et une survie globale à 44%. L'existence d'un groupe de pronostic intermédiaire contenant un certain nombre de patientes présentant pourtant une RCH, montre clairement que le pronostic de ces patientes n'est pas le même pour toutes, et qu'il peut être influencé par la qualité de la réponse immunitaire évaluée dans le lit tumoral. La persistance de cellules tumorales non affectées par une réponse immunitaire efficace, chez ces patientes qui finalement rechutent pourrait être une explication.

La deuxième constatation d'importance faite dans cette étude est le fait que notre signature immunologique CD8/Foxp3 ne semble pas influencé par la présence de trastuzumab dans le traitement néoadjuvant. En effet, l'obtention d'une signature immunologique favorable sur la pièce opératoire n'était pas significativement associé à un traitement comportant du trastuzumab, et l'évaluation semi quantitative des infiltrats en CD8+ et en Foxp3+ ne montrait pas de différence entre les 2 groupes thérapeutiques. C'est donc logiquement qu'un ratio CD8/Foxp3 favorable constituait un facteur pronostic indépendant à la fois de la taille du résidu tumoral, mais aussi du type de chimiothérapie reçu. Ceci pourrait suggérer que la valeur pronostic de la réponse immunitaire telle qu'elle est évaluée dans notre étude, ne dépend pas spécifiquement du recours à un anticorps monoclonal, mais de façon plus générale

de la capacité d'une chimiothérapie à orienter les acteurs cellulaires de l'immunité vers l'éradication des cellules tumorales. De même, notre score PathIm, incorporant la signature CD8/Foxp3 permet de discriminer 3 groupes de patientes de pronostics différents, isolant notamment un groupe de patientes avec une survie globale à 5 ans de 100% à la fois chez les patientes ayant reçu du trastuzumab, et chez celles n'en ayant pas reçu.

Cette constatation faite, il nous restait à vérifier si le concept pronostic de la balance CD8/Foxp3 en situation néoadjuvante, en plus d'être indépendant du type de chimiothérapie reçue, était aussi indépendant du sous type molécualire de cancer du sein, et pouvait ainsi s'appliquer à des tumeurs HER2- traitées par chimiothérapie néoadjuvante. Nous avons donc utilisé une cohorte de 51 patientes présentant ces caractéristiques et traitées par chimiothérapie à base d'anthracyclines, et ainsi mis en évidence que notre score PathIm permettait également sur cette nouvelle cohorte de définir 3 groupes de patientes de pronostic significativement différent quand à leur survie sans récidive.

En dépit de limitations méthodologiques liées à son caractère rétrospectif, cette étude met néanmoins en lumière l'importance du système immunitaire et de son interaction avec la chimiothérapie pour le pronostic des cancers du sein localisés. Notre signature immunologique CD8/Foxp3, et le score PathIm qui en découle, constituent de nouveaux facteurs pronostics du cancer du sein traité en situation néoadjuvante, permettant de mieux appréhender, et de réaffiner le pronostic à long terme des patientes. L'étude semi quantitative des infiltrats tumoraux en CD8+ et en Foxp3+ sur la pièce opératoire est une technique simple, reproductible, nécessitant un apprentissage court, et en outre peu couteuse à mettre en œuvre. Si une telle signature était validée de façon prospective, elle pourrait ainsi permettre de mieux délivrer les indications thérapeutiques de traitements supplémentaires, post chirurgicaux pour les patientes identifiées de mauvais pronostic.

D. Foxp3 et cellules tumorales :

1. Expression de Foxp3 dans les cellules tumorales :

Foxp3 semble donc être le facteur de transcription majeur des lymphocytes T régulateurs, et a pendant très longtemps été considéré comme une protéine exprimée uniquement dans les populations lymphocytaires. Très récemment, la recherche du transcrit et de la protéine Foxp3 dans les tissus de souris Rag2(-/-), dépourvues de lymphocytes T, a permis de mettre en évidence une expression du gène dans les cellules épithéliales prostatiques, bronchiques et mammaires, mais pas dans d'autres organes comme le foie, le rein ou le colon (Chen et al., 2008). Le rôle de Foxp3 dans les cellules épithéliales est mal connu, et c'est essentiellement de l'étude du rôle de Foxp3 dans les cellules tumorales que sont venues récemment de nouvelles informations sur les fonctions de Foxp3 dans les cellules non-lymphocytaires. En effet, à coté de l'expression de Foxp3 dans des cellules épithéliales normales, un certains nombres de lignées cellulaires cancéreuses bronchiques, mammaires, coliques, pancréatiques ou de mélanome expriment également l'ARN messager et la protéine Foxp3 (Karanikas et al., 2008). L'expression de Foxp3 dans les cellules épithéliales est variable d'un organe à l'autre, aussi bien pour le tissu normal que pour le tissu tumoral qui en dérive. Ainsi, si les mélanocytes normaux n'expriment pas Foxp3, plusieurs lignées de mélanomes malins expriment à la fois l'ARN messager (en l'occurrence, un variant dépourvu des exons 3 et 4) et la protéine (Ebert et al., 2008). Par analogie, l'ARN messager de Foxp3 est retrouvé dans des lignées humaines de cancer du pancréas, dans lesquelles la protéine a une localisation essentiellement cytoplasmique en immunohistochimie (Hinz et al., 2007), alors que ni le transcrit, ni la protéine ne sont retrouvées dans les cellules épithéliales pancréatiques normales. Il semble que dans ces lignées, l'expression de Foxp3 soit sous la dépendance du TGF-β2. Par ailleurs, les

cellules pancréatiques tumorales exprimant Foxp3 sont capables d'inhiber la prolifération de lymphocyte T naïfs lors d'une co-culture, suggérant dans ce modèle, la possibilité d'un mécanisme d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire voisin de ceux utilisés par les Tregs (Hinz et al., 2007). De façon intéressante, dans ce travail princeps, les auteurs notaient que la down-regulation par siRNA de l'expression de Foxp3 dans ces cellules tumorales se traduisait par une augmentation très significative de l'expression des gènes de l'IL-6 et de l'IL-8, laissant suggérer un rôle de répresseur transcriptionnel de Foxp3 pour ces 2 gènes dans ce modèle.

L'existence de cette différence d'expression entre tissus sain et tumoral, associée à la possibilité que Foxp3 puisse jouer également un rôle dans les cellules tumorales sur la transcription de gènes cibles a conduit plusieurs équipes à examiner son action potentielle sur la cancérogénèse dans plusieurs modèles. Parallèlement, la constatation de la survenue très fréquente de tumeurs mammaires spontanées chez les souris *Surfy*, porteuses d'une mutation inactivatrice de Foxp3 a amené à sa découverte en tant que premier anti-oncogène lié à l'X (Liu et al., 2009) dans le cancer du sein chez la souris.

La majorité des gènes suppresseurs de tumeurs sont autosomiques, et leur inactivation suppose 2 évènements génétiques, telles des délétions ou des mutations inactivatrices (théorie des « two hits »). Cependant les gènes suppresseur de tumeur lié à l'X sont à l'état hémizygote (par l'existence d'un seul allèle chez l'homme, et du fait de l'inactivation d'un chromosome X chez la femme), et peuvent donc être inactivés par un seul évènement génétique (« single hit »). C'est le cas par exemple du gène WTX dans les tumeurs de Wilms (Rivera et al., 2007). C'est ainsi que chez l'homme, si les cellules épithéliales prostatiques normales expriment Foxp3, l'apparition d'une néoplasie prostatique intraépithéliale, puis d'un cancer de prostate, sont associée à une fréquente perte d'expression de Foxp3 (Wang et al., 2009). De récents travaux montrent que la

transfection de lignées tumorales prostatiques avec Foxp3 ralenti leur croissance tumorale. Ces travaux montrent par ailleurs que le rôle de Foxp3 dans la cancérogénèse prostatique passe par son action de facteur répresseur de l'expression de cMYC. Ainsi, la perte d'expression de Foxp3, possible par la survenue d'un seul événement génétique, se traduit par l'hyperexpression de l'oncogène cMYC, l'une des principales voies oncogéniques du cancer de prostate (Ellwood-Yen et al., 2003).

Des observations similaires ont été faites dans des modèles précliniques de cancers du sein, et sur des prélèvements tissulaires humains : Foxp3 semble ainsi exprimé par l'épithélium mammaire normal (Zuo et al., 2007b), contrairement à ce qui est observé dans plusieurs lignées cellulaires tumorales et sur des tumeurs humaines, dans lesquelles l'expression du transcrit et de la protéine sont moindres ou non retrouvées (Zuo et al., 2007b). Là encore, les explications mécanistiques semblent tenir dans le rôle de répresseur transcriptionnel de Foxp3 pour un certain nombre de proto-oncogènes impliqués dans la cancérogénèse mammaire. C'est ainsi qu'une équipe d'Ann Arbor (Zuo et al., 2007a) a récemment identifié le rôle de Foxp3 dans la répression de l'expression de SKP2 (S-phase kinase associated protein 2), un oncogène codant pour une protéine impliquée dans l'ubiquitination et la dégradation de p27, un inhibiteur de CDK (Pagano, 2004) (Nakayama & Nakayama, 2006). SKP2 est ainsi nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire (Pagano, 2004) (Carrano et al., 1999), et un haut niveau d'expression de SKP2 a été rapporté dans de nombreuses variétés de tumeurs (Nakayama & Nakayama, 2006).

La même équipe a rapporté parallèlement dans le cancer du sein un rôle similaire de Foxp3 sur l'expression de l'oncogène HER2 (Zuo et al., 2007b). Dans ce travail, les auteurs montrent que l'épithélium mammaire normal exprime Foxp3. Les 2 isoformes de transcrits exprimés dans les cellules normales sont celles retrouvées dans les Tregs. A l'inverse dans les nombreuses lignées tumorales mammaires étudiées, des altérations non

seulement quantitatives mais aussi qualitatives de Foxp3 sont retrouvées : ainsi, aucune lignée étudiée n'exprime l'un des 2 transcrits normaux, mais des transcrits amputés des exons 3 et/ou 4 et/ou 8. Par ailleurs, l'expression de Foxp3 dans les cellules tumorales est très significativement moins importante que dans les cellules normales, et souvent absente totalement. La diminution ou la perte d'expression de Foxp3 est significativement corrélée à l'augmentation parallèle de l'expression du gène HER2, et la transfection de ces lignées avec le cDNA de Foxp3 sauvage permet de diminuer l'expression d'HER2, et inversement, l'extinction de Foxp3 par siRNA dans les cellules épithéliales mammaires non cancéreuses se traduit par une augmentation de l'expression de HER2 (Zuo et al., 2007b).

Foxp3 semble donc constituer dans ces différents travaux expérimentaux un puissant antioncogène lié à l'X, potentiellement impliqué dans la cancérogénèse, notamment mammaire. Son lien potentiel avec l'oncogène HER2 nous a conduit à évaluer l'expression de Foxp3 dans les cellules tumorales de cancers du sein surexprimant HER2, afin d'examiner son éventuel rôle pronostic chez des patientes traitées par chimiothérapie pour une tumeur localisée.

2. **Article # 6 :**

« Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy »

Breast Cancer Research and Treatment. Mars 2010.

Breast Cancer Res Treat (2011) 125:65–72
DOI 10.1007/s10549-010-0831-1

PRECLINICAL STUDY

Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy

Sylvain Ladoire · Laurent Arnould · Grégoire Mignot · Bruno Coudert · Cédric Rébé · Fanny Chalmin · Julie Vincent · Mélanie Bruchard · Bruno Chauffert · François Martin · Pierre Fumoleau · François Ghiringhelli

Received: 11 November 2009 / Accepted: 3 March 2010 / Published online: 13 March 2010
© Springer Science+Business Media, LLC. 2010

Abstract The Forkhead Box Protein 3 is highly expressed not only in regulatory T cells, but also in tumor cells, acting as a transcriptional repressor of breast oncogenes including *HER2*. We investigated the prognostic significance of Foxp3 expression in cancer cells in a large cohort of patients with HER2-overexpressing breast carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. Foxp3-positive tumor cells were detected by immunohistochemistry in 103 patients with primary invasive HER2-overexpressing breast carcinoma, and treated with neoadjuvant chemotherapy, with or without trastuzumab. Kaplan–Meier analysis and Cox regression model were used to assess relapse-free and overall survival, respectively, and according to the presence or the absence of Foxp3 expression in tumor cells. Breast cancer cells were Foxp3+ in 57% of tumors. Foxp3 expression in breast cancer cells was associated with better relapse-free ($P = 0.005$) and overall survival ($P = 0.03$). By multivariate analysis, the presence of Foxp3+ tumor cells produced an independent prognostic factor for both better relapse-free ($P = 0.006$) and overall survival ($P = 0.03$). These findings indicate that the presence of Foxp3+ tumor cells represents a new independent prognostic factor of improved outcome in HER2-overexpressing breast carcinoma, which could help identify high-risk patients for additional therapies after neoadjuvant chemotherapy.

Keywords Foxp3 · HER2 · Breast cancer · Tumor cells · Neoadjuvant chemotherapy

S. Ladoire · B. Coudert · B. Chauffert · P. Fumoleau · F. Ghiringhelli
Department of Medical Oncology, Centre Regional de Lutte Contre le Cancer Georges François Leclerc, Dijon, France

S. Ladoire · G. Mignot · C. Rébé · F. Chalmin · J. Vincent · M. Bruchard · B. Chauffert · F. Martin · F. Ghiringhelli
Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, University of Dijon, Avenir Team INSERM. CRI-866, Dijon, France

S. Ladoire · L. Arnould · C. Rébé · F. Ghiringhelli
Department of Pathology and Molecular Biology, Centre Regional de Lutte Contre le Cancer Georges François Leclerc, Dijon, France

F. Ghiringhelli (✉)
Faculté de Médecine, Centre Georges François Leclerc, Centre de Recherche INSERM 866, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon, France
e-mail: fghiringhelli@dijon.fnclcc.fr

Introduction

Forkhead Box Protein 3 (Foxp3) is a transcription factor involved in regulating immune system development [1, 2], notably in the generation of immunosuppressive regulatory T cells (Treg). These cells play a central role in preventing autoimmunity and pathologies inflicted due to uncontrolled immune responses after infection [3]. Moreover, there is increasing evidence that Treg also play an important role in immune evasion mechanisms promoted by cancers, enabling tumor cells to elude the host antitumor immune response [4–9]. Initially, Foxp3 expression was thought to be restricted to hematopoietic tissues. However, although data are scant, Foxp3 expression by other tissues has also been observed, including in human tumor cells [10]. Importantly, biological functions of Foxp3 in tumor cells, and its significance, presently remain unclear. Recent data suggest that Foxp3 expression in tumor cells could be a poor prognostic factor in breast cancer [11], but in contrast with these data, Foxp3 was also recently demonstrated to

be a tumor suppressor gene, acting as a transcriptional repressor of *SKP2* and *HER2*, the two breast cancer oncogenes [12, 13]. These two biological studies suggested that HER2-overexpressing breast cancer subtype may be differently driven by Foxp3. This led us to hypothesize that Foxp3 expression may have antitumor functions in HER2-overexpressing molecular subtype of breast cancer, and, therefore, a different prognostic significance.

This study examined the prognostic relevance of tumor cell Foxp3 expression in archival material of a cohort of 103 consecutive patients treated with neoadjuvant chemotherapy for HER2-overexpressing breast cancer.

Importantly, this study reveals that, in this molecular subtype, the presence of Foxp3 expression in tumor cells independently predicts a better survival after neoadjuvant chemotherapy.

Patients and methods

Patients and tissue sampling

Our series included 103 consecutive patients treated with neoadjuvant chemotherapy in our institution (Centre Regional de Lutte Contre le Cancer de Dijon, Dijon, France) between 1976 and 2007 for localized breast carcinoma overexpressing HER2. All the patients underwent neoadjuvant chemotherapy followed by definitive surgery and radiotherapy. This retrospective study was approved by our institutional review board, and all the data were anonymized. Written informed consent was obtained from all the patients. All the patients were diagnosed with invasive breast carcinoma by core needle biopsy, and a sample was collected in association with anonymized clinical data.

Histologic type was defined according to the WHO classification. Histologic grading was carried out using the Nottingham-combined histologic grade (Elston–Ellis modification of Scarff–Bloom–Richardson (SBR) grading system) [14]. The steroid hormone receptor estrogen, and progesterone receptor status was determined using enzyme-immunoassays (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, USA), or by immunohistochemistry (ER, clone SP1, PR clone 1E2, Ventana, Tucson USA). The Herceptest scoring method was used for the determination of HER2 status, considering only a score of 3+, or 2+ with FISH amplification, as determinants for HER2 overexpressing tumors (clone 4B5, Ventana, Tucson USA).

Chemotherapy was performed using an anthracycline-based regimen (without trastuzumab) in 48 patients treated before 2001: FEC 100 (5-fluorouracil 500 mg/m^2, epirubicin 100 mg/m^2, cyclophosphamide 500 mg/m^2), or ACVMF (adriamycin 50 mg/m^2, cyclophosphamide 400 mg/m^2, vincristine 0.6 mg/m^2, methotrexate 20 mg/m^2, 5-fluorouracil 600 mg/m^2). Patients treated after 2001 received trastuzumab (6 mg/kg) associated with chemotherapy by docetaxel 100 mg/m^2 or by docetaxel 75 mg/m^2 + carboplatin AUC 6. Surgery was performed 3–4 weeks after the last cycle of chemotherapy. Histological response was determined on surgical specimens according to the Chevallier classification [15]. Breast tissue without residual malignant epithelial invasive tumor, and associated with no microscopic evidence of tumor cell in axillary specimens, was considered as pathological complete response (pCR).

Foxp3 immunohistochemical staining

Foxp3 expression was analyzed immunohistochemically on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor sections using Antihuman Foxp3 monoclonal antibody clone ab20034 (Abcam, Cambridge, United Kingdom) at 1/100 dilution, and the iVIEW system (Ventana, Tucson USA). Labeling was detected using the Ventana Benchmark XT automat (Ventana, Tucson USA). The stained arrays were counterstained with hematoxylin and mounted in Aquamount (Dako, Glostrup, Denmark). Positive and negative staining controls were carried out with paraffin tonsil sections using Foxp3 monoclonal antibody and an isotype-matched negative control antibody. The presence or the absence of Foxp3-positive (Foxp3+) tumor cells, and quantification of Foxp3+ Treg were evaluated independently by two of the authors (S.L and F.G), both blinded to clinical data. Discrepancies between the 2 observers were reviewed jointly, and a consensus was reached. In order to evaluate the extent of Foxp3+ Treg cells infiltration, a grading system for semiquantitative scoring based on the system established by Black [16], and previously described and validated to assess Treg infiltration [17] was used. Briefly, at least 10 fields were assessed: grade 0 corresponds to the absence of Foxp3+ Treg cells, grade 1 corresponds to the presence of 1 to 3 Foxp3+ Treg cells in less than three fields, grade 2 corresponds to the presence of 1 to 3 Foxp3+ Treg cells in more than three fields, and grade 3 corresponds to the presence of more than 3 Foxp3+ Treg cells in more than three fields. Grades 0 and 1 were considered as low infiltration, whereas grades 2 and 3 were considered as strong Treg infiltration.

Statistical analysis

The association between the presence of Foxp3+ tumor cells/or Foxp3+ Treg cells infiltration and clinicopathological/biological variables was examined using the Chi2 test and Fisher's exact probability test if required. Relapse-free survival (RFS) was defined as the time elapsed from the date of diagnosis to the date of the first

event (locoregional recurrence and/or a distant recurrence, whichever came first). Overall survival (OS) was defined as the time from date of diagnosis until death. The Kaplan–Meier method was used for calculation of survival probabilities and the log-rank test for comparison of survival curves. Cox's proportional hazards regression was used for univariate and multivariate analysis of RFS and OS. All the predictors with P values lower than 0.10 in univariate analysis were used in multivariate analysis, carried out by the backward elimination procedure. Foxp3 and treatment interaction terms were included in the models with significance testing by the likelihood ratio test.

All the analyses were conducted using Medcalc software (Medcalc Software, Mariakerke, Belgium). Two-sided P values less than 0.05 were considered statistically significant.

Results

Patient characteristics

In total, 103 patients were included in this analysis. Patient and tumor characteristics are reported in Table 1. Half of all the patients presented with stage T3 or T4 tumor and 72% had clinically detectable axillary lymph node involvement at diagnosis. Half the patients presented with high tumor grade (SBR III) and/or negative estrogen receptor. Neoadjuvant chemotherapy was given every 3 weeks for a total of six cycles, and consisted of an anthracycline-based regimen in 48 cases (47%), and trastuzumab + taxane-based regimen in 55 cases (53%). Classic histological analysis of surgical specimens revealed a pCR in 27 cases (25%) (19/55 (33%) in the group treated by trastuzumab + taxane and 8/48 (16%) in the group treated by anthracycline-based regimen). Median follow-up period was 40 months (range 7–144).

Table 1 Clinicopathologic characteristics of patients

Characteristic	No./total no.	%
Age (years)		
<50	57/103	55
≥50	46/103	45
T stage		
T1-2	55/103	53
T3-4	48/103	47
Axillary nodal status		
Positive	74/103	72
Negative	29/103	28
Tumor grade		
III	48/103	47
I + II	55/103	53
Estrogen receptor status		
Negative	52/103	50
Positive	51/103	50
Chemotherapy		
Anthracycline	48/103	47
Trastuzumab + taxane	55/103	53
Response		
Pathological complete response	27/103	26
Non complete response	76/103	74

Foxp3 expression in breast cancer tumor cells

Of the 103 tumor specimens, 59 (57%) were found to express Foxp3 in tumor cells. Foxp3 staining was always localized in the cytoplasm of breast cancer cells (Fig. 1a, d), in contrast to the nuclear staining of Treg cells (Fig. 1d, e). Table 2 lists the frequency of prognostic clinicopathologic characteristics, according to the presence or the absence of Foxp3 immunostaining. No significant association was found between expression of Foxp3 in tumor cells and prognostic parameters (tumor size, estrogen receptor status, lymph node status, type of chemotherapy, histological response after neoadjuvant chemotherapy), except for tumor grade ($P = 0.046$). Frequency of Foxp3+ tumor cells was not significantly different between patients treated with or without trastuzumab ($P = 0.69$).

Prognostic significance of Foxp3 expression in breast cancer cells overexpressing HER2

Univariate analysis of clinical and pathological characteristics (Table 3) indicated that neither age > 50, tumor stage ≥ T3, axillary nodal involvement, high tumor grade, or negative estrogen receptor was associated with an increased risk of relapse (RFS) or death (OS). Only the presence of pathologic complete response on surgical specimen ($P = 0.01$; HR 0.31 95% CI 0.11–0.88 and $P = 0.038$; HR 0.53 95% CI 0.15–0.82 respectively), chemotherapy with trastuzumab ($P = 0.001$; HR 0.32 95% CI 0.15–0.69 and $P = 0.002$; HR 0.05 95% CI 0.006–0.35 respectively), and the presence of Foxp3+ tumor cells ($P = 0.007$; HR 0.40 95% CI 0.21–0.78 and $P = 0.040$; HR 0.46 95% CI 0.22–0.95 respectively) were significantly associated with lower risk of relapse (RFS) or death (OS). Presence of Foxp3+ tumor cells confers significantly better RFS (log-rank test $P = 0.005$) and OS (log-rank test $P = 0.03$) (Fig. 2a, b). Of note, the probability of 10-year survival was 73% for patients with Foxp3+ tumor cells, and only 42% in the Foxp3− tumor cells group. We then performed a subgroup analysis in anthracycline and trastuzumab group. In the anthracycline group, the the presence

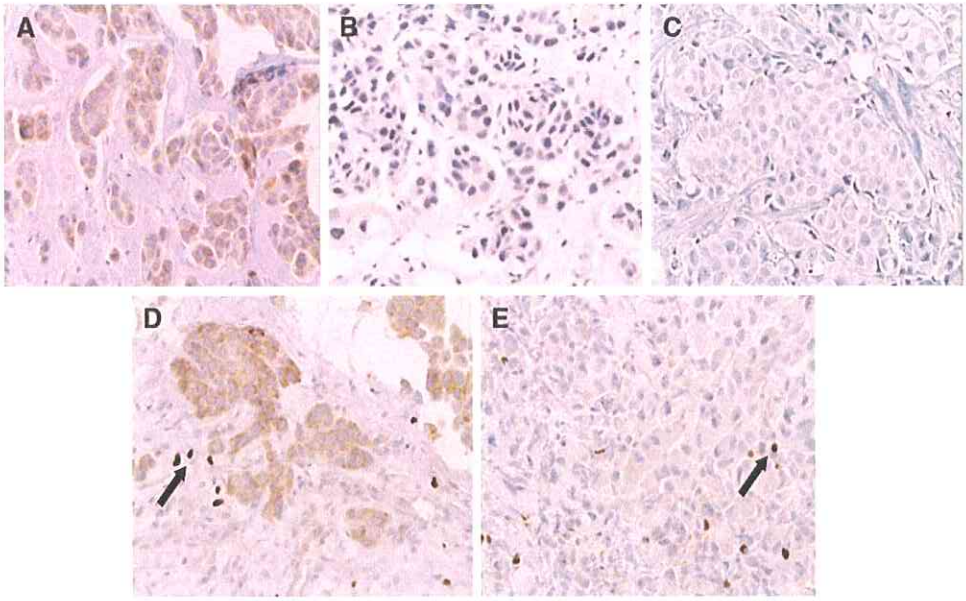


Fig. 1 Immunohistochemical Foxp3 staining of paraffin-embedded breast cancer overexpressing HER2. Representative results are shown for **a** Foxp3+ tumor cells (**b** the same tumor stained with isotype-matched control antibody), and **c** Foxp3− tumor cells. *Black arrows* indicate tumor infiltrating-Foxp3+ Treg cells with typical intense nuclear staining in **d** Foxp3+ tumor cells and **e** Foxp3− tumor cells. Magnification ×20

Table 2 Frequency of prognostic clinicopathological characteristics of the 103 patients according to the presence or the absence of Foxp3 cells

Characteristic	Presence of Foxp3+ cells		Absence of Foxp3+ cells		*P*
	No./total no.	%	No./total no.	%	
Age (years)					
<50	29/59	49	28/44	64	0.21
>50	30/59	51	16/44	36	
T stage					
T1-2	31/59	52	24/44	54	0.68
T3-4	28/59	48	20/44	46	
Axillary nodal status					
Positive	41/59	69	33/44	75	0.69
Negative	18/59	31	11/44	25	
Tumor grade					
I + II	26/59	44	29/44	66	0.046
III	33/59	56	15/44	34	
Estrogen receptor					
Positive	27/59	46	24/44	55	0.49
Negative	32/59	54	20/44	45	
Chemotherapy					
Anthracyclines	29/59	49	19/44	43	0.69
Trastuzumab + taxane	30/59	51	25/44	57	
Response					
Pathological complete response	20/59	34	7/44	16	0.07
Non complete response	39/59	66	37/44	84	

of Foxp3+ tumor cells was significantly associated with lower risk of RFS ($P = 0.0045$; HR 0.31 95% CI 0.14–0.69). In the trastuzumab group, the presence of Foxp3+ tumor cells was also associated with trend toward lower risk of RFS ($P = 0.11$; HR 0.32 95% CI 0.08–1.25). By interaction testing, there was evidence to confirm that the effect of Fopx3+ tumor cells did not differ in both treatment arms (anthracycline vs. trastuzumab) (interaction test = 0.6).

Cox proportional multivariate analysis using all the predictors with *P* values lower than 0.1 in the univariate analysis (Table 4) revealed that only the presence of Foxp3

Table 3 Univariate analysis (Cox regression) for relapse-free survival and overall survival in the 103 patients

Variable	RFS			OS		
	Hazard ratio	95% CI	*P*	Hazard ratio	95% CI	*P*
Age > 50						
No	1			1		
Yes	0.96	0.50–1.85	0.91	1.11	0.53–2.34	0.78
T stage ≥ T3						
No	1			1		
Yes	1.13	0.59–2.15	0.71	1.20	0.57–2.53	0.62
Axillary nodal involvement						
No	1			1		
Yes	1.26	0.71–2.22	0.43	2.14	0.74–6.20	0.13
Tumor grade III						
No	1			1		
Yes	0.99	0.52–1.90	0.99	1.12	0.53–2.36	0.76
Estrogen receptor						
No	1			1		
Yes	0.75	0.39–1.45	0.39	0.75	0.36–1.61	0.46
Pathological complete response						
No	1			1		
Yes	0.31	0.11–0.88	0.01	0.53	0.15–0.82	0.038
Chemotherapy with trastuzumab						
No	1			1		
Yes	0.32	0.15–0.69	0.001	0.05	0.006–0.35	0.002
Foxp3+ tumor cells						
No	1			1		
Yes	0.40	0.21–0.78	0.007	0.46	0.22–0.95	0.040

RFS relapse-free survival, *OS* overall survival

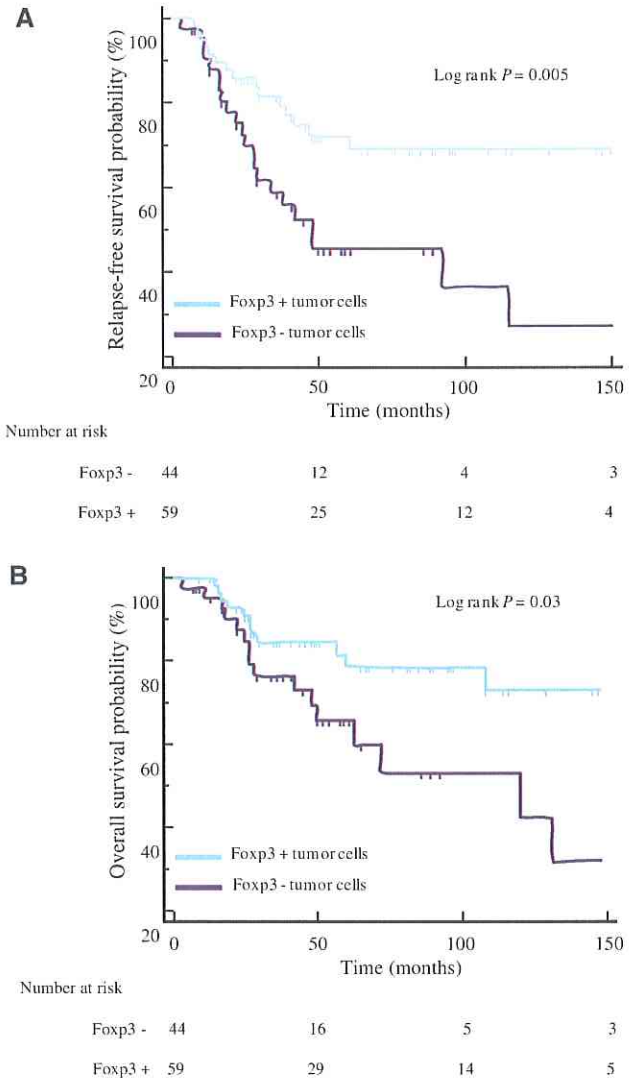


Fig. 2 The presence of Foxp3+ tumor cells in HER2-overexpressing breast cancer predicts better relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) in patients treated with neoadjuvant chemotherapy. Kaplan–Meier curves for **a** RFS, and **b** OS stratified according to the presence (Foxp3+) or the absence (Foxp3−) of Foxp3 expression in breast cancer cells. *P* values were calculated using the log-rank test

expression in tumor cells ($P = 0.006$; HR 0.39 95% CI 0.19–0.76 and $P = 0.03$; HR 0.42 95% CI 0.19–0.90 respectively), and chemotherapy with trastuzumab ($P = 0.002$; HR 0.30 95% CI 0.14–0.64 and $P = 0.002$; HR 0.04 95% CI 0.006–0.33 respectively) were significant independent prognostic factors for better RFS and OS.

Prognostic significance of Foxp3+ Treg cells infiltration in breast cancer overexpressing HER2

There was no significant correlation between the presence of Foxp3+ breast cancer cells and high tumor infiltrates in Foxp3+ Treg cells ($P = 0.1$; χ^2 test). Sixty-one percent of patients had high Foxp3+ Treg cell infiltrate (grade 2–3). By univariate analysis, high Foxp3+ Treg infiltration was not significantly associated with an increased risk of relapse (RFS) or death (OS), whatever treatment received (e.g., anthracyclines or trastuzumab-based chemotherapy) (Table 5).

Discussion

Foxp3 is a member of the forkhead family of transcription factors critically involved in the development and functions of Treg cells, and is, thus far, the most specific marker of this cell subtype [18]. Increased numbers of tumor-infiltrating Treg cells have been demonstrated in various types of cancer [5, 19, 20], and their presence in elevated numbers among T cells infiltrating tumors is associated with poor prognosis in breast [21] and ovarian cancer [5]. Until recently, Foxp3 expression was thought to occur mainly in Treg cells and some populations of activated T cells. However, recent studies have provided clear evidence that

Table 4 Multivariate analysis (Cox regression) for relapse-free survival and overall survival in the 103 patients

Variable	RFS			OS		
	Hazard ratio	95% CI	*P*	Hazard ratio	95% CI	*P*
Pathological complete response						
No	1			1		
Yes	0.47	0.16–1.35	0.16	0.53	0.15–1.82	0.32
Chemotherapy with trastuzumab						
No	1			1		
Yes	0.30	0.14–0.64	0.002	0.04	0.006–0.33	0.002
Foxp3+ tumor cells						
No	1			1		
Yes	0.39	0.19–0.76	0.006	0.42	0.19–0.90	0.03

RFS relapse-free survival, *OS* overall survival

various types of human cancer cells expressed the transcript of Foxp3, as well as the mature protein [10, 22, 23].

Merlo et al. [11] recently reported that Foxp3 was expressed in 57% of 183 patients bearing a localized breast cancer; a rate similar to that found in our study. Interestingly, the authors identified tumor cell Foxp3 expression as a new independent factor of poor prognosis for relapse-free and overall survival. However, the potential function of Foxp3 in tumor cells and the mechanism by which Foxp3 expression in breast cancer cells could affect prognosis remain unclear. In apparent contradiction with Merlo's data, Zuo et al. [12, 13] recently reported that Foxp3 acts as a transcriptional repressor for the breast cancer oncogenes *SKP2* and *HER2*, suppressing breast tumor cell growth. Moreover, induction of Foxp3 expression in breast cancer cell lines could induce apoptosis and abrogate tumor growth in murine models [12, 13, 24]. These biological data suggested that the function of Foxp3 in cancer cells may depend on the nature of the breast tumor, especially concerning oncogenic pathways involved in tumor growth. Interestingly, in our series of HER2-overexpressing breast patients, Foxp3 expression in breast cancer cells was associated with better long-term prognosis and constituted an independent prognostic factor for better relapse-free and overall survival.

These contradictory results with Merlo's study are probably explained by differences in the studied populations. First, we limited our study to patients with HER2-overexpressing breast cancer. In Merlo's study, only 15% of the patients harboured HER2-overexpressing carcinomas. Moreover, no prognostic stratification upon breast cancer histological subtypes was performed. Another important difference with our study is that all our patients received neoadjuvant chemotherapy before surgical resection, and then radiotherapy, whereas only a limited number of patients reported by Merlo et al. received postsurgical chemotherapy.

A nuclear localization of Foxp3 is observed in Treg but also in the epithelial cells of mouse [25] and human [13] normal mammary glands. Our study reveals that, in HER2-overexpressing breast cancer cells, Foxp3 staining was only observed in the cytoplasm. These results are in accordance with those from Zuo et al., who demonstrated that Foxp3 could be expressed in the nucleus of normal or tumoral epithelial breast cells. Importantly this nuclear expression seemed to be restricted to HER negative tumors. However, Foxp3 cytoplasmic expression was not tested in this study [13]. In a recent article about Foxp3 expression in prostate cancer cells [26], the same team of investigators demonstrated that genetic Foxp3 mutation could be detected in cancer cells and restrained its expression in the cytoplasm as in our series of HER overexpressing patients. Nonetheless, the prognostic role of the cytoplasmic expression of Foxp3 was not tested in this study. A cytoplasmic localization of Foxp3 was observed in cancer cells from various human carcinomas [10, 22], including human breast carcinoma. Cytoplasmic rather than nuclear localization of Foxp3 could result from somatic mutations. Foxp3 molecule contains a winged-helix/forkhead (FKH) domain that includes a putative nuclear localization signal.

Table 5 Univariate analysis (Cox regression) for relapse-free survival and overall survival in the 103 patients according to the presence or the absence of high Foxp3+ Treg cells tumor infiltration

	High Treg infiltration	RFS			OS		
		Hazard ratio	95% CI	*P*	Hazard ratio	95% CI	*P*
Whole population	No	1			1		
	Yes	0.86	0.41–1.63	0.56	1.27	0.57–2.80	0.55
Chemotherapy with trastuzumab	No	1			1		
	Yes	0.38	0.08–1.68	0.20	ND	ND	
Chemotherapy with anthracyclines	No	1			1		
	Yes	1.28	0.58–2.80	0.54	1.52	0.68–3.36	0.31

RFS relapse-free survival, *OS* overall survival, *ND* not determinable

Mutations of this domain can be observed in the *Scurfy* mouse and in the corresponding human IPEX syndrome, leading to a Foxp3 localization restricted to the cytoplasm [27]. Similar mutations were observed in human breast carcinoma [13] and, as well as other transcriptional or post-transcriptional modifications, could induce its cytoplasmic rather than nuclear localisation in cancer cells. However, the exact biological function of cytoplasmic Foxp3 is presently undetermined, but our data suggest that, even in this cellular localization, Foxp3 seems to influence HER2 overexpressing breast cancer natural history. As we adhere to the REMARK criteria for tumor marker studies [28], we analyzed our data according to systemic therapy groups. Interestingly, in subgroup analysis, the role of Foxp3 was found significant in the anthracycline group and with a trend toward significance in the trastuzumab group in univariate Cox proportional analysis. The absence of significance was probably due to the few rate of event in this group. Importantly, the multivariate analysis and the interaction testing found that the effect of Foxp3 cell on RFS is independent of the treatment. In sum, these data suggest that the prognostic relevance of tumor cell Foxp3 expression in HER2-overexpressing breast carcinoma is probably not influenced by modulation of the HER2 pathway induced by trastuzumab. However, we think that additional studies have to be performed to validate this result. Some articles demonstrated that Treg infiltrates in tumor bed may have a poor prognostic significance in early breast cancer [21, 29], but in the both series, this prognostic role of Foxp3 Treg was not tested in HER2 overexpressing tumors. In this series of HER2 overexpressing breast carcinoma, Foxp3 expression in cancer cells is relevant for patient's prognostic while the presence of Foxp3+ Treg in tumor bed have no prognostic behavior. In addition, these two informations are not stastistically correlated. These data strongly enforce our results, and suggest that Foxp3 expression is a really new and independent prognostic factor in HER2 overexpressing early breast cancer.

In conclusion, Foxp3 expression and function can no longer be considered to be restricted to the T-cell lineage, but may instead play a wider role in breast cancer cell biology. Our results suggest that Foxp3 expression in Treg and in tumor cells could have opposite prognostic values, at least in certain breast cancer varieties. This is a strong argument against using biomolecular methods such as mRNA expression by real-time polymerase chain reaction instead of immunohistochemistry for determining tumor infiltration by Foxp3+ regulatory T cells. However, determination of Foxp3 expression consequences both in Treg and cancer cells will require further elucidation, especially in the context of new therapeutic strategies targeting Treg cells, and particularly Foxp3 expression [30].

Taken together, our data suggest that Foxp3 expression in breast cancer cells could be a prognostic marker for patient outcome. However, our results also indicate that the influence of Foxp3 was dependent on the molecular subtype of breast cancer. Indeed, Foxp3 expression in cancer cells may be a marker of good prognosis in HER2-over-expressing tumors and of poor prognosis in other molecular subtypes of breast cancer. The issue of whether Foxp3 might become a clinically usable prognostic marker in breast carcinoma will need to be evaluated in other larger series of patients, and analysis will have to be stratified on breast molecular subtype, notably on HER2-overexpressing subtype.

Acknowledgments This study was supported by Ligue contre le Cancer comité de Côte d'Or, Association pour la Recherche Contre le Cancer (ARC), Fondation de France INSERM AVENIR program and GERTI (Groupe d'Etude et de Recherche en Thérapeutique Innovante). Gregoire Mignot was supported by ARC (Association pour la Recherche contre le Cancer), and Julie Vincent by INCa (Institut National du Cancer).

References

1. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. Science 299:1057–1061
2. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nat Immunol 4:330–336
3. Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R et al (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunol Rev 212:8–27
4. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE et al (2007) Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+ CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. Cancer Immunol Immunother 56:641–648
5. Curiel TJ, Coukos G, Zou L et al (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nat Med 10:942–949
6. Ko HJ, Kim YJ, Kim YS et al (2007) A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. Cancer Res 67:7477–7486
7. Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G (2001) Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J Exp Med 193:1303–1310
8. Ghiringhelli F, Menard C, Martin F, Zitvogel L (2006) The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. Immunol Rev 214:229–238
9. Roux S, Apetoh L, Chalmin F et al (2008) CD4+CD25+ tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. J Clin Investig 118:3751–3761
10. Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M et al (2008) Foxp3 expression in human cancer cells. J Transl Med 6:19
11. Merlo A, Casalini P, Carcangiu ML et al (2009) FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. J Clin Oncol 27:1746–1752

12. Zuo T, Liu R, Zhang H et al (2007) FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2. J Clin Investig 117:3765–3773
13. Zuo T, Wang L, Morrison C et al (2007) FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. Cell 129:1275–1286
14. Elston CW, Ellis IO (1991) Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. Histopathology 19:403–410
15. Chevallier B, Roche H, Olivier JP, Chollet P, Hurteloup P (1993) Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. Am J Clin Oncol 16:223–228
16. Black MM, Opler SR, Speer FD (1956) Structural representations of tumor-host relationships in gastric carcinoma. Surg Gynecol Obstet 102:599–603
17. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L et al (2008) Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. Clin Cancer Res 14:2413–2420
18. Coffer PJ, Burgering BM (2004) Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system. Nat Rev Immunol 4:889–899
19. Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF, Korangy F (2005) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. Cancer Res 65:2457–2464
20. Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H, Fujii H (2003) Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. Clin Cancer Res 9:4404–4408
21. Bates GJ, Fox SB, Han C et al (2006) Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. J Clin Oncol 24:5373–5380
22. Hinz S, Pagerols-Raluy L, Oberg HH et al (2007) Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. Cancer Res 67:8344–8350
23. Ebert LM, Tan BS, Browning J et al (2008) The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. Cancer Res 68:3001–3009
24. Liu Y, Wang Y, Li W, Zheng P (2009) Activating transcription factor 2 and c-Jun-mediated induction of FoxP3 for experimental therapy of mammary tumor in the mouse. Cancer Res 69:5954–5960
25. Chen GY, Chen C, Wang L, Chang X, Zheng P, Liu Y (2008) Cutting edge: broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. J Immunol 180:5163–5166
26. Wang L, Liu R, Li W et al (2009) Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. Cancer Cell 16:336–346
27. Lopes JE, Torgerson TR, Schubert LA et al (2006) Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. J Immunol 177:3133–3142
28. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM (2005) Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. J Clin Oncol 23:9067–9072
29. Gobert M, Treilleux I, Bendriss-Vermare N et al (2009) Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer Res 69:2000–2009
30. Nair S, Boczkowski D, Fassnacht M, Pisetsky D, Gilboa E (2007) Vaccination against the forkhead family transcription factor Foxp3 enhances tumor immunity. Cancer Res 67:371–380

3. Synthèse - Discussion :

Si la signification de la présence de Foxp3, et ses fonctions biologiques dans les cellules tumorales commencent petit à petit à être mises en lumière, son rôle pronostic éventuel dans cette localisation n'a en revanche quasiment jamais été étudié. Pourtant son expression différentielle entre cellules normales et cellules tumorales dans plusieurs modèles, associé à la mise en lumière récente de ses fonctions anti-oncogéniques notamment dans le cancer du sein(Zuo et al., 2007a) (Zuo et al., 2007b) en font potentiellement un biomarqueur à la fois de la transformation maligne, mais aussi pronostic en fonction de son niveau d'expression.

Dans ce travail, nous montrons donc que l'expression de Foxp3, étudiée en immunohistochimie, dans les cellules tumorales de cancers du sein surexprimant HER2 constitue un facteur pronostic potentiel concernant la survie sans récidive et même la survie globale de patientes traitées par chimiothérapie première pour une tumeur localisée. Cette étude a été menée sur notre série de patientes traitées par chimiothérapie néoadjuvante comportant ou non du trastuzumab. Nous avons analysé dans ce travail l'expression de Foxp3 dans les cellules tumorales sur la biopsie tumorale initiale, avant mise en route de la chimiothérapie, et montré ainsi que 57% des tumeurs présentaient un marquage Foxp3. L'analyse histologique révèle que cette expression est essentiellement cytoplasmique, comme elle a pu être décrite précédemment dans les cellules de cancers du sein (Merlo et al., 2009), de la prostate (Wang et al., 2009) ou du pancréas (Hinz et al., 2007), et que cette expression, lorsqu'elle existe, est faible, particulièrement en comparaison avec ce qui est observée en immunohistochimie pour les infiltrats en Tregs (cf figure 1). Ce faible marquage était déjà préalablement signalé par Wang et al. dans le cancer de prostate, avec le même anticorps que celui utilisé notre étude, et corrobore indirectement les résultats de Zuo (Zuo et al., 2007b) obtenus dans le cancer du sein,

montrant une relation inverse entre le niveau d'expression de Foxp3 et celui d'HER2. Notre étude s'adressant exclusivement à des tumeurs surexprimant HER2 (en immunohistochimie), il est ainsi logique d'observer une faible expression de Foxp3 dans les cellules tumorales. Néanmoins, la coexpression de Foxp3 et d'HER2 est donc possible, comme cela avait d'ailleurs déjà été démontré dans le travail de Zuo : parmi les tumeurs humaines HER2+++ étudiées, il existait une relation inverse entre le niveau d'amplification du gène HER2 et le pourcentage de tumeurs Foxp3+, mais même en cas de très forte amplification d'HER2, certaines tumeurs pouvaient rester Foxp3+ en immunohistochimie.

Concernant l'association entre les facteurs pronostics classiques du cancer du sein, et la présence de cellules tumorales Foxp3+, seule l'association avec un grade tumoral élevé était significative (56% des tumeurs Foxp3+ versus 34% des tumeurs Foxp3- ; cf table 2).

Outre le rationnel biologique sous jacent à l'hypothèse d'un meilleur pronostic pour les tumeurs Foxp3+ (répression plus forte de différents proto-oncogènes), il faut noter dans notre série que le taux de réponse complète histologique après chimiothérapie est doublé pour les tumeurs Foxp3+ par rapport aux tumeurs Foxp3- (34% versus 16%, cf table 2), pouvant laisser supposer à l'existence d'une chimiosensibilité accrue en cas de persistance de l'expression de Foxp3, pouvant donc potentiellement expliquer le bénéfice en survie observé dans notre étude. Des données personnelles non publiées, montrent que *in vitro*, la lignée leucémique Jurkat transfectée stablement avec Foxp3 est plus sensible à un traitement par la doxorubicine (mais pas par le paclitaxel), par rapport à la lignée sauvage qui n'exprime pas Foxp3 (Ladoire, données personnelles Appendice 2).

Il existe donc un rationnel biologique relativement fort susceptible d'expliquer les résultats que nous observons sur notre cohorte. Cependant, nos résultats s'opposent à ceux publiés quelques mois auparavant par l'équipe de Milan, et faisant état d'un meilleur

pronostic à long terme des patientes présentant une tumeur Foxp3-, par rapport à celles présentant une tumeur positive en immunohistochimie (Merlo et al., 2009). Cette étude, conduite sur 2 cohortes de 183 et 214 patientes italiennes comporte plusieurs différences importantes avec la notre :

1) Une faible proportion de patientes (moins de 20%) de la série italienne avait reçu une chimiothérapie, pouvant donc contribuer à « gommer » un éventuel effet favorable de l'expression de Foxp3 sur la chimiosensibilité.
2) Une faible proportion de patientes (15%) avait une tumeur surexprimant HER2, laissant entrevoir la possibilité d'un effet opposé de Foxp3 dans les différents sous types moléculaires de cancers du sein.

Concernant ce dernier point toutefois, il faut signaler que les travaux de Zuo dans plusieurs modèles précliniques de cancers du sein montrent un effet répresseur de Foxp3 sur le niveau d'expression de HER2, et sur la croissance tumorale y compris sur des lignées ne surexprimant pas HER2 (Zuo et al., 2007b). L'étude par une approche de microarray de l'expression génique de ces lignées transfectées ou non avec le cDNA de Foxp3 sauvage montre que de nombreux autres oncogènes impliqués dans la cancérogénèse mammaire (dont SKP2) sont susceptibles d'être downrégulé par Foxp3 (Zuo et al., 2007b).

Nos résultats sont donc en faveur d'un rôle pronostic favorable concernant l'expression de Foxp3 dans les cellules tumorales, au moins pour les cancers du sein HER2+++, et ce, indépendamment du traitement reçu (trastuzumab ou non), suggérant que ce rôle pronostic est indépendant de la modulation pharmacologique du récepteur HER2. Il est intéressant de signaler que cet effet pronostic sur la survie sans récidive et la survie globale, s'observe à partir du prélèvement tumoral initial, réalisé avant chimiothérapie. Dans cette situation,

le niveau d'infiltration tumorale par des lymphocytes T régulateurs Foxp3+, tel que nous l'évaluons de façon semi-quantitative n'est pas informatif sur le pronostic des patients. Il ne l'est que sur la pièce opératoire, après modulation par la chimiothérapie néo-adjuvante.

Il n'est donc pas impossible que Foxp3 ait un rôle pronostic double dans le contexte des cancers du sein traités par chimiothérapie néoadjuvante :

Au niveau des cellules tumorales elles-mêmes, l'expression de Foxp3 pourrait constituer un facteur de bon pronostic, alors que après réalisation de la chimiothérapie, la persistance d'une forte infiltration en cellules T régulatrices Foxp3+ pourrait s'opposer à l'activité d'une réponse immunitaire antitumorale efficace, et donc constituer un facteur de mauvais pronostic comme 2 de nos études semblent le montrer. Cette dualité pronostique en fonction de la localisation cellulaire incite à considérer avec beaucoup de prudence les études évaluant le pronostic de Foxp3 par une quantification globale (cellules tumorales et microenvironnement) des ARN messagers de Foxp3 sur la tumeur.

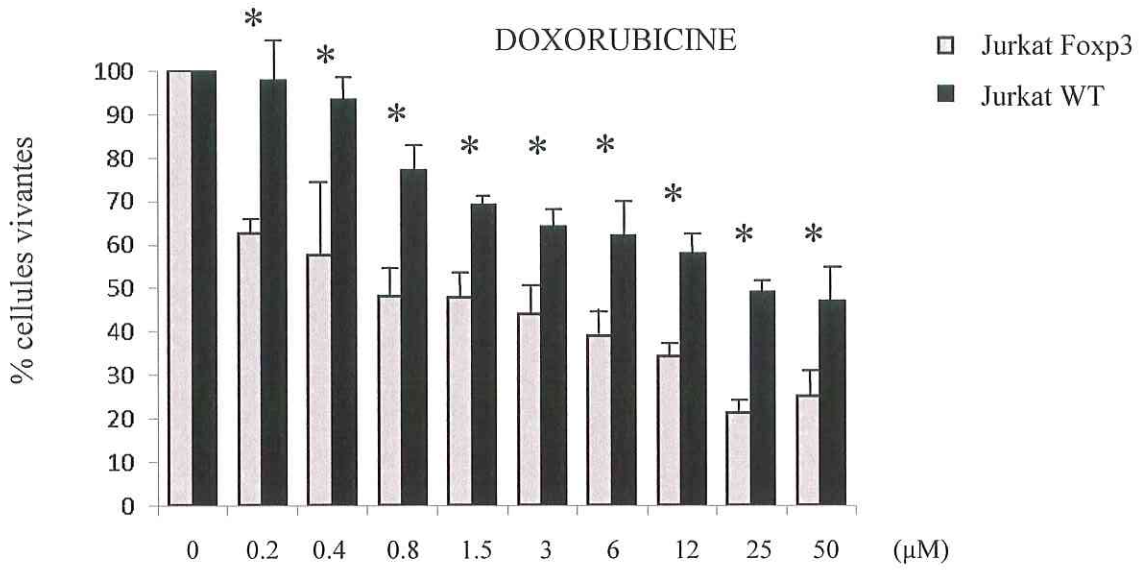
D'autre part, ces résultats pourraient impliquer que le ciblage pharmacologique de Foxp3 ne doive pas se restreindre à la cible lymphocytaire, mais aussi potentiellement à Foxp3 intra tumoral. C'est ainsi que dans des modèles précliniques de cancers du sein, la réactivation de l'expression de Foxp3 dans les cellules tumorales est possible par divers agents pharmacologiques comme l'anisomycine (Liu et al., 2009). La réactivation de l'expression de Foxp3 après traitement par anisomycine se traduit in vitro par l'induction de l'apoptose de lignées cancéreuses mammaires humaines et murines, et in vivo par un ralentissement de la croissance tumorale chez les animaux porteurs de tumeurs (Liu et al., 2009).

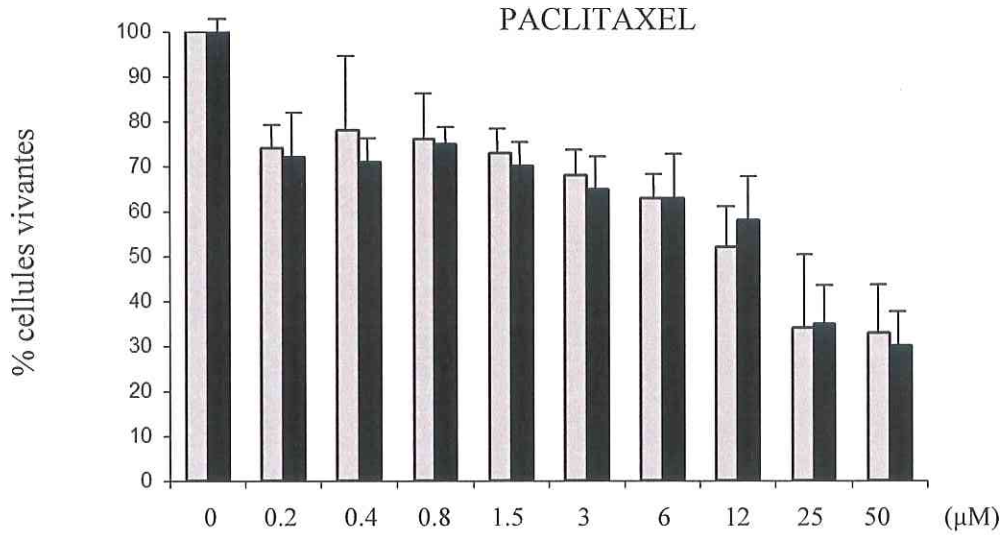
4. Appendice 2 :

Appendice 2:

Evaluation de la cytotoxicité de la doxorubicine et du paclitaxel sur la lignée cellulaire Jurkat transfectée ou non avec Foxp3 (PMS-MTS; traitement 1h, N=5)

(* P <0.05)





Conclusion – Perspectives

En 2000, Hanahan et Weinberg proposaient 6 caractéristiques biologiques majeures déterminant les propriétés des cellules cancéreuses (potentiel de réplication illimité, possibilité d'invasion tissulaire, indépendance vis-à-vis des signaux anti-prolifératifs, capacité à auto-générer des signaux de prolifération, résistance à l'apoptose, stimulation de la néoangiogénèse tumorale) (Hanahan & Weinberg, 2000). Cette vision centrée sur la cellule tumorale parait cependant réductrice, et à l'évidence une tumeur maligne ne semble pouvoir se développer qu'à la condition de subvertir le système immunitaire pour échapper à la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi, comme le proposent Schreiber et Dunn, l'échappement des cellules tumorale au processus d'immunosurveillance doit être considéré comme la 7iéme caractéristiques majeure nécessaire au processus de développement tumoral (Dunn et al., 2004b) (Smyth et al., 2006). Les mécanismes par lesquels la tumeur parvient à médier une immunosubvertion sont donc multiples et font intervenir la plupart des cellules du système immunitaire, au sein desquelles, les cellules immunorégulatrices telles les MDSCs ou les lymphocytes T régulateurs semblent jouer un rôle prépondérant.

Au cours de ce travail de thèse, nous avons donc cherché à mieux comprendre les rôles fonctionnels et pronostics des cellules myéloïdes suppressives et des lymphocytes T régulateurs dans le cancer, avec une attention plus particulière sur la façon dont ces cellules pouvaient être modulées par la chimiothérapie.

C'est ainsi que nos études immunohistochimiques sur les infiltrats immunologiques au sein des tumeurs mammaires, menées sur plusieurs séries de tumeurs humaines, semblent démontrer que la chimiothérapie néoadjuvante s'accompagne de modifications qualitatives de l'infiltration tumorale à la fois en lymphocytes T CD8+ et en lymphocytes T régulateurs Foxp3+. L'existence, après chimiothérapie néoadjuvante, d'une balance favorable de la

réponse immunitaire, associant forte infiltration en CD8+ et faible infiltration en Foxp3+ s'accompagne d'une augmentation significative des marqueurs de cytotoxicité à médiation cellulaire, et est significativement corrélée à une éradication complète des cellules tumorales. Cette signature immunologique favorable se traduit également à long terme par une meilleure survie sans récidive et une meilleure survie globale, indépendamment du type de chimiothérapie reçue, de l'obtention ou non d'une réponse complète histologique, et du sous type moléculaire de cancer du sein. La combinaison de cette information immunologique avec la connaissance de la taille du résidu tumoral après traitement permet de considérablement affiner le pronostic des patientes, en faisant notamment ressortir un sous groupe de patientes avec une survie globale à long terme de 100%. Le ratio CD8/Foxp3 est simple à recueillir, peu couteux, assez reproductible, et pourrait donc constituer s'il était validé sur une nouvelle série indépendante de plus grande taille, s'imposer comme un nouveau facteur pronostic des cancers du sein traités par chimiothérapie néo-adjuvante. Nous avons ainsi entamé des collaborations en France et à l'étranger pour recueillir le matériel biologique tumoral de séries indépendantes de patientes traitées par chimiothérapie néo-adjuvante pour une tumeur surexprimant ou non HER2.

Afin de définir si le phénomène observé in vivo dans les tumeurs humaines est véritablement en rapport avec l'administration de chimiothérapie, nous sommes en train de mettre en place des modèles précliniques murins de cancers du sein afin d'étudier au sein des tumeurs les modifications des infiltrats immunologiques lors des traitements par anthracyclines, taxanes, cyclophosphamide, 5-FU. Nous étudierons plus particulièrement en RT-PCR et en cytométrie de flux, les effets de ces médicaments sur la présence de MDSCs, de lymphocytes T régulateurs, et des autres populations T, ainsi que sur l'orientation de la réponse T au sein de la tumeur (Th1, Th2 ou Th17). Nous souhaiterions parallèlement chez les patientes en cours de chimiothérapie pour le traitement d'un cancer du sein localisé ou métastatique, suivre

l'évolution dans le sang des mêmes populations lymphocytaires et corréler celle-ci au stade de la maladie, au type de traitement et à la réponse au traitement.

Par ailleurs, si nos travaux dans le cancer du sein sont en faveur d'un rôle pronostic de la réponse immunitaire après chimiothérapie, la question du rôle pronostic de la réponse immunitaire latente, présente au niveau de la tumeur avant son traitement, reste posée. En effet, dans nos deux études, les infiltrats initiaux en CD8+ et Foxp3+, de même que le ratio, n'ont apparemment pas de rôle pronostic significatif ni sur l'obtention d'une réponse complète histologique, ni sur la survie à long terme. Ces constatations faites en situation néoadjuvante s'opposent à des données existant dans la littérature, et montrant un impact pronostic potentiel à la fois pour les Tregs et les CD8+ dans d'autres variétés de cancers (Curiel et al., 2004) (Gao et al., 2007) et même dans le cancer du sein (Bates et al., 2006) (Gobert et al., 2009). Afin de vérifier si la signature immunologique que nous avons identifiée en situation néoadjuvante à la fin de la chimiothérapie, comme particulièrement intéressante pour définir le pronostic des patientes présente également un intérêt, plus précocement, avant tout traitement, pour des tumeurs plus petites traitées en situation adjuvante, nous avons initié grâce à l'aide du groupe de recherche translationnelle de la Fédération des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC), une étude immunohistochimique à large échelle des infiltrats tumoraux initiaux en T CD8+ et Foxp3+ des 1200 patientes randomisées dans l'essai thérapeutique de phase III PACS01 (évaluant l'introduction des taxanes en plus des anthracyclines dans la chimiothérapie adjuvantes des cancers du sein). Cette étude nous permettra par ailleurs sur une grande série d'analyser avec plus d'assurance le rôle pronostic éventuel de l'expression de Foxp3 dans les cellules tumorales, puisque nous avons démontré (de façon contradictoire avec les résultats d'une équipe italienne) un rôle pronostic favorable de ce paramètre sur la survie des patientes. Le recours à une cohorte importante et homogène

de patientes devrait permettre d'apporter des éléments plus solides pour mieux définir le véritable rôle pronostic de Foxp3 intratumoral dans le cancer du sein.

Concernant les MDSCs, nos travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires présidant à leur accumulation d'une part, et d'autre part à l'acquisition de leur propriétés immunosuppressives, à travers une voie de signalisation impliquant les exosomes d'origine tumorale. Cette découverte, et la propriété de l'amiloride de diminuer la production d'exosomes, y compris par les cellules tumorales, offrent une nouvelle possibilité de ciblage pharmacologique des MDSC, à l'aide d'une molécule d'usage courant chez l'homme. Nous avons ainsi pu vérifier in vivo chez l'animal et chez des patients traités, les mêmes effets biologiques sur la diminution de la quantité d'exosomes, et sur la diminution parallèle de la phosphorylation de STAT3 dans les MDSCs. Chez l'animal, l'amiloride améliore significativement les effets antitumoraux d'une chimiothérapie immunogène ou d'une immunothérapie. Par ailleurs, l'étude des effets cytotoxiques sur les MDSCs d'une large gamme de molécules de chimiothérapie nous a permis de montrer que le 5-fluorouracile, probablement en raison d'un faible niveau d'expression de sa cible, la thymidilate synthase, dans les MDSCs, possédait une capacité sélective à éliminer ces cellules. In vivo, cette propriété se traduit par l'observation d'une amélioration de la réponse immunitaire contre la tumeur. Cette l'immunogénicité du 5-FU est dépendante des lymphocytes T mais indépendante de l'expression de la calréticuline et du Toll-like récepteur 4, ce qui suggère qu'elle est bien principalement attribuable à son action sur les MDSC et non sur les cellules tumorales. Lors de l'analyse préliminaire de l'action du 5-FU sur les MDSC, nous avons eu la surprise d'observer au cours de la mort cellulaire des MDSC le clivage de la caspase-1 qui entraîne alors la libération d'IL-1β par ces cellules. Comme cette cytokine a été impliquée dans la polarisation des cellules Th17 *in vivo*, nous avons recherché la présence de Th17 au

niveau du site tumoral. Nos données préliminaires indiquent en effet que des cellules Th17 sont bien générées au niveau du site tumoral après traitement par du 5-FU. Il a été démontré que la sécrétion d'Interleukine17 (IL-17) par ces lymphocytes T pouvait favoriser la progression tumorale non seulement de manière directe mais aussi de manière indirecte en augmentant la sécrétion de médiateurs pro-angiogeniques (Murugaiyan & Saha, 2009). Ceci suggère que malgré son action sélective sur les MDSC, la génération de Th17 intratumoraux pourrait représenter un mécanisme immunologique limitant potentiellement l'efficacité antitumorale du 5-FU. C'est ainsi que des travaux préliminaires chez l'animal semble montrer que les effets antitumoraux du 5-FU sont potentialisés par le cotraitement avec un antagoniste de l'IL-1β utilisable chez l'homme en thérapeutique (Anakinra®).

Nos travaux sur les MDSCs vont donc s'orienter sur la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de leur mort induite par le 5-FU, afin de mieux comprendre les fonctions immunomodulatrices potentielles de cette molécule, et de mettre en évidence de nouvelles cibles moléculaires comme l'IL-1 et/ou l'IL-17, pouvant être modulées pour optimiser la réponse anti-cancéreuse.

Enfin, dans une stratégie d'immunothérapie anti-tumorale visant à briser l'état d'immunosuppression présent chez les sujets porteurs de cancer, une approche thérapeutique combinant élimination des Tregs (par le cyclophosphamide), élimination et inhibition des MDSCs (par le 5-FU et l'amiloride), plus ou moins associées à une potentialisation de ces effets par l'antagonisation de l'IL-1β et/ou la majoration de la présentation antigénique (par la chloroquine par exemple (Apetoh et al., 2007a), nous testerons ces différentes combinaisons thérapeutiques chez l'animal avant administration d'une chimiothérapie immunogène, par exemple par les anthracyclines.

Les cancérologues ne doivent donc pas centrer tous leurs efforts de recherche et de thérapeutique sur la seule cellule tumorale, mais doivent bien être convaincus de l'importance pronostique et fonctionnelle de la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans l'optique d'une approche thérapeutique individualisée, une connaissance très précise de la biologie de la cellule cancéreuse, mais aussi de la qualité de la réponse immunitaire anti-tumorale, et des éventuelles influences sur elle des modalités thérapeutiques utilisées (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie) nous semble indispensable, après avoir mené ces travaux de recherche.

Références bibliographiques

Abusamra, A.J., Zhong, Z., Zheng, X., Li, M., Ichim, T.E., Chin, J.L. & Min, W.P. (2005). Tumor exosomes expressing Fas ligand mediate CD8+ T-cell apoptosis. *Blood Cells Mol Dis*, **35,** 169-73.

Akasaki, Y., Liu, G., Chung, N.H., Ehtesham, M., Black, K.L. & Yu, J.S. (2004). Induction of a CD4+ T regulatory type 1 response by cyclooxygenase-2-overexpressing glioma. *J Immunol*, **173,** 4352-9.

Albers, A.E., Ferris, R.L., Kim, G.G., Chikamatsu, K., DeLeo, A.B. & Whiteside, T.L. (2005). Immune responses to p53 in patients with cancer: enrichment in tetramer+ p53 peptide-specific T cells and regulatory T cells at tumor sites. *Cancer Immunol Immunother*, **54,** 1072-81.

Allan, S.E., Song-Zhao, G.X., Abraham, T., McMurchy, A.N. & Levings, M.K. (2008). Inducible reprogramming of human T cells into Treg cells by a conditionally active form of FOXP3. *Eur J Immunol*, **38,** 3282-9.

Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.P. & Gabrilovich, D.I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*, **166,** 678-89.

Anderson, P. (1995). TIA-1: structural and functional studies on a new class of cytolytic effector molecule. *Curr Top Microbiol Immunol*, **198,** 131-43.

Andre, F., Schartz, N.E., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., Tursz, T., Amigorena, S., Raposo, G., Angevin, E. & Zitvogel, L. (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, **360,** 295-305.

Aneja, R., Odoms, K., Dunsmore, K., Shanley, T.P. & Wong, H.R. (2006). Extracellular heat shock protein-70 induces endotoxin tolerance in THP-1 cells. *J Immunol*, **177,** 7184-92.

Antonia, S.J., Mirza, N., Fricke, I., Chiappori, A., Thompson, P., Williams, N., Bepler, G., Simon, G., Janssen, W., Lee, J.H., Menander, K., Chada, S. & Gabrilovich, D.I. (2006). Combination of p53 cancer vaccine with chemotherapy in patients with extensive stage small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, **12,** 878-87.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Criollo, A., Ortiz, C., Lidereau, R., Mariette, C., Chaput, N., Mira, J.P., Delaloge, S., Andre, F., Tursz, T., Kroemer, G. & Zitvogel, L. (2007a). The interaction between HMGB1 and TLR4 dictates the outcome of anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Immunol Rev*, **220,** 47-59.

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

Arnould, L., Gelly, M., Penault-Llorca, F., Benoit, L., Bonnetain, F., Migeon, C., Cabaret, V., Fermeaux, V., Bertheau, P., Garnier, J., Jeannin, J.F. & Coudert, B. (2006). Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer*, **94,** 259-67.

Ashley, C.W. & Baecher-Allan, C. (2009). Cutting Edge: Responder T cells regulate human DR+ effector regulatory T cell activity via granzyme B. *J Immunol*, **183,** 4843-7.

Asseman, C., Read, S. & Powrie, F. (2003). Colitogenic Th1 cells are present in the antigen-experienced T cell pool in normal mice: control by CD4+ regulatory T cells and IL-10. *J Immunol*, **171,** 971-8.

Atkins, D., Breuckmann, A., Schmahl, G.E., Binner, P., Ferrone, S., Krummenauer, F., Storkel, S. & Seliger, B. (2004). MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer*, **109,** 265-73.

Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T. & Hirai, H. (2003). Human CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress NKT cell functions. *Cancer Res*, **63,** 4516-20.

Baecher-Allan, C., Brown, J.A., Freeman, G.J. & Hafler, D.A. (2001). CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, **167,** 1245-53.

Balkwill, F. & Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, **357,** 539-45.

Baniyash, M. (2004). TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response. *Nat Rev Immunol*, **4,** 675-87.

Baron, J.A. & Sandler, R.S. (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cancer prevention. *Annu Rev Med*, **51,** 511-23.

Bates, G.J., Fox, S.B., Han, C., Leek, R.D., Garcia, J.F., Harris, A.L. & Banham, A.H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J Clin Oncol*, **24,** 5373-80.

Baxevanis, C.N., Dedoussis, G.V., Papadopoulos, N.G., Missitzis, I., Stathopoulos, G.P. & Papamichail, M. (1994). Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer*, **74,** 1275-82.

Bayer, A.L., Yu, A., Adeegbe, D. & Malek, T.R. (2005). Essential role for interleukin-2 for CD4(+)CD25(+) T regulatory cell development during the neonatal period. *J Exp Med*, **201,** 769-77.

Beckhove, P., Feuerer, M., Dolenc, M., Schuetz, F., Choi, C., Sommerfeldt, N., Schwendemann, J., Ehlert, K., Altevogt, P., Bastert, G., Schirrmacher, V. & Umansky, V. (2004). Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest*, **114,** 67-76.

Bell, D., Chomarat, P., Broyles, D., Netto, G., Harb, G.M., Lebecque, S., Valladeau, J., Davoust, J., Palucka, K.A. & Banchereau, J. (1999). In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. *J Exp Med*, **190,** 1417-26.

Bennett, C.L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M.E., Ferguson, P.J., Whitesell, L., Kelly, T.E., Saulsbury, F.T., Chance, P.F. & Ochs, H.D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*, **27,** 20-1.

Bentz, B.G., Haines, G.K., 3rd & Radosevich, J.A. (2000). Increased protein nitrosylation in head and neck squamous cell carcinogenesis. *Head Neck*, **22,** 64-70.

Bergmann, C., Strauss, L., Zeidler, R., Lang, S. & Whiteside, T.L. (2007). Expansion of human T regulatory type 1 cells in the microenvironment of cyclooxygenase 2 overexpressing head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, **67,** 8865-73.

Bettelli, E., Dastrange, M. & Oukka, M. (2005). Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102,** 5138-43.

Bibeau, F., Lopez-Crapez, E., Di Fiore, F., Thezenas, S., Ychou, M., Blanchard, F., Lamy, A., Penault-Llorca, F., Frebourg, T., Michel, P., Sabourin, J.C. & Boissiere-Michot, F. (2009). Impact of Fc{gamma}RIIa-Fc{gamma}RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol*, **27,** 1122-9.

Bienvenu, B., Martin, B., Auffray, C., Cordier, C., Becourt, C. & Lucas, B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J Immunol*, **175,** 246-53.

Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G. & Kees, U.R. (1998). Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway. *J Immunol*, **160,** 5729-34.

Bopp, T., Becker, C., Klein, M., Klein-Hessling, S., Palmetshofer, A., Serfling, E., Heib, V., Becker, M., Kubach, J., Schmitt, S., Stoll, S., Schild, H., Staege, M.S., Stassen, M., Jonuleit, H. & Schmitt, E. (2007). Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *J Exp Med*, **204,** 1303-10.

Borg, C., Terme, M., Taieb, J., Menard, C., Flament, C., Robert, C., Maruyama, K., Wakasugi, H., Angevin, E., Thielemans, K., Le Cesne, A., Chung-Scott, V., Lazar, V., Tchou, I., Crepineau, F., Lemoine, F., Bernard, J., Fletcher, J.A., Turhan, A., Blay, J.Y., Spatz, A., Emile, J.F., Heinrich, M.C., Mecheri, S., Tursz, T. & Zitvogel, L. (2004). Novel mode of action of c-kit tyrosine kinase inhibitors leading to NK cell-dependent antitumor effects. *J Clin Invest*, **114,** 379-88.

Bromberg, J. (2002). Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest*, **109,** 1139-42.

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

Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F. & Viola, A. (2005). Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med*, **201,** 1257-68.

Bronte, V., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Tosello, V., Mazzoni, A., Segal, D.M., Staib, C., Lowel, M., Sutter, G., Colombo, M.P. & Zanovello, P. (2003a). IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, **170,** 270-8.

Bronte, V., Serafini, P., Mazzoni, A., Segal, D.M. & Zanovello, P. (2003b). L-arginine metabolism in myeloid cells controls T-lymphocyte functions. *Trends Immunol*, **24,** 302-6.

Bronte, V., Wang, M., Overwijk, W.W., Surman, D.R., Pericle, F., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. (1998). Apoptotic death of CD8+ T lymphocytes after immunization: induction of a suppressive population of Mac-1+/Gr-1+ cells. *J Immunol*, **161,** 5313-20.

Bronte, V. & Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*, **5,** 641-54.

Bruder, D., Probst-Kepper, M., Westendorf, A.M., Geffers, R., Beissert, S., Loser, K., von Boehmer, H., Buer, J. & Hansen, W. (2004). Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. *Eur J Immunol*, **34,** 623-30.

Brunkow, M.E., Jeffery, E.W., Hjerrild, K.A., Paeper, B., Clark, L.B., Yasayko, S.A., Wilkinson, J.E., Galas, D., Ziegler, S.F. & Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, **27,** 68-73.

Buessow, S.C., Paul, R.D. & Lopez, D.M. (1984). Influence of mammary tumor progression on phenotype and function of spleen and in situ lymphocytes in mice. *J Natl Cancer Inst*, **73,** 249-55.

Bunt, S.K., Clements, V.K., Hanson, E.M., Sinha, P. & Ostrand-Rosenberg, S. (2009). Inflammation enhances myeloid-derived suppressor cell cross-talk by signaling through Toll-like receptor 4. *J Leukoc Biol*, **85,** 996-1004.

Bunt, S.K., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J. & Ostrand-Rosenberg, S. (2006). Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol*, **176,** 284-90.

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

Bushley, A.W., Ferrell, R., McDuffie, K., Terada, K.Y., Carney, M.E., Thompson, P.J., Wilkens, L.R., Tung, K.H., Ness, R.B. & Goodman, M.T. (2004). Polymorphisms of interleukin (IL)-1alpha, IL-1beta, IL-6, IL-10, and IL-18 and the risk of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, **95,** 672-9.

Byrd-Leifer, C.A., Block, E.F., Takeda, K., Akira, S. & Ding, A. (2001). The role of MyD88 and TLR4 in the LPS-mimetic activity of Taxol. *Eur J Immunol*, **31,** 2448-57.

Calderwood, S.K., Khaleque, M.A., Sawyer, D.B. & Ciocca, D.R. (2006). Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci*, **31,** 164-72.

Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R. & Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity*, **27,** 635-46.

Carey, L.A., Metzger, R., Dees, E.C., Collichio, F., Sartor, C.I., Ollila, D.W., Klauber-DeMore, N., Halle, J., Sawyer, L., Moore, D.T. & Graham, M.L. (2005). American Joint Committee on Cancer tumor-node-metastasis stage after neoadjuvant chemotherapy and breast cancer outcome. *J Natl Cancer Inst*, **97,** 1137-42.

Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A. & Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat Cell Biol*, **1,** 193-9.

Carrington, M., Wang, S., Martin, M.P., Gao, X., Schiffman, M., Cheng, J., Herrero, R., Rodriguez, A.C., Kurman, R., Mortel, R., Schwartz, P., Glass, A. & Hildesheim, A. (2005). Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. *J Exp Med*, **201,** 1069-75.

Carson, W.E., 3rd, Shapiro, C.L., Crespin, T.R., Thornton, L.M. & Andersen, B.L. (2004). Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. *Clin Cancer Res*, **10,** 3401-9.

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

Cederbom, L., Hall, H. & Ivars, F. (2000). CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. *Eur J Immunol*, **30,** 1538-43.

Chakraborty, N.G., Twardzik, D.R., Sivanandham, M., Ergin, M.T., Hellstrom, K.E. & Mukherji, B. (1990). Autologous melanoma-induced activation of regulatory T cells that suppress cytotoxic response. *J Immunol*, **145,** 2359-64.

Chaudhry, A., Rudra, D., Treuting, P., Samstein, R.M., Liang, Y., Kas, A. & Rudensky, A.Y. (2009). CD4+ regulatory T cells control TH17 responses in a Stat3-dependent manner. *Science*, **326,** 986-91.

Chen, G.Y., Chen, C., Wang, L., Chang, X., Zheng, P. & Liu, Y. (2008). Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. *J Immunol*, **180,** 5163-6.

Chen, L. (2004). Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat Rev Immunol*, **4,** 336-47.

Chen, M.L., Pittet, M.J., Gorelik, L., Flavell, R.A., Weissleder, R., von Boehmer, H. & Khazaie, K. (2005). Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF-beta signals in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102,** 419-24.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G. & Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*, **198,** 1875-86.

Chen, W. & Wahl, S.M. (2003). TGF-beta: the missing link in CD4+CD25+ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev*, **14,** 85-9.

Cheng, P., Corzo, C.A., Luetteke, N., Yu, B., Nagaraj, S., Bui, M.M., Ortiz, M., Nacken, W., Sorg, C., Vogl, T., Roth, J. & Gabrilovich, D.I. (2008). Inhibition of dendritic cell differentiation and accumulation of myeloid-derived suppressor cells in cancer is regulated by S100A9 protein. *J Exp Med*, **205,** 2235-49.

Chevallier, B., Roche, H., Olivier, J.P., Chollet, P. & Hurteloup, P. (1993). Inflammatory breast cancer. Pilot study of intensive induction chemotherapy (FEC-HD) results in a high histologic response rate. *Am J Clin Oncol*, **16,** 223-8.

Chiossone, L., Vitale, C., Cottalasso, F., Moretti, S., Azzarone, B., Moretta, L. & Mingari, M.C. (2007). Molecular analysis of the methylprednisolone-mediated inhibition of NK-cell function: evidence for different susceptibility of IL-2- versus IL-15-activated NK cells. *Blood*, **109,** 3767-75.

Clementi, R., Locatelli, F., Dupre, L., Garaventa, A., Emmi, L., Bregni, M., Cefalo, G., Moretta, A., Danesino, C., Comis, M., Pession, A., Ramenghi, U., Maccario, R., Arico, M. & Roncarolo, M.G. (2005). A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood*, **105,** 4424-8.

Cobbs, C.S., Whisenhunt, T.R., Wesemann, D.R., Harkins, L.E., Van Meir, E.G. & Samanta, M. (2003). Inactivation of wild-type p53 protein function by reactive oxygen and nitrogen species in malignant glioma cells. *Cancer Res*, **63,** 8670-3.

Coleman, S., Clayton, A., Mason, M.D., Jasani, B., Adams, M. & Tabi, Z. (2005). Recovery of CD8+ T-cell function during systemic chemotherapy in advanced ovarian cancer. *Cancer Res*, **65,** 7000-6.

Collison, L.W., Workman, C.J., Kuo, T.T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K.M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R.S. & Vignali, D.A. (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, **450,** 566-9.

Correale, P., Cusi, M.G., Tsang, K.Y., Del Vecchio, M.T., Marsili, S., Placa, M.L., Intrivici, C., Aquino, A., Micheli, L., Nencini, C., Ferrari, F., Giorgi, G., Bonmassar, E. & Francini, G. (2005). Chemo-immunotherapy of metastatic colorectal carcinoma with gemcitabine plus FOLFOX 4 followed by subcutaneous granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-2 induces strong immunologic and antitumor activity in metastatic colon cancer patients. *J Clin Oncol*, **23,** 8950-8.

Corzo, C.A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M.J., Youn, J.I., Cheng, P., Cho, H.I., Celis, E., Quiceno, D.G., Padhya, T., McCaffrey, T.V., McCaffrey, J.C. & Gabrilovich, D.I. (2010). HIF-1{alpha} regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med.*

Coudert, J.D., Zimmer, J., Tomasello, E., Cebecauer, M., Colonna, M., Vivier, E. & Held, W. (2005). Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood*, **106,** 1711-7.

Coussens, L.M. & Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature*, **420,** 860-7.

Curiel, T.J. (2007). Tregs and rethinking cancer immunotherapy. *J Clin Invest*, **117,** 1167-74.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M.L., Knutson, K.L., Chen, L. & Zou, W. (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med*, **10,** 942-9.

Curiel, T.J., Wei, S., Dong, H., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Krzysiek, R., Knutson, K.L., Daniel, B., Zimmermann, M.C., David, O., Burow, M., Gordon, A., Dhurandhar, N., Myers, L., Berggren, R., Hemminki, A., Alvarez, R.D., Emilie, D., Curiel, D.T., Chen, L. & Zou, W. (2003). Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*, **9,** 562-7.

Curti, A., Pandolfi, S., Valzasina, B., Aluigi, M., Isidori, A., Ferri, E., Salvestrini, V., Bonanno, G., Rutella, S., Durelli, I., Horenstein, A.L., Fiore, F., Massaia, M., Colombo, M.P., Baccarani, M. & Lemoli, R.M. (2007). Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25- into CD25+ T regulatory cells. *Blood*, **109,** 2871-7.

Dannull, J., Su, Z., Rizzieri, D., Yang, B.K., Coleman, D., Yancey, D., Zhang, A., Dahm, P., Chao, N., Gilboa, E. & Vieweg, J. (2005). Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest*, **115,** 3623-33.

De Santo, C., Serafini, P., Marigo, I., Dolcetti, L., Bolla, M., Del Soldato, P., Melani, C., Guiducci, C., Colombo, M.P., Iezzi, M., Musiani, P., Zanovello, P. & Bronte, V. (2005). Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102,** 4185-90.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M., Kuchroo, V.K., Strom, T.B. & Robson, S.C. (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med*, **204,** 1257-65.

Delano, M.J., Scumpia, P.O., Weinstein, J.S., Coco, D., Nagaraj, S., Kelly-Scumpia, K.M., O'Malley, K.A., Wynn, J.L., Antonenko, S., Al-Quran, S.Z., Swan, R., Chung, C.S., Atkinson, M.A., Ramphal, R., Gabrilovich, D.I., Reeves, W.H., Ayala, A., Phillips, J., Laface, D., Heyworth, P.G., Clare-Salzler, M. & Moldawer, L.L. (2007). MyD88-dependent expansion of an immature GR-1(+)CD11b(+) population induces T cell suppression and Th2 polarization in sepsis. *J Exp Med*, **204,** 1463-74.

Dhodapkar, M.V., Krasovsky, J., Osman, K. & Geller, M.D. (2003). Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med*, **198,** 1753-7.

Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. (2001). Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med*, **193,** 233-8.

Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Sapp, M., Desai, H., Fossella, C., Krasovsky, J., Donahoe, S.M., Dunbar, P.R., Cerundolo, V., Nixon, D.F. & Bhardwaj, N. (1999). Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest*, **104,** 173-80.

Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J. & Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer Immunol Immunother*, **58,** 49-59.

Dieckmann, D., Bruett, C.H., Ploettner, H., Lutz, M.B. & Schuler, G. (2002). Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-

producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J Exp Med*, **196,** 247-53.

Dietlin, T.A., Hofman, F.M., Lund, B.T., Gilmore, W., Stohlman, S.A. & van der Veen, R.C. (2007). Mycobacteria-induced Gr-1+ subsets from distinct myeloid lineages have opposite effects on T cell expansion. *J Leukoc Biol*, **81,** 1205-12.

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., Lennon, V.A., Celis, E. & Chen, L. (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, **8,** 793-800.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Robbins, P.F., Yang, J.C., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Sherry, R., Restifo, N.P., Hubicki, A.M., Robinson, M.R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C.A., Rogers-Freezer, L., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., White, D.E. & Rosenberg, S.A. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science*, **298,** 850-4.

Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Yang, J.C., Sherry, R.M., Topalian, S.L., Restifo, N.P., Royal, R.E., Kammula, U., White, D.E., Mavroukakis, S.A., Rogers, L.J., Gracia, G.J., Jones, S.A., Mangiameli, D.P., Pelletier, M.M., Gea-Banacloche, J., Robinson, M.R., Berman, D.M., Filie, A.C., Abati, A. & Rosenberg, S.A. (2005). Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, **23,** 2346-57.

Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*, **21,** 137-48.

Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, **22,** 329-60.

Ebert, L.M., Tan, B.S., Browning, J., Svobodova, S., Russell, S.E., Kirkpatrick, N., Gedye, C., Moss, D., Ng, S.P., MacGregor, D., Davis, I.D., Cebon, J. & Chen, W. (2008). The regulatory T cell-associated transcription factor FoxP3 is expressed by tumor cells. *Cancer Res*, **68,** 3001-9.

Ehrlich. (1909). Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd*, **5,** 273-290.

Ekmekcioglu, S., Ellerhorst, J., Smid, C.M., Prieto, V.G., Munsell, M., Buzaid, A.C. & Grimm, E.A. (2000). Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. *Clin Cancer Res*, **6,** 4768-75.

Elias, D., Markovits, D., Reshef, T., van der Zee, R. & Cohen, I.R. (1990). Induction and therapy of autoimmune diabetes in the non-obese diabetic (NOD/Lt) mouse by a 65-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87,** 1576-80.

Ellis, L.M. & Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer*, **8,** 579-91.

Ellwood-Yen, K., Graeber, T.G., Wongvipat, J., Iruela-Arispe, M.L., Zhang, J., Matusik, R., Thomas, G.V. & Sawyers, C.L. (2003). Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. *Cancer Cell*, **4,** 223-38.

Eruslanov, E., Daurkin, I., Ortiz, J., Vieweg, J. & Kusmartsev, S. (2010). Pivotal Advance: Tumor-mediated induction of myeloid-derived suppressor cells and M2-polarized macrophages by altering intracellular PGE catabolism in myeloid cells. *J Leukoc Biol*, **88,** 839-48.

Ezernitchi, A.V., Vaknin, I., Cohen-Daniel, L., Levy, O., Manaster, E., Halabi, A., Pikarsky, E., Shapira, L. & Baniyash, M. (2006). TCR zeta down-regulation under chronic inflammation is mediated by myeloid suppressor cells differentially distributed between various lymphatic organs. *J Immunol*, **177,** 4763-72.

Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L. & Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol*, **4,** 1206-12.

Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E. & Zitvogel, L. (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat Med*, **5,** 405-11.

Fichtner-Feigl, S., Terabe, M., Kitani, A., Young, C.A., Fuss, I., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., Berzofsky, J.A. & Strober, W. (2008). Restoration of tumor immunosurveillance via targeting of interleukin-13 receptor-alpha 2. *Cancer Res*, **68,** 3467-75.

Filipazzi, P., Valenti, R., Huber, V., Pilla, L., Canese, P., Iero, M., Castelli, C., Mariani, L., Parmiani, G. & Rivoltini, L. (2007). Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol*, **25,** 2546-53.

Foell, D., Frosch, M., Sorg, C. & Roth, J. (2004). Phagocyte-specific calcium-binding S100 proteins as clinical laboratory markers of inflammation. *Clin Chim Acta*, **344,** 37-51.

Foell, D., Wittkowski, H., Vogl, T. & Roth, J. (2007). S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*, **81,** 28-37.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*, **4,** 330-6.

Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A. & Rudensky, A.Y. (2005). A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat Immunol*, **6,** 1142-51.

Foss, F.M. (2000). DAB(389)IL-2 (ONTAK): a novel fusion toxin therapy for lymphoma. *Clin Lymphoma*, **1,** 110-6; discussion 117.

Freedman, R.S., Deavers, M., Liu, J. & Wang, E. (2004). Peritoneal inflammation - A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *J Transl Med*, **2,** 23.

Fricke, I., Mirza, N., Dupont, J., Lockhart, C., Jackson, A., Lee, J.H., Sosman, J.A. & Gabrilovich, D.I. (2007). Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses. *Clin Cancer Res*, **13,** 4840-8.

Fritzsching, B., Oberle, N., Eberhardt, N., Quick, S., Haas, J., Wildemann, B., Krammer, P.H. & Suri-Payer, E. (2005). In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J Immunol*, **175,** 32-6.

Fritzsching, B., Oberle, N., Pauly, E., Geffers, R., Buer, J., Poschl, J., Krammer, P., Linderkamp, O. & Suri-Payer, E. (2006). Naive regulatory T cells: a novel subpopulation defined by resistance toward CD95L-mediated cell death. *Blood*, **108,** 3371-8.

Fu, T., Shen, Y. & Fujimoto, S. (2000). Tumor-specific CD4(+) suppressor T-cell clone capable of inhibiting rejection of syngeneic sarcoma in A/J mice. *Int J Cancer*, **87,** 680-7.

Gabrilovich, D. (2004). Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol*, **4,** 941-52.

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

Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. & Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*, **2,** 1096-103.

Gabrilovich, D.I., Velders, M.P., Sotomayor, E.M. & Kast, W.M. (2001). Mechanism of immune dysfunction in cancer mediated by immature Gr-1+ myeloid cells. *J Immunol*, **166,** 5398-406.

Galani, I.E., Wendel, M., Stojanovic, A., Jesiak, M., Muller, M.M., Schellack, C., Suri-Payer, E. & Cerwenka, A. (2010). Regulatory T cells control macrophage accumulation and activation in lymphoma. *Int J Cancer*, **127,** 1131-40.

Galetto, A., Buttiglieri, S., Forno, S., Moro, F., Mussa, A. & Matera, L. (2003). Drug- and cell-mediated antitumor cytotoxicities modulate cross-presentation of tumor antigens by myeloid dendritic cells. *Anticancer Drugs*, **14,** 833-43.

Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Bicciato, S. & Bronte, V. (2006). Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest*, **116,** 2777-90.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoue, F., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H. & Pages, F. (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*, **313,** 1960-4.

Galon, J., Franchimont, D., Hiroi, N., Frey, G., Boettner, A., Ehrhart-Bornstein, M., O'Shea, J.J., Chrousos, G.P. & Bornstein, S.R. (2002). Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. *Faseb J*, **16,** 61-71.

Gao, Q., Qiu, S.J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.Y., Xiao, Y.S., Xu, Y., Li, Y.W. & Tang, Z.Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. *J Clin Oncol*, **25,** 2586-93.

Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M. & Henson, P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell*, **123,** 321-34.

Garin, M.I., Chu, C.C., Golshayan, D., Cernuda-Morollon, E., Wait, R. & Lechler, R.I. (2007). Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, **109,** 2058-65.

Garnett, C.T., Palena, C., Chakraborty, M., Tsang, K.Y., Schlom, J. & Hodge, J.W. (2004). Sublethal irradiation of human tumor cells modulates phenotype resulting in enhanced killing by cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res*, **64,** 7985-94.

Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J. & Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, **436,** 1186-90.

Gattinoni, L., Finkelstein, S.E., Klebanoff, C.A., Antony, P.A., Palmer, D.C., Spiess, P.J., Hwang, L.N., Yu, Z., Wrzesinski, C., Heimann, D.M., Surh, C.D., Rosenberg, S.A. & Restifo, N.P. (2005). Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific CD8+ T cells. *J Exp Med*, **202,** 907-12.

Gavin, M. & Rudensky, A. (2003). Control of immune homeostasis by naturally arising regulatory CD4+ T cells. *Curr Opin Immunol*, **15,** 690-6.

Gavin, M.A., Rasmussen, J.P., Fontenot, J.D., Vasta, V., Manganiello, V.C., Beavo, J.A. & Rudensky, A.Y. (2007). Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*, **445,** 771-5.

Gebhardt, C., Nemeth, J., Angel, P. & Hess, J. (2006). S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol*, **72,** 1622-31.

Generali, D., Bates, G., Berruti, A., Brizzi, M.P., Campo, L., Bonardi, S., Bersiga, A., Allevi, G., Milani, M., Aguggini, S., Dogliotti, L., Banham, A.H., Harris, A.L., Bottini, A. & Fox, S.B. (2009). Immunomodulation of FOXP3+ regulatory T cells by the aromatase inhibitor letrozole in breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **15,** 1046-51.

Gennari, R., Menard, S., Fagnoni, F., Ponchio, L., Scelsi, M., Tagliabue, E., Castiglioni, F., Villani, L., Magalotti, C., Gibelli, N., Oliviero, B., Ballardini, B., Da Prada, G., Zambelli, A. & Costa, A. (2004). Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res*, **10,** 5650-5.

Gershon, R.K. & Kondo, K. (1970). Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, **18,** 723-37.

Gershon, R.K., Mokyr, M.B. & Mitchell, M.S. (1974). Activation of suppressor T cells by tumour cells and specific antibody. *Nature*, **250,** 594-6.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., Perfettini, J.L., Schlemmer, F., Tasdemir, E., Uhl, M., Genin, P., Civas, A., Ryffel, B., Kanellopoulos, J., Tschopp, J., Andre, F., Lidereau, R., McLaughlin, N.M., Haynes, N.M., Smyth, M.J., Kroemer, G. & Zitvogel, L. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med*, **15,** 1170-8.

Ghiringhelli, F., Larmonier, N., Schmitt, E., Parcellier, A., Cathelin, D., Garrido, C., Chauffert, B., Solary, E., Bonnotte, B. & Martin, F. (2004). CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol*, **34,** 336-44.

Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P.E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L. & Chauffert, B. (2007). Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother*, **56,** 641-8.

Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P.E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lecesne, A., Robert, C., Blay, J.Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchencker, W., Martin, F. & Zitvogel, L. (2005a). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med*, **202,** 1075-85.

Ghiringhelli, F., Puig, P.E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B. & Zitvogel, L. (2005b). Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. *J Exp Med*, **202,** 919-29.

Gilliet, M. & Liu, Y.J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med*, **195,** 695-704.

Glaser, M. (1979). Regulation of specific cell-mediated cytotoxic response against SV40-induced tumor associated antigens by depletion of suppressor T cells with cyclophosphamide in mice. *J Exp Med*, **149,** 774-9.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D., Perez, S., Pasqual, N., Faure, C., Ray-

Coquard, I., Puisieux, A., Caux, C., Blay, J.Y. & Menetrier-Caux, C. (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. *Cancer Res*, **69,** 2000-9.

Godfrey, V.L., Wilkinson, J.E. & Russell, L.B. (1991). X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol*, **138,** 1379-87.

Gondek, D.C., Lu, L.F., Quezada, S.A., Sakaguchi, S. & Noelle, R.J. (2005). Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*, **174,** 1783-6.

Gray, C.P., Arosio, P. & Hersey, P. (2002). Heavy chain ferritin activates regulatory T cells by induction of changes in dendritic cells. *Blood*, **99,** 3326-34.

Graziano, F., Ruzzo, A., Canestrari, E., Loupakis, F., Santini, D., Rulli, E., Humar, B., Galluccio, N., Bisonni, R., Floriani, I., Maltese, P., Falcone, A., Tonini, G., Catalano, V., Fontana, A., Giustini, L., Masi, G., Vincenzi, B., Alessandroni, P. & Magnani, M. (2009). Variations in the interleukin-1 receptor antagonist gene impact on survival of patients with advanced colorectal cancer. *Pharmacogenomics J*, **9,** 78-84.

Graziano, F., Ruzzo, A., Santini, D., Humar, B., Tonini, G., Catalano, V., Berardi, R., Pizzagalli, F., Arduini, F., Bearzi, I., Scartozzi, M., Cascinu, S., Testa, E., Ficarelli, R. & Magnani, M. (2005). Prognostic role of interleukin-1beta gene and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms in patients with advanced gastric cancer. *J Clin Oncol*, **23,** 2339-45.

Green, E.A., Gorelik, L., McGregor, C.M., Tran, E.H. & Flavell, R.A. (2003). CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100,** 10878-83.

Grivennikov, S.I. & Karin, M. (2010). Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Curr Opin Genet Dev*, **20,** 65-71.

Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C. & Puccetti, P. (2002). CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol*, **3,** 1097-101.

Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E. & Roncarolo, M.G. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, **389,** 737-42.

Gu, B.J., Zhang, W., Worthington, R.A., Sluyter, R., Dao-Ung, P., Petrou, S., Barden, J.A. & Wiley, J.S. (2001). A Glu-496 to Ala polymorphism leads to loss of function of the human P2X7 receptor. *J Biol Chem*, **276,** 11135-42.

Gupta, S. & Knowlton, A.A. (2007). HSP60 trafficking in adult cardiac myocytes: role of the exosomal pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **292,** H3052-6.

Ha, T.Y. (2009). The role of regulatory T cells in cancer. *Immune Netw*, **9,** 209-35.

Haile, L.A., von Wasielewski, R., Gamrekelashvili, J., Kruger, C., Bachmann, O., Westendorf, A.M., Buer, J., Liblau, R., Manns, M.P., Korangy, F. & Greten, T.F. (2008). Myeloid-derived suppressor cells in inflammatory bowel disease: a new immunoregulatory pathway. *Gastroenterology*, **135,** 871-81, 881 e1-5.

Hanabuchi, S., Ito, T., Park, W.R., Watanabe, N., Shaw, J.L., Roman, E., Arima, K., Wang, Y.H., Voo, K.S., Cao, W. & Liu, Y.J. (2010). Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol*, **184,** 2999-3007.

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

Hanson, E.M., Clements, V.K., Sinha, P., Ilkovitch, D. & Ostrand-Rosenberg, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol*, **183,** 937-44.

Harari, O. & Liao, J.K. (2004). Inhibition of MHC II gene transcription by nitric oxide and antioxidants. *Curr Pharm Des*, **10,** 893-8.

Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J.V., Steinman, R.M. & Nussenzweig, M.C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*, **194,** 769-79.

Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y. & Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res*, **66,** 563-70.

Hengesbach, L.M. & Hoag, K.A. (2004). Physiological concentrations of retinoic acid favor myeloid dendritic cell development over granulocyte development in cultures of bone marrow cells from mice. *J Nutr*, **134,** 2653-9.

Hesse, M., Piccirillo, C.A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., Cheever, A.W., Shevach, E.M. & Wynn, T.A. (2004). The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *J Immunol*, **172,** 3157-66.

Hinz, S., Pagerols-Raluy, L., Oberg, H.H., Ammerpohl, O., Grussel, S., Sipos, B., Grutzmann, R., Pilarsky, C., Ungefroren, H., Saeger, H.D., Kloppel, G., Kabelitz, D. & Kalthoff, H. (2007). Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer. *Cancer Res*, **67,** 8344-50.

Hiratsuka, S., Watanabe, A., Aburatani, H. & Maru, Y. (2006). Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol*, **8,** 1369-75.

Hiura, T., Kagamu, H., Miura, S., Ishida, A., Tanaka, H., Tanaka, J., Gejyo, F. & Yoshizawa, H. (2005). Both regulatory T cells and antitumor effector T cells are primed in the same draining lymph nodes during tumor progression. *J Immunol*, **175,** 5058-66.

Hodi, F.S., Mihm, M.C., Soiffer, R.J., Haluska, F.G., Butler, M., Seiden, M.V., Davis, T., Henry-Spires, R., MacRae, S., Willman, A., Padera, R., Jaklitsch, M.T., Shankar, S., Chen, T.C., Korman, A., Allison, J.P. & Dranoff, G. (2003). Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100,** 4712-7.

Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A. & Urba, W.J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, **363,** 711-23.

Hoechst, B., Ormandy, L.A., Ballmaier, M., Lehner, F., Kruger, C., Manns, M.P., Greten, T.F. & Korangy, F. (2008). A new population of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma patients induces CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells. *Gastroenterology*, **135,** 234-43.

Hoffmann, P., Boeld, T.J., Eder, R., Huehn, J., Floess, S., Wieczorek, G., Olek, S., Dietmaier, W., Andreesen, R. & Edinger, M. (2009). Loss of FOXP3 expression in natural human CD4+CD25+ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol*, **39,** 1088-97.

Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A. & Salih, H.R. (2006a). Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer*, **118,** 684-7.

Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A. & Salih, H.R. (2006b). Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother*, **55,** 1584-9.

Hollenbeak, C.S., Todd, M.M., Billingsley, E.M., Harper, G., Dyer, A.M. & Lengerich, E.J. (2005). Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer*, **104,** 1962-7.

Horlock, C., Stott, B., Dyson, P.J., Morishita, M., Coombes, R.C., Savage, P. & Stebbing, J. (2009). The effects of trastuzumab on the CD4+CD25+FoxP3+ and CD4+IL17A+ T-cell axis in patients with breast cancer. *Br J Cancer*, **100,** 1061-7.

Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M. & Chen, S.H. (2006). Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host. *Cancer Res*, **66,** 1123-31.

Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I., Powell, J.D., Pardoll, D.M., Drake, C.G. & Vignali, D.A. (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, **21,** 503-13.

Huang, Y., Obholzer, N., Fayad, R. & Qiao, L. (2005). Turning on/off tumor-specific CTL response during progressive tumor growth. *J Immunol*, **175,** 3110-6.

Ichihara, F., Kono, K., Takahashi, A., Kawaida, H., Sugai, H. & Fujii, H. (2003). Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res*, **9,** 4404-8.

Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*, **356,** 1795-9.

Ito, T., Hanabuchi, S., Wang, Y.H., Park, W.R., Arima, K., Bover, L., Qin, F.X., Gilliet, M. & Liu, Y.J. (2008). Two functional subsets of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus and periphery. *Immunity*, **28,** 870-80.

Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F. & Sakaguchi, S. (1999). Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J Immunol*, **162,** 5317-26.

Iwamoto, M., Shinohara, H., Miyamoto, A., Okuzawa, M., Mabuchi, H., Nohara, T., Gon, G., Toyoda, M. & Tanigawa, N. (2003). Prognostic value of tumor-infiltrating dendritic cells expressing CD83 in human breast carcinomas. *Int J Cancer*, **104,** 92-7.

Jaattela, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res*, **248,** 30-43.

Jeruss, J.S., Mittendorf, E.A., Tucker, S.L., Gonzalez-Angulo, A.M., Buchholz, T.A., Sahin, A.A., Cormier, J.N., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N. & Hunt, K.K. (2008). Combined use of clinical and pathologic staging variables to define outcomes for breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy. *J Clin Oncol*, **26,** 246-52.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J. & Enk, A.H. (2002). Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med*, **196,** 255-60.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A.H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*, **192,** 1213-22.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J. & Enk, A.H. (2001). Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, **193,** 1285-94.

Juszczynski, P., Ouyang, J., Monti, S., Rodig, S.J., Takeyama, K., Abramson, J., Chen, W., Kutok, J.L., Rabinovich, G.A. & Shipp, M.A. (2007). The AP1-dependent secretion of galectin-1 by Reed Sternberg cells fosters immune privilege in classical Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104,** 13134-9.

Kalinski, P., Schuitemaker, J.H., Hilkens, C.M. & Kapsenberg, M.L. (1998). Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol*, **161,** 2804-9.

Karanikas, V., Speletas, M., Zamanakou, M., Kalala, F., Loules, G., Kerenidi, T., Barda, A.K., Gourgoulianis, K.I. & Germenis, A.E. (2008). Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med*, **6,** 19.

Kelland, L.R. (2004). Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer*, **40,** 827-36.

Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A. & Ramsdell, F. (2003). An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol*, **4,** 337-42.

Kim, J.M. & Rudensky, A. (2006). The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev*, **212,** 86-98.

Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.L. & Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. *Nature*, **457,** 102-6.

Kingston, A.E., Hicks, C.A., Colston, M.J. & Billingham, M.E. (1996). A 71-kD heat shock protein (hsp) from Mycobacterium tuberculosis has modulatory effects on experimental rat arthritis. *Clin Exp Immunol*, **103,** 77-82.

Kinnula, V.L., Torkkeli, T., Kristo, P., Sormunen, R., Soini, Y., Paakko, P., Ollikainen, T., Kahlos, K., Hirvonen, A. & Knuutila, S. (2004). Ultrastructural and chromosomal studies on manganese superoxide dismutase in malignant mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **31,** 147-53.

Knutson, K.L., Dang, Y., Lu, H., Lukas, J., Almand, B., Gad, E., Azeke, E. & Disis, M.L. (2006). IL-2 immunotoxin therapy modulates tumor-associated regulatory T cells and leads to lasting immune-mediated rejection of breast cancers in neu-transgenic mice. *J Immunol*, **177,** 84-91.

Ko, H.J., Kim, Y.J., Kim, Y.S., Chang, W.S., Ko, S.Y., Chang, S.Y., Sakaguchi, S. & Kang, C.Y. (2007). A combination of chemoimmunotherapies can efficiently break self-tolerance and induce antitumor immunity in a tolerogenic murine tumor model. *Cancer Res*, **67,** 7477-86.

Ko, J.S., Zea, A.H., Rini, B.I., Ireland, J.L., Elson, P., Cohen, P., Golshayan, A., Rayman, P.A., Wood, L., Garcia, J., Dreicer, R., Bukowski, R. & Finke, J.H. (2009). Sunitinib mediates reversal of myeloid-derived suppressor cell accumulation in renal cell carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, **15,** 2148-57.

Kobayashi, N. (1985). Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome. *Jpn J Clin Oncol*, **15 Suppl 1,** 307-12.

Kodumudi, K.N., Woan, K., Gilvary, D.L., Sahakian, E., Wei, S. & Djeu, J.Y. (2010). A novel chemoimmunomodulating property of docetaxel: suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin Cancer Res*, **16,** 4583-94.

Kono, K., Kawaida, H., Takahashi, A., Sugai, H., Mimura, K., Miyagawa, N., Omata, H. & Fujii, H. (2006). CD4(+)CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. *Cancer Immunol Immunother*, **55,** 1064-71.

Kornstein, M.J., Brooks, J.S. & Elder, D.E. (1983). Immunoperoxidase localization of lymphocyte subsets in the host response to melanoma and nevi. *Cancer Res*, **43,** 2749-53.

Kortylewski, M., Kujawski, M., Wang, T., Wei, S., Zhang, S., Pilon-Thomas, S., Niu, G., Kay, H., Mule, J., Kerr, W.G., Jove, R., Pardoll, D. & Yu, H. (2005). Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*, **11,** 1314-21.

Kryczek, I., Grybos, M., Karabon, L., Klimczak, A. & Lange, A. (2000). IL-6 production in ovarian carcinoma is associated with histiotype and biological characteristics of the tumour and influences local immunity. *Br J Cancer*, **82,** 621-8.

Kuerer, H.M., Newman, L.A., Smith, T.L., Ames, F.C., Hunt, K.K., Dhingra, K., Theriault, R.L., Singh, G., Binkley, S.M., Sneige, N., Buchholz, T.A., Ross, M.I., McNeese, M.D., Buzdar, A.U., Hortobagyi, G.N. & Singletary, S.E. (1999). Clinical course of breast cancer patients with complete pathologic primary tumor and axillary lymph node response to doxorubicin-based neoadjuvant chemotherapy. *J Clin Oncol*, **17,** 460-9.

Kujawski, M., Kortylewski, M., Lee, H., Herrmann, A., Kay, H. & Yu, H. (2008). Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest*, **118,** 3367-77.

Kuniyasu, Y., Takahashi, T., Itoh, M., Shimizu, J., Toda, G. & Sakaguchi, S. (2000). Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol*, **12,** 1145-55.

Kusmartsev, S., Cheng, F., Yu, B., Nefedova, Y., Sotomayor, E., Lush, R. & Gabrilovich, D. (2003). All-trans-retinoic acid eliminates immature myeloid cells from tumor-bearing mice and improves the effect of vaccination. *Cancer Res*, **63,** 4441-9.

Kusmartsev, S., Eruslanov, E., Kubler, H., Tseng, T., Sakai, Y., Su, Z., Kaliberov, S., Heiser, A., Rosser, C., Dahm, P., Siemann, D. & Vieweg, J. (2008). Oxidative stress regulates expression of VEGFR1 in myeloid cells: link to tumor-induced immune suppression in renal cell carcinoma. *J Immunol*, **181,** 346-53.

Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I. (2003). Inhibition of myeloid cell differentiation in cancer: the role of reactive oxygen species. *J Leukoc Biol*, **74,** 186-96.

Kusmartsev, S. & Gabrilovich, D.I. (2005). STAT1 signaling regulates tumor-associated macrophage-mediated T cell deletion. *J Immunol*, **174,** 4880-91.

Kusmartsev, S., Nagaraj, S. & Gabrilovich, D.I. (2005). Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells. *J Immunol*, **175,** 4583-92.

Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D. & Gabrilovich, D.I. (2004). Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species. *J Immunol*, **172,** 989-99.

Kusmartsev, S.A., Li, Y. & Chen, S.H. (2000). Gr-1+ myeloid cells derived from tumor-bearing mice inhibit primary T cell activation induced through CD3/CD28 costimulation. *J Immunol*, **165,** 779-85.

Kuwata, T., Wang, I.M., Tamura, T., Ponnamperuma, R.M., Levine, R., Holmes, K.L., Morse, H.C., De Luca, L.M. & Ozato, K. (2000). Vitamin A deficiency in mice causes a systemic expansion of myeloid cells. *Blood*, **95,** 3349-56.

Labeur, M.S., Roters, B., Pers, B., Mehling, A., Luger, T.A., Schwarz, T. & Grabbe, S. (1999). Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol*, **162,** 168-75.

Ladanyi, A., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Gaudi, I. & Timar, J. (2004). T-cell activation marker expression on tumor-infiltrating lymphocytes as prognostic factor in cutaneous malignant melanoma. *Clin Cancer Res*, **10,** 521-30.

Ladoire, S., Arnould, L., Apetoh, L., Coudert, B., Martin, F., Chauffert, B., Fumoleau, P. & Ghiringhelli, F. (2008). Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. *Clin Cancer Res*, **14,** 2413-20.

Lake, R.A. & Robinson, B.W. (2005). Immunotherapy and chemotherapy--a practical partnership. *Nat Rev Cancer*, **5,** 397-405.

Lathers, D.M., Achille, N., Kolesiak, K., Hulett, K., Sparano, A., Petruzzelli, G.J. & Young, M.R. (2001). Increased levels of immune inhibitory CD34+ progenitor cells in the peripheral blood of patients with node positive head and neck squamous cell carcinomas and the ability of these CD34+ cells to differentiate into immune stimulatory dendritic cells. *Otolaryngol Head Neck Surg*, **125,** 205-12.

Lazarowski, E.R., Boucher, R.C. & Harden, T.K. (2003). Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol*, **64,** 785-95.

Leach, D.R., Krummel, M.F. & Allison, J.P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, **271,** 1734-6.

Lech-Maranda, E., Baseggio, L., Bienvenu, J., Charlot, C., Berger, F., Rigal, D., Warzocha, K., Coiffier, B. & Salles, G. (2004). Interleukin-10 gene promoter polymorphisms influence the clinical outcome of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*, **103,** 3529-34.

Levitt, M.L., Kassem, B., Gooding, W.E., Miketic, L.M., Landreneau, R.J., Ferson, P.F., Keenan, R., Yousem, S.A., Lindberg, C.A., Trenn, M.R., Ponas, R.S., Tarasoff, P., Sabatine, J.M., Friberg, D. & Whiteside, T.L. (2004). Phase I study of gemcitabine given weekly as a short infusion for non-small cell lung cancer: results and possible immune system-related mechanisms. *Lung Cancer*, **43,** 335-44.

Li, B., Lalani, A.S., Harding, T.C., Luan, B., Koprivnikar, K., Huan Tu, G., Prell, R., VanRoey, M.J., Simmons, A.D. & Jooss, K. (2006). Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, **12,** 6808-16.

Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M. & Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol*, **182,** 240-9.

Lin, W., Haribhai, D., Relland, L.M., Truong, N., Carlson, M.R., Williams, C.B. & Chatila, T.A. (2007). Regulatory T cell development in the absence of functional Foxp3. *Nat Immunol*, **8,** 359-68.

Lin, Y.C., Chang, L.Y., Huang, C.T., Peng, H.M., Dutta, A., Chen, T.C., Yeh, C.T. & Lin, C.Y. (2009). Effector/memory but not naive regulatory T cells are responsible for the loss of concomitant tumor immunity. *J Immunol*, **182,** 6095-104.

Linehan, D.C. & Goedegebuure, P.S. (2005). CD25+ CD4+ regulatory T-cells in cancer. *Immunol Res*, **32,** 155-68.

Liu, C., Yu, S., Kappes, J., Wang, J., Grizzle, W.E., Zinn, K.R. & Zhang, H.G. (2007a). Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host. *Blood*, **109,** 4336-42.

Liu, V.C., Wong, L.Y., Jang, T., Shah, A.H., Park, I., Yang, X., Zhang, Q., Lonning, S., Teicher, B.A. & Lee, C. (2007b). Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta. *J Immunol*, **178,** 2883-92.

Liu, Y., Wang, Y., Li, W. & Zheng, P. (2009). Activating transcription factor 2 and c-Jun-mediated induction of FoxP3 for experimental therapy of mammary tumor in the mouse. *Cancer Res*, **69,** 5954-60.

Liyanage, U.K., Goedegebuure, P.S., Moore, T.T., Viehl, C.T., Moo-Young, T.A., Larson, J.W., Frey, D.M., Ehlers, J.P., Eberlein, T.J. & Linehan, D.C. (2006). Increased prevalence of regulatory T cells (Treg) is induced by pancreas adenocarcinoma. *J Immunother*, **29,** 416-24.

Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S. & Linehan, D.C. (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*, **169,** 2756-61.

Lugade, A.A., Moran, J.P., Gerber, S.A., Rose, R.C., Frelinger, J.G. & Lord, E.M. (2005). Local radiation therapy of B16 melanoma tumors increases the generation of tumor antigen-specific effector cells that traffic to the tumor. *J Immunol*, **174,** 7516-23.

Machiels, J.P., Reilly, R.T., Emens, L.A., Ercolini, A.M., Lei, R.Y., Weintraub, D., Okoye, F.I. & Jaffee, E.M. (2001). Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res*, **61,** 3689-97.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A. & Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature*, **454,** 436-44.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. & Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*, **23,** 549-55.

Mantovani, G., Maccio, A., Madeddu, C., Mura, L., Gramignano, G., Lusso, M.R., Massa, E., Mocci, M. & Serpe, R. (2003). Antioxidant agents are effective in inducing lymphocyte progression through cell cycle in advanced cancer patients: assessment of the most important laboratory indexes of cachexia and oxidative stress. *J Mol Med*, **81,** 664-73.

Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M. & Rudensky, A.Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*, **201,** 1061-7.

Marigo, I., Bosio, E., Solito, S., Mesa, C., Fernandez, A., Dolcetti, L., Ugel, S., Sonda, N., Bicciato, S., Falisi, E., Calabrese, F., Basso, G., Zanovello, P., Cozzi, E., Mandruzzato, S. & Bronte, V. (2010). Tumor-induced tolerance and immune suppression depend on the C/EBPbeta transcription factor. *Immunity*, **32,** 790-802.

Marigo, I., Dolcetti, L., Serafini, P., Zanovello, P. & Bronte, V. (2008). Tumor-induced tolerance and immune suppression by myeloid derived suppressor cells. *Immunol Rev*, **222,** 162-79.

Markiewski, M.M., DeAngelis, R.A., Benencia, F., Ricklin-Lichtsteiner, S.K., Koutoulaki, A., Gerard, C., Coukos, G. & Lambris, J.D. (2008). Modulation of the antitumor immune response by complement. *Nat Immunol*, **9,** 1225-35.

Martin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Apetoh, L. & Ghiringhelli, F. (2010). Human FOXP3 and cancer. *Oncogene*, **29,** 4121-9.

Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci*, **13,** 453-61.

Mazzoni, A., Bronte, V., Visintin, A., Spitzer, J.H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P. & Segal, D.M. (2002). Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism. *J Immunol*, **168,** 689-95.

McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M. & Byrne, M.C. (2002). CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, **16,** 311-23.

Medema, J.P., de Jong, J., Peltenburg, L.T., Verdegaal, E.M., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J. & Offringa, R. (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98,** 11515-20.

Melani, C., Sangaletti, S., Barazzetta, F.M., Werb, Z. & Colombo, M.P. (2007). Amino-biphosphonate-mediated MMP-9 inhibition breaks the tumor-bone marrow axis responsible for myeloid-derived suppressor cell expansion and macrophage infiltration in tumor stroma. *Cancer Res*, **67,** 11438-46.

Menard, C., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Mateus, C., Grohmann, U., Caillat-Zucman, S., Zitvogel, L. & Robert, C. (2008). Ctla-4 blockade confers lymphocyte resistance to regulatory T-cells in advanced melanoma: surrogate marker of efficacy of tremelimumab? *Clin Cancer Res*, **14,** 5242-9.

Merlo, A., Casalini, P., Carcangiu, M.L., Malventano, C., Triulzi, T., Menard, S., Tagliabue, E. & Balsari, A. (2009). FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. *J Clin Oncol*, **27,** 1746-52.

Miescher, S., Whiteside, T.L., Moretta, L. & von Fliedner, V. (1987). Clonal and frequency analyses of tumor-infiltrating T lymphocytes from human solid tumors. *J Immunol*, **138,** 4004-11.

Millar, D.G., Garza, K.M., Odermatt, B., Elford, A.R., Ono, N., Li, Z. & Ohashi, P.S. (2003). Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nat Med*, **9,** 1469-76.

Miller, M.J., Safrina, O., Parker, I. & Cahalan, M.D. (2004). Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med*, **200,** 847-56.

Mirza, N., Fishman, M., Fricke, I., Dunn, M., Neuger, A.M., Frost, T.J., Lush, R.M., Antonia, S. & Gabrilovich, D.I. (2006). All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res*, **66,** 9299-307.

Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M.D. & Kaveri, S.V. (2004). Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*, **172,** 4676-80.

Miyara, M., Yoshioka, Y., Kitoh, A., Shima, T., Wing, K., Niwa, A., Parizot, C., Taflin, C., Heike, T., Valeyre, D., Mathian, A., Nakahata, T., Yamaguchi, T., Nomura, T., Ono, M., Amoura, Z., Gorochov, G. & Sakaguchi, S. (2009). Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*, **30,** 899-911.

Monu, N. & Frey, A.B. (2007). Suppression of proximal T cell receptor signaling and lytic function in CD8+ tumor-infiltrating T cells. *Cancer Res*, **67,** 11447-54.

Morrissey, P.J., Charrier, K., Braddy, S., Liggitt, D. & Watson, J.D. (1993). CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J Exp Med*, **178,** 237-44.

Moseman, E.A., Liang, X., Dawson, A.J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A.M., Liu, Y.J., Blazar, B.R. & Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*, **173,** 4433-42.

Movahedi, K., Guilliams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P. & Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood*, **111,** 4233-44.

Muller, A.J. & Prendergast, G.C. (2007). Indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and cancer. *Curr Cancer Drug Targets*, **7,** 31-40.

Mullins, D.W., Burger, C.J. & Elgert, K.D. (1999). Paclitaxel enhances macrophage IL-12 production in tumor-bearing hosts through nitric oxide. *J Immunol*, **162,** 6811-8.

Multhoff, G. (2002). Activation of natural killer cells by heat shock protein 70. *Int J Hyperthermia*, **18,** 576-85.

Munn, D.H., Sharma, M.D., Lee, J.R., Jhaver, K.G., Johnson, T.S., Keskin, D.B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S.J., Burgess, R., Slingluff, C.L., Jr. & Mellor, A.L. (2002). Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*, **297,** 1867-70.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B. & Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, **8,** 618-31.

Murugaiyan, G. & Saha, B. (2009). Protumor vs antitumor functions of IL-17. *J Immunol*, **183,** 4169-75.

Musolino, A., Naldi, N., Bortesi, B., Pezzuolo, D., Capelletti, M., Missale, G., Laccabue, D., Zerbini, A., Camisa, R., Bisagni, G., Neri, T.M. & Ardizzoni, A. (2008). Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*, **26,** 1789-96.

Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J. & Gabrilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. *Nat Med*, **13,** 828-35.

Nair, S., Boczkowski, D., Fassnacht, M., Pisetsky, D. & Gilboa, E. (2007). Vaccination against the forkhead family transcription factor Foxp3 enhances tumor immunity. *Cancer Res*, **67,** 371-80.

Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H. & Ohtani, H. (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*, **58,** 3491-4.

Nakachi, K., Hayashi, T., Imai, K. & Kusunoki, Y. (2004). Perspectives on cancer immuno-epidemiology. *Cancer Sci*, **95,** 921-9.

Nakamura, K., Kitani, A. & Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med*, **194,** 629-44.

Nakamura, Y., Yasuoka, H., Tsujimoto, M., Yoshidome, K., Nakahara, M., Nakao, K., Nakamura, M. & Kakudo, K. (2006). Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis. *Clin Cancer Res*, **12,** 1201-7.

Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H. & Ohtani, H. (2001). Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res*, **61,** 5132-6.

Nakayama, K.I. & Nakayama, K. (2006). Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer*, **6,** 369-81.

Nausch, N., Galani, I.E., Schlecker, E. & Cerwenka, A. (2008). Mononuclear myeloid-derived "suppressor" cells express RAE-1 and activate natural killer cells. *Blood*, **112,** 4080-9.

Nefedova, Y., Fishman, M., Sherman, S., Wang, X., Beg, A.A. & Gabrilovich, D.I. (2007). Mechanism of all-trans retinoic acid effect on tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, **67,** 11021-8.

Nefedova, Y., Huang, M., Kusmartsev, S., Bhattacharya, R., Cheng, P., Salup, R., Jove, R. & Gabrilovich, D. (2004). Hyperactivation of STAT3 is involved in abnormal differentiation of dendritic cells in cancer. *J Immunol*, **172,** 464-74.

Nefedova, Y., Nagaraj, S., Rosenbauer, A., Muro-Cacho, C., Sebti, S.M. & Gabrilovich, D.I. (2005). Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res*, **65,** 9525-35.

North, R.J. (1982). Cyclophosphamide-facilitated adoptive immunotherapy of an established tumor depends on elimination of tumor-induced suppressor T cells. *J Exp Med*, **155,** 1063-74.

North, R.J. & Awwad, M. (1990). Elimination of cycling CD4+ suppressor T cells with an anti-mitotic drug releases non-cycling CD8+ T cells to cause regression of an advanced lymphoma. *Immunology*, **71,** 90-5.

North, R.J. & Bursuker, I. (1984). Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *J Exp Med*, **159,** 1295-311.

North, R.J. & Dye, E.S. (1985). Ly 1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly 1-2+ effector T cells during progressive growth of the P815 mastocytoma. *Immunology*, **54,** 47-56.

Nowak, A.K., Lake, R.A., Marzo, A.L., Scott, B., Heath, W.R., Collins, E.J., Frelinger, J.A. & Robinson, B.W. (2003a). Induction of tumor cell apoptosis in vivo increases tumor antigen cross-presentation, cross-priming rather than cross-tolerizing host tumor-specific CD8 T cells. *J Immunol*, **170,** 4905-13.

Nowak, A.K., Robinson, B.W. & Lake, R.A. (2003b). Synergy between chemotherapy and immunotherapy in the treatment of established murine solid tumors. *Cancer Res*, **63,** 4490-6.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Metivier, D., Larochette, N., van Endert, P., Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2007a). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*, **13,** 54-61.

Obeid, M., Tesniere, A., Panaretakis, T., Tufi, R., Joza, N., van Endert, P., Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Chaput, N., Flament, C., Ullrich, E., de Botton, S., Zitvogel, L. & Kroemer, G. (2007b). Ecto-calreticulin in immunogenic chemotherapy. *Immunol Rev*, **220,** 22-34.

Ochoa, A.C., Zea, A.H., Hernandez, C. & Rodriguez, P.C. (2007). Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res*, **13,** 721s-726s.

Ochsenbein, A.F. (2005). Immunological ignorance of solid tumors. *Springer Semin Immunopathol*, **27,** 19-35.

Oderup, C., Cederbom, L., Makowska, A., Cilio, C.M. & Ivars, F. (2006). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*, **118,** 240-9.

O'Mahony, D., Morris, J.C., Quinn, C., Gao, W., Wilson, W.H., Gause, B., Pittaluga, S., Neelapu, S., Brown, M., Fleisher, T.A., Gulley, J.L., Schlom, J., Nussenblatt, R., Albert, P., Davis, T.A., Lowy, I., Petrus, M., Waldmann, T.A. & Janik, J.E. (2007). A

pilot study of CTLA-4 blockade after cancer vaccine failure in patients with advanced malignancy. *Clin Cancer Res*, **13,** 958-64.

Onishi, Y., Fehervari, Z., Yamaguchi, T. & Sakaguchi, S. (2008). Foxp3+ natural regulatory T cells preferentially form aggregates on dendritic cells in vitro and actively inhibit their maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105,** 10113-8.

Onizuka, S., Tawara, I., Shimizu, J., Sakaguchi, S., Fujita, T. & Nakayama, E. (1999). Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*, **59,** 3128-33.

Oppenheim, D.E., Roberts, S.J., Clarke, S.L., Filler, R., Lewis, J.M., Tigelaar, R.E., Girardi, M. & Hayday, A.C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol*, **6,** 928-37.

Pagano, M. (2004). Control of DNA synthesis and mitosis by the Skp2-p27-Cdk1/2 axis. *Mol Cell*, **14,** 414-6.

Pages, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., Meatchi, T., Bruneval, P., Cugnenc, P.H., Trajanoski, Z., Fridman, W.H. & Galon, J. (2005). Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*, **353,** 2654-66.

Pages, F., Galon, J., Dieu-Nosjean, M.C., Tartour, E., Sautes-Fridman, C. & Fridman, W.H. (2010). Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*, **29,** 1093-102.

Pages, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., Zatloukal, K., Trajanoski, Z., Berger, A., Fridman, W.H. & Galon, J. (2009). In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*, **27,** 5944-51.

Pallandre, J.R., Brillard, E., Crehange, G., Radlovic, A., Remy-Martin, J.P., Saas, P., Rohrlich, P.S., Pivot, X., Ling, X., Tiberghien, P. & Borg, C. (2007). Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol*, **179,** 7593-604.

Pan, P.Y., Wang, G.X., Yin, B., Ozao, J., Ku, T., Divino, C.M. & Chen, S.H. (2008). Reversion of immune tolerance in advanced malignancy: modulation of myeloid-derived suppressor cell development by blockade of stem-cell factor function. *Blood*, **111,** 219-28.

Pandit, R., Lathers, D.M., Beal, N.M., Garrity, T. & Young, M.R. (2000). CD34+ immune suppressive cells in the peripheral blood of patients with head and neck cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **109,** 749-54.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol*, **8,** 1353-62.

Papiernik, M., de Moraes, M.L., Pontoux, C., Vasseur, F. & Penit, C. (1998). Regulatory CD4 T cells: expression of IL-2R alpha chain, resistance to clonal deletion and IL-2 dependency. *Int Immunol*, **10,** 371-8.

Peguet-Navarro, J., Sportouch, M., Popa, I., Berthier, O., Schmitt, D. & Portoukalian, J. (2003). Gangliosides from human melanoma tumors impair dendritic cell differentiation from monocytes and induce their apoptosis. *J Immunol*, **170,** 3488-94.

Penn, I. (2000). Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf*, **23,** 101-13.

Perez, S.A., Karamouzis, M.V., Skarlos, D.V., Ardavanis, A., Sotiriadou, N.N., Iliopoulou, E.G., Salagianni, M.L., Orphanos, G., Baxevanis, C.N., Rigatos, G. & Papamichail, M. (2007). CD4+CD25+ regulatory T-cell frequency in HER-2/neu (HER)-positive

and HER-negative advanced-stage breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, **13,** 2714-21.

Phan, G.Q., Yang, J.C., Sherry, R.M., Hwu, P., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Restifo, N.P., Haworth, L.R., Seipp, C.A., Freezer, L.J., Morton, K.E., Mavroukakis, S.A., Duray, P.H., Steinberg, S.M., Allison, J.P., Davis, T.A. & Rosenberg, S.A. (2003). Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100,** 8372-7.

Picca, C.C., Larkin, J., 3rd, Boesteanu, A., Lerman, M.A., Rankin, A.L. & Caton, A.J. (2006). Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol Rev*, **212,** 74-85.

Piccirillo, C.A. & Shevach, E.M. (2001). Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*, **167,** 1137-40.

Plate, J.M., Plate, A.E., Shott, S., Bograd, S. & Harris, J.E. (2005). Effect of gemcitabine on immune cells in subjects with adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Immunol Immunother*, **54,** 915-25.

Powell, B.R., Buist, N.R. & Stenzel, P. (1982). An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr*, **100,** 731-7.

Powrie, F., Carlino, J., Leach, M.W., Mauze, S. & Coffman, R.L. (1996). A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med*, **183,** 2669-74.

Prasad, D.V., Richards, S., Mai, X.M. & Dong, C. (2003). B7S1, a novel B7 family member that negatively regulates T cell activation. *Immunity*, **18,** 863-73.

Qin, X.J., Shi, H.Z., Deng, J.M., Liang, Q.L., Jiang, J. & Ye, Z.J. (2009). CCL22 recruits CD4-positive CD25-positive regulatory T cells into malignant pleural effusion. *Clin Cancer Res*, **15,** 2231-7.

Raulet, D.H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, **3,** 781-90.

Read, S., Malmstrom, V. & Powrie, F. (2000). Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*, **192,** 295-302.

Reits, E.A., Hodge, J.W., Herberts, C.A., Groothuis, T.A., Chakraborty, M., Wansley, E.K., Camphausen, K., Luiten, R.M., de Ru, A.H., Neijssen, J., Griekspoor, A., Mesman, E., Verreck, F.A., Spits, H., Schlom, J., van Veelen, P. & Neefjes, J.J. (2006). Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J Exp Med*, **203,** 1259-71.

Rivera, M.N., Kim, W.J., Wells, J., Driscoll, D.R., Brannigan, B.W., Han, M., Kim, J.C., Feinberg, A.P., Gerald, W.L., Vargas, S.O., Chin, L., Iafrate, A.J., Bell, D.W. & Haber, D.A. (2007). An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science*, **315,** 642-5.

Rivoltini, L., Carrabba, M., Huber, V., Castelli, C., Novellino, L., Dalerba, P., Mortarini, R., Arancia, G., Anichini, A., Fais, S. & Parmiani, G. (2002). Immunity to cancer: attack and escape in T lymphocyte-tumor cell interaction. *Immunol Rev*, **188,** 97-113.

Rodriguez, P.C., Ernstoff, M.S., Hernandez, C., Atkins, M., Zabaleta, J., Sierra, R. & Ochoa, A.C. (2009). Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res*, **69,** 1553-60.

Rodriguez, P.C., Hernandez, C.P., Quiceno, D., Dubinett, S.M., Zabaleta, J., Ochoa, J.B., Gilbert, J. & Ochoa, A.C. (2005). Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med*, **202,** 931-9.

Rodriguez, P.C. & Ochoa, A.C. (2008). Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives. *Immunol Rev*, **222,** 180-91.

Rodriguez, P.C., Quiceno, D.G. & Ochoa, A.C. (2007). L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression. *Blood*, **109,** 1568-73.

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. *J Biol Chem*, **277,** 21123-9.

Ronchetti, S., Zollo, O., Bruscoli, S., Agostini, M., Bianchini, R., Nocentini, G., Ayroldi, E. & Riccardi, C. (2004). GITR, a member of the TNF receptor superfamily, is costimulatory to mouse T lymphocyte subpopulations. *Eur J Immunol*, **34,** 613-22.

Rossner, S., Voigtlander, C., Wiethe, C., Hanig, J., Seifarth, C. & Lutz, M.B. (2005). Myeloid dendritic cell precursors generated from bone marrow suppress T cell responses via cell contact and nitric oxide production in vitro. *Eur J Immunol*, **35,** 3533-44.

Roux, S., Apetoh, L., Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Puig, P.E., Lauvau, G., Zitvogel, L., Martin, F., Chauffert, B., Yagita, H., Solary, E. & Ghiringhelli, F. (2008). CD4+CD25+ Tregs control the TRAIL-dependent cytotoxicity of tumor-infiltrating DCs in rodent models of colon cancer. *J Clin Invest*, **118,** 3751-61.

Rozkova, D., Horvath, R., Bartunkova, J. & Spisek, R. (2006). Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol*, **120,** 260-71.

Rozkova, D., Tiserova, H., Fucikova, J., Last'ovicka, J., Podrazil, M., Ulcova, H., Budinsky, V., Prausova, J., Linke, Z., Minarik, I., Sediva, A., Spisek, R. & Bartunkova, J. (2009). FOCUS on FOCIS: combined chemo-immunotherapy for the treatment of hormone-refractory metastatic prostate cancer. *Clin Immunol*, **131,** 1-10.

Rutschman, R., Lang, R., Hesse, M., Ihle, J.N., Wynn, T.A. & Murray, P.J. (2001). Cutting edge: Stat6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J Immunol*, **166,** 2173-7.

Sakaguchi, S., Fukuma, K., Kuribayashi, K. & Masuda, T. (1985). Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med*, **161,** 72-87.

Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M. & Hafler, D.A. (2010). FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*, **10,** 490-500.

Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, **155,** 1151-64.

Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C. & Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J Clin Oncol*, **27,** 186-92.

Salio, M., Cella, M., Vermi, W., Facchetti, F., Palmowski, M.J., Smith, C.L., Shepherd, D., Colonna, M. & Cerundolo, V. (2003). Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. *Eur J Immunol*, **33,** 1052-62.

Salomon, B., Lenschow, D.J., Rhee, L., Ashourian, N., Singh, B., Sharpe, A. & Bluestone, J.A. (2000). B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, **12,** 431-40.

Sancho, D., Joffre, O.P., Keller, A.M., Rogers, N.C., Martinez, D., Hernanz-Falcon, P., Rosewell, I. & Reis e Sousa, C. (2009). Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity. *Nature*, **458,** 899-903.

Sataloff, D.M., Mason, B.A., Prestipino, A.J., Seinige, U.L., Lieber, C.P. & Baloch, Z. (1995). Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. *J Am Coll Surg*, **180,** 297-306.

Sato, E., Olson, S.H., Ahn, J., Bundy, B., Nishikawa, H., Qian, F., Jungbluth, A.A., Frosina, D., Gnjatic, S., Ambrosone, C., Kepner, J., Odunsi, T., Ritter, G., Lele, S., Chen, Y.T., Ohtani, H., Old, L.J. & Odunsi, K. (2005). Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102,** 18538-43.

Sauer, H., Wartenberg, M. & Hescheler, J. (2001). Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation. *Cell Physiol Biochem*, **11,** 173-86.

Schmielau, J. & Finn, O.J. (2001). Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res*, **61,** 4756-60.

Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K.A., Tan, G., Bronte, V. & Borrello, I. (2004). High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells. *Cancer Res*, **64,** 6337-43.

Serafini, P., Meckel, K., Kelso, M., Noonan, K., Califano, J., Koch, W., Dolcetti, L., Bronte, V. & Borrello, I. (2006). Phosphodiesterase-5 inhibition augments endogenous antitumor immunity by reducing myeloid-derived suppressor cell function. *J Exp Med*, **203,** 2691-702.

Serafini, P., Mgebroff, S., Noonan, K. & Borrello, I. (2008). Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells. *Cancer Res*, **68,** 5439-49.

Setoguchi, R., Hori, S., Takahashi, T. & Sakaguchi, S. (2005). Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med*, **201,** 723-35.

Seung, L.P., Rowley, D.A., Dubey, P. & Schreiber, H. (1995). Synergy between T-cell immunity and inhibition of paracrine stimulation causes tumor rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92,** 6254-8.

Sharpe, A.H., Wherry, E.J., Ahmed, R. & Freeman, G.J. (2007). The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol*, **8,** 239-45.

Sheu, B.C., Hsu, S.M., Ho, H.N., Lin, R.H., Torng, P.L. & Huang, S.C. (1999). Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. *Cancer*, **86,** 1537-43.

Shevach, E.M. (2002). CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol*, **2,** 389-400.

Shimizu, J., Yamazaki, S. & Sakaguchi, S. (1999). Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol*, **163,** 5211-8.

Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Takeuchi, O., Akira, S. & Nakanishi, Y. (2004). Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol*, **172,** 2039-47.

Shurin, G.V., Shurin, M.R., Bykovskaia, S., Shogan, J., Lotze, M.T. & Barksdale, E.M., Jr. (2001). Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res*, **61,** 363-9.

Shurin, G.V., Tourkova, I.L., Kaneno, R. & Shurin, M.R. (2009). Chemotherapeutic agents in noncytotoxic concentrations increase antigen presentation by dendritic cells via an IL-12-dependent mechanism. *J Immunol*, **183,** 137-44.

Sica, A. & Bronte, V. (2007). Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. *J Clin Invest*, **117,** 1155-66.

Sica, G.L., Choi, I.H., Zhu, G., Tamada, K., Wang, S.D., Tamura, H., Chapoval, A.I., Flies, D.B., Bajorath, J. & Chen, L. (2003). B7-H4, a molecule of the B7 family, negatively regulates T cell immunity. *Immunity*, **18,** 849-61.

Singh-Jasuja, H., Scherer, H.U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H.G., Toes, R.E. & Schild, H. (2000). The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol*, **30,** 2211-5.

Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M. & Ostrand-Rosenberg, S. (2007a). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol*, **179,** 977-83.

Sinha, P., Clements, V.K., Fulton, A.M. & Ostrand-Rosenberg, S. (2007b). Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res*, **67,** 4507-13.

Sinha, P., Clements, V.K. & Ostrand-Rosenberg, S. (2005a). Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res*, **65,** 11743-51.

Sinha, P., Clements, V.K. & Ostrand-Rosenberg, S. (2005b). Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease. *J Immunol*, **174,** 636-45.

Sinha, P., Okoro, C., Foell, D., Freeze, H.H., Ostrand-Rosenberg, S. & Srikrishna, G. (2008). Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol*, **181,** 4666-75.

Sluyter, R., Shemon, A.N. & Wiley, J.S. (2004). Glu496 to Ala polymorphism in the P2X7 receptor impairs ATP-induced IL-1 beta release from human monocytes. *J Immunol*, **172,** 3399-405.

Smyth, M.J., Dunn, G.P. & Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol*, **90,** 1-50.

Smyth, M.J., Wallace, M.E., Nutt, S.L., Yagita, H., Godfrey, D.I. & Hayakawa, Y. (2005). Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. *J Exp Med*, **201,** 1973-85.

So, T., Takenoyama, M., Mizukami, M., Ichiki, Y., Sugaya, M., Hanagiri, T., Sugio, K. & Yasumoto, K. (2005). Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res*, **65,** 5945-52.

Somasundaram, R., Jacob, L., Swoboda, R., Caputo, L., Song, H., Basak, S., Monos, D., Peritt, D., Marincola, F., Cai, D., Birebent, B., Bloome, E., Kim, J., Berencsi, K., Mastrangelo, M. & Herlyn, D. (2002). Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta. *Cancer Res*, **62,** 5267-72.

Sombroek, C.C., Stam, A.G., Masterson, A.J., Lougheed, S.M., Schakel, M.J., Meijer, C.J., Pinedo, H.M., van den Eertwegh, A.J., Scheper, R.J. & de Gruijl, T.D. (2002). Prostanoids play a major role in the primary tumor-induced inhibition of dendritic cell differentiation. *J Immunol*, **168,** 4333-43.

Song, H., Wang, R., Wang, S. & Lin, J. (2005a). A low-molecular-weight compound discovered through virtual database screening inhibits Stat3 function in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102,** 4700-5.

Song, X., Krelin, Y., Dvorkin, T., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E. & Apte, R.N. (2005b). CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. *J Immunol*, **175,** 8200-8.

Spector, N.L. & Blackwell, K.L. (2009). Understanding the mechanisms behind trastuzumab therapy for human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer. *J Clin Oncol*, **27,** 5838-47.

Srivastava, M.K., Bosch, J.J., Thompson, J.A., Ksander, B.R., Edelman, M.J. & Ostrand-Rosenberg, S. (2008). Lung cancer patients' CD4(+) T cells are activated in vitro by MHC II cell-based vaccines despite the presence of myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Immunol Immunother*, **57,** 1493-504.

Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P. & Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. *Cancer Res*, **70,** 68-77.

Stassen, M., Fondel, S., Bopp, T., Richter, C., Muller, C., Kubach, J., Becker, C., Knop, J., Enk, A.H., Schmitt, S., Schmitt, E. & Jonuleit, H. (2004). Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha 4 beta 7 or alpha 4 beta 1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol*, **34,** 1303-11.

Steitz, J., Bruck, J., Lenz, J., Knop, J. & Tuting, T. (2001). Depletion of CD25(+) CD4(+) T cells and treatment with tyrosinase-related protein 2-transduced dendritic cells enhance the interferon alpha-induced, CD8(+) T-cell-dependent immune defense of B16 melanoma. *Cancer Res*, **61,** 8643-6.

Stephens, L.A. & Mason, D. (2000). CD25 is a marker for CD4+ thymocytes that prevent autoimmune diabetes in rats, but peripheral T cells with this function are found in both CD25+ and CD25- subpopulations. *J Immunol*, **165,** 3105-10.

Stewart, T.H. & Tsai, S.C. (1993). The possible role of stromal cell stimulation in worsening the prognosis of a subset of patients with breast cancer. *Clin Exp Metastasis*, **11,** 295-305.

Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M. & Germain, R.N. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science*, **296,** 1873-6.

Sun, T., Zhou, Y., Li, H., Han, X., Shi, Y., Wang, L., Miao, X., Tan, W., Zhao, D., Zhang, X., Guo, Y. & Lin, D. (2005). FASL -844C polymorphism is associated with increased activation-induced T cell death and risk of cervical cancer. *J Exp Med*, **202,** 967-74.

Sutmuller, R.P., van Duivenvoorde, L.M., van Elsas, A., Schumacher, T.N., Wildenberg, M.E., Allison, J.P., Toes, R.E., Offringa, R. & Melief, C.J. (2001). Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med*, **194,** 823-32.

Suzuki, E., Kapoor, V., Jassar, A.S., Kaiser, L.R. & Albelda, S.M. (2005). Gemcitabine selectively eliminates splenic Gr-1+/CD11b+ myeloid suppressor cells in tumor-bearing animals and enhances antitumor immune activity. *Clin Cancer Res*, **11,** 6713-21.

Suzuki, H., Kundig, T.M., Furlonger, C., Wakeham, A., Timms, E., Matsuyama, T., Schmits, R., Simard, J.J., Ohashi, P.S., Griesser, H. & et al. (1995). Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science*, **268,** 1472-6.

Szuster-Ciesielska, A., Hryciuk-Umer, E., Stepulak, A., Kupisz, K. & Kandefer-Szerszen, M. (2004). Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol*, **43,** 252-8.

Taams, L.S. & Akbar, A.N. (2005). Peripheral generation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol*, **293,** 115-31.

Tai, X., Cowan, M., Feigenbaum, L. & Singer, A. (2005). CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol*, **6,** 152-62.

Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W. & Sakaguchi, S. (2000). Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med*, **192,** 303-10.

Takeda, K., Smyth, M.J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H. & Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med*, **195,** 161-9.

Takeshima, T., Chamoto, K., Wakita, D., Ohkuri, T., Togashi, Y., Shirato, H., Kitamura, H. & Nishimura, T. (2010). Local radiation therapy inhibits tumor growth through the generation of tumor-specific CTL: its potentiation by combination with Th1 cell therapy. *Cancer Res*, **70,** 2697-706.

Talmadge, J.E., Hood, K.C., Zobel, L.C., Shafer, L.R., Coles, M. & Toth, B. (2007). Chemoprevention by cyclooxygenase-2 inhibition reduces immature myeloid suppressor cell expansion. *Int Immunopharmacol*, **7,** 140-51.

Tanaka, F., Yamaguchi, H., Ohta, M., Mashino, K., Sonoda, H., Sadanaga, N., Inoue, H. & Mori, M. (2002a). Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo. *Int J Cancer*, **101,** 265-9.

Tanaka, H., Matsushima, H., Nishibu, A., Clausen, B.E. & Takashima, A. (2009). Dual therapeutic efficacy of vinblastine as a unique chemotherapeutic agent capable of inducing dendritic cell maturation. *Cancer Res*, **69,** 6987-94.

Tanaka, H., Tanaka, J., Kjaergaard, J. & Shu, S. (2002b). Depletion of CD4+ CD25+ regulatory cells augments the generation of specific immune T cells in tumor-draining lymph nodes. *J Immunother*, **25,** 207-17.

Tang, Q., Smith, J.A., Szot, G.L., Zhou, P., Alegre, M.L., Henriksen, K.J., Thompson, C.B. & Bluestone, J.A. (2003). CD28/B7 regulation of anti-CD3-mediated immunosuppression in vivo. *J Immunol*, **170,** 1510-6.

Tarbell, K.V., Yamazaki, S., Olson, K., Toy, P. & Steinman, R.M. (2004). CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med*, **199,** 1467-77.

Terabe, M. & Berzofsky, J.A. (2004). Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Curr Opin Immunol*, **16,** 157-62.

Terabe, M., Matsui, S., Park, J.M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D.D., Chen, W., Wahl, S.M., Ledbetter, S., Pratt, B., Letterio, J.J., Paul, W.E. & Berzofsky, J.A. (2003). Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med*, **198,** 1741-52.

Terness, P., Bauer, T.M., Rose, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H. & Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med*, **196,** 447-57.

Tesniere, A., Schlemmer, F., Boige, V., Kepp, O., Martins, I., Ghiringhelli, F., Aymeric, L., Michaud, M., Apetoh, L., Barault, L., Mendiboure, J., Pignon, J.P., Jooste, V., van Endert, P., Ducreux, M., Zitvogel, L., Piard, F. & Kroemer, G. (2010). Immunogenic death of colon cancer cells treated with oxaliplatin. *Oncogene*, **29,** 482-91.

Thornton, A.M., Piccirillo, C.A. & Shevach, E.M. (2004). Activation requirements for the induction of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *Eur J Immunol*, **34,** 366-76.

Thornton, A.M. & Shevach, E.M. (1998). CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, **188,** 287-96.

Thornton, A.M. & Shevach, E.M. (2000). Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, **164,** 183-90.

Tiemessen, M.M., Mitchell, T.J., Hendry, L., Whittaker, S.J., Taams, L.S. & John, S. (2006). Lack of suppressive CD4+CD25+FOXP3+ T cells in advanced stages of primary cutaneous T-cell lymphoma. *J Invest Dermatol*, **126,** 2217-23.

Toda, A. & Piccirillo, C.A. (2006). Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol*, **80,** 458-70.

Troy, A., Davidson, P., Atkinson, C. & Hart, D. (1998). Phenotypic characterisation of the dendritic cell infiltrate in prostate cancer. *J Urol*, **160,** 214-9.

Tsan, M.F. & Gao, B. (2009). Heat shock proteins and immune system. *J Leukoc Biol*, **85,** 905-10.

Tu, S., Bhagat, G., Cui, G., Takaishi, S., Kurt-Jones, E.A., Rickman, B., Betz, K.S., Penz-Oesterreicher, M., Bjorkdahl, O., Fox, J.G. & Wang, T.C. (2008). Overexpression of interleukin-1beta induces gastric inflammation and cancer and mobilizes myeloid-derived suppressor cells in mice. *Cancer Cell*, **14,** 408-19.

Turk, M.J., Guevara-Patino, J.A., Rizzuto, G.A., Engelhorn, M.E., Sakaguchi, S. & Houghton, A.N. (2004). Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. *J Exp Med*, **200,** 771-82.

Turovskaya, O., Foell, D., Sinha, P., Vogl, T., Newlin, R., Nayak, J., Nguyen, M., Olsson, A., Nawroth, P.P., Bierhaus, A., Varki, N., Kronenberg, M., Freeze, H.H. & Srikrishna, G. (2008). RAGE, carboxylated glycans and S100A8/A9 play essential roles in colitis-associated carcinogenesis. *Carcinogenesis*, **29,** 2035-43.

Ugel, S., Delpozzo, F., Desantis, G., Papalini, F., Simonato, F., Sonda, N., Zilio, S. & Bronte, V. (2009). Therapeutic targeting of myeloid-derived suppressor cells. *Curr Opin Pharmacol*, **9,** 470-81.

Umemura, N., Saio, M., Suwa, T., Kitoh, Y., Bai, J., Nonaka, K., Ouyang, G.F., Okada, M., Balazs, M., Adany, R., Shibata, T. & Takami, T. (2008). Tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells are pleiotropic-inflamed monocytes/macrophages that bear M1- and M2-type characteristics. *J Leukoc Biol*, **83,** 1136-44.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T. & Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*, **9,** 1269-74.

Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Pilla, L., Sovena, G., Villa, A., Corbelli, A., Fais, S., Parmiani, G. & Rivoltini, L. (2006). Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res*, **66,** 9290-8.

Valzasina, B., Piconese, S., Guiducci, C. & Colombo, M.P. (2006). Tumor-induced expansion of regulatory T cells by conversion of CD4+CD25- lymphocytes is thymus and proliferation independent. *Cancer Res*, **66,** 4488-95.

Varchetta, S., Gibelli, N., Oliviero, B., Nardini, E., Gennari, R., Gatti, G., Silva, L.S., Villani, L., Tagliabue, E., Menard, S., Costa, A. & Fagnoni, F.F. (2007). Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2. *Cancer Res*, **67,** 11991-9.

Vence, L., Palucka, A.K., Fay, J.W., Ito, T., Liu, Y.J., Banchereau, J. & Ueno, H. (2007). Circulating tumor antigen-specific regulatory T cells in patients with metastatic melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104,** 20884-9.

Vickers, S.M., MacMillan-Crow, L.A., Green, M., Ellis, C. & Thompson, J.A. (1999). Association of increased immunostaining for inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine with fibroblast growth factor transformation in pancreatic cancer. *Arch Surg*, **134,** 245-51.

Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rebe, C. & Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res*, **70,** 3052-61.

Von Roenn, J., Harris, J.E. & Braun, D.P. (1987). Suppressor cell function in solid tumor cancer patients. *J Clin Oncol*, **5,** 150-9.

Voronov, E., Shouval, D.S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C.A. & Apte, R.N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100,** 2645-50.

Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J.E., Fletcher, J.M., McQuaid, A., Masters, J.E., Rustin, M.H., Taams, L.S., Beverley, P.C., Macallan, D.C. & Akbar, A.N. (2006). Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J Clin Invest*, **116,** 2423-33.

Walker, L.S., Chodos, A., Eggena, M., Dooms, H. & Abbas, A.K. (2003). Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J Exp Med*, **198,** 249-58.

Walkley, C.R., Yuan, Y.D., Chandraratna, R.A. & McArthur, G.A. (2002). Retinoic acid receptor antagonism in vivo expands the numbers of precursor cells during granulopoiesis. *Leukemia*, **16,** 1763-72.

Wan, Y.Y. & Flavell, R.A. (2007). 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*, **220,** 199-213.

Wang, D. & DuBois, R.N. (2008). Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. *Cancer Lett*, **267,** 197-203.

Wang, L., Liu, R., Li, W., Chen, C., Katoh, H., Chen, G.Y., McNally, B., Lin, L., Zhou, P., Zuo, T., Cooney, K.A., Liu, Y. & Zheng, P. (2009). Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate. *Cancer Cell*, **16,** 336-46.

Waris, G. & Ahsan, H. (2006). Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog*, **5,** 14.

Watanabe, S., Deguchi, K., Zheng, R., Tamai, H., Wang, L.X., Cohen, P.A. & Shu, S. (2008). Tumor-induced CD11b+Gr-1+ myeloid cells suppress T cell sensitization in tumor-draining lymph nodes. *J Immunol*, **181,** 3291-300.

Weinblatt, M.E., Coblyn, J.S., Fox, D.A., Fraser, P.A., Holdsworth, D.E., Glass, D.N. & Trentham, D.E. (1985). Efficacy of low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, **312,** 818-22.

Weiner, H.L. & Cohen, J.A. (2002). Treatment of multiple sclerosis with cyclophosphamide: critical review of clinical and immunologic effects. *Mult Scler*, **8,** 142-54.

Weng, W.K. & Levy, R. (2003). Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*, **21,** 3940-7.

Wildin, R.S., Ramsdell, F., Peake, J., Faravelli, F., Casanova, J.L., Buist, N., Levy-Lahad, E., Mazzella, M., Goulet, O., Perroni, L., Bricarelli, F.D., Byrne, G., McEuen, M., Proll, S., Appleby, M. & Brunkow, M.E. (2001). X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*, **27,** 18-20.

Willimsky, G. & Blankenstein, T. (2005). Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature*, **437,** 141-6.

Willimsky, G., Czeh, M., Loddenkemper, C., Gellermann, J., Schmidt, K., Wust, P., Stein, H. & Blankenstein, T. (2008). Immunogenicity of premalignant lesions is the primary cause of general cytotoxic T lymphocyte unresponsiveness. *J Exp Med*, **205,** 1687-700.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T. & Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*, **322,** 271-5.

Wolfers, J., Lozier, A., Raposo, G., Regnault, A., Thery, C., Masurier, C., Flament, C., Pouzieux, S., Faure, F., Tursz, T., Angevin, E., Amigorena, S. & Zitvogel, L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med*, **7,** 297-303.

Workman, C.J. & Vignali, D.A. (2005). Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223). *J Immunol*, **174,** 688-95.

Wu, Y., Borde, M., Heissmeyer, V., Feuerer, M., Lapan, A.D., Stroud, J.C., Bates, D.L., Guo, L., Han, A., Ziegler, S.F., Mathis, D., Benoist, C., Chen, L. & Rao, A. (2006). FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell*, **126,** 375-87.

Xiang, X., Poliakov, A., Liu, C., Liu, Y., Deng, Z.B., Wang, J., Cheng, Z., Shah, S.V., Wang, G.J., Zhang, L., Grizzle, W.E., Mobley, J. & Zhang, H.G. (2009). Induction of myeloid-derived suppressor cells by tumor exosomes. *Int J Cancer*, **124,** 2621-33.

Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K. & Steinman, R.M. (2003). Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*, **198,** 235-47.

Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A.E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D.P., Matrisian, L.M., Richmond, A., Lin, P.C. & Moses, H.L. (2008). Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. *Cancer Cell*, **13,** 23-35.

Yang, R., Cai, Z., Zhang, Y., Yutzy, W.H.t., Roby, K.F. & Roden, R.B. (2006). CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells. *Cancer Res*, **66,** 6807-15.

Yang, Z.Z., Novak, A.J., Ziesmer, S.C., Witzig, T.E. & Ansell, S.M. (2007). CD70+ non-Hodgkin lymphoma B cells induce Foxp3 expression and regulatory function in intratumoral CD4+CD25 T cells. *Blood*, **110,** 2537-44.

Youn, J.I., Nagaraj, S., Collazo, M. & Gabrilovich, D.I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*, **181,** 5791-802.

Young, M.R., Newby, M. & Wepsic, H.T. (1987). Hematopoiesis and suppressor bone marrow cells in mice bearing large metastatic Lewis lung carcinoma tumors. *Cancer Res*, **47,** 100-5.

Yu, H., Pardoll, D. & Jove, R. (2009). STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer*, **9,** 798-809.

Zang, X., Loke, P., Kim, J., Murphy, K., Waitz, R. & Allison, J.P. (2003). B7x: a widely expressed B7 family member that inhibits T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100,** 10388-92.

Zea, A.H., Rodriguez, P.C., Atkins, M.B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., Mier, J. & Ochoa, A.C. (2005). Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*, **65,** 3044-8.

Zhang, H., Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A.D., Li, H.S., Murray, P.J. & Watowich, S.S. (2010). STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood*, **116,** 2462-71.

Zhao, D.M., Thornton, A.M., DiPaolo, R.J. & Shevach, E.M. (2006). Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes. *Blood*, **107,** 3925-32.

Zhao, J., Cao, Y., Lei, Z., Yang, Z., Zhang, B. & Huang, B. (2010). Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer Res*, **70,** 4850-8.

Zhou, G., Lu, Z., McCadden, J.D., Levitsky, H.I. & Marson, A.L. (2004). Reciprocal changes in tumor antigenicity and antigen-specific T cell function during tumor progression. *J Exp Med*, **200,** 1581-92.

Zhou, H., Luo, Y., Lo, J.F., Kaplan, C.D., Mizutani, M., Mizutani, N., Lee, J.D., Primus, F.J., Becker, J.C., Xiang, R. & Reisfeld, R.A. (2005). DNA-based vaccines activate innate and adaptive antitumor immunity by engaging the NKG2D receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102,** 10846-51.

Zhu, B., Bando, Y., Xiao, S., Yang, K., Anderson, A.C., Kuchroo, V.K. & Khoury, S.J. (2007). CD11b+Ly-6C(hi) suppressive monocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, **179,** 5228-37.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F. & Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, **8,** 59-73.

Zitvogel, L., Casares, N., Pequignot, M.O., Chaput, N., Albert, M.L. & Kroemer, G. (2004). Immune response against dying tumor cells. *Adv Immunol*, **84,** 131-79.

Zitvogel, L., Tesniere, A. & Kroemer, G. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*, **6,** 715-27.

Zou, W. (2005). Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*, **5,** 263-74.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A., Pustilnik, T., Curiel, D.T., Galanaud, P., Capron, F., Emilie, D. & Curiel, T.J. (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nat Med*, **7,** 1339-46.

Zuo, T., Liu, R., Zhang, H., Chang, X., Liu, Y., Wang, L. & Zheng, P. (2007a). FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2. *J Clin Invest*, **117,** 3765-73.

Zuo, T., Wang, L., Morrison, C., Chang, X., Zhang, H., Li, W., Liu, Y., Wang, Y., Liu, X., Chan, M.W., Liu, J.Q., Love, R., Liu, C.G., Godfrey, V., Shen, R., Huang, T.H., Yang, T., Park, B.K., Wang, C.Y. & Zheng, P. (2007b). FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene. *Cell*, **129,** 1275-86.

TITRE : Aspects fonctionnels et pronostiques des cellules myéloides suppressives et de Foxp3 dans le cancer.

AUTEUR : Sylvain LADOIRE

RESUME :
L'échappement des cellules tumorales au processus d'immunosurveillance semble être une condition nécessaire au développement tumoral dans les modèles précliniques, comme chez l'homme. Les mécanismes par lesquels la tumeur parvient à médier une immunosubvertion sont multiples et font intervenir la plupart des cellules du système immunitaire, au sein desquelles, les cellules immunorégulatrices telles les cellules myéloides suppressives (MDSCs) ou les lymphocytes T régulateurs (Tregs, exprimant le facteur de transcription Foxp3), semblent jouer un rôle prépondérant. Les résultats présentés dans ce travail visent à mieux comprendre les rôles fonctionnels et pronostics des cellules myéloïdes suppressives et des Tregs dans le cancer, avec une attention plus particulière sur la façon dont ces cellules peuvent être modulées par la chimiothérapie.
Concernant les MDSCs, nos travaux ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires présidant à leur accumulation d'une part, et d'autre part à l'acquisition de leur propriétés immunosuppressives, à travers une voie de signalisation impliquant les exosomes d'origine tumorale. Cette découverte, et la propriété d'une molécule d'usage thérapeutique courant, l'amiloride, de diminuer la production d'exosomes, y compris par les cellules tumorales, offrent une nouvelle possibilité de ciblage pharmacologique des MDSCs. Par ailleurs, l'étude des effets cytotoxiques sur les MDSCs de plusieurs molécules de chimiothérapie nous a permis de montrer que le 5-fluorouracile, probablement en raison d'un faible niveau d'expression de sa cible, la thymidilate synthase, dans les MDSCs, possédait une capacité sélective à éliminer ces cellules.
Nos travaux d'immunohistochimie conduits sur des prélèvements tumoraux issus de patientes porteuses de cancers du sein localisés traitées par chimiothérapie néoadjuvante ont quand à eux permis de démontrer que la chimiothérapie néoadjuvante s'accompagne de modifications qualitatives de l'infiltration tumorale à la fois en lymphocytes T CD8+ et en lymphocytes T régulateurs Foxp3+. L'existence, après chimiothérapie néoadjuvante, d'une balance favorable de la réponse immunitaire, associant forte infiltration en CD8+ et faible infiltration en Foxp3+ s'accompagne d'une augmentation significative des marqueurs de cytotoxicité à médiation cellulaire, et est significativement corrélée à une éradication complète des cellules tumorales. Cette signature immunologique favorable se traduit également à long terme par une meilleure survie sans récidive et une meilleure survie globale, indépendamment du type de chimiothérapie reçue, de l'obtention ou non d'une réponse complète histologique, et du sous type moléculaire de cancer du sein. La combinaison de cette information immunologique avec la connaissance de la taille du résidu tumoral après traitement permet de considérablement affiner le pronostic des patientes.
Enfin, nos travaux préliminaires semblent montrer que l'expression de Foxp3 dans les cellules cancéreuses de tumeurs du sein HER2+++ constitue un facteur de bon pronostic.
Ces résultats illustrent donc l'importance non pas seulement des caractéristiques tumorales, mais aussi des caractéristiques de l'hôte, en particulier de la réponse immunitaire qu'il est capable de susciter, et de l'influence de la chimiothérapie sur cette dernière.

MOTS CLES : Cellules myéloides suppressives – Foxp3 – Lymphocytes T régulateurs – Cancer.

LABORATOIRE D'ACCUEIL : UFR Médecine-Pharmacie de Dijon, Equipe INSERM Avenir. Centre de Recherche INSERM 866. 7, Boulevard Jeanne d'Arc, 21000 Dijon.