

**THÈSE DE DOCTORAT DE L'ÉTABLISSEMENT UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ
PRÉPARÉE AU LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE ET IMMUNOTHÉRAPIE DES CANCERS**

École doctorale n°554

Environnements - Santé

Doctorat en Sciences de la Vie

Spécialité Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par

Silvia Ottavia GHIONE

**NOUVELLES STRATEGIES THÉRAPEUTIQUES ANTITUMORALES :
IMPACT D'UN INHIBITEUR DE KINASES DANS LE CANCER
COLORECTAL ET DU GLYCERYL TRINITRATE DANS LE CANCER DU
SEIN TRIPLE NÉGATIF**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 1^{er} Février 2022

Composition du Jury :

Président : Dr. Anne CAIGNARD

Dr. Anne CAIGNARD

Pr. Bruno SÉGUI

Dr. Fathia MAMI-CHOUAIB

Dr. Mickaël RIALLAND

Dr. Stéphanie PLENCHETTE

Pr. Ali BETTAIEB

DR2 INSERM - IRSL

DE - CRCT

DR1 INSERM - IGR

MC - LNC

MC - EPHE

DE - EPHE

Rapportrice

Rapporteur

Examinatrice

Examineur

Co-directrice de thèse

Directeur de thèse

*« Avoir des objectifs est non seulement nécessaire pour nous motiver, mais c'est
essentiel pour que nous restions en vie »*

Robert H. Schuller

...à Oscar

Remerciements

Je remercie les membres du jury, qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Au Dr. **Anne CAIGNARD** et au Pr. **Bruno SEGUI** pour avoir accepté d'évaluer mes travaux en tant que rapporteurs. Aux examinateurs, le Dr. **Fathia MAMI-CHOUAIB** et le Dr. **Mickaël RIALLAND**.

Merci au Pr. **Bruno CANQUE** et au Pr. **François GHIRINGHELLI** pour avoir suivi l'avancement de mes travaux durant ces années, en me donnant vos précieux conseils qui ont été importants pour l'avancement de mon projet.

Au Pr. **Ali BETTAIEB**, merci de m'avoir accueillie dans votre équipe et m'avoir encadré durant ces années. D'abord en M2, puis en thèse, nous avons fait un bout de chemin ensemble. Merci pour vos enseignements, vos conseils, votre bienveillance.

Au Dr. **Stéphanie PLENCHETTE**. Stéph, tu as été la première à avoir cru en moi en M1, pour mon tout premier stage de recherche en France. Merci de m'avoir donné cette chance et merci d'avoir accepté de continuer mon encadrement jusqu'à ma thèse. Merci pour tous les conseils, le support moral quand tout ne marchait pas comme il fallait. Tu as toujours été là pour me soutenir, non seulement du côté « pro » mais également pour le « perso », et pour ça je te remercie.

Au Pr. **Catherine PAUL**. Catherine, tu as toujours été d'une grande aide scientifique et morale, toujours pleine de bons conseils, que ce soit pour les expériences *in vivo* ou du côté personnel. Merci d'avoir été là pendant toute cette période et pour toutes les fois où tu m'as remonté le moral quand ça n'allait pas.

Au Dr. **Véronique LAURENS**. Merci Véro pour tes conseils durant ces années et pour ta disponibilité à n'importe quel moment pour toutes mes questions « immuno ».

A tous les membres de l'équipe LIIC avec qui j'ai pu interagir durant ces années : **Cindy, Nesrine, Emma, Mélina, Malorie, Aurélie, Mallaury**. Merci pour tous les moments passés ensemble.

Cindy, bien plus qu'une collègue, une amie. Merci pour le temps passé ensemble, les conseils aussi bien sur le plan scientifique que personnel. Tu as été là pendant la période la plus compliquée de ma thèse, et tu as su me remonter le moral et me guider. Tu as été une

confidente, tu vas beaucoup me manquer au quotidien mais nos aventures ne s'arrêtent pas là.

Nesrine, même si tu es déjà partie, tu as été là quasiment tout au long de ma thèse, nous sommes arrivées au labo avec une année de décalage et nous en avons vécu des aventures. Entre les « diff », les stats foirées, les marqueurs effaçables à l'eau et les « enguelades » (je crois que Cindy se souvient encore de la dernière fois dans le box), nous avons bien rigolé. Merci d'avoir été là.

Emma, ma stagiaire préférée. Le H89 nous a fait connaître, et tu as été la meilleure des stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, impossible de te remplacer. Merci « tata » pour ton support moral, les petites soirées, le super morbier et le vin du Jura.

Mélina, tu viens d'arriver mais tu viens de me filer un coup de main énorme (tu sais pourquoi) et j'apprécie énormément. Dommage que notre temps ensemble soit si court, je vais te laisser ma petite Cindy, prend en bien soin.

Malorie, on a commencé ensemble, et on termine « presque » ensemble. Merci pour les bons moments, les conseils « ordi » et les rigolades.

A tous les membres de l'U-1231, de la **plateforme de cytométrie** et de **l'animalerie** que j'ai croisés durant toutes ces années, avec qui j'ai pu échanger, qui m'ont donné des bons conseils. Ils se reconnaîtront, MERCI.

Merci à tous les collaborateurs de ces projets : **Lotfi CHOUCANE**, **Shan JINGXUAN**, **Caroline TRUNTZER** et **Elise BALLOT** pour le RNAseq, ainsi que **Valentin DERANGERE** pour les analyses IHC.

A ma famille et tous mes proches,

Merci à **mes parents** de m'avoir supporté durant toutes ces années. Au début de près, ensuite de loin, vous avez toujours été là pour m'épauler, m'écouter. Merci pour votre amour inconditionnel et sans frontières, merci d'avoir accepté mes choix et de les avoir soutenus. J'espère que vous êtes fiers de moi aujourd'hui.

Merci à **Adrien**, ma moitié. Merci d'avoir été là, de m'avoir écoutée, soutenue. Tu as été parfois dur, mais sans toi je ne serais pas là. Nous en avons vécu de choses ensemble,

certaines heureuses, d'autres difficiles, mais notre petite famille est plus forte que tout et nous avons encore beaucoup de chemin à parcourir ensemble.

Merci à mes cousins, **Nicolò, Ines, Vanni**. Vous êtes comme mes frères, merci d'avoir toujours été là.

Merci à **mes oncles et tantes**, et **mes grands-parents**. Certains ne sont plus là, mais vous avez tous été d'une aide inestimable pendant ce parcours.

Merci à **ma belle-famille**, de m'avoir accueillie et soutenue durant ce parcours et pendant toutes ces années. Cela aurait été beaucoup moins facile sans vous.

En dernier, mais pas moins important, **Oscar**. Mon fils, merci d'être arrivé dans ma vie et d'avoir été le moteur de ce parcours. Souvent on me disait que tu aurais été un obstacle, qu'avec toi tout aurait été plus difficile. Au contraire, tu as été mon moteur, tu m'as donné la force de m'accrocher quand j'étais prête à tout laisser tomber. Tout cela, je l'ai fait pour toi.

TABLE DES MATIERES

Liste des figures et des tableaux.....	1
Liste des abréviations.....	2
RÉSUMÉ.....	6
ABSTRACT.....	7
AVANT-PROPOS.....	8
INTRODUCTION GÉNÉRALE	10
1. Le cancer.....	10
1.1 Maintien des signaux de croissance et insensibilité aux signaux anti-prolifératifs	12
1.2 Résistance à la mort cellulaire par apoptose	13
1.3 Capacité répliquative indéfinie	14
1.4 Instabilité génomique	14
1.5 Dérégulation du métabolisme énergétique	15
1.6 Induction de l'angiogenèse	16
1.7 Invasion et métastases.....	16
1.8 Inflammation	18
1.8.1 Les cytokines impliquées dans le développement tumoral.....	21
1.8.1.1 Le TNF α	21
1.8.1.2 Le TGF- β	21
1.8.1.3 L'IL-6	22
1.8.1.4 L'IL-10	22
1.9 Echappement à la surveillance du système immunitaire.....	23
1.9.1 Le rôle des LT dans l'immunoédition	26
1.9.2 Les LT CD8+ cytotoxiques	27
1.9.3 Les LT CD4 helper.....	31
1.9.3.1 Les Th1 et les Th2	32
1.9.3.2 Les Treg.....	33
1.9.4 L'épuisement des LT CD8 ⁺ dans le MET	35
1.9.4.1 Petites molécules immunosuppressives et épuisement des LT CD8 ⁺	35
1.9.4.2 Les points de contrôle immunitaires (PCIs).	36
1.9.5 L'immunothérapie des cancers : restaurer une réponse immunitaire efficace.....	39
1.9.5.1 La stimulation non-spécifique du système immunitaire	39
1.9.5.2 Le transfert adoptif de cellules	40
1.9.5.3 Les vaccins à CD.....	41
1.9.5.4 L'inhibition des points de contrôle immunitaires	41

OBJECTIFS DE LA THÈSE.....	44
PARTIE 1 : NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER	
COLORECTAL : POTENTIEL IMMUNOMODULATEUR D'UN INHIBITEUR DE KINASES.....	45
1. LE CANCER COLORECTAL	46
1.1 Epidémiologie et classification	46
1.2 Les traitements du cancer colorectal.....	49
1.2.1 La chimiothérapie systémique.....	49
1.2.2 Les thérapies ciblées	52
1.2.2.1 Bloquer les voies de signalisation de l'EGFR et du VEGFR	52
1.2.2.2 Les inhibiteurs des PCIs	54
1.2.2.3 Autres stratégies thérapeutiques.....	56
2. Les inhibiteurs de kinases en thérapie anti-cancéreuse.....	57
2.1 L'imatinib.....	58
2.2 Les inhibiteurs de l'EGFR et du VEGFR	59
2.3 L'inhibition de BRAF V600E	60
2.4 Limites des inhibiteurs de kinases : le développement de résistances.....	60
3. Le H89, une petite molécule inhibitrice de kinases et son potentiel anti-cancéreux.....	62
3.1 Structure	62
3.2 Fonctions.....	63
3.3 H89 et cancer.....	64
RATIONNEL DE L'ETUDE	67
ARTICLE 1: « Protein kinase inhibitor-mediated immunoprophylactic and immunotherapeutic control of colon cancer ».....	68
DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	98
PARTIE 2 : NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LE CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF :	
ROLE DU GLYCERYL TRINITRATE DANS LA MODULATION DE LA VOIE DE LA CYTOKINE IL-6	108
1. Le cancer du sein	109
1.1 Epidémiologie et classification	109
1.2 Le cancer du sein triple négatif (CSTN)	110
1.2.1 Définition.....	110
1.2.2 Traitement.....	111
1.2.2.1 La chimiothérapie systémique	111
1.2.2.2 Autres stratégies thérapeutiques à l'essai.....	113
a. Les inhibiteurs de PARP.....	113
b. Les inhibiteurs du VEGF	114
c. Les inhibiteurs de l'EGFR	114
d. Les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt.....	114

e.	Les « Antibody-Drug Conjugate » ou ADC	116
2.	La voie de la cytokine IL-6	116
2.1	La cytokine IL-6 et son récepteur	116
2.2	La voie IL-6/JAK2/STAT3	119
2.2.1	Les protéines JAK2 et STAT3	119
2.2.2	L'activation de la voie	120
2.3	Les inhibiteurs de la voie JAK/STAT en thérapie anti-cancéreuse	121
2.3.1	Les inhibiteurs de l'IL-6 et son récepteur	121
2.3.2	Les inhibiteurs de JAK2	122
2.3.3	Les inhibiteurs de STAT3	122
3.	Le monoxyde d'azote (NO•) et son potentiel anti-cancéreux	123
3.1	Généralités	123
3.2	Les donneurs de NO•	124
3.3	Le rôle du NO• dans le cancer	125
3.3.1	Les modifications post-traductionnelles induites par le NO• dans le cancer	126
3.3.1.1	La nitration	126
3.3.1.2	La nitrosylation	127
a.	La S-nitrosylation	127
▪	S-nitrosylation et régulation des voies de prolifération cellulaire	128
▪	S-nitrosylation et mort cellulaire	129
3.3.1.3	Utilisation du GTN en thérapie anti-cancéreuse	130
	RATIONNEL DE L'ETUDE	131
	ARTICLE 2: « Nitric Oxide-Releasing Drug Glyceryl Trinitrate Targets JAK2/STAT3 Signaling, Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells »	133
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	155
	CONCLUSION GÉNÉRALE	160
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	162
	ANNEXES	187

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

FIGURE 1. LES DIX CARACTERISTIQUES DES CELLULES CANCEREUSES.....	11
FIGURE 2. LIEN ENTRE INFLAMMATION CHRONIQUE ET CANCER.....	20
FIGURE 3. LES TROIS PHASES DE L'IMMUNOEDITION.....	25
FIGURE 4. LES DIFFERENTES VOIES D'ACTIVATION DES LT CD8+ PAR LES CD	28
FIGURE 5. ACTION DES LT CD8+ ACTIVES SUR LES CELLULES TUMORALES.....	29
FIGURE 6. EXPRESSION DES PCIS ET LEURS LIGANDS.....	38
FIGURE 7. STADES DU CANCER COLORECTAL SELON LA CLASSIFICATION DE L'UICC, ET CORRESPONDANCE AVEC LA CLASSIFICATION TNM	48
FIGURE 8. MECANISMES D'ACTION DES PRINCIPAUX TRAITEMENTS SYSTEMIQUES DU CANCER COLORECTAL.....	51
FIGURE 9. MECANISME D'ACTION DU BEVACIZUMAB, DU CETUXIMAB ET DU REGORAFENIB.	53
FIGURE 10. MODE D'ACTION DE PEMBROLIZUMAB ET NIVOLUMAB DANS LA VOIE PD-1/PD- L1	55
FIGURE 11. MECANISME D'ACTION DE L'IMATINIB (STI-571).	58
FIGURE 12. MECANISME D'ACTIVATION DE LA PKA.	62
FIGURE 13. COMPARAISON DE LA STRUCTURE DU H89 A CELLE DE L'ATP.	63
FIGURE 14. SCHEMA RECAPITULATIF DU ROLE DU H89 DANS LE CANCER.	66
FIGURE 15. SCHEMA SIMPLIFIE DE L'ANATOMIE DU SEIN ET DU CANAL LACTIFERE.....	110
FIGURE 16. INHIBITEURS DE LA VOIE PI3K/AKT ET DE L'EGFR DANS LE CSTN	115
FIGURE 17. ACTIVATION DE LA VOIE DE L'IL-6.....	118
FIGURE 18. LES DOMAINES DES PROTEINES JAK2 ET STAT3	120
 TABLEAU 1. DETAIL DE LA CLASSIFICATION ANATOMIQUE TNM POUR LES CARCINOMES COLIQUES.....	 48

LISTE DES ABREVIATIONS

5-FdUDP : 5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-diphosphate

5-FdUMP : 5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate

5-FdUTP : 5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate

5-FU 5-Fluorouracile

ADC : Antibody-Drug Conjugates

ADCC : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

ADCP : Antibody-Dependent Cell-mediated Phagocytosis

ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

ADN : Acide Désoxyribonucléique

APC : Adenomatous Polyposis Coli

ARN : Acide Ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : Adénosine Triphosphate

Bad : Bcl-2-associated death promoter

BCG : Bacille de Calmette-Guérin

Bcl-2 : B cell lymphoma-2

Bcr-Abl : Breakpoint cluster region – Abelson

BH4 : Tetrahydrobioptérine

BRCA1/2 : Breast Cancer 1/2

BTLA : B- and T-Lymphocyte Attenuator

CAF : Cancer-Associated Fibroblasts

CAR-T : Chimeric Antigenic Receptor-T

CCL2/22 : Chemokine Ligand 2/22

CCR8 : C-C Motif Chemokine Receptor 8

CD : Cellules Dendritiques

CD4/8/25/28/40/63/126/155 : Cluster de Différenciation 4/8/25/28/40/63/126/155

CDC : Complement-Dependent Cytotoxicity

CEA : Carcino-Embryonnaire Antigen

ciAP1 : cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CSF1 : Colony Stimulating Factor 1

CSTN : Cancer du Sein Triple Négatif

CTD-RR : Cancer de la Thyroïde Différencié Réfractaire à l'iode Radioactif

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocytes-Associated protein 4

CXCL1/2/3/10 : C-X-C motif chemokine Ligand 1/2/3/10

dMMR : Deficient mismatch repair

DPD : Dihydropyrimidine Déshydrogénase

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

eNOS : NOS endothéliale

ERK1/2 : Extracellular signal Regulated Kinases 1/2

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FMN : Flavine Mononucléotide

FasL : Fas Ligand

FDA : Food and Drug Administration

FERM : 4.1 protein ezrin/radixin/moesin

FOLFIRI : Acide Folinique, 5-FU, Irinotecan

FOLFOX : Acide Folinique, 5-FU, Oxaliplatine

FOX : 5-Fluorouracile, Oxaliplatine

FoxP3 : Forkhead box P3

FT : Facteurs de Transcription

Fv : Fragment variable

GATA3 : GATA Binding Protein 3

GDN : 1,2-Glycéryldinitrate

GLP-1R : Glucagon Like Peptide 1 Receptor

GM-CS : Granulocytes-Macrophage Colony-Stimulating Factor

GMPc : Guanosine Monophosphate cyclique

Gp80/130 : Glycoprotein 80/130

GSH : Gluthation

GTN : Glyceryl Trinitrate

GTP : Guanosine Triphosphate

H89 : N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide

HCC : Hepatocellular Carcinoma

HepG2 : Cellules de carcinome hépatocellulaire

HER-2 : Human Epidermal growth factor Receptor-2

HPV : Human Papillomavirus

HVEM : Herpes Virus Entry Mediator

IAP : Inhibitors of Apoptosis

iDO : indoléamine 2,3-Dioxygénase

IFN γ : Interféron gamma

IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor

IL-2/4/6/8/10/12/15/21/35 : Interleukine

iNOS : NOS inductible

IRI : Irinotecan

iTreg : induced T regulator

JAK2 : Janus Kinase 2

JH1/2 : Jak Homology ½

KRAS : Kirsten Rat Sarcoma virus

Kv1.3 : voltage-gated potassium channel

LAG3 : Lymphocyte-Activation Gene 3

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoblastique

LB : Lymphocyte B

LDGCB : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B

LMC : Leucémie Myéloïde Chronique

LT : Lymphocyte T

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MAT : Macrophages Associés aux Tumeurs

MCF-7 : lignée de cellules tumorales mammaires

MDA-MB-231 : lignée cellulaire humaine de cancer du sein triple négatif

MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells

MEC : Matrice Extracellulaire

MEK : Mitogen-activated Extracellular signal-regulated protein Kinase

MLCK : Myosin Light Chain Kinase

MMP2/9 : Matrix Metalloproteinase 2/9

mNOS : NOS mitochondriale

MRLC : Myosin Regulatory Light Chain

MSI-high : Microsatellites Instable élevé

MSK1 : Mitogen and Stress-activated protein Kinase 1

mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin

N₂O₂ : Dioxyde de diazote

N₂O₃ : Trioxyde de diazote

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

NFκB : Nuclear Factor-kappa B

NK : Natural Killer

nNOS : NOS neurale

NO : Monoxyde d'azote

NO₂ : dioxyde d'azote

NO₂⁻ : Nitrite

NO-Cbl : Nitrosylcobalamine

NOS : Oxyde Nitrique Synthase

NSCLC : Non-Small-Cell Lung Carcinoma

NTreg : Natural T regulator

O₂ : Dioxygène

ONOO⁻ : Péroxynitrites

OVCAR-3 : Lignée cellulaire humaine de cancer ovarien

OXA : Oxaliplatine

p53 : Protein 53

PANVAC-V/F : PANVAC-Vaccina/Fowlpox

PARP : Poly-ADP-Ribose Polymérase

PCI : Points de Contrôles Immunitaires

PD-1 : Programmed cell Death 1

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PD-L1/2 : Programmed cell Death-ligand ½

PEG : polyéthylène glycol

Ph1 : chromosome de Philadelphie 1

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKA/C : Protéine Kinase A/C

PKIs : Protein Kinase Inhibitors

PP2A : Protéine Phosphatase 2A

PTEN : Phosphatase and TENSin homolog

Rag2 : Recombination-activating protein 2

RAS : Rat Sarcoma virus

RCC : Renal Cell Carcinoma

RNS : Reactive Nitrogen Species

RO : Récepteurs aux œstrogènes

ROCKII : Rho-associated coiled-coil Containing protein Kinase 2

RONO₂ : ester de nitrate

ROS : Reactive Oxygen Species

RP : Récepteurs à la Progestérone

S6K1 : ribosomal protein S6 Kinase beta-1

SASP : Senescence Associated Secretory Phenotype

SCID : Severe Combined Immunodeficiency

sGC : Guanylate Cyclase Cytosolique soluble

SH2 : Src Homology 2

SHP2 : Src Homology region 2-containing protein tyrosine Phosphatase 2

siRNA : small Interfering RNA

SN-38 : 7-Ethyl-10-Hydroxycamptothecin

SNO : S-Nitrosotiol

SSR : Survie Sans Récidive

STAT1/3/4/5/6 : Signal Transducer and Activator of Transcription 1/3/4/5/6

SW480 : lignée cellulaire humaine de cancer colique

Tbet : T-box transcription factor TBX21

TCF-4 : T-Cell Factor 4

TCR : T Cell Receptor

T-DMI : l'ado-trastuzumab emtansine

TEM : Transition Épithélio-Mésenchymateuse

T_{EM} : T Effecteurs Mémoires

Tfh : T helper folliculaires

TGF-β : Transforming Growth Factor-Bêta

TβRI/II : TGF-β Receptor I/II

TIGIT : T-cell Immunoglobulin and ITIM domain

Th1/2/17 : T helper 1/2/17

TIM-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin-domain-containing molecule-3

TIMP-1 : Tissue Inhibitor Matrix metalloproteinase-1

TLR4 : Tool-Like Receptor 4

T_{MC} : T à Mémoire Centrale

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TNFα : Tumor Necrosis Factor-alpha

TNM : Tumor, Nodes, Metastasis

TRAIL : Tumor necrosis factor Related Apoptosis Inducing Ligand

Treg : T régulateur

T_{RM} : T Résidents Mémoires

TS : Thymidylate Synthase

TSC2 : Tuberous Sclerosis Complex subunit 2

TSG I : Tumeur Stromale Gastro-Intestinale

TWIST : TWIST basic Helix-loop-helix transcription factor

UICC : Union for International Cancer Control

UV : Ultra-Violet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

Wnt : Wingless integration site

RÉSUMÉ

Parmi les défis majeurs de la recherche en cancérologie, le développement de résistance aux thérapies conventionnelles ainsi que le fort taux de mauvais répondeurs restent des problèmes de taille dans la prise en charge des patients. Ainsi, dans le but de rechercher des nouvelles stratégies thérapeutiques dans le cancer colorectal et le cancer du sein triple négatif (CSTN), nous nous sommes intéressés au potentiel de deux molécules : le H89 et le glyceryl trinitrate (GTN). Le premier est un inhibiteur de kinases à large spectre, ayant déjà montré un potentiel antitumoral *in vitro*, tandis que le deuxième est un donneur de monoxyde d'azote (NO) ayant également un potentiel anti-cancéreux. Nos études voient l'utilisation du H89 en tant qu'immunomodulateur à activité antitumorale dans le cancer colorectal, et le GTN dans la modulation de la voie de la cytokine IL-6 dans le CSTN.

Cancer colorectal : nos résultats montrent que le H89 a une activité prophylactique et antitumorale dans nos modèles de cancer colorectal chez la souris. De plus, ces effets impliquent l'activation des cellules immunitaires *in vivo* à activité antitumorales comme les lymphocytes (LT) CD8⁺ cytotoxiques, ainsi que les LT CD4⁺ Th1 et les cellules NK. Nos résultats *in vitro* confirment un effet activateur direct du H89 sur les LT, ainsi qu'une capacité à moduler les points de contrôle immunitaires impliqués dans leur épuisement. Nous montrons également un impact de la molécule sur l'inhibition de la phosphatase PP2A et l'activation de la kinase Akt, mécanismes fondamentaux dans l'activation lymphocytaire. De plus, nous montrons que le récepteur IL-15RA est impliqué dans l'effet antitumoral du H89, suggérant l'importance de cette voie dans le processus.

CSTN : dans nos modèles de CSTN, le GTN est capable d'inhiber la voie de la cytokine IL-6 induite par une chimiothérapie conventionnelle, le carboplatine. L'inhibition de la voie de l'IL-6 se fait via la S-nitrosylation de JAK2, une modification post traductionnelle induite par le NO libéré par le GTN. De plus, le GTN bloque la migration et l'invasion des cellules cancéreuses *in vitro* tout en diminuant l'expression des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse induite par le carboplatine. Enfin, nous montrons que le GTN seul est capable de diminuer le développement des métastases pulmonaires *in vivo*.

Mots clés : thérapies innovantes ; cancer colorectal ; cancer du sein triple négatif ; H89 ; GTN.

ABSTRACT

Among the major challenges in cancer research, the development of resistance to conventional therapies, as well as the high rate of poor responders, remain major problems in the management of cancers patients. Thus, in order to find new therapeutic strategies in colorectal cancer and triple-negative breast cancer (TNBC), we focused on the potential of two molecules: H89 and glyceryl trinitrate (GTN). The first is a broad spectrum protein kinase inhibitor, which has already shown antitumor potential *in vitro*, while the latter is a nitric oxide (NO) donor that also has antitumor potential. Our studies reveal the use of H89 as an immunomodulator with an antitumor activity in colorectal cancer, and GTN in the modulation of the IL-6 signaling pathway in TNBC.

Colorectal cancer : Our results show that H89 has prophylactic and antitumor activity in our mouse colorectal cancer models. Moreover, these effects involve the activation of immune cells with antitumor activity such as cytotoxic CD8⁺ lymphocytes (LT), as well as CD4⁺ Th1 LT and NK cells *in vivo*. *In vitro* results confirm a direct activating effect of H89 on LT, as well as an ability to modulate the immune checkpoints involved in their exhaustion. We also show an impact of our agent on the inhibition of PP2A phosphatase and the activation of Akt kinase, both involved in lymphocyte activation. Furthermore, we show that the IL-15RA receptor is involved in the antitumor effect of H89, suggesting the importance of this pathway in the process.

TNBC : In our CSTN models, GTN is able to inhibit the IL-6 cytokine pathway induced by a conventional chemotherapy, carboplatin. Inhibition of the IL-6 pathway occurs via JAK2 S-nitrosylation, a NO-induced post-translational modification. In addition, GTN blocks cancer cell migration and invasion *in vitro* by decreasing the expression of epithelial to mesenchymal transition markers induced by carboplatin. Moreover, GTN alone is able to decrease the development of lung metastasis *in vivo*.

Keywords : innovative therapies ; colorectal cancer ; triple-negative breast cancer ; H89 ; GTN.

AVANT-PROPOS

Le cancer est un problème de Santé Publique majeur en France, avec 382 000 nouveaux cas recensés en 2018, tous cancers et tous sexes confondus (Santé Publique France). La majorité des traitements anti-cancéreux actuellement disponibles présentent de nombreux points faibles, soit pour leur toxicité et leur manque de spécificité (comme dans le cas de la chimiothérapie), soit par la résistance innée de certains patients, l'acquisition de résistances secondaires ou un faible nombre de bons répondeurs (ce qui est le cas des thérapies ciblées et de l'immunothérapie) (Bashraheel, Domling and Goda, 2020; Carter, 1984; Trapani and Darcy, 2017). Le but actuel de la recherche en cancérologie est de développer des nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des malades. Parmi les voies de prolifération constitutivement activées dans les cellules tumorales, nous retrouvons celle de la cytokine IL-6, activant la voie JAK2/STAT3, souvent associée à un mauvais pronostic dans des nombreux cancers. En effet, l'activation de cette voie induit la prolifération des cellules cancéreuses, ainsi que l'invasion et la formation de métastases, mais également l'inhibition de la réponse immunitaire antitumorale (Johnson, O'Keefe and Grandis, 2018). Une parmi les voies primordiales dans l'activation de la réponse cellulaire T contre la tumeur, est celle de la kinase Akt. La phosphorylation d'Akt, induit l'activation lymphocytaire et une réponse cytotoxique de ces derniers contre les cellules cancéreuses. Or, les cellules tumorales inhibent l'activation des lymphocytes T via différents mécanismes qui, entre autres, bloquent la phosphorylation d'Akt (Parry *et al.*, 2005). Les protéines kinases jouent un rôle primordial dans les mécanismes de développement tumoral, que ce soit du côté lymphocytaire avec la kinase Akt, ou du côté des cellules cancéreuses avec la kinase JAK2 activée via l'IL-6. Nous nous sommes intéressés à mieux comprendre le mécanisme d'action cellulaire et moléculaire de deux molécules, le H89 et le glyceryl trinitrate (GTN) dans le but d'apporter de nouvelles solutions pour le traitement des cancers. Ce travail repose sur l'étude des propriétés antitumorales de ces deux molécules résultant de leur capacité à inhiber certaines kinases.

Dans la première partie de ce manuscrit, je développerai le rôle d'une petite molécule inhibitrice de kinases, le H89, ayant montré un effet antitumoral *in vivo*, en induisant le recrutement au sein de la tumeur des cellules immunitaires à activité antitumorale, ainsi que

leur activation, dans un modèle de cancer colorectal. De plus, les mécanismes moléculaires associés à l'effet du H89, montrent une activation de la kinase Akt, indispensable dans l'activation lymphocytaire.

Dans la deuxième partie, nous nous sommes focalisés sur la voie de la cytokine IL-6, activant la kinase JAK2 et induisant la prolifération des cellules tumorales. Nous avons montré qu'un donneur de monoxyde d'azote (NO), le GTN, était capable d'induire des modifications post-traductionnelles sur la kinase JAK2, en empêchant l'activation de la voie, ainsi que la capacité invasive et la formation des métastases dans le cancer du sein triple négatif.

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1. LE CANCER

Le terme « **cancer** » inclut un groupe de maladies qui se caractérise par la prolifération incontrôlée de cellules anormales au sein d'un tissu sain de l'organisme et qui acquièrent des caractéristiques particulières, absentes dans les cellules saines. Ces caractéristiques différencient le cancer, qui est une lésion maligne, des tumeurs bénignes, où nous retrouvons uniquement la prolifération anormale de cellules saines au sein d'un tissu sans pour autant avoir un phénotype cancéreux et invasif.

Hanahan & Weinberg ont décrit les caractéristiques des cellules cancéreuses une première fois en 2000, en abordant six points fondamentaux, qui sont : le maintien des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs, la résistance à la mort cellulaire par apoptose, l'induction de l'angiogenèse, la capacité de se diviser de manière indéfinie et la capacité d'envahir des tissus sains avec la formation de métastases (Hanahan and Weinberg, 2000). En 2011, quatre autres caractéristiques ont été décrites par Hanahan & Weinberg, telles que : la dérégulation du métabolisme énergétique, l'instabilité génomique, la promotion de l'inflammation et l'échappement à la surveillance du système immunitaire (Figure 1) (Hanahan and Weinberg, 2011).

Je détaillerai toutes ces caractéristiques, en me focalisant plus particulièrement sur la capacité d'invasion et formation de métastases, l'inflammation et l'échappement à la surveillance du système immunitaire, qui recouvrent une importance particulière au sein de mes travaux de thèse.

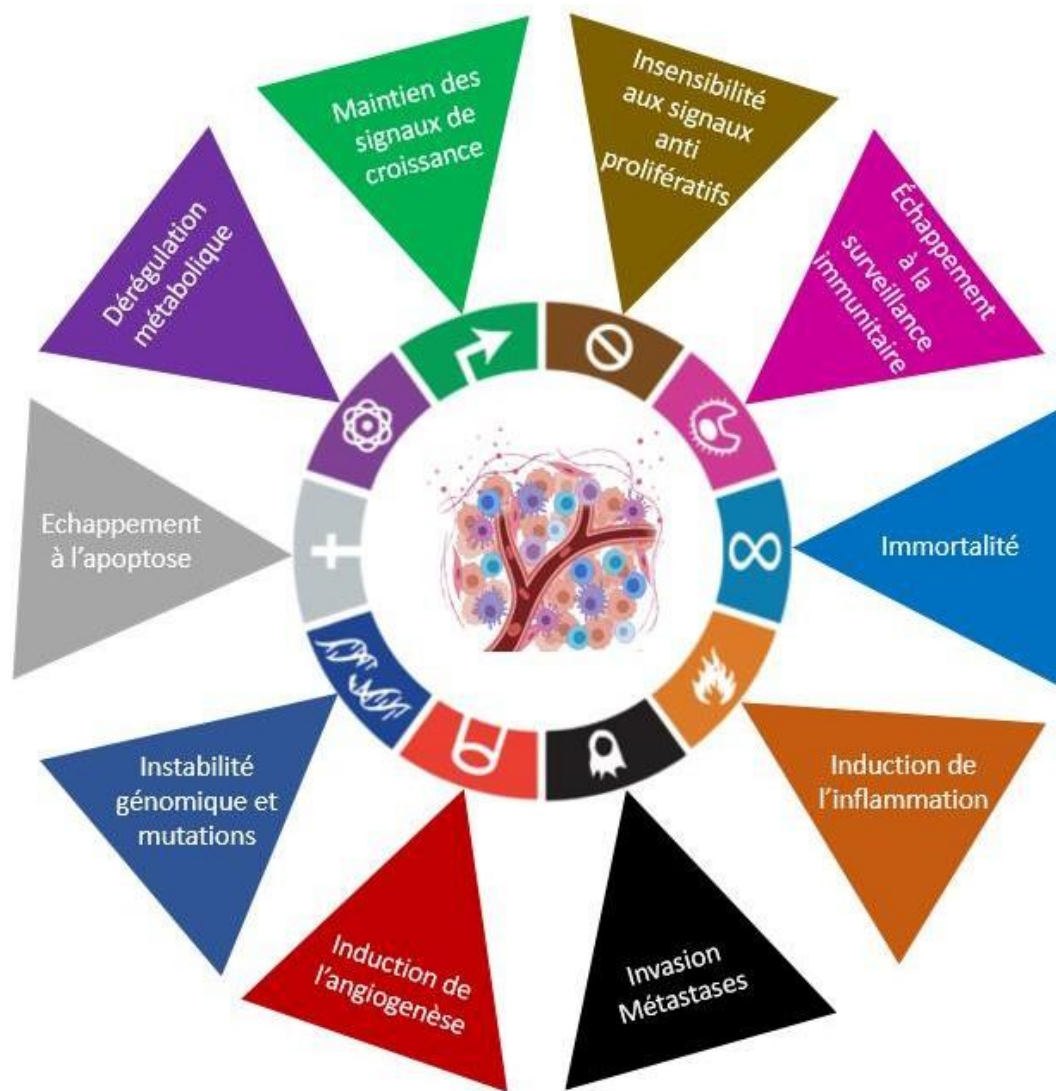


Figure 1. Les dix caractéristiques des cellules cancéreuses. (Modifié d'après Hanahan & Weinberg, 2011).

1.1 Maintien des signaux de croissance et insensibilité aux signaux anti-prolifératifs

La cancérogenèse est un processus multi-étape pendant lequel les cellules normales deviennent malignes et prolifèrent de manière incontrôlée. Une cellule saine devient cancéreuse suite à l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes stimulent la prolifération des cellules tumorales, ils sont souvent surexprimés (comme *c-MYC*) ou activés par des mutations (comme *RAS*). Les gènes suppresseurs de tumeurs préviennent le développement tumoral et leur inactivation se fait souvent par mutation, soit pendant la vie d'un individu au niveau des cellules somatiques, soit dans les cellules germinales (ce dernier mécanisme est responsable de certains cancers héréditaires). Parmi les oncogènes humains les plus courants, nous retrouvons ceux qui codent pour des récepteurs aux facteurs de croissance, comme *ERBB* (*Epidermal growth factor receptor family*). Ce gène code pour une famille de protéines transmembranaires, des récepteurs à activité tyrosine kinase, qu'après liaison avec leur ligand activent des voies de signalisation prolifératives (comme la voie PI3K/Akt). Dans cette famille de récepteurs nous retrouvons le VEGFR (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor), l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), PDGFR (Platelet-derived Growth Factor Receptor) et l'IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor). Un autre oncogène important est *RAS*. Ce gène code pour des petites protéines en aval des récepteurs *ERBB*, qui en amplifie le signal prolifératif. Quand les protéines Ras sont mutées, la voie de signalisation est constitutivement active même en absence de stimulation du récepteur par son ligand. La surexpression de l'oncogène *MYC* est aussi très connue en cancérologie. Ce gène code pour un facteur de transcription qui stimule la prolifération cellulaire, la croissance et inhibe l'apoptose (Stine *et al.*, 2015). Dans le cadre du cancer colorectal, les mutations du gène suppresseur de tumeurs *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) sont fréquemment observées et peuvent constituer un élément déclencheur. Ce gène régule la production de la β -caténine et empêche la prolifération cellulaire excessive. Lorsque la protéine APC est inactive, cela engendre une dérégulation de la production de β -caténine et, par conséquence, de la prolifération cellulaire. Dans le cancer du sein héréditaire, mais aussi le cancer de l'ovaire, deux gènes suppresseurs de tumeurs sont souvent impliqués : *BRCA1* et *BRCA2* (Breast cancer 1 et 2). Ces deux gènes codent pour des protéines qui régulent le cycle cellulaire via la réparation de l'ADN. Leur mutation perturbe cette fonction réparatrice du génome et augmente considérablement l'apparition de ces deux types de cancer. Enfin,

mais pas moins important, nous retrouvons le gène suppresseur de tumeurs *p53*, qui est muté dans la plupart des cancers. Le gène *p53* code pour la protéine homonyme, qui est un facteur de transcription (FT) qui régule l'expression de différents gènes impliqués dans le cycle cellulaire, de l'apoptose, la réparation de l'ADN et la prolifération. Tous ces gènes induisent des mécanismes complexes antiprolifératifs. Par exemple, lorsque la cellule subit un stress génotoxique, *p53* induit l'arrêt du cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN en induisant l'apoptose si cela est impossible. Quand *p53* est muté, cette fonction de protection n'existe plus, et les cellules présentant de lésions géniques continuent de se diviser au sein du tissu, contribuant à générer un « pool » de cellules cancéreuses.

1.2 Résistance à la mort cellulaire par apoptose

L'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée qui intervient en réponse à différents signaux, physiologiques ou pathologiques. Par exemple, l'élimination de certains tissus au cours du développement embryonnaire et l'élimination des lymphocytes T (LT) auto-réactifs pour éviter les maladies auto-immunes font partie des mécanismes physiologiques de contrôle de l'homéostasie de l'organisme. L'apoptose peut aussi être déclenchée suite à un stress pathologique, comme la mort du tissu liée à un infarctus ou dans les maladies neurodégénératives, mais aussi suite aux dommages à l'ADN qui peuvent entraîner le développement des lésions néoplasiques (comme discuté dans le paragraphe précédent) (Kaczanowski, 2016). L'apoptose peut être activée par deux voies de signalisation différentes mais convergentes : la **voie intrinsèque** et la **voie extrinsèque**. La première implique la signalisation mitochondriale via les protéines Bax et le cytochrome c ; la deuxième est liée aux récepteurs de mort comme Fas, TRAIL et TNFR (Pistritto *et al.*, 2016). Ces deux voies activent les caspases initiatrices puis effectrices, qui induisent la mort cellulaire. Même si beaucoup de mécanismes différents sont impliqués dans l'altération de ce processus, la résistance à l'apoptose peut avoir lieu, par exemple, via des anomalies de la signalisation de récepteurs de mort, mais aussi via la mutation de *BCL2* (gène codant pour la protéine anti-apoptotique Bcl-2), via la dérégulation des protéines IAP (Inhibitors of Apoptosis) et les mutations de *p53*. De manière générale, la dérégulation de l'apoptose est impliquée dans le développement du cancer et dans la résistance aux traitements (Pistritto *et al.*, 2016).

1.3 Capacité répliquative indéfinie

Le contrôle du cycle cellulaire est fondamental dans le développement des tissus normaux, et sa dérégulation est présente au sein des tumeurs. En effet, les cellules saines ne possèdent pas de capacité répliquative indéfinie, mais cessent de proliférer après un certain nombre de divisions. Ce mécanisme, appelé *senescence*, permet de contrôler leur prolifération et a été mis en évidence pour la première fois par Hayflick et Moorhead en 1961 (HAYFLICK and MOORHEAD, 1961). L'un des mécanismes moteurs dans l'induction de la senescence est le raccourcissement des télomères : ceux-ci sont impactés pendant la réplication, et au fur et à mesure des divisions leur taille diminue. Lorsque les télomères sont trop petits les cellules entrent en senescence, afin de limiter les anomalies chromosomiques qui pourraient engendrer la survenue d'anomalie génétiques et le développement du cancer. Les cellules en senescence sécrètent différents facteurs solubles et cytokines, qui font partie du phénotype sécrétoire associé à la senescence (*SASP, de Senescence Associated Secretory Phenotype*) ayant un rôle de suppresseurs de tumeurs, car ils entretiennent l'arrêt du cycle cellulaire et aident au recrutement des cellules immunitaires à activité antitumorale. Le but est donc d'éliminer les cellules anormales et éviter le développement de la tumeur. Or, les cellules cancéreuses arrivent à contourner les mécanismes de senescence et continuent de se diviser de manière incontrôlée. De plus, les cellules tumorales sont aussi capables d'utiliser la SASP en leur faveur via des mécanismes paracrines et créer un environnement protumoral. La senescence et la SASP sont donc contexte-dépendantes. Ces processus ont fait l'objet d'une revue intitulée « Senescence and Cancer : « Role of Nitric Oxide (NO) in SASP », où je suis co-première auteure avec Mabrouk N (Mabrouk *et al.*, 2020).

1.4 Instabilité génomique

L'accumulation de mutations est un processus fondamental dans le développement du cancer et les tumeurs humaines sont génétiquement instables (Gerlach and Herranz, 2020). De manière générale, des mutations peuvent s'accumuler pendant la réplication de l'ADN lors de la division cellulaire, dû à la perte de mécanismes de détection et de réparation des lésions causées au niveau de l'ADN. Dans un contexte physiologique, des enzymes comme la Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP) réparent ces erreurs pour éviter que les mutations soient transmises aux cellules filles. Cependant, quand celles-ci s'avèrent trop importantes, les

cellules entrent en apoptose via l'activation de p53, par exemple (Slade, 2020; Gerlach and Herranz, 2020). Or, la PARP est souvent surexprimée dans les cellules tumorales ce qui leur permet de contourner ce système de contrôle et entraîner les mutations aberrantes (Brown *et al.*, 2017). Pour cela, des inhibiteurs de PARP sont utilisés en thérapie anti-cancéreuse, et cela sera approfondi dans la section dédiée aux traitements ciblés dans le cancer du sein triple négatif.

1.5 Dérégulation du métabolisme énergétique

Le métabolisme énergétique est un processus finement régulé, et l'approvisionnement en nutriment des cellules est contrôlé afin de prévenir l'excès nutritif qui pourrait mener à une prolifération trop intense. Certaines mutations oncogéniques ont pour résultat d'induire un excès en apport nutritionnel aux cellules cancéreuses, en particulier au niveau du glucose, ce qui stimule leur prolifération. De plus, différemment des cellules saines qui utilisent plutôt la respiration mitochondriale pour la production d'ATP, les cellules cancéreuses privilégient la glycolyse. Dans les cellules malignes on observe donc une forte fermentation du glucose en lactate, même si l'apport en oxygène serait suffisant pour produire de l'ATP par la voie mitochondriale. Ce phénomène est appelé effet Warburg, découvert par Otto Warburg en 1924, mais son origine reste floue. L'hypothèse plus cohérente est liée à la possibilité de produire des quantités plus importantes d'ATP, ce qui permet aux cellules cancéreuses de mieux subvenir à leurs besoins énergétiques lors de leur intense prolifération (Vander Heiden, Cantley and Thompson, 2009). L'effet Warburg est un effet parmi beaucoup d'autres mécanismes impliqués dans la dérégulation du métabolisme énergétique dans le cancer. Pavlova et Thompson ont résumé ces mécanismes dans une revue intitulée « The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism », en regroupant cinq caractéristiques principales, en plus de l'effet Warburg : la dérégulation dans l'apport en glucose et acides aminés, l'utilisation d'une manière opportuniste l'approvisionnement en nutriments, l'augmentation des besoins en azote et la dérégulation des gènes qui contrôlent le métabolisme (Pavlova and Thompson, 2016).

1.6 Induction de l'angiogenèse

La néo-angiogenèse est la production de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de ceux préexistants, un processus physiologique normal qui intervient souvent au cours de la vie d'un individu. Ce mécanisme est induit par des facteurs pro-angiogéniques, comme le VEGF, le PDGF et le TGF- β (Transforming Growth Factor-beta), et est contrôlé par un équilibre avec des facteurs anti-angiogéniques, comme l'angiostatine et l'angiopoïétine (Ramjiawan, Griffioen and Duda, 2017). Les cellules tumorales sécrètent beaucoup de facteurs pro-angiogéniques afin de développer un réseau vasculaire qui est souvent formé de vaisseaux immatures et désorganisés. Cela permet aux cellules cancéreuses de recevoir des nutriments et de l'oxygène mais aussi d'éliminer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone et, donc, de soutenir leur taux de prolifération assez élevé. Cependant, la formation du réseau immature et peu organisé ne garantit pas un apport en oxygène optimal au sein de la tumeur, ce qui induit la formation d'un microenvironnement hypoxique. Ce processus diminue l'infiltrat immunitaire à activité antitumorale, en augmentant le risque de développer un phénotype invasif avec formation de métastases. Pour cela, des médicaments avec action anti-angiogénique sont très étudiés en thérapie anti-cancéreuse. Un exemple est le bevacizumab, anticorps monoclonal anti-VEGF qui sera discuté plus en détail dans la section dédiées aux thérapies du cancer colorectal (Viallard and Larrivée, 2017).

1.7 Invasion et métastases

Au début du développement tumoral, les cellules cancéreuses prolifèrent *in situ*, ce qui résulte en une tumeur localisée appelée néoplasme primitif. Mais, plus la tumeur prolifère, plus le patient risque de développer ce que l'on appelle des métastases, induisant la formation de tumeurs localisées dans des sites éloignés de ceux de la tumeur primitive. Le terme « métastase » identifie donc le processus pendant lequel les cellules cancéreuses diminuent leur adhérence locale et migrent en utilisant les vaisseaux sanguins ou le système lymphatique. Cela commence généralement par l'invasion des ganglions lymphatiques proches de la tumeur primaire, suivie dans un deuxième temps par la diffusion dans la circulation sanguine. Le développement de métastases est la résultante d'une série de processus qui visent à modifier l'adhérence cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (MEC) : les cellules perdent leurs caractéristiques épithéliales et augmentent leur motilité en

se détachant de la tumeur primitive et en laissant place à un phénotype invasif. Cela est appelé transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) (Diepenbruck and Christofori, 2016). En effet, les cellules épithéliales sont séparées du stroma et des compartiments mésenchymateux par la membrane basale, qui contient des nombreuses protéines structurales telles que le collagène (dont le collagène IV est le principal composant), la laminine et les protéoglycanes. Les trois étapes principales qui mènent les cellules épithéliales à franchir la membrane basale sont : la diminution de l'adhérence cellule-cellule et cellule-matrice, la protéolyse de la matrice et la migration. En effet, les cellules épithéliales sont polarisées et liées entre elles via notamment les desmosomes, les jonctions serrées et certaines molécules d'adhérence comme la E-cadhérine, tandis que la liaison des cellules avec la membrane basale se fait principalement via les intégrines (Suhail *et al.*, 2019). La E-cadhérine étant indispensable dans l'interaction entre cellules, le gène codant pour cette protéine est considéré comme suppresseur de tumeurs et son inactivation est très courante dans les cancers métastatiques (Canel *et al.*, 2013). Dans le cancer colorectal sporadique héréditaire la mutation du gène APC est fréquente et, étant ce gène régulateur de l'expression de la β -caténine, protéine interagissant avec la E-cadhérine, cela induit une perte des adhésions cellules-cellule et induit le phénotype métastatique (Yang *et al.*, 2006). Quand les cellules cancéreuses diminuent l'adhérence entre elles, l'étape suivante consiste à dégrader la MEC afin d'atteindre les vaisseaux sanguins. Pour cela, une famille de protéines très importante est celle des métalloprotéases matricielles (MMP). Parmi celles-ci, les protéines MMP-2 et MMP-9 sont souvent surexprimées dans les tumeurs et permettent une protéolyse locale de la MEC avec comme cible principale de ces métalloprotéases est le collagène IV contenu dans la membrane basale (McCawley and Matrisian, 2000). De plus, la protéase MMP-9 est également impliquée dans le déclenchement de l'angiogenèse via l'induction de la libération du VEGF, ce qui contribue à l'induction de l'angiogenèse augmentant la malignité de la tumeur (Carlson and Ethier, 2000). La régulation en amont de toutes les modifications de la TEM se fait via des FT, comme TWIST et SNAIL, et l'augmentation de leur expression est souvent liée à un mauvais pronostic (Wang *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2014). L'invasion des tissus environnants ou éloignés via le système lymphatique et les vaisseaux sanguins est strictement lié au type et à la localisation de la tumeur primitive. En effet, cela dépend de la voie empruntée par les cellules cancéreuses. Par exemple, dans le cancer colorectal, les métastases se localisent principalement au niveau du foie car les cellules transitent dans le système porte hépatique

transportant les nutriments absorbés par les intestins. Le cancer du sein métastase principalement au niveau pulmonaire, mais également au niveau hépatique. Cependant, le lien avec l'anatomie n'est pas exclusif, car certaines métastases ne peuvent pas s'expliquer par l'anatomie du système cardiovasculaire. Par exemple, certains patients atteints de mélanome présentent des métastases cérébrales ainsi que certains patients atteints de cancer du poumon. Ou encore, le cancer du sein peut métastaser au niveau des os, des ovaires et du cerveau (Chambers, Groom and MacDonald, 2002).

1.8 Inflammation

Le lien entre l'inflammation et le développement du cancer est maintenant bien établi. Le premier à émettre cette hypothèse fut Rudolf Virchow en 1863, décrivant le lien entre l'inflammation chronique et l'origine des tissus néoplasiques (Heidland *et al.*, 2006). En condition physiologiques, comme dans la réponse à une blessure ou à un agent infectieux, l'inflammation est un phénomène très contrôlé. Les cellules situées dans le site de blessure secrètent des nombreux facteurs solubles, comme des cytokines (TNF α (Tumor Necrosis Factor Alpha), IL (Interleukin)-6, TGF- β) et des chimiokines (CXCL (C-X-C motif Chemokine Ligand)1, CXCL2, CXCL3, IL-8, CXCL10) qui attirent les cellules immunitaires afin de réparer le tissu touché. Les premières cellules recrutées sont les neutrophiles et les éosinophiles, cellules de l'immunité innée responsables de la phase aiguë de l'inflammation. Ensuite le processus se poursuit avec le recrutement des monocytes, qui se différencient en macrophages en sécrétant de nombreuses cytokines et facteurs de croissance. Suivent les mastocytes, qui secrètent également des cytokines et des médiateurs inflammatoires comme l'histamine. Enfin, le processus de recrutement des cellules immunitaires se termine avec les lymphocytes, cellules de l'immunité adaptative qui terminent le processus d'inflammation (Oishi and Manabe, 2018). Une fois l'inflammation aiguë terminée, le processus inflammatoire s'atténue. Quand le processus inflammatoire aigu persiste, on parle alors d'inflammation chronique, qui peut durer pendant plusieurs semaines ou plusieurs années. Dans ce cas, l'infiltrat immunitaire reste présent sur le site inflammatoire et la production de cytokines pro-inflammatoires ne cesse pas (Germolec *et al.*, 2018). Cette condition d'inflammation chronique est liée au développement de certains cancers. Dans le cas du cancer colorectal, par exemple, son développement est souvent en lien avec les maladies inflammatoires de

l'intestin (comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse) ; dans le cas du mélanome, l'inflammation de la peau et l'exposition aux rayons UV, induisant des mutations, est une cause très commune dans le développement de ce type de cancer. Les cellules tumorales sont capables d'entretenir un microenvironnement pro-inflammatoire qui stimule leur croissance et leur résistance à l'apoptose. Les macrophages associés aux tumeurs (MAT) font partie de la composante immunitaire inflammatoire prépondérante au sein des tissus néoplasiques. Ces cellules produisent de l'IL-6, qui entretient le processus inflammatoire et qui est également produite par les cellules cancéreuses (Coussens and Werb, 2002). Une voie de signalisation importante activée par la cytokine IL-6 est celle impliquant JAK2 (Janus Kinase 2)/STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3), induisant la prolifération des cellules cancéreuses, mais également la TEM et le phénotype invasif, la résistance à l'apoptose et l'angiogenèse (cette voie de signalisation sera approfondie ultérieurement dans la section cancer du sein, reliée à l'article 2) (Johnson, O'Keefe and Grandis, 2018) (Figure 2). Les MAT produisent également de l'IL-10, cytokine qui bloque la réponse immunitaire antitumorale, mais également de l'IL-8 et du VEGF, qui stimulent la croissance des cellules cancéreuses et l'angiogenèse. L'infiltrat macrophagique au sein des tumeurs est donc associé à un phénotype invasif et métastatique, en partie à cause de l'angiogenèse induite par ces cellules (Figure 2) (Sawa-Wejksza and Kandefer-Szerszeń, 2018).

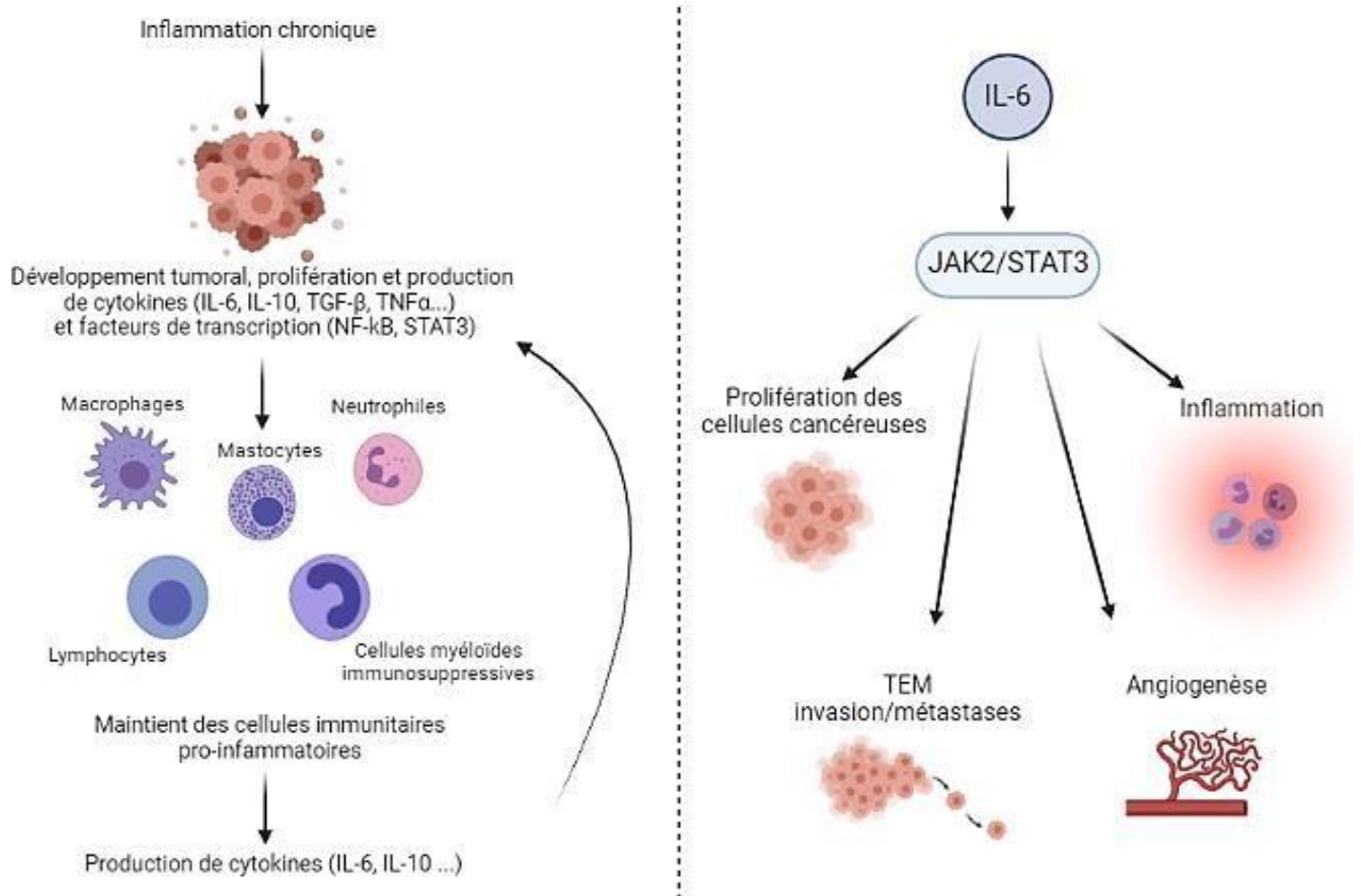


Figure 2. Lien entre inflammation chronique et cancer. L'inflammation chronique fait partie des nombreux facteurs qui interviennent dans le développement tumoral. Les cellules présentes dans le MET sécrètent des cytokines qui recrutent et entretiennent les cellules immunitaires (macrophages, mastocytes, neutrophiles, lymphocytes et cellules myéloïdes immunosuppressives) au sein de la tumeur. Ces cellules immunitaires stimulent la prolifération des cellules tumorales car cela crée un microenvironnement dynamique favorable au développement de la tumeur (schéma de gauche). Parmi les cytokines pro-inflammatoires sécrétées par les cellules immunitaires et les cellules tumorales, l'IL-6 joue un rôle prépondérant. En effet, cette cytokine active la voie de signalisation JAK2/STAT3 qui stimule la prolifération des cellules cancéreuses, l'acquisition d'un phénotype invasif et la mise en place de la TEM, ainsi que l'amplification du processus inflammatoire et l'angiogenèse (schéma de droite). Figure créée à l'aide du logiciel BioRender.

1.8.1 Les cytokines impliquées dans le développement tumoral

Les cytokines sont des acteurs fondamentaux dans l'établissement du processus inflammatoire. Secrétées par les cellules immunitaires, les cellules tumorales et les cellules du stroma, elles ont un rôle prépondérant dans le développement des tumeurs. Parmi les principales cytokines qui prennent part à ce processus nous retrouvons le TNF α , l'IL-6, le TGF- β et l'IL-10.

1.8.1.1 Le TNF α

La cytokine TNF α est un important médiateur inflammatoire impliqué dans le développement tumoral, qui intervient notamment dans les phases précoces de l'initiation de la carcinogénèse, comme la néo-angiogenèse, plutôt que dans les phases tardives de la progression tumorale (Szlosarek, Charles and Balkwill, 2006). Le rôle de cette cytokine dans le développement tumoral est controversé et dépend de sa concentration et du contexte cellulaire dans le MET. En effet, des fortes concentrations en TNF α stimulent plutôt une réponse immunitaire antitumorale, alors que des faibles concentrations induisent le développement de la tumeur (Landskron *et al.*, 2014). Les LT activés secrètent de fortes concentrations de TNF α , avec un effet principalement antitumoral. A contrario, le TNF α sécrété par les cellules tumorales ou les cellules immunitaires présentes dans le MET, telles que les MAT et cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSCs), agit principalement via le récepteur TNFR1 (TNF Receptor 1) de manière autocrine et paracrine. Cela induit la prolifération des cellules cancéreuses et leur survie, ainsi que des dommages à l'ADN et la TEM, avec maintien de la prolifération des MAT et des MDSCs (Balkwill, 2009).

1.8.1.2 Le TGF- β

Comme le TNF α , le rôle du TGF- β dans le développement tumoral est complexe et contexte-dépendant. Trois isoformes ont été identifiées, le TGF- β 1, le TGF- β 2 et le TGF- β 3 et les sources principales dans le MET sont les cellules du stroma, ainsi que les fibroblastes et les cellules immunitaires. En effet, au début du développement tumoral le TGF- β agit comme suppresseur de tumeur, induisant l'inhibition du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules cancéreuses. Plus tard dans le développement tumoral, il induit la progression tumorale, induisant la TEM (Morrison, Parvani and Schiemann, 2013). Mais les cellules cancéreuses contournent l'effet antitumoral du TGF- β via l'inactivation des différents composants de sa

voie de signalisation, comme ses récepteurs (Massagué, 2008). Plusieurs études montrent la corrélation entre l'expression de TGF- β et le développement tumoral. Par exemple, l'augmentation de l'expression de l'ARNm de TGF- β 1 a été observée dans le cancer gastrique, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer de la prostate et le cancer colorectal (Bierie and Moses, 2006). La délétion et/ou la mutation des récepteurs T β RI et T β RII sont associées avec le développement du cancer colorectal, du cancer de la prostate, du cancer du sein et du cancer de la vessie, avec développement d'un phénotype plus invasif et un mauvais pronostic (Levy and Hill, 2006).

1.8.1.3 L'IL-6

Contrairement au TNF α et au TGF- β qui ont un rôle ambivalent et contexte-dépendant dans le développement tumoral, la cytokine IL-6 est un médiateur inflammatoire impliqué dans la progression de la tumeur. En effet, un fort taux d'IL-6 est détecté dans le sérum des patients atteints de certains types de cancer (cancer du sein, cancer de la prostate, cancers de la tête et du cou et cancer du rein) comparés aux individus sains, faisant de la cytokine un marqueur prédictif de l'agressivité de la pathologie (Heikkilä, Ebrahim and Lawlor, 2008). L'IL-6 joue un rôle prépondérant dans la prolifération des cellules cancéreuses, via la liaison à son récepteur l'IL-6R, activant la voie de signalisation JAK/STAT3. Cette voie de signalisation sera traitée plus en détail dans la partie cancer du sein, section 2.

1.8.1.4 L'IL-10

La cytokine IL-10 est connue pour être importante dans la diminution de l'inflammation et la tolérance. Presque toutes les cellules immunitaires sont capables de sécréter de l'IL-10, comme les LT, les LB, les monocytes, les macrophages, les mastocytes, les granulocytes et les cellules dendritiques (Sabat *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013). Les cellules cancéreuses peuvent également sécréter de l'IL-10, ainsi que les MAT et les kératinocytes (Gastl *et al.*, 1993). Différentes études montrent que l'IL-10 peut avoir un effet pro ou antitumoral. Dans une étude menée en 1996, Berg et collaborateurs montrent que les souris déficientes en IL-10 sont sujettes au développement du cancer colorectal (Berg *et al.*, 1996). Une autre étude montre que le transfert adoptif de LT CD4⁺ exprimant l'IL-10 chez les souris Rag2^{-/-} contrecarre le développement du cancer colorectal (Erdman *et al.*, 2003). Mais, étant l'IL-10 une cytokine au pouvoir immunosuppresseur, elle peut freiner la présentation d'antigène ainsi que la

maturation et la différenciation des LT à activité antitumorale, induisant la progression tumorale et stimulant l'échappement à la surveillance du système immunitaire (Wang *et al.*, 2019). Par exemple, l'expression de l'IL-10 induit la progression de la tumeur et bloque la signalisation antitumorale médiée par l'IFN γ et une augmentation de l'expression de son récepteur est corrélée à un mauvais pronostic dans le cancer du poumon (Gao *et al.*, 2020). La signalisation de l'IL-10 est également associée à la progression du cancer de la tête et du cou, et l'accumulation des TAM sécrétant de l'IL-10 est un facteur de mauvais pronostic dans le cancer du sein (Bornstein *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2015).

1.9 Echappement à la surveillance du système immunitaire

Il est actuellement bien connu que le système immunitaire joue un rôle déterminant dans la progression tumorale et agit à différents niveaux dans la prévention du développement des tumeurs. D'une part, il protège des infections virales induisant des tumeurs (comme le virus HPV induisant le cancer du col de l'utérus, ou encore les carcinomes du nasopharynx associés au virus d'Epstein-Barr). Mais le système immunitaire est également capable de reconnaître et détruire directement les cellules cancéreuses avant que la tumeur soit détectable. Ce dernier mécanisme est appelé « **immunosurveillance** » (Crispin and Tsokos, 2020). Malgré le contrôle exercé par le système immunitaire afin d'éviter le développement tumoral, les tumeurs parviennent à se développer et à échapper cette surveillance. Pour cela, le concept d'immunosurveillance laisse place à celui d'«**immunoédition**», définissant de manière plus complète la relation entre les cellules immunitaires et les cellules cancéreuses, répartie en trois phases : la phase d'élimination, la phase d'équilibre et la phase d'échappement (Kunimasa and Goto, 2020).

La phase d'élimination, est la première phase de l'immunoédition pendant laquelle les cellules immunitaires reconnaissent et éliminent les cellules tumorales. Pour cela, il y a mise en place aussi bien de la réponse innée, représentée principalement par les cellules natural killer (NK) et les cellules dendritiques (CD), et d'une réponse adaptative plus spécifique, impliquant les LT CD4⁺, CD8⁺ et B. Les cellules NK ont une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales, en sécrétant des molécules comme la perforine et le granzyme B qui lysent les cellules cancéreuses, mais également l'IFN γ , cytokine pro-inflammatoire fondamentale dans la réponse immunitaire antitumorale. Les cellules dendritiques, quant à elles, sont

proches des macrophages et ont une activité phagocytaire grâce à laquelle elles internalisent les antigènes exprimés à la surface des cellules cancéreuses, qu'elles exposent ensuite à leur surface sur le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH de classe I et II). Elles migrent ensuite dans les ganglions pour présenter les antigènes aux LT CD4⁺, CD8⁺ qui seront activés afin d'exercer leur activité antitumorale. Le rôle des CD en tant que cellules présentatrices d'antigène est donc fondamental pour la réponse immunitaire adaptative contre la tumeur (Dunn, Old and Schreiber, 2004).

La phase d'équilibre suit la phase d'élimination, la tumeur reste cliniquement indétectable et les cellules immunitaires et tumorales rentrent en équilibre dynamique. Les cellules immunitaires exercent une pression sélective sur les cellules tumorales, qui accumulent des mutations avec des changements génétiques et épigénétiques induisant le développement de variants cellulaires résistants. La tumeur est donc contenue mais le système immunitaire n'arrive pas à l'éliminer complètement. Cette phase est la plus longue de l'immunoédition et se traduit avec une période de latence avant que la tumeur échappe totalement et devienne cliniquement détectable (Mittal *et al.*, 2014).

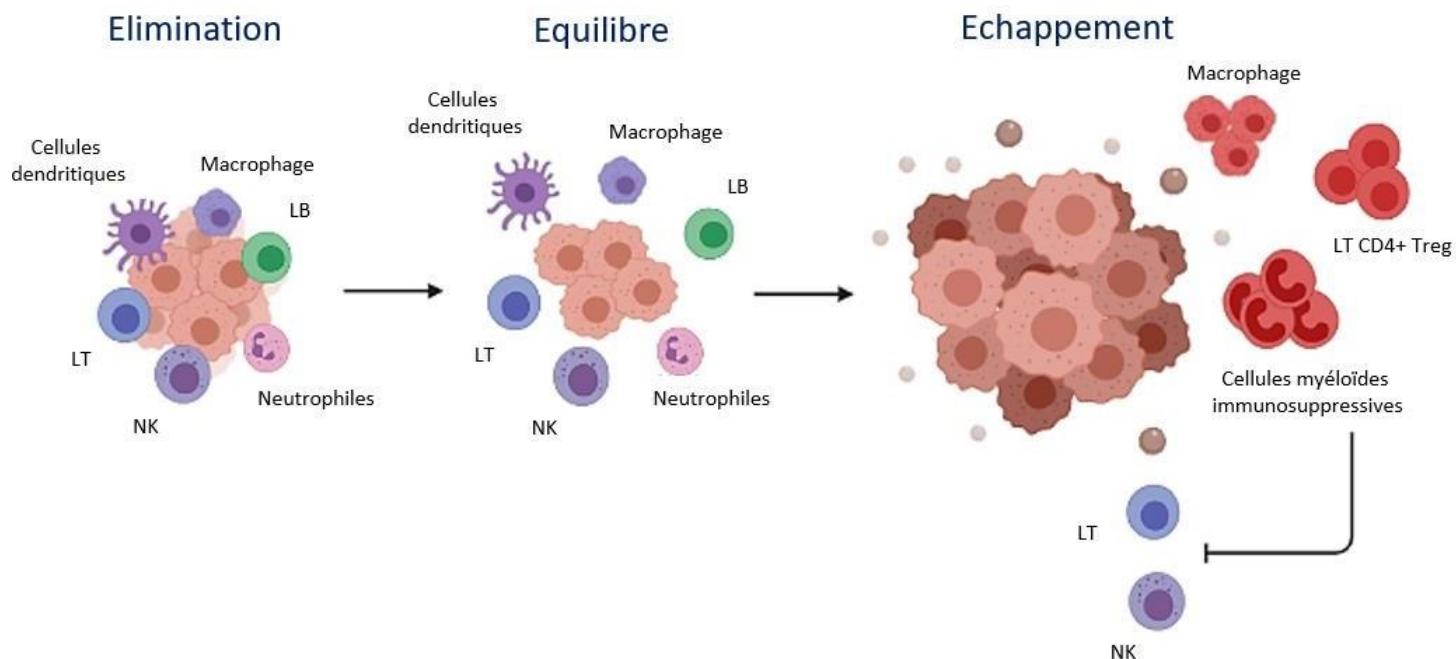


Figure 3. Les trois phases de l'immunoédition. Pendant la phase d'élimination, les cellules immunitaires agissent contre la tumeur afin de l'éliminer. Suit la phase d'équilibre dynamique, pendant laquelle la tumeur reste cliniquement indétectable et les cellules immunitaires ne parviennent pas à son élimination complète. Le processus se termine par la phase d'échappement, pendant laquelle les cellules immunitaires immunosuppressives sont prépondérantes, inhibent les cellules immunitaires à activité antitumorale, la tumeur échappe à la surveillance du système immunitaire via différents mécanismes et devient cliniquement détectable. Figure créée à l'aide du logiciel BioRender.

La phase d'échappement est la dernière, pendant laquelle les cellules cancéreuses utilisent différents mécanismes afin de contrôler la réponse immunitaire antitumorale, la tumeur devient alors cliniquement détectable et se développe de manière incontrôlée. Les trois phases de l'immunoédition sont résumées dans la Figure 3 (Schreiber, Old and Smyth, 2011). Pendant la phase d'échappement les cellules cancéreuses éludent la surveillance du système immunitaire via différents mécanismes (Schreiber, Old and Smyth, 2011). Elles favorisent le développement d'un microenvironnement immunitaire immunosuppresseur, en sécrétant des cytokines comme l'IL-10 et le TGF- β , induisant l'accumulation de cellules telles que les LT CD4⁺ T reg et les MDSCs (Dunn, Old and Schreiber, 2004). L'accumulation de mutations par les cellules cancéreuses au cours de la phase d'équilibre induit également une perte de reconnaissance par les cellules immunitaires, et parmi ces mécanismes nous retrouvons une perte des antigènes tumoraux à la surface des cellules, ainsi qu'une perte de l'expression des molécules de CMH de classe I, ce qui empêche la reconnaissance par les LT cytotoxiques et la présentation d'antigènes par les CD (Mellman, Coukos and Dranoff, 2011; Chen *et al.*, 2020b). Les cellules cancéreuses augmentent également l'expression de certaines protéines impliquées dans leur prolifération et leur survie, comme le FT STAT3 ou la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ou encore via l'expression des points de contrôle immunitaires (PCI), qui inhibent l'activation des cellules T et empêchent leur activité antitumorale (Vesely *et al.*, 2011; Mantovani and Sica, 2010). Les points de contrôle immunitaires seront discutés plus en détail dans la section 1.9.4.2.

1.9.1 Le rôle des LT dans l'immunoédition

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les CD exposent les antigènes tumoraux à leur surface sur les molécules de CMH, et peuvent donc activer les LT CD8⁺ et CD4⁺. Les LT deviennent donc capables de reconnaître les antigènes tumoraux, migrent vers le site néoplasique via la circulation sanguine, infiltrent le tissu tumoral et éliminent les cellules cancéreuses de manière directe (LT CD8⁺ cytotoxiques) ou indirecte (LT CD4⁺ helper) (Zagorulya, Duong and Spranger, 2020). Pour cela, la présence d'un infiltrat lymphocytaire T au sein de la tumeur est généralement associé à un bon pronostic chez les patients, ce qui semble indiquer que le système immunitaire cherche activement à détruire les cellules tumorales (Stanton and Disis, 2016). Cela reste néanmoins dépendant de la nature de l'infiltrat en LT et de la balance entre les sous-populations présentes.

1.9.2 Les LT CD8+ cytotoxiques

Les LT CD8⁺ demeurent les effecteurs les plus puissants de la réponse immunitaire antitumorale et constituent le pilier dans l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses. Ces cellules interagissent avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH-I) qui se trouvent à la surface des CPA, en particulier les CD, présentant des antigènes tumoraux via un processus de présentation croisée. En effet, les CD sont capables d'internaliser des antigènes exogènes pour ensuite les exposer à leur surface sur les molécules CMH-I. Cette voie d'activation lymphocytaire implique la reconnaissance du complexe CMH-I/antigène par les LT CD8⁺ naïfs, qui s'activent et éliminent ainsi les cellules cancéreuses (Raskov *et al.*, 2021).

En plus des CPA et des CD, les LT CD8⁺ peuvent également être activés par les LT CD4⁺, via l'expression de certaines molécules de surface telles que le ligand CD40 (CD40L). Dans un premier temps, les cellules CD4⁺ exprimant CD40L interagissent avec les CD, qui expriment le CD40, et cette liaison active ces dernières qui deviennent capables d'activer les CD8⁺. Par la suite, les cellules CD4⁺ effectuent donc une interaction directe entre leur CD40L et le CD40 exprimé par les CD8⁺ (de Silva *et al.*, 2020; Ridge, Di Rosa and Matzinger, 1998; Schoenberger *et al.*, 1998). Les CD interviennent donc soit de manière directe en activant les CD8⁺ sans intermédiaires, ou de manière indirecte en favorisant l'interaction CD4⁺/CD8⁺ (Bourgeois, Rocha and Tanchot, 2002). Toutes ces étapes sont résumées dans la Figure 4.

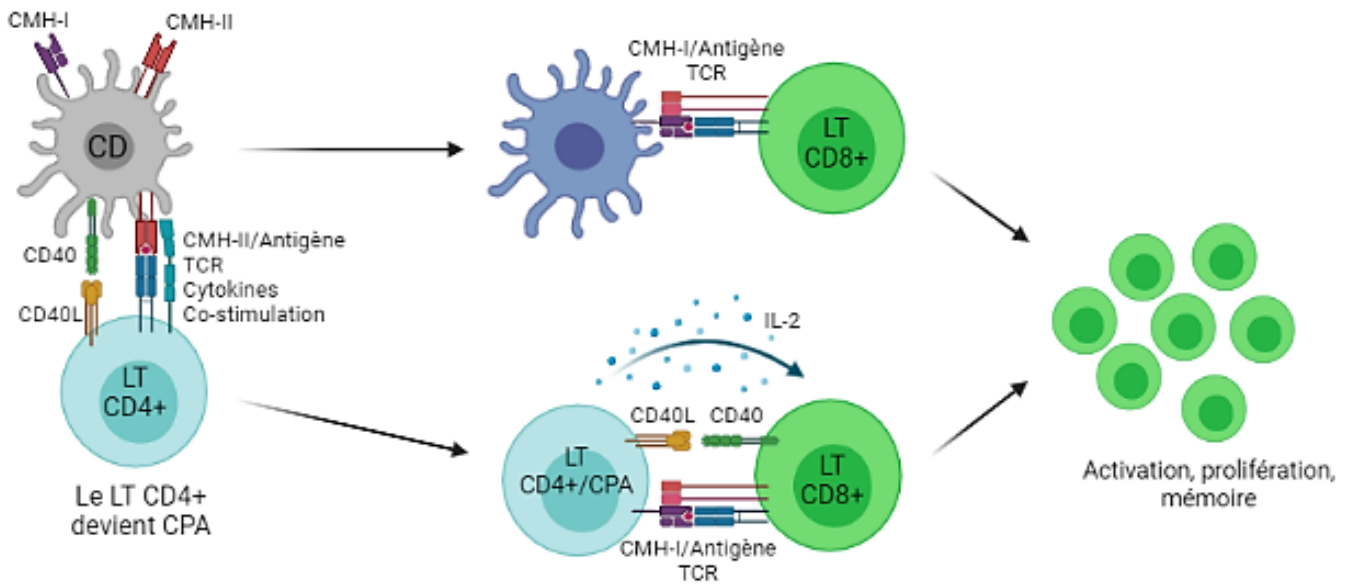


Figure 4. Les différentes voies d'activation des LT CD8+ par les CD. Les LT peuvent être activés via deux voies différentes impliquant les CD de manière directe (présentation croisée) ou indirecte (impliquant les LT CD4+). Dans le premier cas, une CD peut présenter directement des antigènes tumoraux sur les molécules de CMH-I et induire l'activation des CD8+, la prolifération et la formation de cellules mémoires. D'autre part, les CD peuvent activer des CD4+ en présentant les antigènes tumoraux sur des molécules de CMH-II en simultanément avec la liaison de CD40 (sur les CD) et de CD40L (sur les CD4+). Suite à cela, les CD4+ internalisent les antigènes et les présentent aux CD8+ via les molécules de CMH-I en parallèle de la liaison avec leur CD40L avec le CD40 des CD8+. Cela induit aussi l'activation et prolifération des CD8+ qui exercent leur activité cytotoxique sur les cellules cancéreuses. Schéma réalisé avec le logiciel BioRender.

Une fois activés, les LT CD8+ deviennent cytotoxiques et induisent la mort des cellules cancéreuses via différents mécanismes. Le premier consiste à sécréter de l'IFN γ , cytokine qui entretient leur activation en cellules effectrices et amplifie la réponse immunitaire en induisant, entre autres, le recrutement des macrophages et en stimulant leur polarisation vers un phénotype M1, à activité antitumorale. D'autres cytokines sécrétées et importantes pour la réponse immunitaire antitumorale sont le TNF α et l'IL-2. Les CD8+ agissent également de manière directe sur leurs cibles en sécrétant des molécules solubles, telles que la perforine et le granzyme B, induisant la lyse des cellules tumorales et leur mort par apoptose. Un autre mécanisme via lequel les LT CD8+ effecteurs induisent l'apoptose des cellules cancéreuses

implique la liaison du ligand de Fas (Fas ligand (FasL)) exprimé à leur surface, avec le récepteur de mort Fas qui se trouve à la surface des cellules tumorales et qui active la voie extrinsèque de l'apoptose (Figure 5).

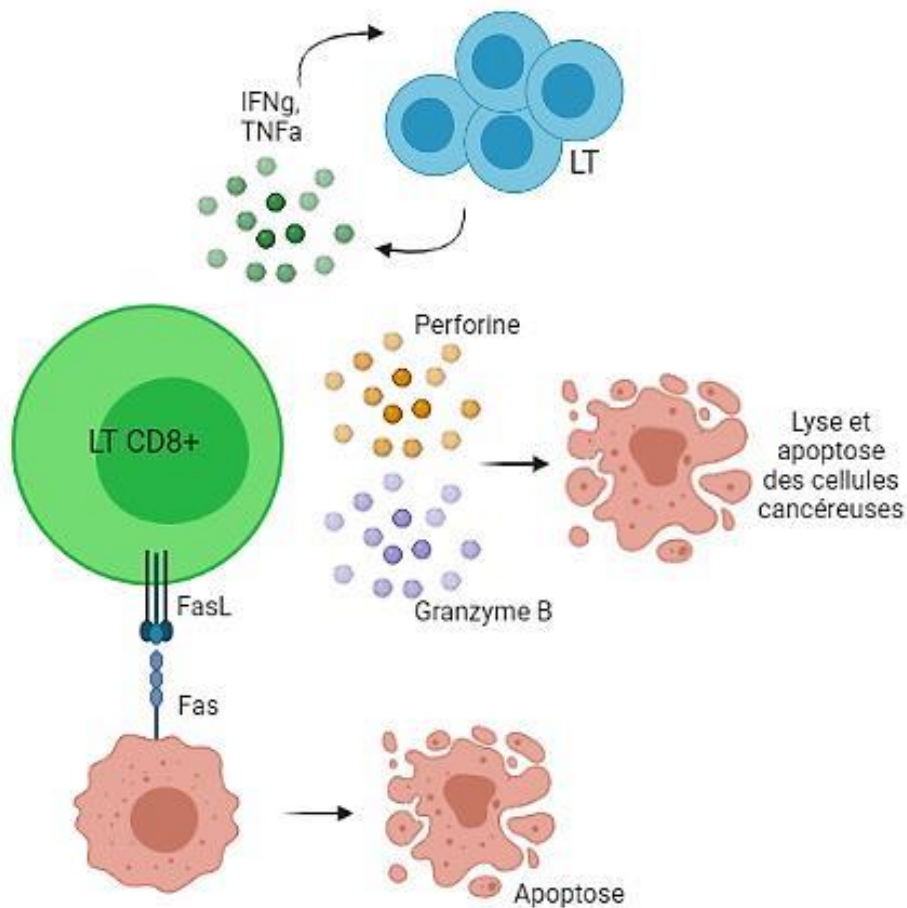


Figure 5. Action des LT CD8⁺ activés sur les cellules tumorales. Une fois activés, les LT CD8⁺ secrètent des cytokines telles que l'IFN γ et le TNF α qui stimulent la réponse immunitaire antitumorale et entretiennent leur activation. De plus, ces cellules possèdent une activité cytotoxique directe sur les cellules cancéreuses via la sécrétion de perforine et granzyme b, et TNF α en induisant la lyse et l'apoptose. De plus, les LT CD8⁺ peuvent induire l'apoptose des cellules tumorales via la voie extrinsèque impliquant la liaison entre FasL et son récepteur Fas. Schéma réalisé avec le logiciel BioRender.

Afin de générer une réponse immunitaire antitumorale durable, l'établissement d'une mémoire immunitaire est indispensable. Une fois qu'un LT CD8⁺ naïf a été en contact avec l'antigène tumoral, il se différencie en différentes sous-populations de cellules mémoires. Nous retrouvons ainsi les cellules T à mémoire centrale (T_{MC}), T effecteurs mémoires (T_{EM}) et des cellules T résident mémoires (T_{RM}) (Gattinoni *et al.*, 2017; Schluck *et al.*, 2019). Ces sous-types cellulaires se différencient principalement par leur mode d'action et leur localisation. Les T_{MC} se trouvent dans les organes lymphoïdes secondaires, où ils sont capables de s'auto-renouveler sur le long-terme et de se réactiver rapidement en cellules effectrices en cas de re-stimulation par l'antigène. Les T_{EM} sont des cellules circulantes, qui se trouvent dans le sang et les tissus périphériques et ont des capacités effectrices importantes, mais évoluent en T_{MC} en cas d'absence de stimulation sur le long terme (Sallusto *et al.*, 1999). Les T_{MC} et les T_{EM} étaient, jusqu'au début des années 2000, les seules populations de T mémoire connues. Mais une autre sous-population de T mémoire a été mise en évidence par la suite, qui avait toujours été assimilée aux T_{EM} : les T_{RM} (Schenkel and Masopust, 2014). Ces cellules sont également effectrices, comme les T_{EM}, mais ne circulent pas dans le sang et restent au sein des tissus. Au départ identifiées dans l'intestin, elles ont par la suite été détectées dans d'autres tissus comme la peau, le poumon, le système nerveux ou encore les organes génitaux (Cauley and Lefrançois, 2013).

Cet aspect très important dans l'activation des LT CD8⁺ et l'établissement d'une mémoire immunitaire contre la tumeur, concerne la cytokine IL-15. La liaison de l'IL-15 à son récepteur, IL-15RA, induit la prolifération et la survie des LT CD8⁺ via la phosphorylation de STAT5 et l'activation des voies Bcl-2 (survie) et Akt/mTOR (prolifération) (Guo *et al.*, 2017). Ainsi, non seulement l'IL-15 induit l'activation des CD8⁺ en leur cytotoxicité, mais aide à l'établissement d'une réponse mémoire efficace (Doedens *et al.*, 2016; Brincks and Woodland, 2010). Il a été montré que le traitement des patients avec de l'IL-15 induit l'activation des CD8⁺, en augmentant le pourcentage de ces cellules sécrétant du granzyme B et, donc, leur cytotoxicité (Younes *et al.*, 2016). L'IL-15 est également impliquée dans la survie des LT CD8⁺ mémoire et induit une réactivation rapide en cas de deuxième contact avec l'antigène (Kokaji, Hockley and Kane, 2008). Le traitement des patients avec l'IL-15 est évalué en clinique. En effet, l'administration de la cytokine chez les patients atteints de mélanome métastatique et de cancer du rein, induit le recrutement et l'activation des LT CD8⁺ au sein de la tumeur

(Conlon *et al.*, 2015). Dans le cadre du cancer colorectal, il a été montré que la déplétion de l'IL-15 diminue la prolifération et la survie des LT, et donc la réponse immunitaire antitumorale (Zhang *et al.*, 2021).

Le rôle des LT CD8⁺ dans la réponse immunitaire antitumorale est maintenant bien établi. Les premiers chercheurs mettant en évidence le lien entre ces cellules et l'efficacité de la réponse immunitaire contre la tumeur, ont été Fortner et Kripke en 1977. Avec leur étude effectuée chez la souris ils montraient que les animaux irradiés subissaient une perte de fonction des LT infiltrant la tumeur, ce qui induisait le rejet de cette dernière moins efficace par rapport aux souris non-irradiées (Fortner and Kripke, 1977). Quelques années après, Engel et collaborateurs montraient que le développement de sarcomes induits par injection de méthylcholanthène était plus rapide chez les souris nude et SCID, qui sont dépourvues de LT (Engel *et al.*, 1996; Engel *et al.*, 1997). Au début des années 2000, Shankaran décrit les LT et l'IFN γ comme essentiels dans la réponse immunitaire antitumorale, ce qui suggère le rôle fondamental des CD8⁺ dans ce processus (Shankaran *et al.*, 2001). Suite à cela, de nombreuses études ont montré une corrélation positive entre l'infiltrat CD8⁺ au sein de la tumeur et la survie des patients en différents types de cancers, tels que le cancer du sein, le cancer colorectal, le cancer du poumon, le mélanome et le glioblastome (Djenidi *et al.*, 2015; Dudley *et al.*, 2008; Galon *et al.*, 2006; Kmiecik *et al.*, 2013; Mahmoud *et al.*, 2011; Ling *et al.*, 2014). Par exemple, un infiltrat CD8⁺ intra-tumoral important, accompagné d'un infiltrat CD4⁺, améliore considérablement le pronostic des patients atteints de cancer de la vessie au stade IV (Li *et al.*, 2020b). La même chose est observée chez les patients atteints de carcinome hépatocellulaire et cancer du sein triple-négatif (Oshi *et al.*, 2020; Ye *et al.*, 2019).

1.9.3 Les LT CD4 helper

Les LT CD4⁺ « helper », ou auxiliaires, comme leur nom l'indique, ont une action auxiliaire à l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ qui régule plutôt la phase effectrice de l'immunité antitumorale (Zhou, Chong and Littman, 2009). Pour cette raison, les premières études effectuées pour stimuler la réponse immunitaire au sein de la tumeur se focalisaient plutôt sur les LT CD8⁺. Mais les dernières avancées scientifiques montrent un rôle de plus en plus important des LT CD4⁺ helper, composés par diverses sous-populations cellulaires, chacune avec un rôle précis dans l'éradication de la tumeur ou dans sa résistance à la

surveillance du système immunitaire (Gu-Trantien *et al.*, 2013). Tout comme les LT CD8⁺, les CD4⁺ reconnaissent des antigènes spécifiques présentés par les CPA, ce qui induit leur prolifération et leur différenciation en différentes sous-populations effectrices. Cette différenciation se fait au cours de l'activation via différents facteurs solubles tels que les cytokines présentes dans le microenvironnement, et grâce à l'activation de certains FT spécifiques de chaque sous-type cellulaire. Les sous-types de LT CD4⁺ helper sont essentiellement au nombre de sept : les T helper de type 1 (Th1), les Th2, les Th17, les Th9, les Th22, les T helper folliculaires (Tfh) et les T régulateurs (Treg) (Luckheeram *et al.*, 2012). Dans ce manuscrit je me focaliserai principalement sur les Th1, les Th2 et les Treg, en accord avec les études effectuées dans mon projet de recherche.

1.9.3.1 Les Th1 et les Th2

La différenciation des LT CD4⁺ naïfs en Th1 ou Th2 dépend d'un ensemble de FT et de cytokines présentes dans le microenvironnement. En général, un environnement riche en IL-12 et IFN γ , induit l'expression des FT *Tbet* (T-box transcription factor TBX21) et *STAT* (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) 4 dans les cellules naïves, induisant leur différenciation en Th1, alors qu'un environnement riche en IL-4 induit l'expression de *GATA3* (Trans-Acting T cell specific transcription factor) et *STAT6* et la différenciation en Th2 (Zhang, Gu and Sun, 2014). Les Th1 différenciés secrètent de l'IL-2, qui stimule l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques et la maturation des LB, mais également de l'IFN γ , qui stimule l'activation des macrophages, des NK et qui entretient la boucle de différenciation Th1. Cela se traduit globalement en un effet cytotoxique direct sur les cellules cancéreuses. Les Th2 matures produisent principalement de l'IL-4, mais également de l'IL-10, cytokines avec effet immunosuppresseur, qui diminue la différenciation des cellules Th1 et donc principalement l'efficacité de la réponse immunitaire antitumorale (Mitchell *et al.*, 2017).

Le taux d'IFN γ , d'IL-2 et d'IL-12 est généralement bas chez les patients ayant un cancer au stade avancé, tandis que les taux d'IL-10 et d'IL-4 peuvent être prépondérants (Seruga *et al.*, 2008). Une augmentation du taux d'IL-10 a été documentée dans de nombreux cancers, comme le cancer de l'ovaire, certains lymphomes, et le cancer colorectal et se révèle plutôt de mauvais pronostic (Batchu *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2019). Une étude menée en 2011 par Tosolini *et al.* met en évidence le rôle des Th1 dans la survie des patients atteints de cancer colorectal. En effet, la quantification des sous-populations CD4⁺ montre une

meilleure survie sans récurrence chez les patients présentant un fort infiltrat Th1 (Tosolini *et al.*, 2011). Une autre étude montre que la combinaison des cytokines secrétées par les Th1, comme l'IFN γ et le TNF α , induisent un arrêt de croissance des cellules cancéreuses via la signalisation TNFR1 et STAT1 (Braumüller *et al.*, 2013). En contrepartie, DeNardo *et al.* montrent que les LT CD4⁺ exprimant de l'IL-4 augmentent l'invasion et les métastases dans le cancer du sein, et ce via une réponse Th2. En effet, cela induit une augmentation de la signalisation de l'EGFR dans les cellules épithéliales mammaires et induit la différenciation des macrophages de type M2, immunosuppresseurs. L'utilisation d'anticorps anti-IL-4 *in vivo* diminue de ce fait la formation de métastases (DeNardo *et al.*, 2009). Toujours dans le cadre du cancer du sein, l'analyse de 147 échantillons de patients montre une proportionnalité directe entre le taux de CCL2 et de TGF β dans les cancers les plus avancés, ce qui fait pencher la balance Th1/Th2 du côté des Th2 avec un mauvais pronostic (Mandal *et al.*, 2018). Le bon pronostic lié à l'infiltrat Th1 est essentiellement dû à la stimulation des LT CD8⁺ qui en résulte. En effet, la production d'IL-2 par les Th1 induit l'expansion et la prolifération des LT CD8⁺ au sein de la tumeur et leur production de granzyme B, en boostant leur activité cytotoxique (Bos and Sherman, 2010; Ross and Cantrell, 2018).

1.9.3.2 Les Treg

Les LT de type régulateur (Treg) sont des LT CD4⁺ caractérisés par l'expression du récepteur CD25 (qui correspond à la chaîne α du récepteur à l'IL-2) et du facteur de transcription FoxP3 (forkhead box P3). Ce sous-type de cellule constitue 5 à 10 % des CD4⁺ circulants et inclut différentes sous-populations : les nTreg (natural Treg), les iTreg (induced Treg), les Treg sécrétant IL-17, les Treg CD8⁺ et les Tr1 (les seuls n'exprimant pas FoxP3) (Hashemi *et al.*, 2020). Les Treg ont une activité immunosuppressive, qui permet d'éviter l'activation excessive du système immunitaire et sont responsables des mécanismes de tolérance qui préviennent les maladies auto-immunes. Leur activité immunosuppressive se fait en grande partie via la sécrétion de cytokines comme l'IL-10 et le TGF β visant à inhiber l'activation des CD et des LT CD8⁺ cytotoxiques, en grande partie responsables de la réponse immunitaire. Ce qui, dans un contexte physiologique, tend à protéger contre le développement de maladies auto-immunes, se traduit en une inhibition de la réponse immunitaire antitumorale dans le contexte d'un cancer. Mais l'activité immunosuppressive des Treg envers les LT antitumoraux ne se résume pas seulement à la production d'IL-10 et de

TGF β , mais des mécanismes bien plus complexes sont à l'origine de cette immunosuppression. Par exemple, la production d'IL-35 par les Treg augmente l'expression de LAG3, TIM-3 et PD-1, molécules immunosuppressives faisant partie des points de contrôle immunitaires (PCI, qui seront développés plus en détail par la suite) et qui induisent l'anergie des cellules T cytotoxiques. De plus, l'expression de LAG3 à la surface des Treg inhibe la maturation des CD, qui ne pourront plus présenter les antigènes tumoraux aux LT. Certains sous-types de Treg peuvent également exercer une activité cytotoxique directe sur les LT CD8⁺ via la sécrétion de granzyme B, ou encore via la voie apoptotique du récepteur TRAIL (Hashemi *et al.*, 2020).

L'infiltrat Treg constitue un marqueur de mauvais pronostic chez la souris et chez l'homme. Une étude menée en 2011 par Xu *et al.* chez la souris, montre que dans les tumeurs 4T1 (lignée murine de cancer du sein triple négatif) chez la souris BALB/c il y a une accumulation de cellules Treg exprimant CCR6 inhibant la réponse immunitaire antitumorale (Xu *et al.*, 2011). Chez l'homme, de nombreuses études analysent la corrélation entre l'infiltrat Treg et le pronostic des patients. Une étude effectuée par Aruga *et al.* sur 93 patientes atteintes de cancer du sein et traitées par chimiothérapie, montre qu'un faible infiltrat en cellules FoxP3⁺ est considéré comme un facteur de bon pronostic (Aruga *et al.*, 2009). De la même façon, Plitas *et al.* ont montré une corrélation entre un infiltrat Treg important et la diminution de la survie globale sans récurrence chez 105 patientes atteintes de cancer du sein (Plitas *et al.*, 2016). De ce fait, les traitements induisant une diminution des Treg ou de leur activité immunosuppressive ont un fort potentiel anti-cancéreux. Par exemple, l'administration d'un anticorps anti-CD25 (daclizumab), induisant la déplétion des Treg, chez des patientes porteuses de cancer du sein métastatique est capable de restaurer la réponse immunitaire antitumorale (Rech and Vonderheide, 2009). Le nombre de cellules Treg infiltrant la tumeur peut être contrôlé également grâce à l'utilisation de certaines chimiothérapies, comme le cyclophosphamide. Une étude menée par l'équipe du Pr. François Ghiringhelli montre que l'administration de cyclophosphamide chez 61 patientes atteintes de cancer du sein diminue l'infiltrat Treg et restaure la réponse antitumorale assurée par les cellules NK et les LT (Ghiringhelli *et al.*, 2007). Dans le cadre du cancer colorectal, Villarreal *et al.* ont montré que l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre le CCR8, exprimé par les Treg, diminue la croissance tumorale et augmente la survie chez la souris (Ghiringhelli *et al.*, 2007; Villarreal *et al.*, 2018). La même chose est observée chez les patients porteurs de cancer

colorectal, où la diminution de l'infiltrat Treg augmente la survie et l'infiltrat CD8⁺ (Crosby *et al.*, 2020).

Mais l'augmentation d'un infiltrat Treg au sein de la tumeur n'est pas le seul moyen utilisé par les cellules cancéreuses afin d'échapper à la surveillance du système immunitaire. L'accumulation d'autres cellules immunitaires immunosuppressives, comme les MDSCs ou les macrophages de type M2, sont également observés chez les patients atteints de cancer. Ce microenvironnement pro-tumoral induit un épuisement des cellules T CD8⁺, qui perdent leur pouvoir cytotoxique.

1.9.4 L'épuisement des LT CD8⁺ dans le MET

Le rôle cytotoxique des LT CD8⁺ infiltrant la tumeur est progressivement perdu au contact des antigènes tumoraux. En effet, la stimulation chronique induite par ces antigènes entraîne une perte de fonction progressive qui mène à un état d'épuisement, ou anergie. Les CD8⁺ anergiques sont caractérisés par une perte progressive de l'expression des cytokines effectrices telles que l'IL-2, le TNF α et l'IFN γ , entraînant une diminution de la production de perforine de granzyme B, une diminution de la prolifération et, donc, de leur survie. Quand les LT CD8⁺ atteignent le niveau maximal d'épuisement, leurs activités d'origine ne peuvent plus être restaurées (He *et al.*, 2019). Cet état peut être dû à différents mécanismes mis en place aussi bien par les cellules cancéreuses que par les cellules immunitaires immunosuppressives :

1.9.4.1 Petites molécules immunosuppressives et épuisement des LT CD8⁺

Plusieurs molécules solubles entrent en jeu dans la perte de fonction des cellules T CD8⁺. Les cytokines immunosuppressives IL-10 et TGF β (sécrétées principalement par les MDSCs et les Treg) stimulent la prolifération des cellules cancéreuses tout en inhibant la prolifération des CD8⁺ et induisant leur perte de fonction (Sawant *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2017). L'IL-35 sécrétée par les Treg contribue à la création d'un microenvironnement immunosuppressif qui diminue la réponse immunitaire antitumorale (Maj *et al.*, 2017). Un microenvironnement riche en CSF1 (colony stimulating factor 1) induit le recrutement des macrophages M2 exerçant une activité immunosuppressive (Xun *et al.*, 2020). La chimiokine CCL22 a également un pouvoir immunosuppressif, induisant le recrutement des Treg dans le MET (Röhrle, Knott

and Anz, 2020). Les cellules cancéreuses sécrètent aussi des molécules entraînant une perte de fonction des CD8⁺. L'adénosine sécrétée dans le MET peut avoir une action inhibitrice directe via la liaison sur le récepteur A2AR des LT, ou indirecte induisant la stimulation de la prolifération des Treg, inhibant la capacité des CPA à présenter des antigènes tumoraux et en activant les MDSCs (Raskovalova *et al.*, 2007; Ohta and Sitkovsky, 2014). L'indoléamine 2,3-dioxygénase (iDO) induit également l'état d'anergie des LT CD8⁺ via la déplétion locale du tryptophane et l'activation des cellules Treg (Munn and Mellor, 2007). Une autre molécule à activité immunosuppressive est le VEGF-A sécrété par les cellules cancéreuses. En effet, le VEGF-A participe à l'épuisement des LT CD8⁺ via l'inhibition de la maturation des CD, l'accumulation des MDSCs au sein de la tumeur et la stimulation des Treg (Laxmanan *et al.*, 2005; Terme *et al.*, 2013).

1.9.4.2 Les points de contrôle immunitaires (PCIs).

Les PCIs incluent une série de récepteurs qui sont normalement impliqués dans la tolérance du « soi » et évitent la survenue de maladies auto-immunes. Cela concerne plusieurs récepteurs exprimés par les cellules T, dont la liaison avec leurs ligands spécifique entraîne une diminution de leur activation et diminue la réponse immunitaire. Bien que ces molécules soient indispensables au maintien de l'homéostasie et régulent la réponse immunitaire chez les individus sains, dans un contexte cancéreux cela peut induire l'anergie des cellules T cytotoxiques (Haanen and Robert, 2015). Différentes voies de signalisation exercent cette fonction inhibitrice. Un mécanisme immunosuppresseur parmi les plus connus et développés dans les études et en thérapie, est celui impliquant le récepteur PD-1 (programmed cell death 1). Ce récepteur transmembranaire se trouve à la surface des LT et appartient à la famille des récepteurs CD28. Il existe deux ligands de PD-1 : PD-L1 (programmed cell death ligand 1), qui peut être exprimé par de nombreux types cellulaires, dont les cellules cancéreuses, et PD-L2, qui a une expression plus restreinte (CD, macrophages et LB). La liaison entre PD-1, à la surface des LT, et PD-L1, normalement exprimés par les CPA, induit l'activation de la phosphatase SHP-2 (Src homology 2 (SH2) domain-containing tyrosine phosphatase), puis l'activation de la phosphatase PP2A, qui diminue la phosphorylation de la kinase Akt. Si Akt n'est pas phosphorylée, cela bloque l'activation de la voie Akt/mTOR, indispensable à l'activation lymphocytaire. En parallèle, le récepteur de co-stimulation CD28 est de-phosphorylé, ce qui diminue ultérieurement l'activation via le TCR. L'expression de PD-L1 par les cellules

cancéreuses engendre, donc, une diminution de l'activité des LT au sein de la tumeur, contribuant à leur anergie et à une diminution de la réponse immunitaire antitumorale (Ai, Xu and Xu, 2020). Une autre voie inhibitrice de l'activation lymphocytaire est celle des récepteurs CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocytes-associated protein 4)/B7. Le récepteur CTLA-4, comme PD-1, se trouve à la surface des LT, et lie les récepteurs B7 (B7-1 et 2) situés sur les CPA. La liaison CTLA-4/B7 entraîne également une diminution de l'activation lymphocytaire. Le récepteur CTLA-4 entre donc en compétition avec le CD28 pour la liaison aux récepteurs B7 et ce « switch » induit une inhibition de la réponse immunitaire. Les cellules immunitaires immunosuppressives utilisent cette voie de signalisation afin d'inhiber la réponse T au sein de la tumeur (Buchbinder and Desai, 2016). Contrairement à PD-1 qui intervient dans la phase effectrice de l'activation des LT, plus tardive, CTLA-4 en contrepartie joue un rôle important dans la phase précoce de la réponse immunitaire (Okazaki *et al.*, 2013). Ces deux mécanismes inhibiteurs de l'activation des LT sont schématisés dans la Figure 6.

Bien que les voies PD-1/PD-L1 et CTLA-4/B7 soient les premières identifiées et étudiées, elles ne sont pas les seules voies inhibitrices de l'activation lymphocytaire. D'autres récepteurs exprimés à la surface des cellules T entraînent une induction de leur anergie : le récepteur TIM-3, qui lie la galectine 9 souvent surexprimée dans le microenvironnement tumoral ; le récepteur TIGIT qui a comme ligand le CD155 ; le récepteur LAG-3 qui lie le CMH-II ; le récepteur BTLA qui lie HVEM (Hashimoto *et al.*, 2018) (Figure 6).

Un autre mécanisme inhibiteur récemment identifié et classé dans les points de contrôle immunitaires est le « point de contrôle ionique ». En effet, Eil *et al.* ont montré que les cellules tumorales nécrotiques sécrètent des ions K^+ qui s'accumulent dans le microenvironnement tumoral. Cette accumulation induit une entrée d'ions K^+ au sein des LT via le canal potassique Kv1.3, ayant comme conséquence une activation de la phosphatase PP2A, inhibant la phosphorylation d'Akt et, donc, l'activation lymphocytaire (Eil *et al.*, 2016).

Les voies de signalisation et les molécules inhibant l'activation des LT sont donc nombreuses, et l'enjeu actuel des thérapies anti-cancéreuses est d'inhiber ces mécanismes afin de restaurer une réponse immunitaire antitumorale efficace.

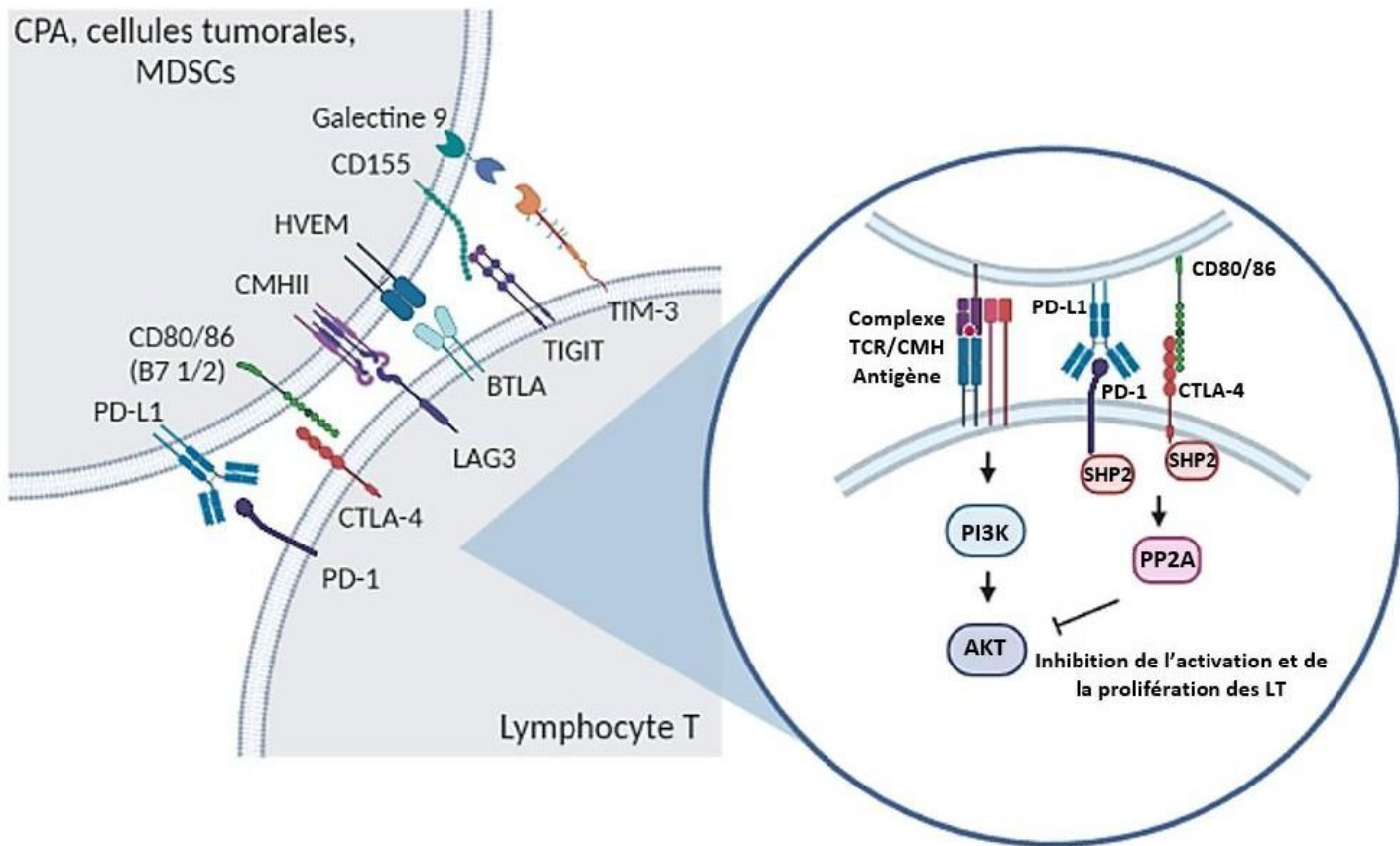


Figure 6. Expression des PCIs et leurs ligands. Représentation des principaux récepteurs présents à la surface des LT et des cellules cancéreuses, entraînant une diminution de la réponse immunitaire antitumorale. Dans les voies de signalisation impliquant les récepteurs PD-1 et CTLA-4, le recrutement des phosphatases SHP2 et PP2A entraîne une inhibition de la kinase Akt, importante dans l'activation des LT via le TCR. Schéma réalisé à l'aide du logiciel BioRender.

1.9.5 L'immunothérapie des cancers : restaurer une réponse immunitaire efficace

L'immunothérapie des cancers inclut différentes stratégies visant à restaurer le potentiel cytotoxique des cellules immunitaires envers la tumeur, en particulier l'activité des LT CD8⁺ (Velcheti and Schalper, 2016). Les principales stratégies utilisées en immunothérapie des cancers sont essentiellement au nombre de quatre : la stimulation non-spécifique du système immunitaire via des molécules solubles, le transfert adoptif de cellules, les vaccins à CD, et l'inhibition des points de contrôle immunitaires (Lei *et al.*, 2020).

1.9.5.1 La stimulation non-spécifique du système immunitaire.

Cette stratégie vise à stimuler le système immunitaire via l'administration de molécules solubles induisant une réponse contre la tumeur. L'administration de GM-CSF (Granulocytes-macrophage colony-stimulating factor), par exemple, induit la différenciation des CD et stimule leur capacité à présenter les antigènes tumoraux aux LT cytotoxiques (Yan *et al.*, 2017). D'autres cytokines administrées afin de stimuler l'activité du système immunitaires sont l'IL-2, l'IL-12, l'IL-15, l'IL-21 et l'IFN γ (Floros and Tarhini, 2015). La cytokine IL-2 recombinante est utilisée depuis 1992 pour le traitement des patients atteints de cancer du rein métastatique, et depuis 1998 chez les patients atteints de mélanome métastatique, avec un réel bénéfice chez les patients (Clark *et al.*, 2017; Jiang, Zhou and Ren, 2016; Marabondo and Kaufman, 2017). L'IL-12 est une autre cytokine au fort pouvoir immunomodulateur et depuis 2004 elle fait l'objet d'études cliniques pour les patients atteints de cancer du sein et du cancer de la prostate (ClinicalTrials.gov NCT00004893, NCT00406939). L'IL-15 a des effets similaires à l'IL-2 pour son activité biologique, et elle a fait l'objet d'études cliniques prometteuses pour le traitement du mélanome métastatique, le cancer rénal, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer de la tête et du cou et le lymphome (Cooley *et al.*, 2019)(ClinicalTrials.gov NCT01946789). L'IL-21 a fait l'objet d'essais cliniques pour le traitement du mélanome et du cancer rénal métastatiques (ClinicalTrials.gov NCT00601861, NCT00095108). L'IFN γ fait également l'objet d'essais cliniques chez les patients atteints de cancer du sein HER-2+, de cancer de l'ovaire, de cancer rénal métastatique et de cancer de la prostate (ClinicalTrials.gov NCT03112590, NCT00004032, NCT02614456, NCT00002637). Malgré les nombreux effets positifs obtenus via les cytokines, le point faible de ces traitements reste la forte toxicité si administrés à forte dose, ce qui rend difficile leur

utilisation chez les patients (Floros and Tarhini, 2015). L'administration à forte dose est en partie due à la demi-vie courte de ces molécules. Pour cette raison des cytokines « pégyliées », dont l'IL-2, sont en cours d'étude. En effet, la pégylation consiste à lier la molécule au polyéthylène glycol (PEG) qui est soluble dans l'eau et qui en augmente la biodisponibilité. Une autre stratégie pour augmenter l'efficacité de l'IL-2 implique l'addition d'un anticorps anti-IL2R β (CD122) appelé NARA1. Cette molécule hybride est capable d'activer les LT CD8⁺ en inhibant l'activation des T_{reg}, dont l'effet semble prometteur en thérapie anti-cancéreuse (Boyman and Arenas-Ramirez, 2019).

L'administration du Bacille de Calmette-Guérin (BCG) est également utilisée et a fait ses preuves dans le traitement du cancer de la vessie, du cancer gastro-intestinal, du mélanome et du cancer du sein (Falk *et al.*, 1983; Vasekar, Degraff and Joshi, 2016).

1.9.5.2 Le transfert adoptif de cellules

Contrairement aux thérapies basées sur l'administration de cytokines, le transfert adoptif est une technique qui mène à une activation plus spécifique du système immunitaire. La technique la plus connue et utilisée est celle concernant les cellules T à récepteur antigénique chimérique (ou cellules CAR-T), qui consiste à modifier les cellules T d'un patient pour faire en sorte qu'elles soient en mesure de reconnaître et détruire les cellules cancéreuses. Ces cellules T autologues sont donc modifiées génétiquement pour qu'elles expriment à leur surface une protéine chimérique permettant une reconnaissance spécifique des cellules tumorales (Kalos and June, 2013). D'autres techniques prévoient le transfert adoptif de cellules NK (Fang, Xiao and Tian, 2017). Actuellement, seulement deux traitements impliquant l'administration de cellules CAR-T sont approuvés par la FDA : le tisagenlecleucel dans le cadre de la leucémie aigüe lymphoblastique (LAA) et le lymphome diffus à grandes cellules B (LDGCB), et l'axicabtagène ciloleucel pour le LDGCB. Malheureusement, l'utilisation de ces thérapies implique encore beaucoup d'effets indésirables, comme le syndrome de relargage cytokinique, un syndrome inflammatoire très grave (Brudno and Kochenderfer, 2019). De plus, l'utilisation des cellules CAR-T s'avère peu efficace dans les tumeurs solides et ce pour plusieurs raisons. D'une part, les tumeurs solides sont plus hétérogènes que les tumeurs hématologiques, de ce fait le nombre d'antigènes tumoraux est élevé et varié au sein de la tumeur, ce qui rend difficile un ciblage efficace. D'autre part, les cellules CAR-T accèdent

plus facilement à la circulation sanguine et au système lymphatique, tandis que la pénétration au sein des tissus s'avère plus compliquée (Marofi *et al.*, 2021).

1.9.5.3 Les vaccins à CD

Cette stratégie thérapeutique vise à moduler la capacité des CD à présenter l'antigène et activer les cellules immunitaires effectrices, comme les LT CD8⁺, contre la tumeur. Cela peut être réalisé *in vivo* via la stimulation des CD via le GM-CSF (même si cela reste moins spécifique, comme discuté précédemment), ou via des anticorps ciblant le récepteur CD40. Certaines approches *ex vivo* portent sur la différenciation et maturation des monocytes de patient en CD matures chargées avec des antigènes tumoraux spécifiques (Sabado, Balan and Bhardwaj, 2017; Wculek *et al.*, 2020). Plusieurs essais cliniques sont actuellement en cours à ce sujet dans différents types de cancers tels que le cancer de l'ovaire, le cancer rénal, le mélanome et le cancer colorectal (Wang *et al.*, 2014; Radomski *et al.*, 2016)(ClinicalTrial.gov, NCT00703105, NCT00929019).

1.9.5.4 Les anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôle immunitaires

L'inhibition des points de contrôle immunitaire représente un des principaux succès des traitements en immunothérapie des cancers. Ces thérapies consistent principalement à utiliser des anticorps monoclonaux ciblant les récepteurs inhibiteurs (voir paragraphe sur les points de contrôle immunitaires, 1.9.4.2), toujours dans l'objectif de restaurer l'activité cytotoxique des LT. Le premier anticorps monoclonal approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) et ciblant le récepteur CTLA-4 a été l'ipilimumab, utilisé dans le traitement du mélanome métastatique (van de Ven and Borst, 2015). Le traitement par ipilimumab est capable de stimuler le recrutement des LT CD8⁺ cytotoxique et des LT CD4⁺ au sein de la tumeur, ce qui est indispensable pour une réponse antitumorale efficace (Sharma *et al.*, 2019). D'autres anticorps, comme le nivolumab et le pembrolizumab, fixent et bloquent le récepteur PD-1 et empêchent sa liaison avec le récepteur PD-L1, ce qui contrecarre l'inactivation des LT induite par cette voie. Ces deux anticorps sont actuellement autorisés en France pour le traitement du mélanome, des cancers du poumon non à petites cellules, les carcinomes urothéliaux, les lymphomes de Hodgkin et les carcinomes à cellules de Merkel (Koppolu and Rekha Vasigala, 2018; Reck, Borghaei and O'Byrne, 2019; Sharma *et al.*, 2017; Ansell *et al.*, 2015; Barrios *et al.*, 2020; Kwok *et al.*, 2016; Suzman *et al.*, 2019). Deux autres anticorps

monoclonaux ciblant PD-L1 sont également autorisés en France : l'avelumab, indiqué pour le traitement des carcinomes à cellules de Merkel, et l'atezolizumab, indiqué dans le traitement des carcinomes urothéliaux, des cancers du poumon non à petites cellules et des cancers du sein triple négatifs (D'Angelo *et al.*, 2018; Suzman *et al.*, 2019; Markham, 2016). Pour que ces traitements soient efficaces, en règle générale, le patient doit exprimer un fort taux de ces récepteurs au sein de la tumeur et ceci est considéré comme fondamental dans la détermination des bons et mauvais répondeurs. Ces thérapies se montrent plus efficaces dans les sous-types de cancers présentant un taux de mutation élevé, comme le mélanome et le cancer du poumon, car cela implique une activation du système immunitaire plus importante. Malheureusement ces thérapies ont encore beaucoup de points limitants, comme le taux de bons répondeurs qui reste assez faible. En effet, ces thérapies se montrent efficaces chez environ 40% des patients atteints de mélanome et environ 30% des patients atteints de cancer du poumon. Sans compter que chez certains patients des phénomènes d'hyper-progression ont été enregistrés, avec une progression tumorale qui est accélérée avec ce type de traitement et qui induit à un décès plus rapide du patient. Le manque d'efficacité de ces thérapies est également dû au fait que les cellules tumorales développent des résistances afin de contourner l'action de ces anticorps (Kalbasi and Ribas, 2020). Afin de développer des nouvelles stratégies thérapeutiques, d'autres anticorps monoclonaux sont actuellement en essai clinique et ciblent d'autres récepteurs inhibiteurs tels que LAG-3, TIM3 et TIGIT. Pour les anti-LAG3 et les anti-TIM3, les études cliniques sont plutôt en Phase I, et évaluent la toxicité des médicaments chez les patients atteints de lymphome ou de cancer du pancréas (ClinicalTrial.gov, NCT00732082, NCT03489369, NCT03489343). Le blocage du récepteur TIGIT se fait principalement à l'aide de l'anticorps tiragolumab, est en cours d'évaluation dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules, avec des études cliniques de Phase II actuellement en cours (ClinicalTrial.gov, NCT03563716).

D'autres anticorps monoclonaux ne ciblant pas spécifiquement les points de contrôle immunitaires se classent parmi les immunothérapies, et ce parce que ces molécules peuvent avoir une action antitumorale indirecte via leur partie Fc (fragment cristallisable). Ces mécanismes impliquent la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC), la phagocytose cellulaire dépendante des anticorps (ADCP) et la cytotoxicité dépendante du complément (CDC)(Castelli, McGonigle and Hornby, 2019). Un exemple est le

rituximab, anticorps dirigé contre le récepteur CD20 exprimé par les LB et indiqué dans le traitement de certains lymphomes (Jurczak, Długosz Danecka and Buske, 2019). Le trastuzumab est un autre anticorps ciblant la protéine HER2, exprimée à la surface de certaines cellules de cancer du sein, et son inhibition diminue la croissance tumorale (Maximiano *et al.*, 2016). Le bevacizumab est un anticorps bloquant le VEGF qui inhibe sa liaison avec le récepteur VEGFR en inhibant son activité (Garcia *et al.*, 2020). Plus récemment, des anticorps dits bi-spécifiques ont été développés, reconnaissant deux molécules différentes et pouvant interagir avec deux types cellulaires à la fois. C'est l'exemple du blinatumomab, médicament indiqué dans le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique, capable de fixer simultanément le récepteur CD3 exprimé par les LT cytotoxiques et le CD19 exprimé par les LB, permettant donc la destruction de ces derniers par les LT (Goebeler and Bargou, 2016).

L'immunothérapie des cancers est donc une voie en plein développement dans la recherche de nouveaux médicaments anti-cancéreux. Le challenge actuel est donc de trouver des nouvelles stratégies thérapeutiques afin d'augmenter le pourcentage de bons répondeurs, mais aussi de pouvoir restaurer la réponse immunitaire antitumorale là où les thérapies actuelles demeurent inefficaces.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Mon travail de thèse inclut deux projets axés sur le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses qui seront présentées dans deux parties distinctes au sein de ce manuscrit.

La première partie se focalisera sur le cancer colorectal, et en particulier sur le rôle immunomodulateur d'une petite molécule inhibitrice de kinases, le H89. Dans une première partie introductive je développerai le cancer colorectal ainsi que les traitements couramment utilisés en thérapie et les inhibiteurs de kinases dans le cancer. Je me focaliserai ensuite sur le H89 et son utilisation potentielle en oncologie, avant de présenter le premier article (en cours de soumission) qui étudie le potentiel antitumoral du H89 dans nos modèles de cancers en analysant le rôle du système immunitaire inné et adaptatif dans l'effet de la molécule.

La deuxième partie sera axée sur le cancer du sein triple négatif et l'étude de l'effet antitumoral du monoxyde d'azote (NO). Je présenterai donc le cancer du sein, et en particulier le cancer du sein triple négatif, ainsi que les traitements utilisés pour ensuite me focaliser sur la voie de signalisation IL-6/JAK2/STAT3 et le rôle du NO dans le cancer. Cette partie introductive a comme but de présenter le deuxième article (publié en 2021 dans le journal IJMS) qui étudie le rôle d'un médicament donneur de NO, le glyceryl trinitrate (GTN), dans la diminution de la migration/invasion des cellules cancéreuses et formation des métastases.

PARTIE 1 : NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER COLORECTAL : POTENTIEL IMMUNOMODULATEUR D'UN INHIBITEUR DE KINASES

PRÉSENTATION DE L'ARTICLE 1 : en préparation

« *Protein kinase inhibitor-mediated immunoprophylactic and immunotherapeutic control of colon cancer* »

Silvia Ghione^{1,2}, Cindy Racœur^{1,2}, Nesrine Mabrouk^{1,2}, Jingxuan Shan³, Emma Groetz^{1,2}, Elise Ballot^{4,5}, Caroline Truntzer^{4,5}, Lotfi Chouchane³, Frédérique Vegran^{4,5,6}, Catherine Paul^{1,2}, Stéphanie Plenchette^{1,2*#}, Ali Bettaieb^{1,2*#}

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), EA7269, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

²LIIC, EPHE, PSL Research University, Paris, France

³Genetic Intelligence Laboratory, Weill Cornell Medicine-Qatar, Qatar Foundation, Doha, Qatar

⁴ Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, Centre Georges François Leclerc, Dijon, France

⁵INSERM U1231, Dijon, France

⁶University of Burgundy and Franche Comté, Dijon, France

*These authors jointly supervised

1. LE CANCER COLORECTAL

1.1 Epidémiologie et classification

Le cancer colorectal demeure l'un des cancers les plus fréquents en France, soit le deuxième chez la femme et le troisième chez l'homme, avec 43 336 nouveaux cas recensés en 2018 tous sexes confondus. Malgré une diminution du taux de mortalité (-1,6% par an en moyenne tous sexes confondus entre 1990 et 2018), ce cancer représente actuellement la deuxième cause de décès par cancer en France, et 12% de l'ensemble des décès par cancer, surtout chez les personnes âgées de plus de 65 ans. Dans plus de 80% des cas, ces cancers dérivent d'une tumeur bénigne qui évolue et devient cancéreuse, avec apparition en moyenne entre l'âge de 71 ans (chez l'homme) et 73 ans (chez la femme). Actuellement, 44% des cancers colorectaux sont diagnostiqués précocement, surtout chez les patients ayant moins de 65 ans. En revanche, encore 10% des malades sont diagnostiqués en stade avancé. Cela est dû à une participation encore insuffisante aux campagnes de dépistage, car seulement 33,5% des patients entre 50 et 74 ans ont été dépistés entre 2016 et 2017. Afin de garantir une bonne prise en charge des patients ce dépistage est primordial, et la classification de la tumeur a aussi toute son importance, car le stade de la pathologie est un élément de diagnostic essentiel ((InVs)).

Entre 1943 et 1952 le chirurgien français Pierre DENOIX, de l'institut Gustave-Roussy, a proposé une classification des cancers selon leur extension anatomique, appelée TNM (pour *Tumor, Nodes, Metastasis*). Les trois lettres représentent la propagation de la *tumeur* locale (T), au niveau des ganglions lymphatiques (N, pour *node* en anglais) et délocalisé s'il y a présence de *métastases* (M). La lettre « **T** », qui décrit donc la tumeur initiale, est identifiée avec T0 en absence de lésion primitive, jusqu'à 4 pour les tumeurs les plus avancées. La lettre « **N** », de 0 à 2 dans le cas du cancer colorectal, dépend du nombre de ganglions périphériques envahis par la tumeur. Enfin, la lettre « **M** », de 0 à 1 (avec sous-catégories 1a, 1b, 1c) en cas d'absence ou présence de métastases (Tableau 1). Cette classification, reconnue internationalement, permet de faciliter les échanges et la prise en charge des patients. Cette classification est mise à jour régulièrement par les spécialistes membres de l'UICC (*Union for International Cancer Control*). La classification TNM permet de codifier les indications de traitement, et la combinaison des trois repères contribue à établir un stade d'avancement de

la tumeur qui est plus synthétique, allant simplement de I à IV (Figure 7). Dans le cadre du cancer colorectal, au **stade 0** la tumeur est *in situ*, très superficielle et n'a pas encore envahi la sous-muqueuse ni les ganglions lymphatiques, avec absence de métastases. Au **stade I** la tumeur envahit la sous-muqueuse et la paroi du côlon/rectum, sans encore atteindre les ganglions et sans formation de métastases. Les **stades II et III** voient la tumeur se développer plus en profondeur, en traversant plusieurs couches de la paroi intestinale (II), jusqu'à envahir les ganglions situés en proximité de la tumeur (III). Au dernier stade (**IV**), la tumeur s'est propagée au-delà des parois du côlon/rectum, vers des organes éloignés avec formation de métastases (généralement au niveau du foie, mais aussi des poumons). Tous ces paramètres permettent d'évaluer efficacement la condition des patients pour permettre une prise en charge thérapeutique personnalisée (*Union and (UICC)*).

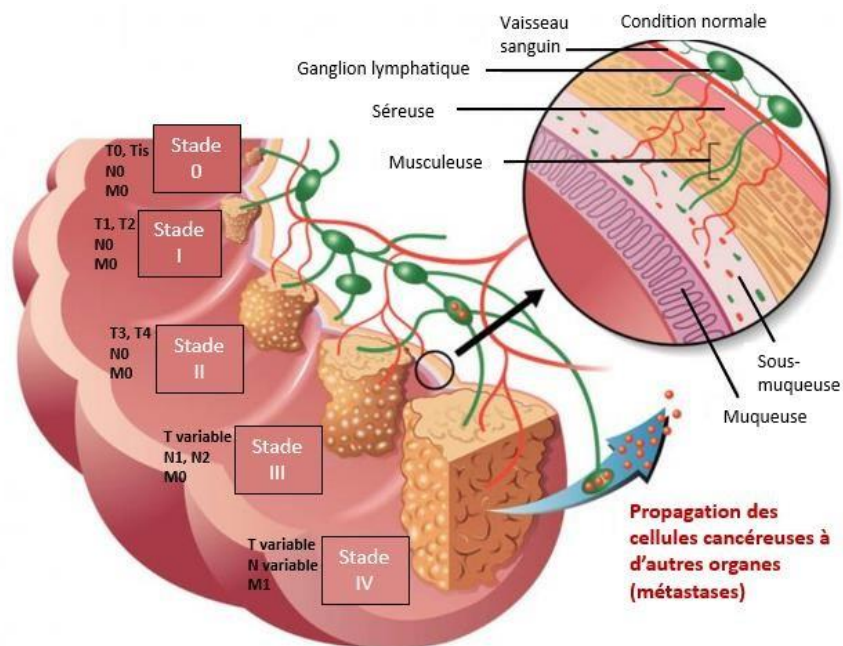


Figure 7. Stades du cancer colorectal selon la classification de l’UICC, et correspondance avec la classification TNM. Illustration des différents stades du carcinome colique, avec détail de la classification TNM correspondante (UICC). Image modifiée d’après le site <https://www.creapharma.ch/cancer-colorectal.htm>.

Tableau 1. Détail de la classification anatomique TNM pour les carcinomes coliques. D’après la 8ème édition du TNM, 2017 (UICC).

T= Tumeur primaire
T0: absence de tumeur
Tis: carcinome in situ, tumeur localisée dans la paroi interne du côlon/rectum
T1: invasion de la sous-muqueuse
T2: invasion de la paroi du côlon/rectum
T3: invasion de toute la paroi intestinale
T4: la tumeur est très développée et touche les organes périphériques
N= Ganglions Lymphatiques
N0: absence de tumeur dans les ganglions
N1: entre 1 et 3 ganglions touchés par la tumeur
N2: invasion de 4 ganglions ou plus
M= Métastases
M0: absence de métastases
M1: présence de métastases à distance
M1a: les métastases sont présentes dans un seul organe (foie, poumons, ovaires ...), mais pas dans le péritoine
M1b: les métastases ont envahi plusieurs organes
M1c: les métastases ont envahi le péritoine, avec ou sans leur présence dans d’autres organes

1.2 Les traitements du cancer colorectal

Le traitement des carcinomes coliques pour les patients ayant une tumeur *in situ*, avec absence de métastases, est principalement locorégional. La procédure classique mise en place est une exérèse chirurgicale qui vise à éliminer la tumeur et également une partie des tissus sains, si nécessaire et possible. Suite à la chirurgie, quand le cancer est diagnostiqué en phase précoce, une simple surveillance du patient suffit. Pour les tumeurs les plus agressives, on observe la mise en place d'un traitement néo-adjuvant, soit avant la chirurgie. Cette pratique vise à réduire la taille de la tumeur avant de procéder à l'acte d'exérèse (Labianca *et al.*, 2010). Le type de traitement néo-adjuvant est décidé en fonction des patients, selon des critères moléculaires décrétés grâce à une biopsie. La chimiothérapie systémique fait partie des traitements néo-adjuvants. Un autre type de traitement néo-adjuvant très utilisé est la radiothérapie, technique qui consiste à irradier avec des rayonnements ionisant la tumeur, en essayant d'épargner les cellules saines qui l'entourent. Cela a le bénéfice de rester un traitement local et non systémique contrairement à la chimiothérapie avec moins d'effets secondaires et de toxicité pour le patient. La radiothérapie peut également être utilisée après la chirurgie (radiothérapie adjuvante) afin de réduire les risques de récurrence de manière moins agressive qu'avec la chimiothérapie, ou encore pour traiter des patients atteints de cancer colorectal avec un état de santé fragile et qui ne supporterait pas un acte chirurgical (Rosen, Degett and Gögenur, 2016).

1.2.1 La chimiothérapie systémique

Dans le cas des tumeurs les plus agressives, il y a la mise en place de traitements systémiques suite à la chirurgie. Dans le cadre du cancer colorectal, ce type de traitement repose essentiellement sur la chimiothérapie adjuvante. Plusieurs classes de molécules sont actuellement utilisées, avec un mécanisme d'action et des cibles moléculaires différentes avec des protocoles d'administration variés en fonction des patients. Les trois molécules principales utilisées sont : le 5-Fluorouracile (5-FU), l'oxaliplatine (OXA) et l'irinotecan (IRI). Le 5-FU, découvert en 1957 par Heidelberg et Duschinsky, est le plus ancien médicament utilisé dans le traitement du cancer colorectal, ainsi que l'un des médicaments les plus utilisés en oncologie. Cette molécule appartient à la classe des antimétabolites, et a donc comme mécanisme principal celui de bloquer la synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN). Le 5-

FU étant un analogue de l'Uracile, il est converti par la machinerie cellulaire en trois métabolites actifs (le 5-FdUMP, le 5-FdUDP et le 5-FdUTP) qui sont incorporés dans l'ADN et l'ARN, ou bien inhibent l'enzyme thymidylate synthase (TS), en bloquant le cycle cellulaire et induisant la mort des cellules par apoptose (Figure 8). Le 5-FU ne peut pas être administré par voie orale à cause de la présence de l'enzyme dihydropyrimidine déshydrogénase (DPD) intestinale, qui intervient dans le catabolisme de la molécule, et la voie intra-veineuse reste la meilleure solution thérapeutique. L'efficacité du 5-FU peut être améliorée avec la prescription concomitante d'acide folinique, qui module son mécanisme d'action grâce à son action inhibitrice sur la TS (Vodenkova *et al.*, 2020). Un autre agent qui a un effet sur la réplication de l'ADN est l'OXA, un dérivé du platine. Cette molécule fait partie des agents alkylants, et induit la formation de ponts intra-brins entre deux guanines, en inhibant la réplication de l'ADN (Mauri *et al.*, 2020). Ce médicament est souvent utilisé en combinaison avec le 5-FU et l'acide folinique, constituant le FOLFOX, traitement de référence dans les protocoles actuels pour le cancer colorectal (Cheeseman *et al.*, 2002). Enfin, mais tout aussi important, l'IRI, un inhibiteur de topoisomérase. Ce médicament est métabolisé par les carboxylestérases, afin de produire le SN-38, sa forme active. Ce dernier inhibe la topoisomérase I, avec comme conséquence des cassures de l'ADN qui inhibent sa réplication (Paulík, Nekvindová and Filip, 2020). Ce traitement est souvent administré en combinaison avec le 5-FU et l'acide folinique, soit le FOLFIRI. De manière générale, le 5-FU peut être proposé seul aux patients ayant un cancer colorectal au stade précoce (principalement au stade II), mais pour les patients à plus haut risque comme ceux au stade III et IV, le traitement de première ligne repose sur le FOLFOX, suivi par le FOLFIRI en cas d'échec thérapeutique ou récurrence (Neugut *et al.*, 2019). Ces traitements ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses, mais inhibent la division cellulaire et induisent l'apoptose de toutes les cellules qui se répliquent, donc potentiellement des cellules saines de l'organisme. Les effets nocifs les plus importants sont liés aux cellules avec un haut taux de prolifération, comme celles de la moelle osseuse (baisse des défenses immunitaires), les épithéliums digestifs (troubles du système digestif et nausées), les follicules pileux (perte de cheveux et poils) ainsi que les ovaires et les testicules (baisse de la fertilité) (Livshits, Rao and Smith, 2014). Pour cela, d'autres types de traitements sont privilégiés quand cela est possible, avec des molécules plus spécifiques des cellules tumorales, ce que l'on appelle la thérapie ciblée.

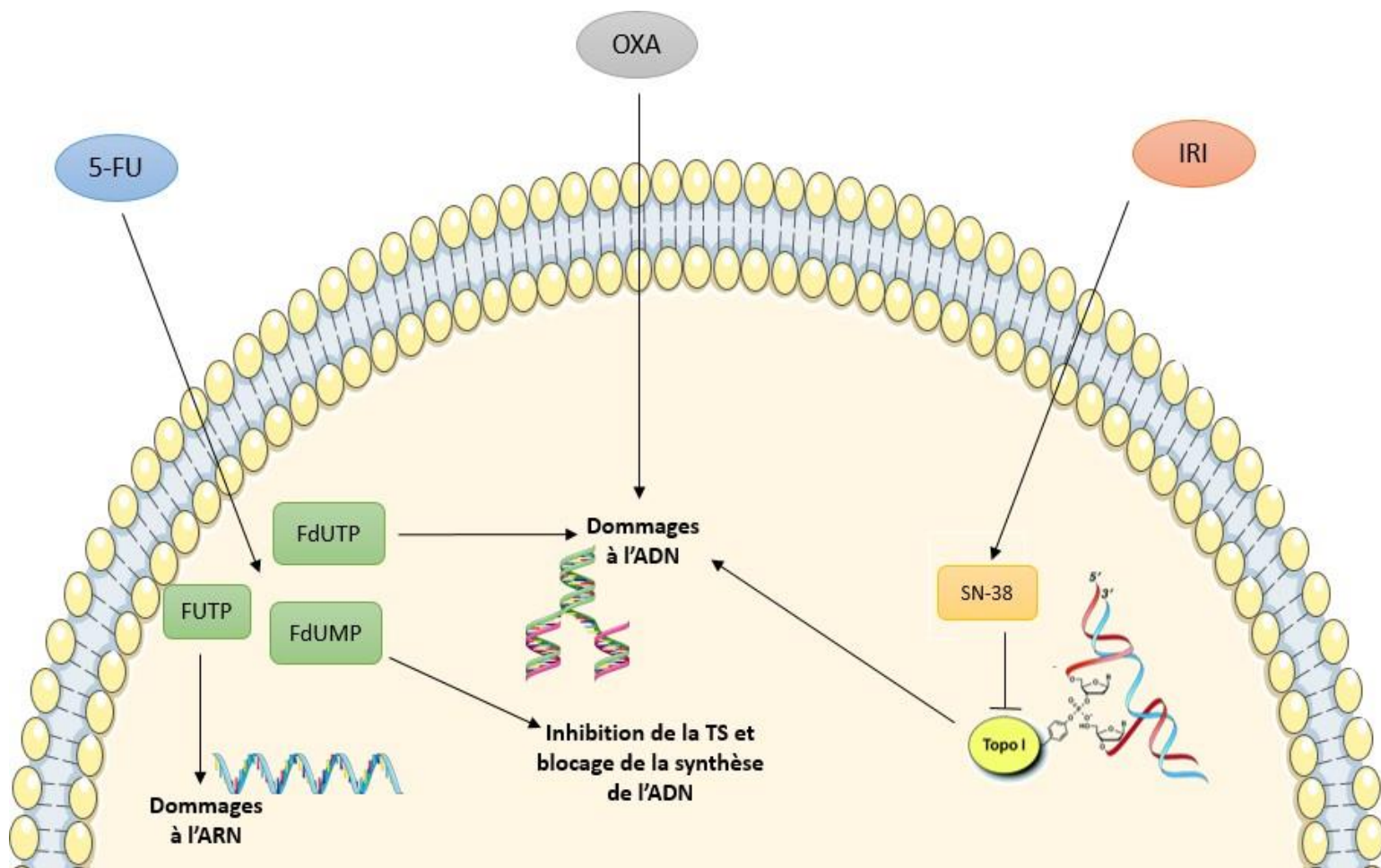


Figure 8. Mécanismes d'action des principaux traitements systémiques du cancer colorectal. Le 5-FU, l'OXA et l'IRI, ainsi que leurs combinaisons, demeurent les traitements principaux du cancer colorectal. Leurs mécanismes d'action, même si différents, visent à perturber la machinerie cellulaire de réplication de l'ADN, de l'ARN, ainsi que leur synthèse et réparation. Le 5-FU est transformé en FUTP, FdUMP et FdUTP, qui causent respectivement des dommages à l'ARN, l'inhibition de la thymidylate synthase (TS) et des dommages à l'ADN. L'OXA est un agent alkylant induisant des cassures et des dommages à l'ADN, et l'IRI est un inhibiteur de la topoisomérase I via son intermédiaire métabolique (SN-38). Tout cela mène à une induction de l'apoptose des cellules cancéreuses, avec des effets secondaires sur les cellules saines environnantes.

1.2.2 Les thérapies ciblées

Au-delà des traitements systémiques aspécifiques, une autre stratégie thérapeutique utilisée dans le cadre du cancer colorectal repose sur la thérapie ciblée. Ces thérapies regroupent un ensemble de traitements qui visent de manière spécifique certaines protéines ou certains récepteurs des cellules cancéreuses qui sont indispensables à leur prolifération.

1.2.2.1 Bloquer les voies de signalisation de l'EGFR et du VEGFR

Deux voies de signalisation très actives dans les cellules tumorales coliques sont celles des récepteurs VEGFR et EGFR (Figure 9) (Nagano *et al.*, 2019; de Castro-Carpeño *et al.*, 2008). Deux thérapies basées sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux sont actuellement très utilisées dans le cancer colorectal : le bevacizumab (Avastin®), un anti-VEGF, et le cetuximab (Erbix®), un anti-EGFR. Dans le cas du bevacizumab, l'anticorps cible spécifiquement le ligand du VEGFR, le VEGF, ce qui empêche sa liaison sur le récepteur en bloquant la cascade de signalisation menant à l'angiogenèse et la prolifération des cellules tumorales. Le cetuximab, quant à lui, cible directement le récepteur EGFR en bloquant sa cascade de signalisation proliférative en empêchant la liaison naturelle entre le récepteur et son ligand, l'EGF (Figure 9) (Piawah and Venook, 2019). Deux études cliniques de Phase II sont actuellement en cours, et utilisent un autre inhibiteur de l'EGFR, le panitumumab, chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique muté KRAS et ayant déjà reçu les traitements à base de 5-FU, OXA et IRI (Clinicaltrials.gov NCT03087071, NCT03227926). Un autre traitement faisant partie des thérapies ciblées du cancer colorectal métastatique est le regorafenib, commercialisé sous le nom de stivarga®. Cette molécule est un inhibiteur de kinase aspécifique, ciblant principalement l'activité tyrosine kinase du récepteur VEGFR et bloquant donc sa cascade de signalisation (Figure 9) (Carter, 2014). Il est principalement utilisé chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique pour lesquels les autres thérapies précédemment citées ne sont pas efficaces (Dhillon, 2018). Le regorafenib, ainsi que la classe des molécules inhibitrices de kinases et leur rôle dans le cancer, seront détaillés plus tard, dans le paragraphe 2. En général, ces traitements ont des résultats prometteurs chez les patients, et s'utilisent souvent en combinaison avec d'autres traitements, notamment la chimiothérapie. Par exemple, une étude clinique de Phase II voit la combinaison de l'irinotecan avec le cetuximab en traitement de troisième ligne pour les patients atteints de

cancer colorectal métastatique (Masuishi *et al.*, 2020). Ou encore, le cetuximab est administré en combinaison avec des autres molécules inhibitrices de kinases, le binimetinib et l'encorafenib, dans une étude clinique de Phase III chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique muté BRAF V600E (Van Cutsem *et al.*, 2019).

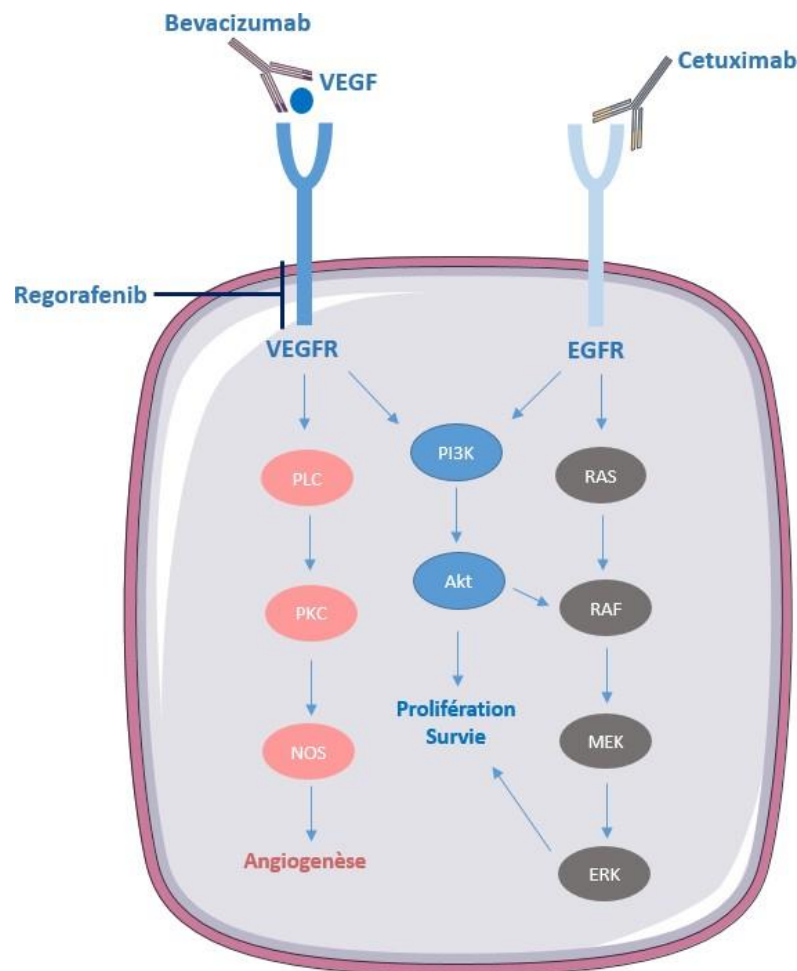


Figure 9. Mécanisme d'action du Bevacizumab, du Cetuximab et du Regorafenib. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal ciblant le VEGF et empêchant sa liaison avec son récepteur, le VEGFR. Cela entraîne une inhibition de la voie de signalisation incluant la PKC, qui stimule l'angiogenèse au sein de la tumeur, limitant son approvisionnement en oxygène. Le VEGFR active également la voie de prolifération PI3K/Akt, et le bevacizumab bloque aussi la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que leur survie. Le cetuximab cible directement le récepteur EGFR, activant la voie RAS mais également la voie PI3K/Akt (commune avec le VEGFR) et engendre une inhibition de la prolifération tumorale. Le regorafenib agit au niveau de l'activité tyrosine kinase du VEGFR, avec un effet similaire au bevacizumab quant à l'inhibition de la cascade de signalisation pro-angiogénique et de survie cellulaire. Ce dernier médicament reste moins spécifique, car son action ne se limite pas au VEGFR mais à d'autres protéines kinases présentes au sein de la cellule.

1.2.2.2 Les inhibiteurs des PCIs

D'autres traitements reposent sur l'immunothérapie et plus particulièrement sur les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires. Dans le cadre du cancer colorectal, l'utilisation de l'immunothérapie est limitée et cible essentiellement la voie PD-1/PD-L1 ou la voie CTLA-4/B7. Le pembrolizumab et le nivolumab sont deux anticorps monoclonaux ciblant le récepteur PD-1, présent sur les LT, et qui contrecarrent leur épuisement au sein de la tumeur (Figure 10). Malheureusement ces traitements ne fonctionnent que chez les patients ayant un cancer colorectal microsatellite instable élevé (MSI-high) ou avec défaillance du système de réparation de l'ADN (dMMR), ce qui représente seulement un faible pourcentage des cancers colorectaux. L'immunothérapie est donc peu accessible dans ce type de cancer même si elle reste une option thérapeutique éventuelle chez certains patients (Oliveira, Bretes and Furtado, 2019). La FDA a approuvé en 2017 l'administration de pembrolizumab et nivolumab pour le traitement des cancers colorectaux MSI-high ou dMMR chez des patients ayant déjà reçu deux à quatre thérapies antérieures (Piawah and Venook, 2019). Un autre anticorps approuvé par la FDA en 2018 pour le traitement du cancer colorectal métastatique MSI-high ou dMMR est l'ipilimumab, un anti-CTLA-4 administré en combinaison avec le nivolumab (Morse *et al.*, 2019). Le pembrolizumab, le nivolumab, et l'ipilimumab se montrent efficaces dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques de type MSI-high ou dMMR et, même si à l'heure actuelle ce sont les seuls traitements approuvés par la FDA, de nombreux essais cliniques étudient l'efficacité d'autres combinaison de traitements (Johdi and Sukor, 2020). Une étude de Phase II est actuellement en cours, et voit la combinaison du pembrolizumab avec le bevacizumab et la capecitabine, un précurseur du 5-FU (ClinicalTrials.gov, NCT03396926). Une autre étude de Phase I terminée depuis peu combine l'atezolizumab, un anti-PD-L1 utilisé dans les carcinomes urothéliaux, le cancer du poumon non à petites cellules et le cancer du sein triple négatif, avec le bevacizumab et le FOLFOX (Liu *et al.*, 2018). Deux autres études de Phase II sont actuellement en cours, et combinent le pembrolizumab avec le cetuximab ou avec l'ibrutinib, un inhibiteur de kinases utilisé dans le traitement de certaines leucémies (Kim *et al.*, 2021)(ClinicalTrials.gov, NCT02713373). Enfin, une étude prometteuse de Phase III va démarrer, combinant le FOLFOX et le bevacizumab avec ou sans l'atezolizumab dans le cancer colorectal métastatique (ClinicalTrials.gov, NCT02997228). Il reste encore beaucoup de chemin à parcourir pour augmenter l'efficacité

de l'immunothérapie dans le cancer colorectal et pour élargir le nombre de patients éligibles à ce type de traitements, ce qui fait de cette branche thérapeutique un axe de recherche prometteur.

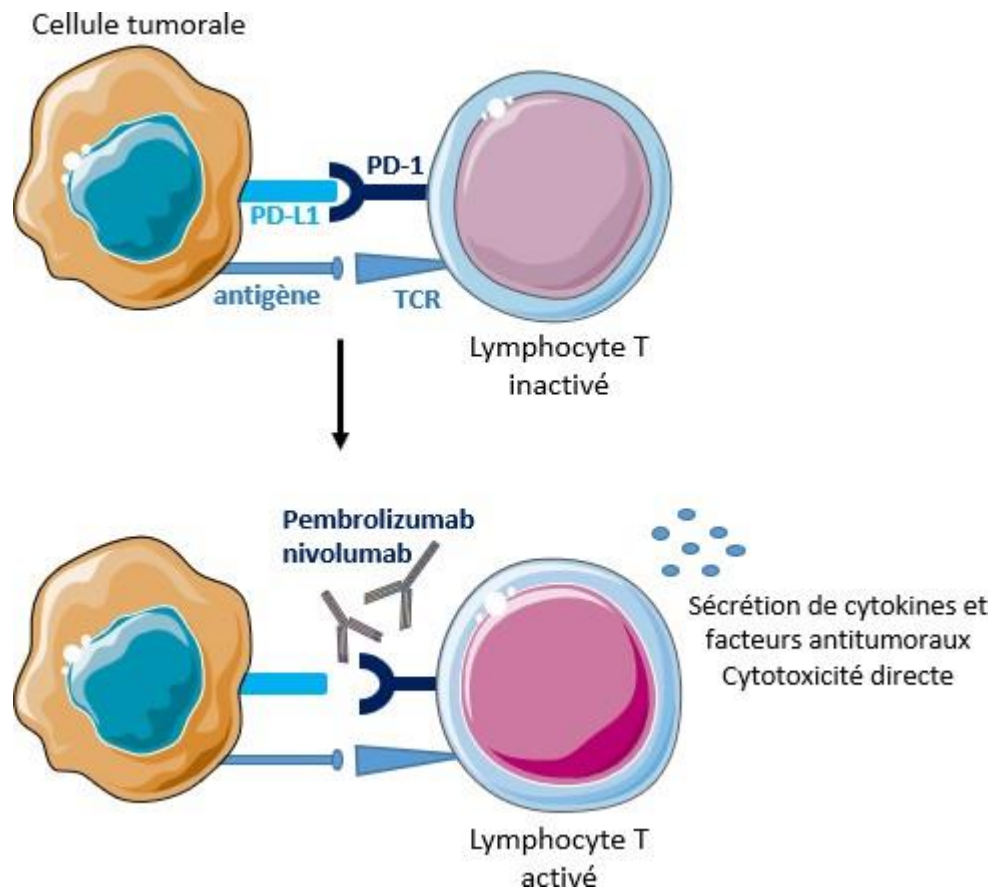


Figure 10. Mode d'action de pembrolizumab et nivolumab dans la voie PD-1/PD-L1. La liaison entre PD-1, exprimé sur les lymphocytes T (LT), et PD-L1, exprimé sur les cellules tumorales, inactive les premiers et la tumeur échappe à la surveillance du système immunitaire. Les deux anticorps monoclonaux pembrolizumab et nivolumab, utilisés dans le traitement de certains cancers colorectaux, vont lier le récepteur PD-1, ce qui empêche la liaison avec PD-L1 et restaure donc l'activité antitumorale des LT.

1.2.2.3 Autres stratégies thérapeutiques

D'autres stratégies thérapeutiques en cours d'évaluation pour la prise en charge du cancer colorectal reposent sur les cellules CAR-T et les stratégies vaccinales ciblant l'antigène carcino-embryonnaire, ou CEA. Le CEA est un antigène typiquement surexprimé chez les patients atteints de cancer colorectal, aussi bien au sein de la tumeur que dans le sang, et constitue un moyen de diagnostic rapide courant (Campos-da-Paz *et al.*, 2018). Cet antigène est utilisé dans le cadre de développement de cellules CAR-T, dans une étude clinique de Phase I montrant des résultats prometteurs, avec une diminution du taux de CEA dans le sang de tous les patients, associé à une rémission complète ou partielle de ceux-ci. Le seul point négatif de ce traitement est le développement transitoire de colites sévères chez tous les patients (Parkhurst *et al.*, 2011). L'antigène CEA a fait aussi l'objet d'un essai clinique de Phase I développant des vaccins, le PANVAC-V et le PANVAC-F, pour le traitement de plusieurs cancers en stade avancé, dont le cancer colorectal métastatique en échec thérapeutique. Les résultats obtenus se montrent prometteurs et le vaccin ne montre pas de toxicité chez les patients, mais ces traitements nécessitent d'être combinés à d'autres thérapies standards pour obtenir l'efficacité souhaitée. De plus, plusieurs injections sont nécessaires afin d'obtenir une réponse immunitaire efficace (Madan *et al.*, 2012).

Les protéines kinases sont des acteurs majeurs de la transduction des signaux cellulaires, et régulent finement toutes les voies de signalisation. Ces protéines phosphorylent leurs cibles par transfert d'un γ -phosphate de l'ATP sur le groupement hydroxyle des résidus de tyrosine, sérine et thréonine. La déphosphorylation est régulée par les phosphatases, qui rendent ce processus réversible et régulent donc l'homéostasie cellulaire (Hunter, 1991). Actuellement le lien entre la dérégulation des protéines kinases et le développement de certains types de cancer est bien établi. Chez l'individu sain, les protéines kinases régulent des voies de signalisation qui induisent la prolifération tout en inhibant l'apoptose, via l'activation de certains facteurs de transcription (comme NF κ B et Myc) et l'inhibition des molécules pro-apoptotiques (comme Bax). Dans le cadre du cancer ces protéines subissent des mutations qui les rendent constitutivement actives, la prolifération cellulaire n'est plus régulée et les cellules tumorales peuvent se diviser de manière incontrôlée (Du and Lovly, 2018). Les kinases jouent donc un rôle très important dans l'oncogénèse et sont actuellement la cible de nombreux traitements anti-cancéreux qui visent à inhiber leur activation : **les inhibiteurs de protéines kinases, appelés *Protein Kinase Inhibitors (PKIs)*** (Hartmann *et al.*, 2009).

La découverte des PKIs a révolutionné la thérapie ciblée anti-cancéreuses, et dans les vingt dernières années des nombreuses molécules ont fait l'objet d'essais cliniques validés par la FDA pour leur utilisation en thérapie. Les PKIs sont donc devenus une grande famille de molécules anti-cancéreuses avec un grand intérêt thérapeutique. Un de principaux avantages de ces molécules par rapport aux traitements systémiques comme la chimiothérapie, est la toxicité moindre sur les cellules saines grâce à une meilleure sélectivité de ces traitements. Malgré cette toxicité mineure, ces molécules gardent un profil toxique qui leur est spécifique et qui dépend de leur mécanisme d'action. De plus, même si ces traitements sont inclus dans les thérapies ciblées, leur action impacte souvent plusieurs kinases simultanément. C'est la raison pour laquelle certains inhibiteurs sont souvent utilisés pour traiter différents types de cancer ne partageant pas forcément les mêmes mutations protéiques (Kannaiyan and Mahadevan, 2018).

2.1 L'imatinib

Le premier PKI qui a été développé et approuvé par la FDA est l'*imatinib* (STI-571), qui bloque l'activité aberrante de la kinase Bcr-Abl (*Breakpoint Cluster Region – Abelson*). Cette protéine dérive d'une fusion entre le chromosome 9 et le chromosome 22 qui génère le chromosome de Philadelphie (Ph1) possédant le gène de fusion *BCR-ABL* qui code pour la protéine Bcr-Abl avec une activité tyrosine kinase dérégulée et qui est à la base du développement de la leucémie myéloïde chronique (LMC) (Waller, 2018). La LMC avec la mutation de la kinase Bcr-Abl est le modèle de référence pour le développement de ce genre de traitement car c'est une maladie qui dérive d'une mutation oncogénique unique, pour lequel le ciblage par monothérapie est donc efficace, et qui développe des résistances assez tardivement (Claudiani and Apperley, 2018). L'*imatinib* fonctionne grâce à un mécanisme d'inhibition compétitif avec l'ATP. En effet, cette molécule se fixe au niveau du site de fixation de l'ATP sur la protéine Bcr-Abl, en empêchant sa fixation avec comme résultat une inactivation de la kinase (Figure 11) (Suttorp *et al.*, 2018). L'utilisation de l'*imatinib* s'est révélée être très bénéfique chez les patients atteints de LMC, avec une survie globale de 83% sur 10 ans selon la dernière mise à jour de l'étude ISIS (Gugliotta *et al.*, 2015). Malgré le succès thérapeutique observé chez certains patients, des mécanismes de résistance à l'*imatinib* se mettent en place et diminuent son efficacité. Dans la majorité des cas, ces mécanismes de résistance sont liés à des mutations ponctuelles au niveau du site de fixation de l'ATP, ce qui empêche la fixation correcte du médicament et donc engendre la résistance. Actuellement 57 résidus mutés ont été identifiés, surtout au niveau de l'ATP-binding loop, et leur connaissance est indispensable pour faire face aux mécanismes de résistance (Claudiani and Apperley, 2018).

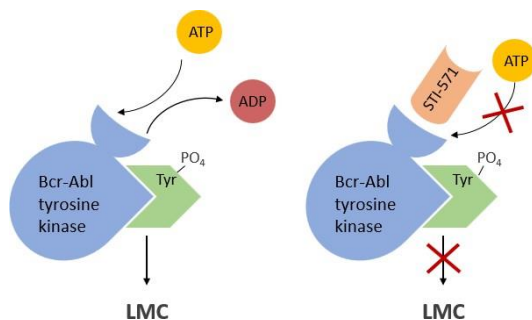


Figure 11. Mécanisme d'action de l'imatinib (STI-571). Le médicament se lie au site de fixation de l'ATP de la protéine kinase Bcr-Abl, suractivée dans la LMC. Ainsi, l'ATP ne peut plus se fixer et l'activité kinase de la protéine est inhibée avec comme conséquence une régression de la maladie. Ce mécanisme d'action est classique et

commun à des nombreux PKIs (Schéma modifié d'après (Mauro *et al.*, 2002).

L'*imatinib* n'est pas utilisé uniquement chez les patients atteints de LMC, mais il est utilisé dans le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (TSGI, mieux connues avec l'appellation anglophone GIST). Ce sont des cancers digestifs très rares et agressifs qui appartiennent à la famille des tumeurs mésoenchymateuses des tissus mous (vaisseaux, enveloppes, muscles et tous les tissus conjonctifs). Ces tumeurs surviennent principalement au niveau de l'estomac et de l'intestin grêle, mais peuvent se localiser à n'importe quel niveau du tube digestif, avec haut risque de métastases (Reichardt, 2018). L'*imatinib* s'est montré efficace dans les traitements des TSGI causé par une mutation de la tyrosine kinase KIT (aussi connue sous le nom de CD117). En effet, une étude clinique de Phase III a montré une augmentation de la survie sans récurrence (SSR) après un an de traitement (Dematteo *et al.*, 2009).

2.2 Les inhibiteurs de l'EGFR et du VEGFR

Les inhibiteurs du récepteur à l'EGF, l'EGFR, comme l'*erlotinib*, le *gefitinib* et l'*afatinib*, sont également utilisés en thérapie anti-cancéreuse. L'*erlotinib* est un traitement de première ligne chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules (*Non-small-cell lung carcinoma, NSCLC*) avec mutation d'EGFR, tout comme le *gefitinib*. L'*afatinib* est un traitement de deuxième génération utilisé dans le même type de cancer (Abdelgalil, Al-Kahtani and Al-Jenoobi, 2020; Rawluk and Waller, 2018; Harvey *et al.*, 2020).

D'autres inhibiteurs de kinases ont été conçus pour contrer les mutations du récepteur au VEGF, le VEGFR, dont les plus connus sont le *sorafenib*, le *sunitinib*, le *regorafenib* et le *lenvatinib*. Le *sorafenib* a été le premier approuvé par la FDA en 2005 pour le traitement du cancer à cellules rénales métastatique (*Renal Cell Carcinoma ou RCC*) et le carcinome hépatocellulaire (*Hepatocellular Carcinoma ou HCC*) montrant une meilleure efficacité en combinaison avec des faibles doses de 5-FU dans ce dernier type de cancer (Abdelgalil, Alkahtani and Al-Jenoobi, 2019; Xie, Wang and Spechler, 2012). Le *sunitinib* est également approuvé par la FDA et utilisé chez les patients atteints de RCC au stade métastatique, mais montre une bonne efficacité aussi chez les patients atteints de TSGI et résistants à l'*imatinib* comme traitement de deuxième ligne (études cliniques de Phase III) (Heng and Kollmannsberger, 2010). Le *regorafenib* est un autre inhibiteur de la même famille qui est utilisé chez les patients atteints de TSGI et résistants aussi bien à l'*imatinib* qu'au *sunitinib*,

considéré donc comme un traitement de troisième ligne pour ce type de cancer (Ettrich and Seufferlein, 2018). Le regorafenib est également utilisé dans le traitement du cancer colorectal (voir paragraphe 1.2.2.1 concernant les thérapies ciblées dans le cancer colorectal). Enfin, le *lenvatinib* (commercialisé sous le nom de Lenvima®) a été approuvé en 2015 par la FDA pour le traitement du cancer de la thyroïde différencié réfractaire à l'iode radioactif (CTD-RR), traitement qui s'est montré efficace et bien toléré chez les patients et qui représente une bonne alternative au *sorafenib* (Schlumberger *et al.*, 2015; Kudo *et al.*, 2018).

2.3 L'inhibition de BRAF V600E

D'autres inhibiteurs ciblent la kinase BRAF, comme le *vemurafenib*. Cette molécule a été approuvée en 2011 pour le traitement des mélanomes métastatiques présentant une mutation V600E (Valine 600 mutée en glutamate), présente chez près de 50% des patients (Tas and Erturk, 2020). Cette mutation rend la kinase constitutivement active, avec prolifération incontrôlée des cellules tumorales. Une étude clinique récente voit la combinaison du vemurafenib avec l'IRI, un agent chimiothérapeutique, et le cetuximab, un anticorps monoclonal, utilisés couramment dans le traitement du cancer colorectal métastatique muté BRAF, montrant des résultats prometteurs (Kopetz *et al.*, 2021).

2.4 Limites des inhibiteurs de kinases : le développement de résistances

Ces molécules ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de cancer, avec une vraie amélioration de la survie et une cytotoxicité moindre comparée à la chimiothérapie conventionnelle. Mais, malgré leur efficacité, il existe différents mécanismes de résistance aux PKIs (Ghione *et al.*, 2020). Ces mécanismes incluent essentiellement deux possibilités : une mutation directe de la cible du médicament, ou l'activation de voies de signalisation prolifératives des cellules tumorales qui contournent l'inhibition des kinases ciblées (Lin and Shaw, 2016). On parle de résistance primaire en cas de redondance de la kinase cible (compensation fonctionnelle par une autre kinase), ou en cas de mutations des cibles de la kinase inhibée (par exemple phosphorylation constitutive de la cible). Dans le cas des résistances secondaires, on observe des mutations du site de fixation du médicament au niveau de la protéine kinase, ou la suractivation d'une autre protéine kinase qui maintient la

prolifération des cellules tumorales active et également la sous-expression des phosphatases (Jiao *et al.*, 2018).

Le développement de nouvelles stratégies thérapeutique est en constante évolution, et cela est indispensable pour contrer les résistances liées à l'incroyable capacité d'adaptation des cellules tumorales. Mon travail de thèse s'inscrit donc dans la perspective de trouver une nouvelle stratégie thérapeutique, en décortiquant les mécanismes liés à l'effet antitumoral et le potentiel immunogène d'un inhibiteur de kinases, le *H89*.

3. LE H89, UNE PETITE MOLECULE INHIBITRICE DE KINASES ET SON POTENTIEL ANTI-CANCEREUX

3.1 Structure

Le H89, ou N-[2-(bromocinnamylamino)éthyl]-5-isoquinoline sulfonamide, est une petite molécule inhibitrice de kinases qui fait partie des composés inhibiteurs de la série H, étudié de manière détaillée par Hidaka et collaborateurs entre 1990 et 1991 et identifié comme étant le plus puissant et sélectif inhibiteur de la protéine kinase A (PKA) (Hidaka, Watanabe and Tokumitsu, 1990). La PKA est une kinase ubiquitaire que l'on retrouve dans toutes les cellules, et qui phosphoryle des résidus sérine/thréonine sur les protéines cible en réponse à l'AMP cyclique (AMPC). Elle présente quatre sous-unités, deux régulatrices qui fixent l'AMPC, et deux catalytiques qui se dissocient après liaison de l'AMPC au niveau des sous-unités régulatrices et peuvent lier l'ATP en permettant l'activité kinase (Figure 12) (Lochner and Moolman, 2006).

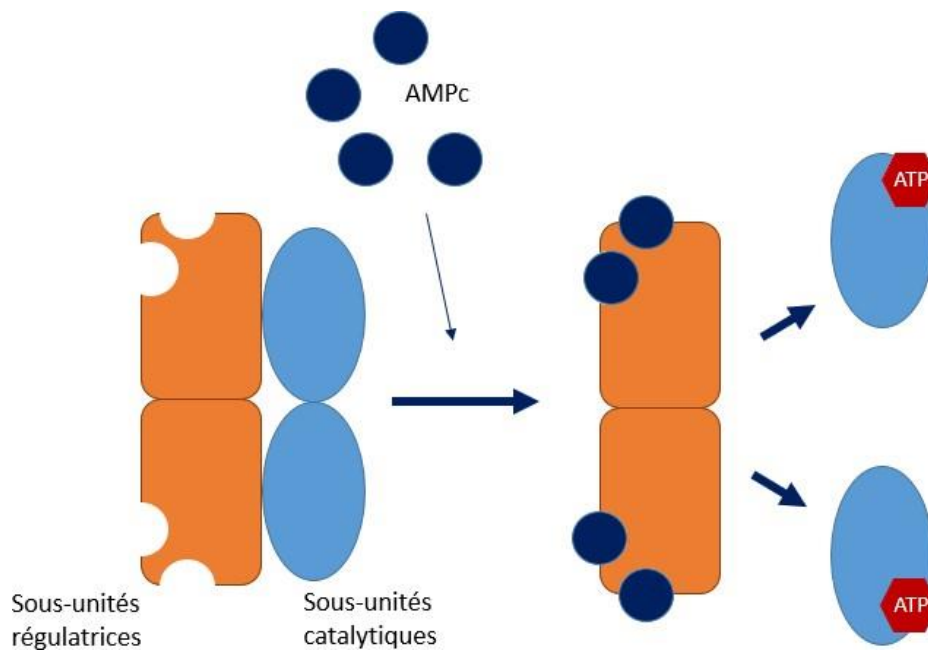


Figure 12. Mécanisme d'activation de la PKA. Cette protéine kinase possède deux sous unités régulatrices, qui lient l'APMc, et deux sous-unités catalytiques, qui fixent l'ATP. Après la liaison de l'APMc sur les sous-unités régulatrices, les deux sous-unités catalytiques se dissocient, fixent l'ATP, et peuvent exercer leur activité kinase.

Le H89 possède une structure similaire à celle de l'ATP (Figure 13) et son inhibition de la PKA est donc de type compétitif. Il se lie à la poche de fixation de l'ATP située au niveau des sous-unités catalytique et empêche l'activité de la kinase (Davies *et al.*, 2000).

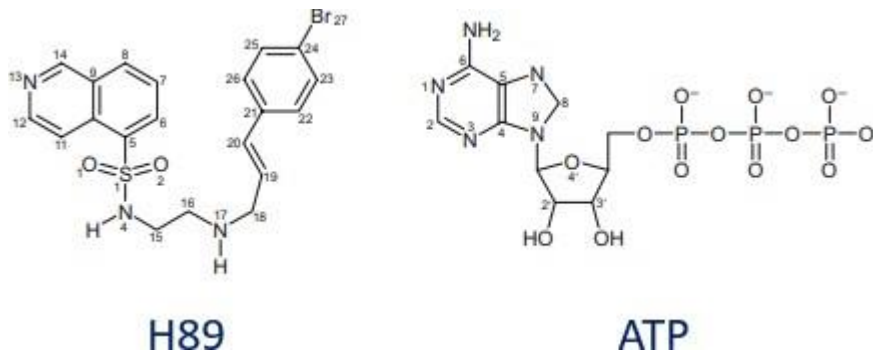


Figure 13. Comparaison de la structure du H89 à celle de l'ATP. Les deux structures ont certaines analogies structurales, permettant au H89 de prendre la place de l'ATP au sein de la poche de fixation du domaine catalytique de la protéine kinase cible, et bloquer ainsi son activité enzymatique. Le groupement adénosine est l'analogie la plus évidente entre ces deux petites molécules.

3.2 Fonctions

Même si le H89 a été décrit comme un inhibiteur sélectif de la PKA, Davies *et al.* ont montré qu'il est capable d'inhiber au moins huit autres protéines kinases comme MSK1 (*Mitogen and stress-activated protein kinase 1*), S6K1 (*S6 Kinase 1*), PKB α (autre nom d'Akt) et ROCKII (*Rho-associated protein kinase 2*), certaines de manière similaire et parfois même plus efficace que la PKA (IC₅₀ de 80 nM pour S6K1, 120 nM pour MSK1 contre 135 nM pour la PKA). L'analyse par cristallographie des poches de fixation de l'ATP montre qu'il y a une grande variabilité des résidus fixant le groupement adénosine, qui est celui analogue entre l'ATP et le H89 et qui permet donc la fixation de l'inhibiteur. Cette variabilité permettrait d'expliquer la différence d'affinité et la capacité inhibitrice variable selon les protéines (Davies *et al.*, 2000).

3.3 H89 et cancer

L'étude du H89 en cancérologie demeure restreinte, mais quelques études montrent des résultats bénéfiques de cette molécule en thérapie anti-cancéreuse. En effet, le H89 a montré des effets encourageants dans le traitement la leucémie aigüe lymphoblastique (LAL), un des cancers les plus répandus chez les enfants, via son action inhibitrice de la PKA en combinaison avec le HA22. Le HA22 (*Moxetumomab pasudotox*) est une immunotoxine recombinante utilisée en traitement de deuxième ligne chez les patients résistants aux traitements conventionnels. Dans HA22 le domaine de liaison de la toxine recombinante RIT (dérivée de *Pseudomonas*) est remplacé par une partie Fv d'un anticorps monoclonal anti-CD22 qui cible les cellules leucémiques et stimule leur élimination par le système immunitaire (Kreitman *et al.*, 2018; Janus and Robak, 2019). Une étude de 2016 effectuée par Liu et collaborateurs a mis en évidence que le H89 est capable de potentialiser l'effet de HA22 (Liu *et al.*, 2016). Une étude effectuée en 2018 par Yu et collaborateurs a montré que le H89 augmente l'effet antitumoral de la tetrandrine, un alcaloïde anti-cancéreux, aussi bien sur des modèles *in vitro* qu'*in vivo*. L'action de la combinaison *in vitro* induit l'apoptose des cellules cancéreuses et l'autophagie, médié par la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). De plus, le traitement tetrandrine/H89 induit une diminution de l'expression de c-Myc, ce qui pourrait être intéressant chez les patients atteints de cancers avec amplification de ce dernier. *In vivo*, la combinaison diminue de manière significative la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe de cellules humaines de cancer du sein triple négatif (MDA-MB-231) chez la souris BALB/c (Yu *et al.*, 2018). La capacité du H89 à induire la production ROS avait déjà été montrée en 2015 au sein de notre équipe de recherche avec les travaux de Marion Cortier *et al.* Ces travaux montrent que la combinaison du H89 avec le GTN, un donneur de monoxyde d'azote (NO) induit l'apoptose des cellules cancéreuses coliques humaines SW480, qui met en jeu la production de ROS induits par le H89 (Cortier *et al.*, 2015).

Au sein des cellules cancéreuses, la suractivation de la kinase oncogénique Akt et de sa cible, la kinase mTOR (mechanistic target of rapamycin, anciennement mammalian target of rapamycin) est une caractéristique fréquente, induisant une prolifération incontrôlée en stimulant le développement tumoral. Pour contrer l'activation de la voie Akt/mTOR, et donc la prolifération des cellules cancéreuses, la rapamycine, découverte en 1972, a longtemps été utilisée en tant qu'inhibiteur de mTOR (Julien and Roux, 2010). Aussi connue sous le nom

générique de *sirolimus*, la rapamycine seule n'est malheureusement pas suffisante pour un effet antitumoral dans le cancer colorectal (Benjamin *et al.*, 2011). Les travaux d'Ali-Boina *et al.*, effectués au sein de notre équipe, ont montré que la combinaison entre le GTN, la triciribine (un inhibiteur d'Akt) et le H89 était capable d'induire l'apoptose dans les cellules cancéreuses coliques résistantes à la rapamycine (Ali-Boina *et al.*, 2013). Le H89 a également la capacité de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses en agissant indirectement sur le cytosquelette et la division cellulaire, en particulier sur la myosine II (Maciver, 1996). L'activité de la myosine II est contrôlée via sa phosphorylation/déphosphorylation au niveau de sa chaîne régulatrice légère (myosin regulatory light chain, MRLC) au niveau des résidus de Thr-18/Ser-19. Ces mécanismes sont régulés respectivement par les kinases MRLC et par des phosphatases, qui maintiennent l'équilibre de phosphorylation/déphosphorylation en contrôlant les divisions cellulaires. Les principales kinases MRLC sont la MLCK (myosin light chain kinase) et la kinase Rho, souvent activées de manière constitutive dans des nombreuses lignées cancéreuses. Le H89, grâce à son activité inhibitrice sur la kinase Rho, diminue la phosphorylation des résidus Thr-18 et Ser-19 de la MRLC, avec inhibition de la prolifération des cellules de carcinome hépatocellulaire (HepG2), de cancer du sein (MCF-7), du poumon (A549) et de la peau (A431) (Umeda, Yamada and Tachibana, 2008).

Mais le H89 n'a pas systématiquement des effets bénéfiques en thérapie anti-cancéreuse. Dans le cas du cancer du pancréas, par exemple, le traitement avec le H89 pourrait avoir un effet néfaste. Il est actuellement bien établi que dans ce type de cancer le niveau du GLP-1R (glucagon like peptide 1 receptor) au niveau des cellules tumorales est faible par rapport à celui des cellules pancréatiques saines, ce qui rend ces cellules résistantes à la gemcitabine. Or, le liraglutide, un analogue du GLP-1, le ligand du GLP-1R, augmente l'expression de GLP-1R et de la PKA, et inhibe la voie PI3K/Akt, en bloquant la prolifération des cellules tumorales. Le H89 est aussi bien un inhibiteur de la PKA qu'un activateur de la kinase Akt (Ali-Boina *et al.*, 2013), et son effet contredit complètement le bénéfice du traitement par le liraglutide dans les cancers du pancréas gemcitabine-résistants (Zhao *et al.*, 2020).

Toutes ces études sont résumées dans la Figure 14.

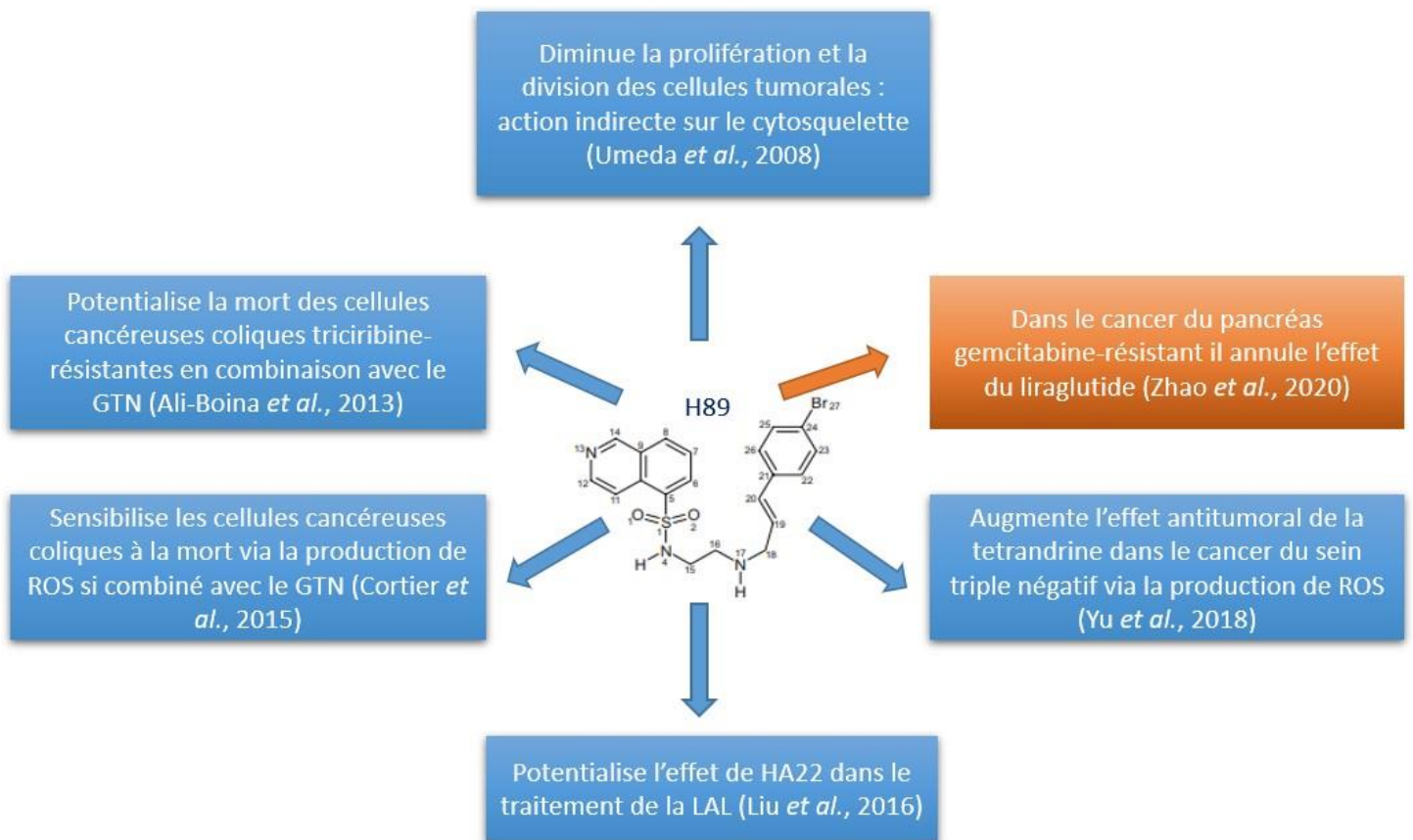


Figure 14. Schéma récapitulatif du rôle du H89 dans le cancer. En bleu, les études montrant un effet bénéfique du H89 en thérapie anti-cancéreuse. Le cadre orange montre une étude pour laquelle le H89 aurait plutôt un effet néfaste dans le cadre du cancer de la prostate.

RATIONNEL DE L'ETUDE

Le cancer colorectal fait partie des cancers les plus fréquents en France, aussi bien chez la femme que chez l'homme, constituant un problème majeur de santé publique. Le premier traitement du cancer colorectal repose sur l'exérèse chirurgicale de la tumeur, qui peut être précédée et/ou suivie d'un traitement par radiothérapie ou par chimiothérapie systémique. La toxicité de la chimiothérapie est sa limite majeure, puisqu'elle ne cible pas seulement les cellules tumorales mais également les cellules saines, engendrant de nombreux effets secondaires chez les patients. Pour cette raison, le développement de thérapies ciblées constitue une voie thérapeutique prometteuse dans le traitement du cancer colorectal. Cependant, l'éventail de thérapies ciblées dans le traitement du cancer colorectal reste limité, ce qui pousse la recherche oncologique à se tourner vers des nouvelles approches thérapeutiques.

Nous nous sommes intéressés à une petite molécule inhibitrice de kinases, le H89. Au sein de notre équipe de recherche, plusieurs études montrent son efficacité *in vitro* dans l'induction de la mort des cellules cancéreuses coliques humaines (Ali-Boina *et al.*, 2013; Cortier *et al.*, 2015). Nous avons donc décidé d'investiguer le potentiel antitumoral de la molécule *in vivo* dans différents modèles de cancer colorectal chez la souris. De plus, nous nous sommes intéressés au rôle du système immunitaire dans l'effet antitumoral de la molécule, ainsi que son effet sur le recrutement des cellules immunitaires dans le MET et les mécanismes moléculaires associés. Le but de cette étude est donc, non seulement celui de comprendre le rôle du système immunitaire dans l'effet antitumoral du H89, mais aussi celui d'envisager son utilisation en immunothérapie dans le but de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à restaurer la réponse immunitaire antitumorale dans le cancer colorectal.

ARTICLE 1: « PROTEIN KINASE INHIBITOR-MEDIATED
IMMUNOPROPHYLACTIC AND IMMUNOTHERAPEUTIC CONTROL OF
COLON CANCER »

Silvia Ghione^{1,2}, Cindy Racoeur^{1,2}, Jingxuan Shan³, Emma Groetz^{1,2}, Elise Ballot^{4,5},
Caroline Truntzer^{4,5}, Lotfi Chouchane³, Frédérique Vegran^{4,5,6}, Catherine Paul^{1,2},
Stéphanie Plenchette^{1,2*}, Ali Bettaieb^{1,2*}

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), EA7269,
Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

²LIIC, EPHE, PSL Research University, Paris, France

³Genetic Intelligence Laboratory, Weill Cornell Medicine-Qatar, Qatar
Foundation, Doha, Qatar

⁴ Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, Centre Georges François
Leclerc, Dijon, France

⁵INSERM U1231, Dijon, France

⁶University of Burgundy and Franche Comté, Dijon, France

*These authors jointly supervised

Protein kinase inhibitor-mediated immunoprophylactic and immunotherapeutic control of colon cancer

Silvia Ghione^{1,2}, Cindy Racœur^{1,2}, Nesrine Mabrouk^{1,2}, Jingxuan Shan³, Emma Groetz^{1,2}, Elise Ballot^{4,5}, Caroline Truntzer^{4,5}, Lotfi Chouchane³, Frédérique Vegran^{4,5,6}, Catherine Paul^{1,2},
Stéphanie Plenchette^{1,2*#}, Ali Bettaieb^{1,2*#}

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), EA7269, Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

²LIIC, EPHE, PSL Research University, Paris, France

³Genetic Intelligence Laboratory, Weill Cornell Medicine-Qatar, Qatar Foundation, Doha, Qatar

⁴ Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, Centre Georges François Leclerc, Dijon, France

⁵INSERM U1231, Dijon, France

⁶University of Burgundy and Franche Comté, Dijon, France

*These authors jointly supervised.

Running title: Immunomodulation and anti-cancer function of H89.

Keywords: H89, kinases inhibitor, Colon cancer, Immunotherapy, Immunoprophylaxis.

Additional information:

- Financial support: This work was financially supported by “La Ligue Contre le Cancer–Conférence de Coordination InterRégionale Est (CCIR Est grant no. 2021-0093), and the Department of Genetic Medicine, Weill Cornell Medicine-Qatar (Qatar Foundation, Doha, Qatar), Université de Bourgogne and EPHE.
- Corresponding authors:
 - Stéphanie Plenchette, LIIC, EA7269, UFR Sciences de Santé, 7 Bd. Jeanne d’Arc, 21079, Dijon, France, Phone : +33 (0)3 80 39 33 59, Fax : +33 (0)3 80 39 34 34, stephanie.plenchette-colas@ephe.psl.eu.
 - Ali Bettaieb, LIIC, EA7269, UFR Sciences de Santé, 7 Bd. Jeanne d’Arc, 21079, Dijon, France, Phone : +33 (0)3 80 39 33 34, Fax : +33 (0)3 80 39 34 34, ali.bettaieb@ephe.psl.eu.
- the authors declare no conflict of interest.
- Word count: 4891.
- Total number of figures: 6

Abstract

Immunotherapy has allowed major advances in oncology in the past years, in particular with the development of the immune checkpoint inhibitors, but the clinical benefits are still limited, particularly in colorectal cancer (CRC). Our scientific approach is based on the search for an innovative immunotherapy with a final goal that aims to induce an effective antitumor immune response in CRC. Here we focused on H89, a multikinase inhibitor. We carried out *in vivo* experiments based on syngeneic mouse models of colon cancer in BALB/c mice and chemically colon tumorigenesis. Flow cytometry, RNAseq, RT-qPCR, immune cell depletion, and Western blot were used to identify the immune cell type involved in the preventive and antitumor activity of H89. We demonstrated that H89 delays colon oncogenesis and prevents tumor growth. This later effect involved NK cells. H89 also inhibits colon tumor growth in a T-cells-dependent manner. Analysis of the immune landscape in the tumor microenvironment showed an increase of CD4⁺ Th1 cells and CD8⁺ cytotoxic T cells, but a decrease of CD4⁺ T_{reg} cells infiltration. Mechanistically, we showed that H89 can promote naïve CD4⁺ T cells differentiation into Th1, decreases T_{reg} differentiation and increases CD8⁺ T cells activation and cytotoxicity *ex-vivo*. Further, H89 induced an overexpression of genes involved in antitumor immune response, such as IL-15RA, that depletion counteracts the antitumor effect of H89. We also found that H89 regulated Akt/PP2A pathway axis. Our findings identify the kinase inhibitor H89 as a potential strategy for the prevention and treatment of colon cancer.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide with an incidence of 10.2% and a mortality rate of 9.2% among the 10 most common type of cancer [1-3]. Conventional treatments for CRC essentially rely on surgery, chemotherapy and radiotherapy used alone or in combination [4-7]. The main chemotherapies used in CRC are 5-fluorouracil (5-FU) associated to oxaliplatin [8]. Recently, immunotherapy emerged as alternative way to bat cancer. This approach consists in the reactivation of the immune system exhausted by tumor cells and the tumor microenvironment (TME). Attention was first focused on CD8⁺ T lymphocytes (TLs), endowed with direct cytotoxic activity on cancer cells orchestrated via granzyme B (GMB)/perforin or Fas/FasL [9]. Several studies have shown a positive correlation between CD8⁺ TLs infiltration within tumors and the survival of patients with CRC [10, 11]. Moreover, the presence of CD4⁺ LTs is also essential for the establishment of an effective response [12]. The cytokine environment is fundamental for the polarization of naïve CD4⁺ TLs into different subpopulations exhibiting anti- or pro-tumoral effect, including type 1 T-helper (Th1), Th2, and regulatory T (T_{reg}) [13, 14]. Cell-based approaches, mainly immune checkpoint (IC) blockade, represent an important tool of immunotherapy. IC are receptors, involved in the modulation of the activation of immune cells in order to limit the duration and the intensity of immune responses [15]. Such a mechanism is used by many cancer cells to protect themselves from the immune system by inhibiting the T cell inhibitory receptors as the cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) and the programmed death 1 (PD-1) leading to suppress effector function such as proliferation, and tumor cell death [16]. IC blockers targeting PD-1 and its ligand PD-L1 have been successfully implemented in the therapeutic management of multiple type of cancer, giving substantial benefit for patients [17, 18]. However, a limited number of patients responds to these immunotherapies including CRC patients. To circumvent these issues, we have focused our attention on other agents that could exhibit an immunomodulatory potential such as the protein kinase inhibitors (KI), dihydrochloride of N- [2 - [[3- (4-bromophenyl) -2-propenyl] amino] ethyl] -5-isoquinolinesulfonamide (H89). This drug is known to inhibit protein kinase A (PKA) and some other kinases including MSK1, S6K1 and ROCK-II [19, 20]. Our previous reports showed that

H89 can trigger human colon cancer cell death *in vitro* when combined with the nitric oxide donor, glyceryl trinitrate [21, 22].

Here, we report that the KI H89 delays the development of endogenous colon carcinogenesis, but also reduces the growth of other transplantable mouse models of colon cancer, that relies on the activation of NK and T-cell antitumor response, respectively. These findings identify the KI H89 as a potential strategy for the prevention and treatment of colon cancer.

Results

H89 delays AOM/DSS-driven carcinogenesis and prevents tumor growth

Based on our previous results which showed that H89 reduces intestinal inflammation in a murine model of DSS-induced colitis [23], we investigated its prophylactic potential. In a mouse model of AOM/DSS colitis-associated intestinal carcinogenesis we showed that H89 decreases tumor incidence as attested by a significant reduction in the total number of colorectal polyps (Fig.1A). In parallel, using a CT26 tumor-bearing mouse model, mice receiving H89 for 3 days in a row prior implantation of CT26 cells, showed a significant decrease in tumor incidence (Fig. 1B). We hypothesize that such effect might involve an early innate immune response. Here we report that the depletion of NK cells abrogates the tumor prophylactic potential of H89 (Figure 1C).

H89 mediates immunotherapeutic activity against colon cancer

Besides its prophylactic potential, we investigated whether H89 may have an antitumor therapeutic effect. We investigated the role of the adaptive immune system on mouse models of colon cancer. Intraperitoneal or per os administration (one route of administration used in anti-cancer treatments in humans) of H89 in BALB/c mice bearing CT26 or C51 cells significantly decelerated tumor progression (Fig.2A-C). Such antitumor effect of H89 was not restricted to colon cancer and was also observed in a triple negative breast cancer mouse model, known for its aggressiveness and resistance to treatment (Fig. 2D). We also investigated whether H89 may potentiates chemotherapy used in CRC such as 5-FU. Importantly, even though each agent used alone reduced CT26 tumor growth, their combination significantly enhanced their antitumor capacity (Fig 2E). We further tested whether H89-mediated tumor growth inhibition depends on the immune system. We then induced tumors in *Swiss nude* mice, lacking T cells, and treated with H89. The monitoring of tumor growth showed that the antitumoral activity of H89 is abolished in *Swiss nude* mice, (Fig.2F). Same results were obtained in mice subjected to the depletion of the cytotoxic effector CD8⁺ T cells. Indeed, the absence of CD8⁺ T cells totally blunted the antitumor efficacy of H89 (Fig.2G). Altogether our results reveal that H89 antitumor efficacy is dependent on an adaptive immune response.

H89 increases CD8⁺ LT tumor-infiltration, activation and function

We investigated the effect of H89 on the intratumoral infiltration of CD8⁺ T_H1s, and their state of activation and function. Quantification of intratumoral CD8⁺ T_H1s by flow cytometry analysis revealed that H89 significantly increased the amount of total CD8⁺ T_H1s (CD45⁺/CD3⁺/CD8⁺ cells) at day 21 but not at days 10 and 14 post-tumor cells injection (Fig. 3A). We found that H89 significantly increases the number of effector memory CD8⁺ T_H1s at day 14 but not the central memory T_H1s (Fig. 3B, Suppl. Figure S1). Such effects were confirmed by IHC staining (Fig.3C). To depict how H89 mediates tumor recruitment of CD8⁺ T_H1s, we analyzed by RT-PCR the mRNA expression level of the chemokine *CXCL10*, known to attract CD8⁺ T_H1s in the TME. The results showed that the H89 significantly increased the expression of the *CXCL10* gene transcript at day 14 (Fig.3D). We also analyzed the impact of H89 on the activation of CD8⁺ T_H1s by measuring gamma interferon (IFN γ) and granzyme B expression. We showed that H89 significantly increases the amount of IFN γ mRNA within the tumor and IFN γ production in CD8⁺ T_H1s (Fig.3E, 3F). Regarding granzyme B, H89 significantly raised its expression at day 10 (Fig.3G). Similar effect was obtained when CD8⁺ T_H1s isolated from the spleen lymph nodes of BALB/c mice were treated *in vitro* with H89 for 72h (Fig.3H). We next used the OT-I/B16-OVA mouse model to investigate whether the activation of CD8⁺ T_H1s by H89 correlates with their cytotoxic activity. We thus. The administration of H89 on *ex vivo* co-cultured CD8⁺ T_H1s, purified from OT-I mice, with melanoma B16-OVA for 48h significantly decreased melanoma B16-OVA cell viability in 1:5 and 1:10 ratios (target:effector) (Fig.3I).

Effect of H89 on CD4⁺ T_H1s infiltration and differentiation

In parallel, we investigated CD4⁺ T_H1s infiltrates in H89-treated and untreated mice bearing CT26 tumors. We showed that H89 significantly increases the amount of intratumoral CD4⁺ T_H1s (CXCR3⁺/CCR6⁻) (Th1) expressing IFN γ (CD4⁺/IFN γ ⁺ T_H1s) (Fig. 4A, B). In addition, we confirmed the intratumoral presence of Th1 cells by RT-qPCR analysis of *T-bet* expression, a well-known key transcription factor of Th1 cell differentiation. Indeed, H89 significantly increased the expression of *T-bet* at day 14 and at day 21 (Fig. 4C). Conversely, CT26 tumors treated with H89 exhibited a decreased levels of CD4⁺ T_{reg}s (CD25⁺/CD127⁻) (Fig. 4D). However, we failed to detect significant differences on Th2 (IL-4⁺ T_H2s) and Th17 (IL-17⁺ T_H17s)

from untreated versus H89-treated tumors (Suppl. Figure S2 A, B). We also evaluated the ability of H89 to induce the differentiation of Th1 and Treg cells *in vitro*. Differentiation of CD4⁺ naïve T cells isolated from the spleen and lymph nodes of BALB/c mice showed that H89 promotes Th1 differentiation as attested by a significant increase of *T-bet* transcription (Fig. 4E). Conversely, H89 did not promote T_{reg} cell differentiation attested by the inhibition of *FoxP3* gene expression (Fig. 4F).

H89 modulates immunosuppressive receptors expressed either by T cells or colon cancer cells

We analyzed by flow cytometry the impact of H89 on some immunosuppressive molecules expressed at the surface of T cells or cancer cells. We found that H89 significantly decreased the expression of PD-1 on total CD4⁺ T cells (isolated from the spleen of BALB/c mice) and on the CD8⁺-like cell line MOLT-4 (Fig. 5A, B). Since the decrease in intracellular concentration of K⁺ ([K⁺]_i), another ICP inhibitor, of T cells is one of the hallmarks of their activation [24], we evaluated the impact of H89 in [K⁺]_i regulation in CD4⁺ T cells. We observed that CD4⁺ T cells exhibited low level of [K⁺]_i in presence of H89 (Fig. 5C), attesting their activation. Since some immunomodulatory receptors such as PD-L1 and CD80 (mainly expressed by immune cells) can be expressed on the cellular surface of cancer cells, we have tried to find out the influence of H89 on the expression of these receptors on the surface of CT26 cells. As depicted on Figure 5, H89 significantly affected both PD-L1 (Fig. 5D) and CD80 (Fig. 5E) expression.

H89 regulates signaling pathways involved in immune cell activation and cancer cell growth

To further decipher the molecular mechanisms related to the antitumor effect of H89, we isolated immune and cancer cells from CT26 tumors for transcriptomic analysis. Comparative transcriptome profiling of CT26 tumors from H89-treated and untreated mice revealed major changes in the expression level of genes related to immune function and cancer promotion (Fig. 6A). In particular, transcripts associated to T cells activation and/or proliferation were markedly upregulated by H89 such as IL-15RA, IL-18R1, STAT2, CCR9, and P2ry14, a G protein-coupled receptor (Fig. 6A and Suppl. Table 1). While some cancer-associated transcripts were downregulated, such as potassium channel 6.1 (Kir6.1), the atypical cadherin, FAT2 and keratin 18 (Krt18) (Fig. 6A and Suppl. Figure S3A). Furthermore, GSEA analysis (FDR < 0.05)

revealed distinct hallmark pathways between H89-treated (D14 of treatment) and untreated tumors, in particular, H89-mediated amplification of hallmarks of IFN α and IFN γ response (an antitumor phenotype) compared to untreated tumors with elevated protumoral hallmarks such as MYC pathway and oxidative phosphorylation (Suppl. Fig. S3B).

Based on these transcriptomic data, we particularly focused our attention on the H89-mediated modulation of the IL-15/IL-15RA axis. Interestingly, the IL-15/IL-15RA signaling pathway is important in the activation of immune cells including CD8⁺ T cells and is associated with a favorable prognosis in CRC [10, 25]. We first tested whether H89 also induced IL-15 in addition to IL-15RA. We found that H89 increases both mRNA and protein levels of IL-15 in tumors (Fig. 6B). IL-15 mRNA levels were also increased *in vitro* in CT26 treated with H89 for 24h (Fig. 6C). Furthermore, we investigated the involvement of the IL-15/IL-15RA pathway in H89-mediated tumor growth inhibition in CT26 tumor-bearing mice. We found that blocking IL-15 signaling with an anti-TMB1 antibody abrogated the antitumor effect of H89 (Fig. 6D). Since the Akt signaling pathway is mainly under the control of IL-15 [26], this prompted us to assess the phosphorylation status of Akt. We found that H89 significantly increases the phosphorylation of Akt (at Ser 473) in CD8⁺ T cells (Fig. 6E), MOLT-4 cells (CD8⁺-like phenotype) (Fig.6F) and Jurkat cells (CD4⁺-like phenotype) (Fig.6G). Since Akt is a target of the serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A) [27], we investigated whether H89-mediated phosphorylation of Akt could be associated with the inhibition of PP2A activity. We showed that H89 significantly reduces PP2A activity in Jurkat (Fig. 6H) and MOLT-4 cells (Fig. 6I).

Discussion

Here, we demonstrate that the kinase inhibitor H89 not only delays the manifestation of tumors when used as a prophylactic intervention, but also mediates therapeutic effects on established murine colorectal tumors. In the first setting, one can speculate that H89 could be used as an adjuvant therapy after resection of early stage of CRC. In such a situation, only conventional chemotherapies are used as adjuvant such as 5-FU and FOLFOX [28]. The introduction of immunotherapy as an adjuvant in CRC treatment is currently under study in multiple registered clinical trials [28]. In this context, H89 could be a new immunotherapy strategy in its use as an adjuvant in colon cancer. Indeed, it is able to prevent tumor growth dependent on NK cells. To our knowledge, few molecules have this potential. Recently, it has been shown that nicotinamide, a variant of vitamin B3, currently used as nutritional supplement delays the development of mammary carcinogenesis through NK activation [29].

Concerning the therapeutic effect of H89, it depends on CD8⁺ T_H1s, suggesting that this kinase inhibitor is endowed with immunomodulatory activity, which is involved in its antitumor effect. Besides its own antitumor effect, H89 can also potentiate the therapeutic efficacy of standard chemotherapy in the treatment of colon cancer, namely 5-FU. Our results are consistent with data showing that the use of multikinase inhibitors e.g. regorafenib exhibit antitumor and immunomodulatory properties [30, 31]. Unlike the very low number of the small molecules multikinase inhibitors tested against CRC, a myriad of other small molecules directed selected kinases involved in various pathways mediating the initiation, progression, and migration of CRC are currently being explored (for review: [32]). It is worthy to note that H89 inhibits tumor growth of CT26 cells, which is well known to share molecular features with aggressive, undifferentiated, refractory human colorectal carcinoma cells [33]. During this study, we discovered that H89 acts as a therapeutic agent by the activation of antitumor immune response. Thus, it is efficient to recruit within tumors CD8⁺ and Th1 T_H1s, probably by its ability to induce the chemokine CXCL10, but it alleviates the presence of T_{regs} in TME. Although, we have not demonstrated whether CXCL10 is at the origin in these latter lymphocytic traffics, it is well known to be a chemokine that plays a key role in the recruitment of CD8⁺ and Th1 cells [34].

In this report, we also observed that H89 not only induces the recruitment of CD8⁺ and CD4⁺ T cells at the tumor site, but also allows their activation, emphasizing the establishment of

immune protection against tumor development. Such immune signature (tumor infiltration and activation of CD8⁺ T cells) has been considered as a powerful factor that predicts favorable prognosis in colorectal cancer patients [10, 11, 35, 36]. Relief of exhaustion in TILs in CRC remains a challenge. Most of CRC patients poorly respond to IC blockers, well known to regulate the exhaustion stage of TILs. However, it has been reported that standard chemotherapy for CRC treatments such as 5-FU or oxaliplatin alone or combined modulate the level of exhaustion of TILs attested by exhibited higher effector function to reduce tumor burden [37, 38].

We have shown in this study that the combination of H89 and 5-FU improves their anti-tumor effect compared to the effect of each other used alone. However, we do not know whether this effect is attributed to a better antitumor immune response or to a direct influence on tumor cell growth.

Our results suggest that H89 can act directly on the tumor cell not by inducing their death as we have previously showed [22] but by making it more immunogenic. Indeed, we showed that H89 increases the mRNA expression of IL-15 *in vitro* on CT26 cells, and IL-15RA at the site of tumors, a signaling pathway that can promote the activation of CD8⁺ T cells and NK cells as previously reported [26, 39]. In our case, IL-15/IL-15RA was found to be involved in the antitumor activity of H89, probably by the efficacy of H89 to the expression of IL-15 and its receptor IL-15RA. This later is frequently downregulated in cancer patients, reducing the efficacy of IL-15-based treatments, hence the development of other strategies such as IL-15 superagonist receptor-linker-IL-15 (RLI), designed to bypass the need of endogenous IL-15RA, as a promising approach to stimulate host immunity [39]. The advantage of the use of H89 compared to the later treatment strategies is the ability of H89 to increase the expression of both IL-15 and IL-15RA and leads to better activation of an antitumor immune response. Other evidences for a possible direct effect of H89 on cancer cells are its ability to reduce the transcripts of certain tumor markers, such as keratin 18 (Krt18) and atypical cadherin (FAT2). Of note, Krt18 is correlated with the malignant status and acts as an oncogene in colorectal cancer [40] as for FAT2, an independent prognostic factor for the poor prognosis of gastric carcinoma [41]. Furthermore, H89 affects the expression of PD-L1 on cancer cells, which contributes to cancer immune evasion. Thus, by its ability to reduce the expression of these proteins, H89 can also make cancer cells more permissive to an antitumor immune response that it also activates. In summary, we discovered that the kinase inhibitor H89 is

efficient at either preventing colon oncogenesis or inhibiting various mouse models of colon tumors established in immunocompetent hosts. Such effects are due to H89-mediated re-establishing of NK- and T cell-dependent immunosurveillance, respectively, making H89 a potential strategy for the prevention and treatment of colon cancer.

Materials and Methods

Cell lines and treatments

Mouse colorectal cancer cells (CT26, C51) or triple-negative breast cancer cells (4T1) and human leukemic cells (Jurkat, MOLT-4) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and periodically tested to avoid mycoplasma contamination using a universal mycoplasma detection kit (ATCC). Cells were cultured in RPMI (CT26, C51, Jurkat, MOLT-4) or DMEM high glucose (4T1) media supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (FBS, Dominique Dutscher) at 37°C with 5% of CO₂. Cells were treated with 10 μM of H89 (Cayman Chemicals) at different time points.

Tumor models and treatments

Seven-week-old female BALB/c mice or *Swiss nude* mice were purchased from Charles River Laboratory or from the animal care facility at the University of Burgundy (France). Mice were inoculated with subcutaneous injection, and under isoflurane anesthesia, with 5x10⁵ colon CT26, C51 or 4T1 cell lines. After six days, when tumors reach ≈ 50 mm³, animals were randomly assigned to different groups (5 or 7 mice per cage) and treated with H89 (10 mg/kg in 100 μL of NaCl) with intraperitoneal (i.p.) injection twice a week. For LT CD8⁺ depletion, an anti-CD8a antibody (BioXCell 500 μg in 100 μL NaCl) or IgG2A control isotype (BioXCell 500 μg in 100 μL of NaCl) was injected (i.p.) together with the first H89 administration and renewed once a week. For IL-15RA blockade, an anti-TMB1 (BioXCell 50 μg in 100 μL of NaCl) or IgG2A control isotype (BioXCell 50 μg in 100 μL of NaCl) was injected (i.p.) the day before the first H89 administration and renewed twice a week. For the H89/5-FU combination, 5-FU (5 mg/kg in 100 μL NaCl) was injected (i.p.) weekly at the same time as H89 administration. For the oral administration, H89 was given twice a week by gavage (5 mg/kg in NaCl). For prophylaxis experience, H89 were administrated by i.p injections (10 mg/kg in NaCl) three days before CT26 implantation. Tumor growth was monitored three times a week. For AOM/DSS-induced carcinogenesis, colorectal polyps were induced by azoxymethane (AOM) and dimethylhydrazine (DMH) i.p. injection before sodium dextran sulphate (DSS) administration in drinking water according to Rosenberg *et al.* protocol [42]. For this experience, mice were treated by H89 (5 mg/kg in 100 μL NaCl by gavage) twice a week. Animals health status was

monitored by observing weight variations three times a week, and mice were sacrificed if their weight loss was higher than 20% of their initial weight. After 90 days, mice were sacrificed and colorectal polyps were quantified.

NK cells depletion *in vivo*

NK cells depletion was performed using an anti-asialo GM1 antibody (WaKo Biochemicals). BALB/c mice received the anti-asialo GM1 antibody (10 μ L/100 μ L NaCl according to the supplier's instructions) at days -5, -3 and -1 and then every 5 days before CT26 cells injection. H89 was injected three times at D-3 to D-1. Tumor growth was monitored three times a week.

Animal and Ethics Statement

The animal care staff observed the animal state each day and we monitored their behavior. When the volume of the tumor reached 2000 mm³, animals were sacrificed. The experiments were approved by the Ethics Committee "C2EA Grand Campus Dijon n° 105" and by the ministry of research with the protocol codes: 28546, 33240.

Characterization of CD4⁺ and CD8⁺ T cells infiltration in the TME

CT26 tumor-bearing mice were treated with H89 (10 mg/kg in 100 μ L of NaCl, i.p.) for 10, 14 or 21 days (10 mice / time point). At each time point, mice were sacrificed and tumor were dissociated with collagenase and DNase solution before red blood cells lysis. For membrane staining cells were incubated with Flow Cytometry Staining Buffer (FCSB) during 15 min and then for 30 min at 4°C with membrane antibodies. For intracellular staining, cells were fixed and permeabilised with the Cytofix/Cytoperm™ kit from BD Biosciences before incubation with antibodies for 30 min at 4°C. One million of cells were stained with TMs specific antibody panels (Suppl. Tables S2, S3, S4) and analyzed by flow cytometry. All the acquisition were performed using a BD FACS Canto or a LSRII cytometers using the BD FACSDiva software (BD Biosciences). Data were analysed using the FlowJo software v10.

RNA sequencing analysis

Total RNA extraction was performed as per manufacturer's instructions. Sequencing, data quality, and reads repartition were performed by BGISEQ500 platform (BGI-Shenzhen,

China). Differential expression analysis was performed with the DESeq2 R package (<https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>). Treatment groups were compared. Raw p-values associated to each gene were adjusted using Bonferroni correction, as advised. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) was used to identify biological pathways that are enriched in the lists of differential genes characteristics of each group of patients. Pathways from Hallmark database were used. GSEA was conducted using clusterProfiler R package (<https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118>).

Isolation of primary mouse immune cells

Naïve CD4⁺ or CD8⁺ T cells were isolated from the spleen of female Balb/c mice using Miltenyi isolation kits. Naive CD4⁺ T cells (CD62L⁺) were differentiated into Th1 or T_{reg} cells subtypes using cytokines and blocking antibodies cocktails: anti-IL-4 (10 µg/mL) and IL-2 (10 µg/mL) for Th1 and anti-INFγ (10 µg/mL), anti-IL-4 (10 µg/mL) and TGFβ (4 ng/mL) for T_{reg} cells. During T cells differentiation, Th1 and T_{reg} cells were treated with 1 µM of H89 during 72 h and T cells differentiation was assessed by RT-qPCR. Total CD4⁺ T cells (CD62L⁻) were obtained using the negative fraction and were treated with 1 µM of H89 during 2 h to assess intracellular potassium [K⁺]_i concentration as previously reported [24]. CD8⁺ T cells was cultured during 72 h with 1 µM of H89 to assess the level of Akt phosphorylation and Granzyme B production. All T cells were activated using anti-CD3/anti-CD28 Dynabeads (Gibco) and cultured in antibiotics-enriched RPMI medium (10% FBS with 1% penicillin, streptomycin and amphotericin B (PSA)).

CD8⁺ T cells cytotoxic assay

B16-OVA melanoma cancer cells were seeded in 96 well plate (30 000 cells per well) in 200 µL of RPMI 10%FBS 1%PSA medium after cell trace™ violet labeling (Invitrogen). Splenic CD8⁺ T cells were isolated from OT-I female mice using the CD8a⁺ T cells Isolation Kit and co-cultured with B16-OVA cells at different ratios of B16-OVA: CD8⁺ T cells) and treated, or not, with 5 µM of H89. After 48 h of co-culture, B16-OVA cells viability was analyzed by flow cytometry using a Fixable Viability stain 700 (FVS700, BD Biosciences) and using the cell trace™ violet labeling to differentiate B16-OVA cells from CD8⁺ T cells.

PP2A enzymatic activity assay

Jurkat and MOLT-4 cells were lysed with a buffer containing imidazole-HCl, EDTA, EGTA (Sigma) with protease and phosphatase inhibitor cocktail (Complete, Roche). After proteins quantification with the Bio-Rad DC protein assay as recommended by the manufacturer (Bio-Rad), the enzymatic activity of the phosphatase PP2A was assessed using the PP2A Immunoprecipitation Phosphatase Assay Kit (Millipore) as per manufacturer's procedures.

RT-qPCR

Th1 and Treg cells as well as mice tumors were collected using the Trizol reagent (Ambion) to perform total RNA extraction. Five hundred nanograms of total RNA were reverse transcribed into cDNA using a M-MLV reverse transcriptase, recombinant RNasin® Plus RNase inhibitor and random primers (Promega kit). cDNA level was assessed by real-time PCR using PowerUp™ SYBR™ Green (Applied biosystems) on ViiA™7 Real-Time PCR System (Applied biosystems). Relative mRNA expression was quantified using the $2^{-\Delta Ct}$ formula after actin normalization (ΔCt). Primers were purchased at Eurogentec and are listed in the Suppl. Table S1.

Immune-checkpoint analysis

For PD-1, PD-L1 and CD80 expression analysis, CT26 or MOLT-4 cells, treated or not *in vitro* with H89, were stained using the tumors membrane staining protocol described above. All the antibodies used in this paper are listed in the Suppl. Table S5. All the acquisitions were performed using a BD FACS Canto or a LSRII cytometers using the BD FACSDiva software (BD Biosciences). Data were analysed using the FlowJo software v10.

Immunohistochemistry

CT26 tumors collected from Balb/c mice were cut in 4 μ m thick slices after formalin fixation and paraffine embedding. After demasking in a water bath with Tris-EDTA buffer (20 min, 95°C, pH 9) the slices were left to cool for 10 min at RT. Inhibition of endogenous horseradish peroxidase (HRP) was performed with H₂O₂ (3%) in PBS followed by saturation in TBS-Tween BSA 3%. Slices were then incubated for 1 h at RT with an anti-CD4 (dilution 1:800) or anti-CD8 antibody (dilution 1:500) (HistoSure HS-360108 or 361008) and then with a secondary

antibody (Impress anti-rabbit IgG 5+L (Vector® laboratories MP-7401-50) with a substrate kit HRP (Vector® laboratories, NovaRED Substrate Kit SK-4800). The samples were then exposed to a Harris Hematoxylin bath for 10 seconds before dehydration followed by mounting in organic medium.

Western Blot

Cell lysates were prepared, quantified and proteins were separated in a 10% SDS-page gel and transferred on a nitrocellulose membrane as previously described [43]. Membranes were incubated overnight at 4°C with anti-pAkt or anti-Akt antibodies (Cell Signaling) and HSC70 as endogenous loading control (Santa Cruz). Membranes were washed and incubated for 1 h with HRP-conjugated secondary antibody (Jackson Immunoresearch Laboratories) and revealed using the Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) and the ChemiDoc imaging system (Bio-Rad).

Statistics

Statistical analyses were performed using paired or unpaired Student's t-test one or two-tailed with significance determined at $p \leq 0.05$ for *in vitro* and *ex vivo* experiments. For *in vivo* experiments we used two-way ANOVA with Bonferroni's correction for multiple comparisons. The GraphPad prism 7 software was used to all statistical analyses and differences were considered statistically significant at * $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$ **** $p \leq 0.0001$.

Acknowledgements

We thank François Ghiringhelli (UMR 1231; CGFL) for providing OT-I mice and Lionel Apetoh (UMR 1231) for CD8 T cells depletion protocol. We also thank Valentin Dérangère (UMR 1231; CGFL) and Tibor Ponnelle for immunohistochemistry analysis.

References

1. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. CA Cancer J Clin, 2018. **68**(6): p. 394-424.
2. Siegel, R.L., et al., *Cancer Statistics, 2021*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(1): p. 7-33.
3. Ferlay, J., et al., *Cancer statistics for the year 2020: An overview*. Int J Cancer, 2021.
4. Schmoll, H.J., et al., *ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making*. Ann Oncol, 2012. **23**(10): p. 2479-2516.
5. Van Cutsem, E., et al., *Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up*. Ann Oncol, 2014. **25 Suppl 3**: p. iii1-9.
6. Yoshino, T., et al., *Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS*. Ann Oncol, 2018. **29**(1): p. 44-70.
7. Van Cutsem, E., et al., *ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer*. Ann Oncol, 2016. **27**(8): p. 1386-422.
8. Cheeseman, S.L., et al., *A 'modified de Gramont' regimen of fluorouracil, alone and with oxaliplatin, for advanced colorectal cancer*. Br J Cancer, 2002. **87**(4): p. 393-9.
9. Shresta, S., et al., *How do cytotoxic lymphocytes kill their targets?* Curr Opin Immunol, 1998. **10**(5): p. 581-7.
10. Galon, J., et al., *Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome*. Science, 2006. **313**(5795): p. 1960-4.
11. Marisa, L., et al., *The Balance Between Cytotoxic T-cell Lymphocytes and Immune Checkpoint Expression in the Prognosis of Colon Tumors*. J Natl Cancer Inst, 2018. **110**(1).
12. Tay, R.E., E.K. Richardson, and H.C. Toh, *Revisiting the role of CD4*. Cancer Gene Ther, 2021. **28**(1-2): p. 5-17.
13. Swain, S.L., *CD4 T cell development and cytokine polarization: an overview*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(5): p. 795-8.
14. Murphy, K.M. and B. Stockinger, *Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances*. Nat Immunol, 2010. **11**(8): p. 674-80.
15. Pardoll, D.M., *The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy*. Nat Rev Cancer, 2012. **12**(4): p. 252-64.
16. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
17. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 56-61.
18. Vanpouille-Box, C., et al., *Trial watch: Immune checkpoint blockers for cancer therapy*. Oncoimmunology, 2017. **6**(11): p. e1373237.
19. Hidaka, H., et al., *Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C*. Biochemistry, 1984. **23**(21): p. 5036-41.
20. Davies, S.P., et al., *Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors*. Biochem J, 2000. **351**(Pt 1): p. 95-105.
21. Rahamata, A.-B., et al., *Activation of Akt by the Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 Renders Colon Cancer Cells Sensitive to Apoptosis Induced by Nitric Oxide and Akt Inhibitor*. Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis, 2013.
22. Cortier, M., et al., *H89 enhances the sensitivity of cancer cells to glyceryl trinitrate through a purinergic receptor-dependent pathway*. Oncotarget, 2015. **6**(9): p. 6877-86.
23. Dumortier, C., et al., *H89 Treatment Reduces Intestinal Inflammation and*. Microorganisms, 2020. **8**(12).

24. Eil, R., et al., *Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function*. *Nature*, 2016. **537**(7621): p. 539-543.
25. Guo, Y., et al., *Immunobiology of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017. **38**: p. 10-21.
26. Marçais, A., et al., *The metabolic checkpoint kinase mTOR is essential for IL-15 signaling during the development and activation of NK cells*. *Nat Immunol*, 2014. **15**(8): p. 749-757.
27. Millward, T.A., S. Zolnierowicz, and B.A. Hemmings, *Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(5): p. 186-91.
28. Bender, U., et al., *Adjuvant therapy for stages II and III colon cancer: risk stratification, treatment duration, and future directions*. *Curr Oncol*, 2019. **26**(Suppl 1): p. S43-S52.
29. Buqué, A., et al., *Immunoprophylactic and immunotherapeutic control of hormone receptor-positive breast cancer*. *Nat Commun*, 2020. **11**(1): p. 3819.
30. Schmieder, R., et al., *Regorafenib (BAY 73-4506): antitumor and antimetastatic activities in preclinical models of colorectal cancer*. *Int J Cancer*, 2014. **135**(6): p. 1487-96.
31. Abou-Elkacem, L., et al., *Regorafenib inhibits growth, angiogenesis, and metastasis in a highly aggressive, orthotopic colon cancer model*. *Mol Cancer Ther*, 2013. **12**(7): p. 1322-31.
32. Xie, Y.H., Y.X. Chen, and J.Y. Fang, *Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer*. *Signal Transduct Target Ther*, 2020. **5**(1): p. 22.
33. Castle, J.C., et al., *Immunomic, genomic and transcriptomic characterization of CT26 colorectal carcinoma*. *BMC Genomics*, 2014. **15**: p. 190.
34. Karin, N., *CXCR3 Ligands in Cancer and Autoimmunity, Chemoattraction of Effector T Cells, and Beyond*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 976.
35. Zhang, J., et al., *CD169 identifies an activated CD8(+) T cell subset in regional lymph nodes that predicts favorable prognosis in colorectal cancer patients*. *Oncoimmunology*, 2016. **5**(7): p. e1177690.
36. E, J., et al., *CD8*. *Hum Immunol*, 2018. **79**(6): p. 446-452.
37. Vincent, J., et al., *5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity*. *Cancer Res*, 2010. **70**(8): p. 3052-61.
38. Guan, Y., et al., *FOLFOX Chemotherapy Ameliorates CD8 T Lymphocyte Exhaustion and Enhances Checkpoint Blockade Efficacy in Colorectal Cancer*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 586.
39. Desbois, M., et al., *IL-15 Trans-Signaling with the Superagonist RLI Promotes Effector/Memory CD8+ T Cell Responses and Enhances Antitumor Activity of PD-1 Antagonists*. *J Immunol*, 2016. **197**(1): p. 168-78.
40. Zhang, J., S. Hu, and Y. Li, *KRT18 is correlated with the malignant status and acts as an oncogene in colorectal cancer*. *Biosci Rep*, 2019. **39**(8).
41. Li, L., et al., *FAT2 is a novel independent prognostic factor for the poor prognosis of gastric carcinoma*. *Int J Clin Exp Pathol*, 2017. **10**(12): p. 11603-11609.
42. Rosenberg, D.W., C. Giardina, and T. Tanaka, *Mouse models for the study of colon carcinogenesis*. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(2): p. 183-96.
43. Bouaouiche, S., et al., *Nitric Oxide-Releasing Drug Glyceryl Trinitrate Targets JAK2/STAT3 Signaling, Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(16).

Supplementary table S1. RT-qPCR primers

Primers (mouse)	Forward	Reverse
<i>Cxcl10</i>	AGA ACG GTG CGC TGC AC	CCT ATG GCC CTG GGT CTC A
<i>IFNγ</i>	GAGCTCATTGAATGCTTGGC	GCGTCATTGAATCACACCTG
<i>Tbet</i>	GCCAGGGAACCGCTTATATG	GACGATCATCTGGGTCACATTGT
<i>FoxP3</i>	CCTATGGCTCCTTCCTTGGC	ATGAAGTGTGGTCTGTCCTGG
<i>IL-15</i>	CATATGGAATCCAACCTGGATAGATGTAAGATA	CATATGCTCGAGGGACGTGTTGATGAACAT
<i>Actine</i>	GGCACCACACCTTCTACAATGAGC	CGACCAGAGGCATACAGGGACAG

Supplementary table S2. Flow cytometry antibodies for CD4⁺ TLs populations characterisation

Antibodies	References
CD45 VioGreen	Miltenyi
CD4 FITC	BD Pharmingen™
CD25 BV605	BioLegend
CD127 PerCP/Cy5.5	BioLegend
CxCr5 BV421	BioLegend
ST2(IL-33R) PE	Mdbioproducts
CCR6 PE-Vio	Miltenyi

CxCr3 APC	Miltenyi
PD-1 APC/Cy7	BioLegend
Viability FVS700	BD Pharmingen™

Supplementary table S3. Flow cytometry antibodies for CD8⁺ T cells characterisation

Antibodies	References
CD45 Pacific Blue	BioLegend
CD44 BV 605	BioLegend
CD3 FITC	BioLegend
CD8a PerCP/Cy5.5	BioLegend
CD62L APC	BioLegend
Viability FVS700	BD Pharmingen™

Supplementary table S4. Flow cytometry antibodies for CD8⁺ and CD4⁺ T cells intracellular staining.

Antibodies	References
CD45 VioGreen	Miltenyi
CD4 FITC	BD Pharmingen™
CD8a PerCP/Cy5.5	BioLegend
IFN γ PE/Cy7	BioLegend
Granzyme B APC-Fire750	BioLegend
Viability FVS700	BD Pharmingen™

Supplementary table S5. Flow cytometry antibodies for PD-1, PD-L1 and CD80 labeling

Antibodies	References
PD-1 Pacific Blue	BioLegend
PD-L1 APC	Invitrogen
CD80 FITC	BioLegend
Viability FVS700	BD Pharmingen™

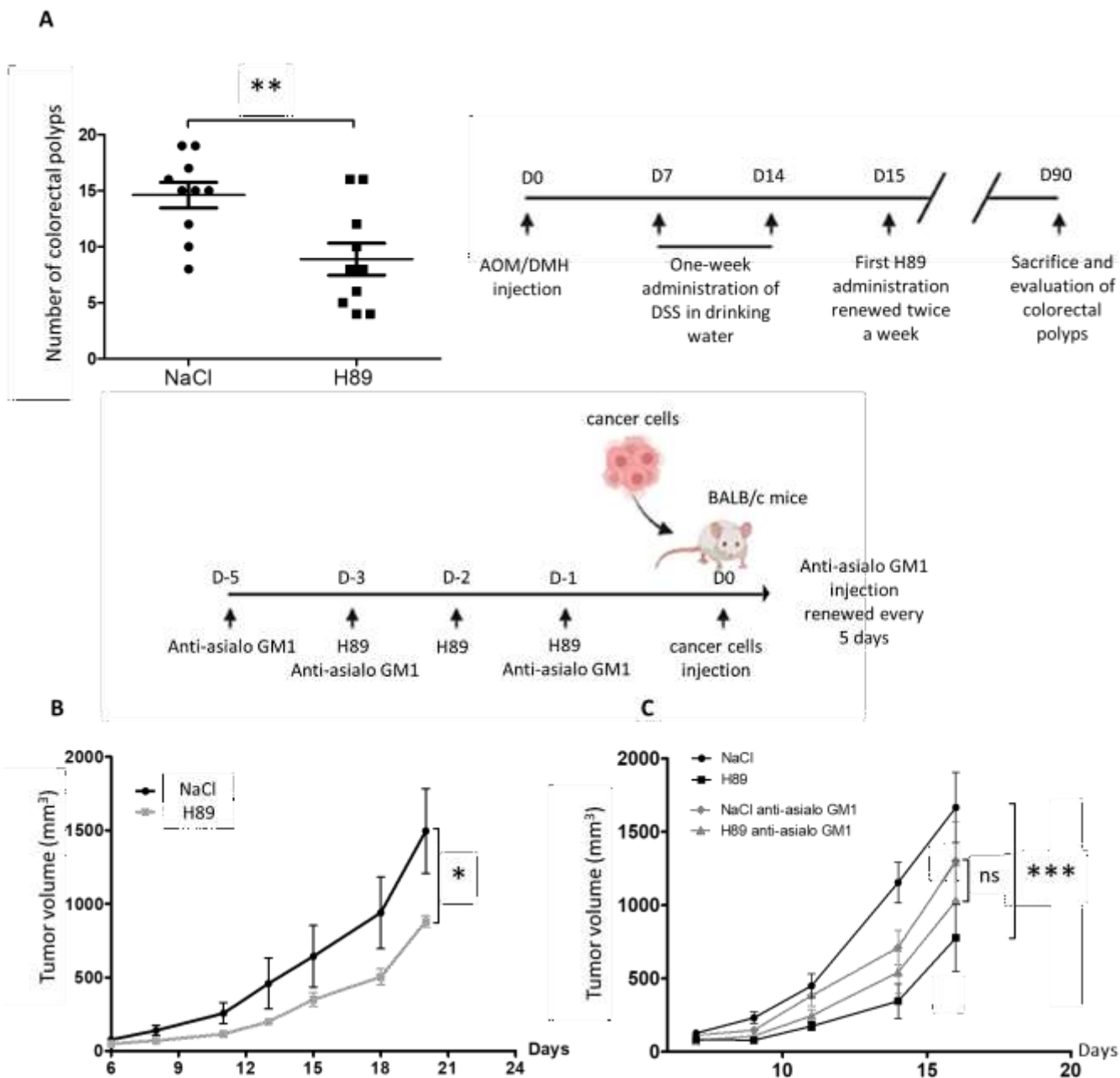


Figure 1. H89 delays tumor growth and AOM/DSS-driven carcinogenesis. (A) Macroscopic evaluation of the number of colorectal polyps in BALB/c mice with AOM/DSS induced colorectal carcinoma, treated or not with H89 (5 mg/kg, oral administration) twice a week ($n=10$ mice/group). **(B)** To assess the preventive effect of H89 in CT26-bearing BALB/c mice, H89 (or NaCl in the control group) was injected for three days in a row (10 mg/kg, i.p.). At day four, 5×10^5 CT26 cells were injected in s.c. and tumor growth was monitored three times a week ($n=5$). **(C)** Two days before the first H89 injection, mice were treated with an anti-asialoGM1 to deplete NK cells (10 μ L in 100 μ L of NaCl according to the supplier's instructions). Anti-asialo GM1 Injections were repeated during the first and the last H89 injection, and then every 5 days ($n=7$ mice/group). Statistically significant differences were determined by using a *t*-test **(A)** or two-way ANOVA **(B,C)** : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$

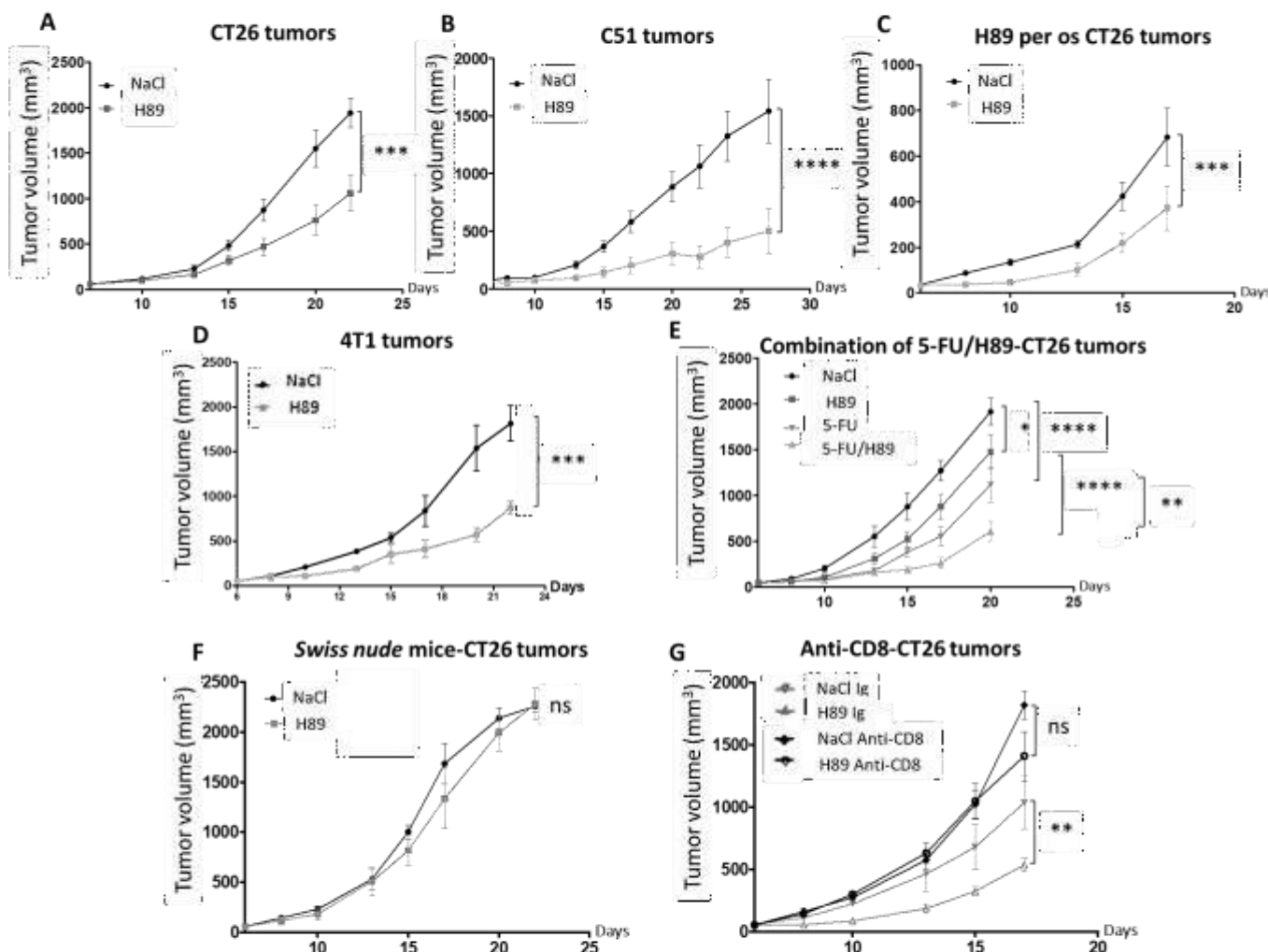
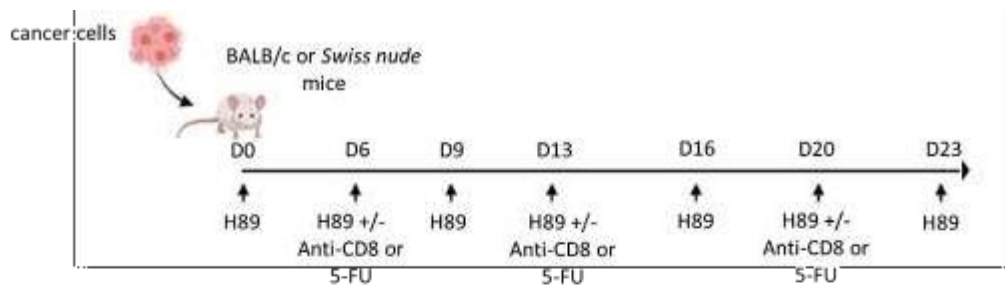


Figure 2 . H89 mediates immunotherapeutic activity against colon cancer. (A,B) CT26 or C51 tumor-bearing BALB/c mice (5×10^5 murine colon cancer cells in s.c.) were treated, or not (NaCl, i.p.), with H89 (10 mg/kg, i.p.) twice a week, and tumor growth was monitored three times a week (A, $n=10$ mice/group; B, $n=7$ mice/group). (C) Oral administration of H89 (5 mg/kg), or NaCl in the control group, twice a week in CT26 tumor-bearing Balb/c mice. Tumor growth was monitored three times a week ($n=7$ mice/group). (D) 4T1 breast cancer cells tumor-bearing mice (5×10^5 4T1 cells in s.c.) were treated, or not (NaCl, i.p.), with H89 (5mg/kg, i.p.) twice a week and tumor growth was monitored three times a week ($n=5$ mice/group). (E) CT26 tumor-bearing BALB/c mice (5×10^5 CT26 cells in s.c.) were treated, or not (NaCl, i.p.), with H89 (10 mg/kg, i.p.) twice a week, in combination with 5-Fluorouracil (5-FU, 5 mg/kg in i.p.) once a week, and tumor growth was monitored three times a week ($n=14$ mice/group). (F) Swiss nude immunodeficient mice, bearing CT26 tumors (5×10^5 CT26 cells in s.c.) were treated, or not (NaCl, i.p.), with H89 (10 mg/kg, i.p.) twice a week, and tumor growth was monitored three times a week ($n=5$ mice/group). (G) CT26 tumor-bearing BALB/c mice (5×10^5 CT26 cells in s.c.) were treated, or not (NaCl, i.p.), with H89 (10 mg/kg, i.p.) twice a week. Mice also received anti-CD8a or control IgG injections once a week (500 μ g in i.p.) and tumor growth was monitored three times a week ($n=7$ mice/group). Statistically significant differences were determined by using two-way ANOVA : * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$; **** $p \leq 0,0001$; n.s. : non-significant results.

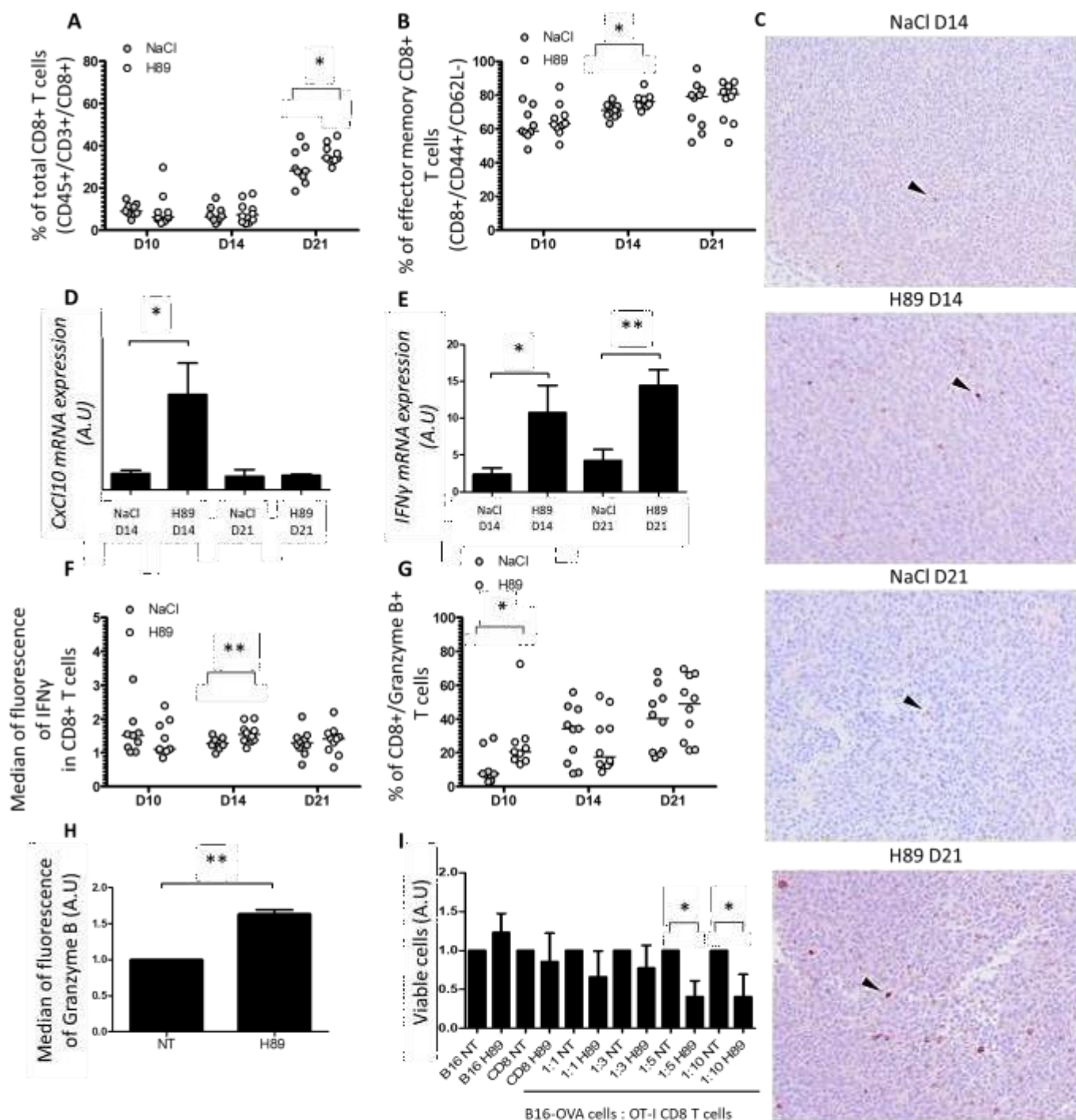


Figure 3. H89 increases CD8+ LT tumor-infiltration, activation and function. (A,B) Flow cytometry analysis (n=10 mice/group) of the intra-tumor infiltration of CD8+ T cells under H89 treatment on day 10 (D10), D14 and D21 after CT26 colon cancer cells injection (5×10^5 in s.c.). BALB/c mice were treated or not (NaCl) by H89 (10 mg/kg, i.p. administration twice a week). (C) IHC analysis on CT26 tumors after CD8+ T cells labelling at D14 and D21 (representative images of 3 animals/group/time point). RT-qPCR analysis of *CXCL10* (D) and *IFN γ* (E) expression at D14 and D21 after CT26 cancer cells injection (n=3 mice) and H89 treatment (10 mg/kg, i.p. NaCl in the control group). (F,G) Flow cytometry analysis after intracellular labelling (n=10 mice/group) of IFN γ and Granzyme B in intratumor CD8+ T cells at D10, D14 and D21 after CT26 colon cancer cells injection and H89 treatment (10 mg/kg, i.p. NaCl in the control group). (H) Flow cytometry analysis of Granzyme B production of splenic CD8+ T cells *ex-vivo* after H89 treatment (5 μ M, 72h) and (n=3) (I) cytotoxic assay using CD8+ T cells from OT-I mice co-cultured with B16-OVA cells *in vitro* treated by H89 (5 μ M, 48h) (n=3). Statistically significant differences were determined by using a t-test: *p \leq 0,05; **p \leq 0,01.

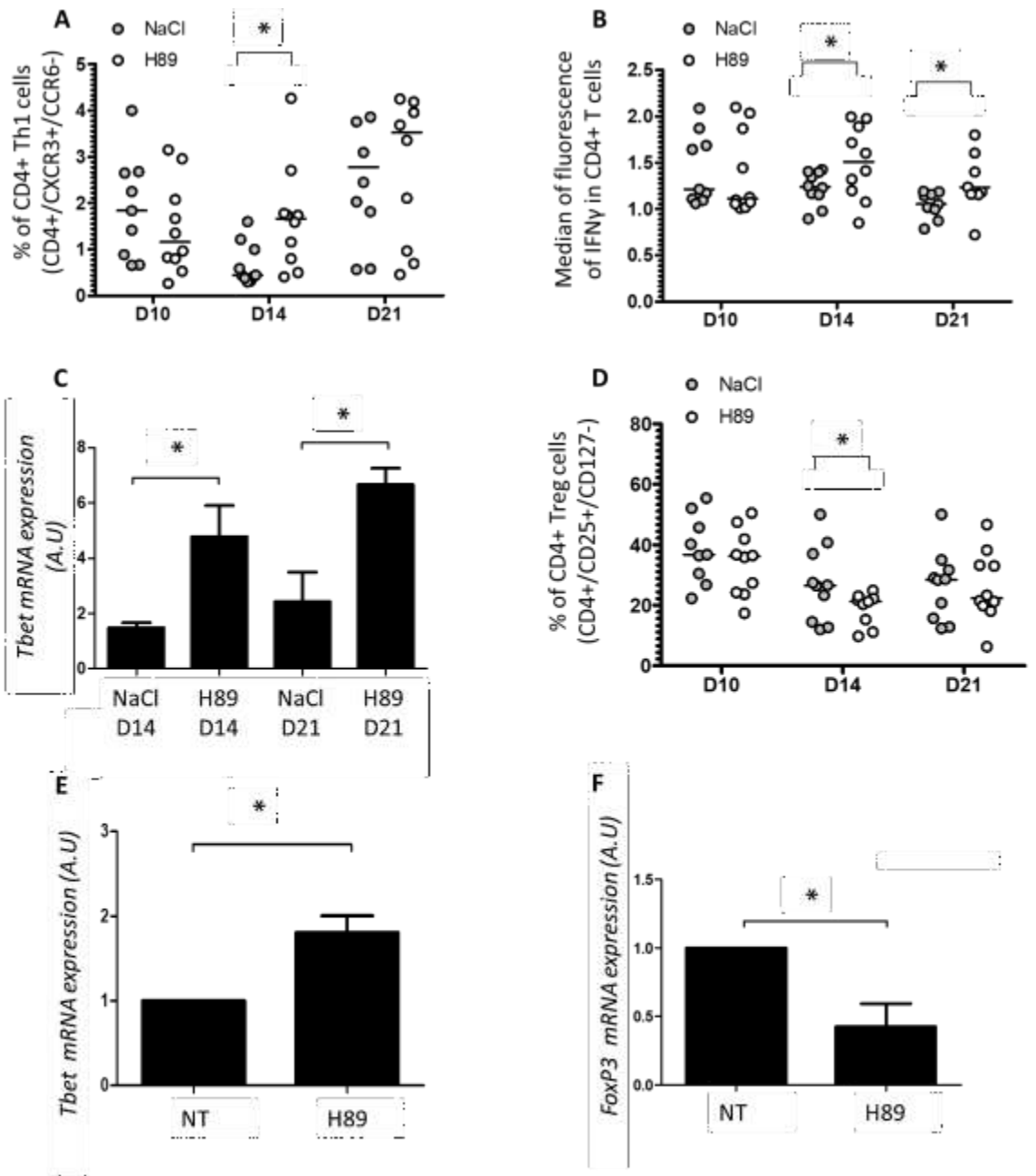


Figure 4. Effect of H89 on CD4+ T cell infiltration and differentiation. (A,B,D) Flow cytometry analysis (n=10 mice/group) of the intra-tumor infiltration of CD4+ Th1, Treg and IFN γ expression in CD4+ T cells at day 10 (D10), D14 and D21 after CT26 colon cancer cells injection into BALB/c mice (5×10^5 in s.c), treated or not by H89 (10 mg/kg, i.p. injection two times a week). Control group received NaCl injection. **(C)** RT-qPCR analyses of *Tbet* expression at D14 and D21 after CT26 cancer cells injection into BALB/c mice (n=3 mice). **(E,F)** RT-qPCR analyses of *Tbet* and *FoxP3* expression on splenic naifs CD4+ T cells from BALB mice after *in vitro* differentiation into Th1 and Treg under H89 treatment (1 μ M, 72h) (n=3). Statistically significant differences were determined by using a *t*-test: *p \leq 0,05.

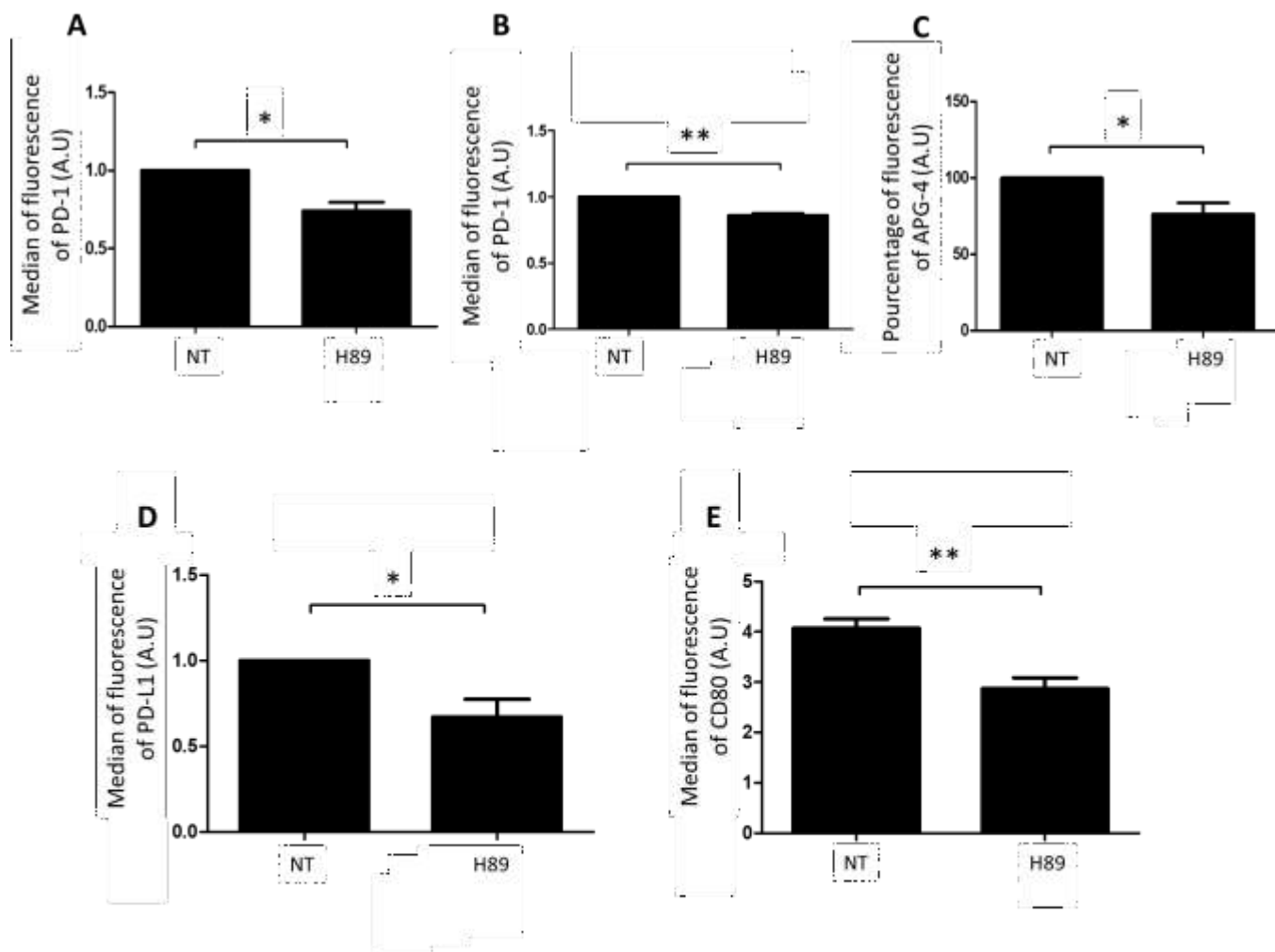


Figure 5. H89 modulates immunosuppressive receptors expressed either by T cells or colon cancer cells. Flow cytometry analysis of PD-1 expression on CD4+ T cells isolated from the spleen of BALB/c mice (A) or MOLT-4 cells (B) cells treated by H89 for 24 hours (n=3). Flow cytometry intracellular K⁺ detection using APG-4 probe on splenic CD4+ T cells treated by H89 for 2 hours (n=3) (C). Flow cytometry analysis of PD-L1/CD80 expression on CT26 colon cancer cells treated by H89 for 24 hours (n=3) (D,E). Statistically significant differences were determined by using a t-test: *p<0,05; **p<0,01.

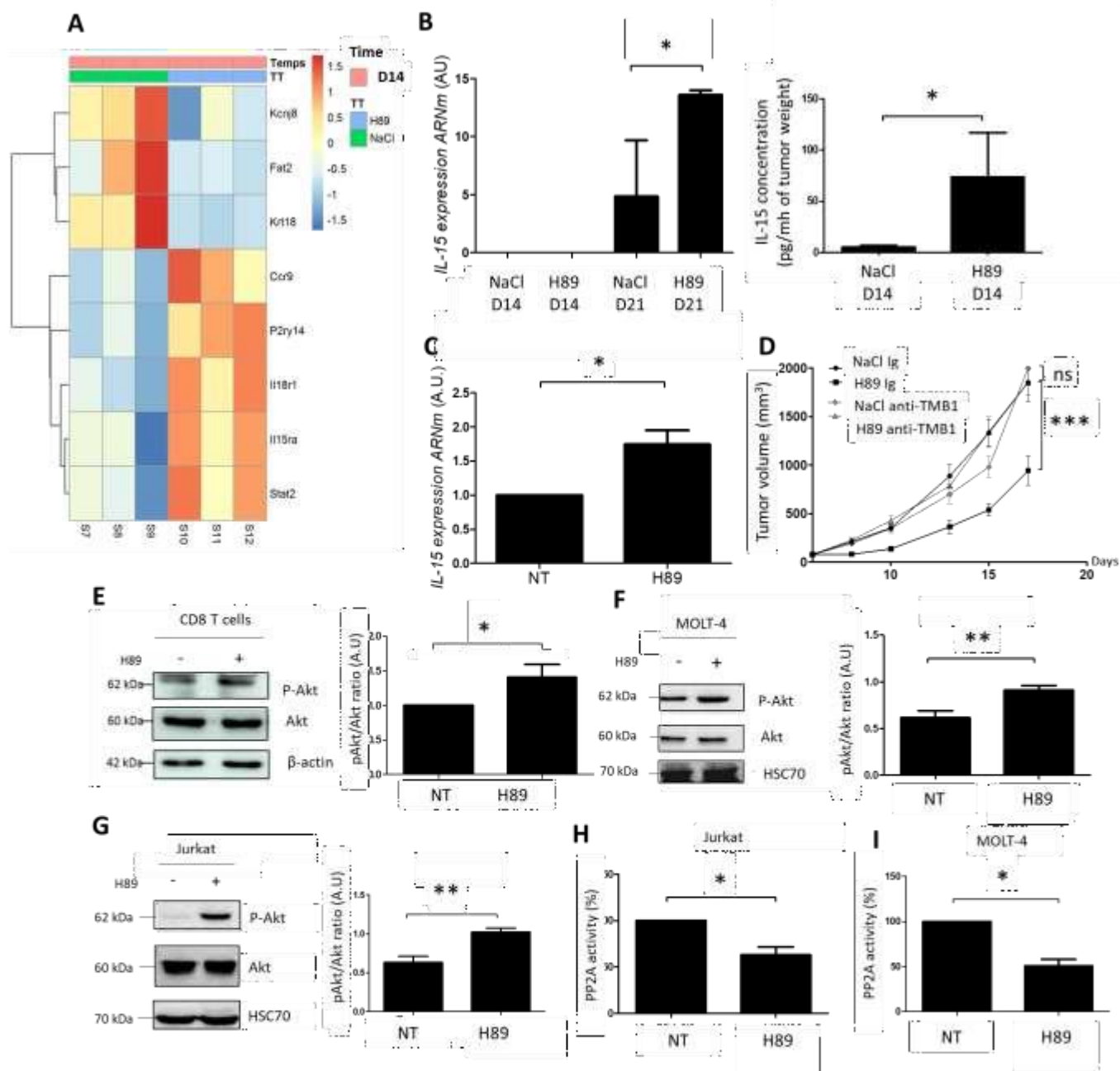


Figure 6. H9 regulates signaling pathways involved in immune cell activation and cancer cell growth. (A) RNAseq analysis were performed on CT26 solid tumors isolated from BALB/c mice treated or not (NaCl) with H89 (10 mg/kg, i.p) at D14 after colon cancer cells injection (n=3 mice/group) **(B)** RT-qPCR analysis of *IL-15* expression mRNA level at D14 and D21 after CT26 cancer cells injection into BALB/c mice (n=3 mice/group) and ELISA analysis of IL-15 on tumor lysates ad D14 (n=5 mice/group). **(C)** RT-qPCR analysis of *IL-15* expression mRNA level on CT26 cells treated *in vitro* with H89 for 24 h (n=3). **(D)** CT26 tumor-bearing BALB/c mice (5x 10⁵ CT26 cells in s.c) were treated, or not (NaCl, i.p.), with H89 (10 mg/kg, i.p) twice a week. Mice also received anti-TMB1 or control IgG injections once a week (50 µg in i.p.) and tumor growth was monitored three times a week (n=7 mice/group). **(E,F,G)** Western Blot analysis of Akt phosphorylation (P-Akt) after H89 treatment in CD8 T cells isolated from the spleen of BALB/c mice or MOLT-4 and Jurkat T cells (n=5) **(H,I)** Quantification of the enzymatic activity of phosphatase PP2A in Jurkat and MOLT-4 T cells (n=3). Statistically significant differences were determined by using two-way ANOVA (D) or a t-test (B,C,E,F,G,H,I): *p<0,05 (or 0,1 in B with 90% confidence level); **p<0,01. ; n.s. : non-significant results. For RNAseq analysis were performed with the DSEeq2 package using a Wald test.

Supplementary Figure S1

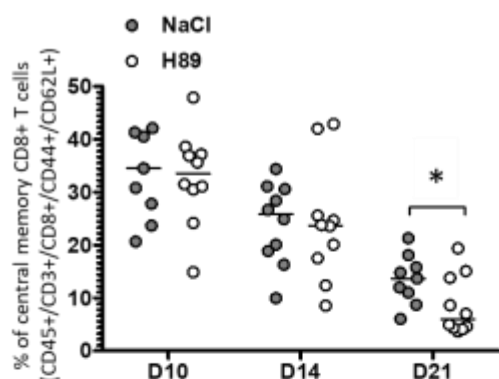


Figure S1. Central memory CD8+ T cells recruitment in response to H89. Flow cytometry analysis of the intra-tumor infiltration of central memory CD8+ T cells day 10 (D10), D14 and D21 after CT26 colon cancer cells injection into BALB/c mice (5×10^5 in s.c), treated or not by H89 (10 mg/kg, i.p. injection two times a week). Control group received NaCl injection. (n=10 mice/group). Statistical analyses were performed using a *t*-test. * $p < 0,05$

Supplementary Figure S2

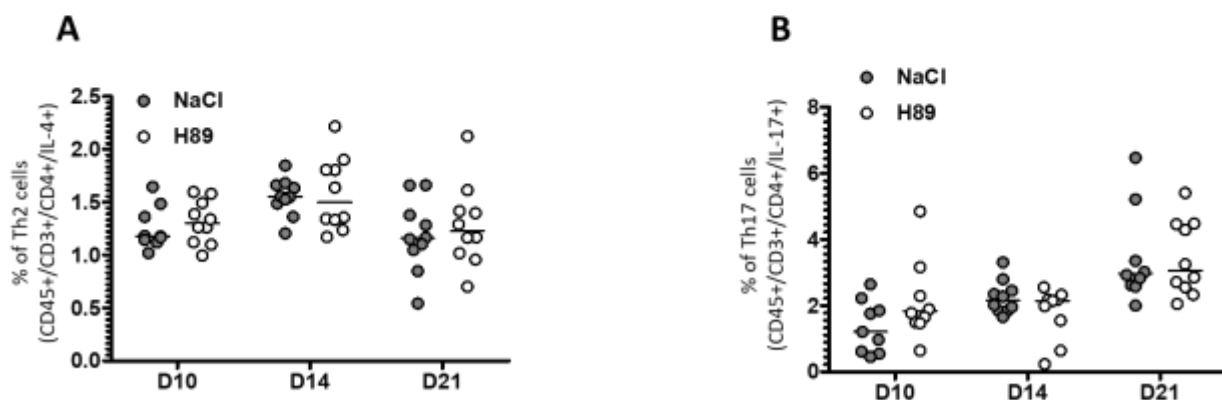


Figure S2. Th2 and Th17 CD4+ T cells recruitment in response to H89. Flow cytometry analysis of the intra-tumor infiltration of Th2 (A) and Th17 (B) CD4+ T cells day 10 (D10), D14 and D21 after CT26 colon cancer cells injection into BALB/c mice (5×10^5 in s.c), treated or not by H89 (10 mg/kg, i.p. injection two times a week). Control group received NaCl injection. (n=10 mice/group). Statistical analyses were performed using a *t*-test.

Supplementary Figure S3

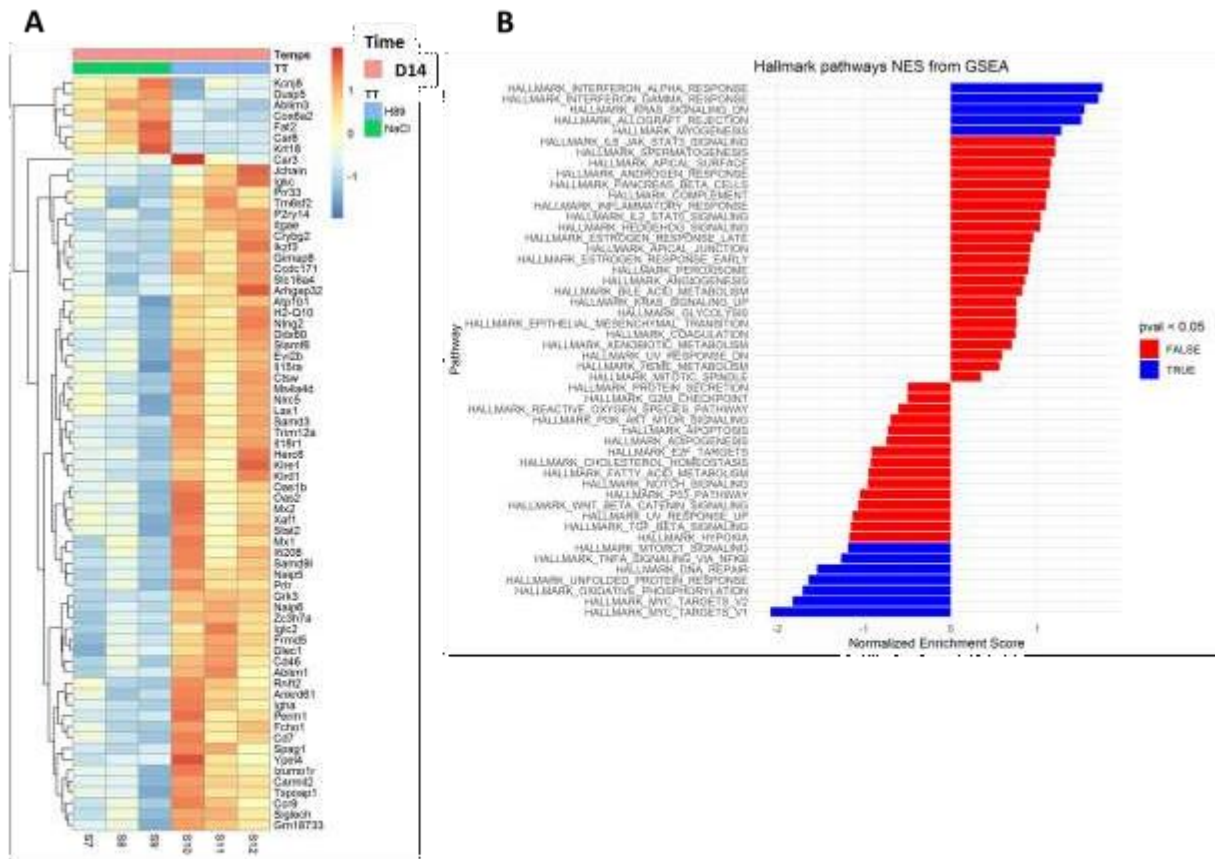


Figure S3. Heatmap showing differential gene expression and GSEA Hallmark pathways variation in response to H89. RNAseq analyses for gene expression (A) and GSEA Hallmark pathways variation (B) were performed on colorectal tumors from Balb/c mice treated or not with H89 at D14 after CT26 cancer cells injection (n=3 mice/group). Statistical analyses were performed using the DSEeq2 package using a Wald test. GSEA was conducted using clusterProfiler R package.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Si l'immunothérapie est un pilier dans le traitement du cancer, son utilisation demeure limitée dans la prise en charge du cancer colorectal. Récemment, une nouvelle classification moléculaire du cancer colorectal appelée CMS (de *Consensus Molecular Subtypes*) a été proposée, dans le but de mieux comprendre la potentielle réponse des patients à l'immunothérapie. Cette classification inclut quatre sous-types de cancer colorectal, **CMS1**, **CMS2**, **CMS3** et **CMS4** (Becht *et al.*, 2016). Les tumeurs CMS1 sont des tumeurs à haut taux de mutations, avec un profil MSI-high des mutations de BRAF et un infiltrat immunitaire important. Les tumeurs CMS2 sont considérées comme « canoniques », avec comme caractéristique une activation des voies Wnt/ β -caténine et Myc. Dans le cas des CMS3, soit les « tumeurs métaboliques », les cellules cancéreuses présentent une activation de l'oncogène KRAS avec dérégulation du métabolisme énergétique de la cellule. Enfin, les tumeurs CMS4 présentent une activation de la voie de signalisation de la cytokine TGF- β et une augmentation de l'infiltrat immunitaire pro-inflammatoire. Ces différents groupes de tumeurs sont caractérisés par des différences au sein du MET. En effet, les tumeurs CMS1 et CMS4 sont appelées « tumeurs chaudes », soit avec un important infiltrat immunitaire, tandis que les tumeurs CMS2 et CMS3 sont des « tumeurs froides », très peu infiltrées (Ciardiello *et al.*, 2019). Pour cette raison, la classification CMS est très utilisée pour prédire la réponse des patients à l'immunothérapie. Par exemple, dans le cas des tumeurs CMS1, fortement infiltrées en LT CD8⁺ et avec une surexpression des récepteurs PD-1, PD-L1 et CTLA-4, l'utilisation des inhibiteurs des PCIs est une option thérapeutique intéressante. Dans le cas des tumeurs CMS4 la situation est différente, parce que ces tumeurs sont fortement infiltrées par les cellules immunitaires immunosuppressives et riches en TGF- β . L'approche la plus adaptée en immunothérapie repose donc sur l'inhibition de ces cellules et sur l'utilisation d'inhibiteurs des cytokines immunosuppressives. Dans le cas des tumeurs CMS2 et CMS3, définies comme « désert immunitaire », l'utilisation de l'immunothérapie reste, aujourd'hui, compliquée. C'est pourquoi l'intérêt des nouvelles stratégies thérapeutiques est essentiellement celui de rendre ces « tumeurs froides » plus immunogènes (Angelova *et al.*, 2015).

Il a été montré que certaines chimiothérapies sont capables d'induire la mort cellulaire immunogène (ICD, *Immunogenic Cell Death*), stimulant une réponse immunitaire spécifique dirigée contre les cellules cancéreuses. Ainsi, différents mécanismes rendent les cellules cancéreuses « visibles » aux cellules du système immunitaire inné et adaptatif, et cela intervient dans l'éradication de la tumeur (Bracci *et al.*, 2014). Pour cette raison, la combinaison de la chimiothérapie avec l'immunothérapie est un outil important dans la stimulation d'une réponse immunitaire antitumorale efficace et donne des résultats prometteurs en thérapie anti-cancéreuse (Bracci *et al.*, 2014).

L'utilisation du H89 s'inscrit dans la recherche de nouvelles petites molécules capables de stimuler la réponse immunitaire. Actuellement, aucune étude vise à comprendre les propriétés immunogènes de cette molécule. L'utilisation d'une petite molécule comme le H89 présente de nombreux avantages en thérapie. En effet, celles-ci peuvent être administrées aux patients par voie orale et l'utilisation des inhibiteurs de kinases a fait ses preuves en clinique dans le traitement de différents types de cancer (Lee, Tan and Oon, 2018). Dans la majorité des cas, ces molécules sont utilisées en combinaison avec la chimiothérapie, traitement standard pour le traitement du cancer colorectal. La combinaison avec la chimiothérapie peut également constituer un avantage vis-à-vis de la stimulation de l'ICD et de la réponse immunitaire. Dans le cas de notre étude, le H89 stimule à lui seul la réponse immunitaire antitumorale, ce qui rend la molécule intéressante pour son éventuelle utilisation en thérapie anti-cancéreuse. De plus, le modèle pré-clinique CT26 utilisé dans l'étude est considéré comme « tumeur froide » (Soldevilla *et al.*, 2018). Ainsi, le fait que le H89 soit capable de stimuler le recrutement des cellules immunitaires à activité antitumorale au sein de la tumeur est très prometteur pour le traitement des types de cancers peu infiltrés, sur lesquelles l'immunothérapie demeure inefficace. La combinaison du H89 avec le 5-FU améliore considérablement l'effet de la chimiothérapie, et le fait que le 5-FU fasse partie des chimiothérapies immunogènes induisant le recrutement des cellules immunitaires au sein de la tumeur, fait de la combinaison 5-FU/H89 une alternative thérapeutique prometteuse.

H89 et prophylaxie : rôle de l'immunité innée

Dans notre étude nous montrons que le H89 est capable d'inhiber la prise tumorale, aussi bien dans un modèle de carcinome colique induit par des mutagènes chimiques, que dans un modèle d'allogreffe de tumeurs CT26 chez la souris BALB/c. Cet effet préventif pourrait être dû à une réponse immunitaire innée, qui se met en place rapidement et qui ralentit la croissance des cellules cancéreuses. En effet, certaines cellules de l'immunité innée sont responsables d'une réponse immunitaire antitumorale précoce comme les cellules NK, les cellules NKT, les LT $\gamma\delta$, mais également les CD et les macrophages (Woo, Corrales and Gajewski, 2015). Les cellules NK, avec leur activité cytotoxique directe sur les cellules cancéreuses, ont une place importante en immunothérapie (Sivori *et al.*, 2021). Pour cette raison, nous avons décidé de dépléter les cellules NK *in vivo* à l'aide d'un anticorps anti-asialo GM1 chez les souris BALB/c porteuses de tumeurs coliques CT26. Nous montrons qu'en présence d'anti-asialo GM1, l'effet préventif que le H89 exerce sur la prise tumorale est inhibé, ce qui suggère que l'effet du H89 est dépendant des cellules NK. Même si ce résultat montre que les cellules NK sont importantes dans ce processus, d'autres cellules de l'immunité innée pourraient être impliquées. Les macrophages associés aux tumeurs (MAT) font partie des cellules immunitaires innées prépondérantes au sein du MET, et jouent un rôle important dans la progression de la maladie (Fu *et al.*, 2020). Les MAT peuvent avoir un rôle pro- ou antitumoral selon leur polarisation en M1-like ou M2-like. Les MAT M1-like ont un rôle antitumoral, stimulant entre autres l'activation des LT CD8⁺ et des LT CD4⁺ Th1, tandis que les M2-like ont plutôt une activité pro-tumorale et induisent le recrutement des cellules immunitaires immunosuppressives comme les Treg (Anfray *et al.*, 2019). Etant donné que l'activité du H89 semble être lié à la présence des cellules NK, il serait intéressant de dépléter les macrophages afin d'en évaluer leur rôle dans l'effet préventif de la molécule. Si le H89 est capable de stimuler l'activation des macrophages, leur déplétion pourrait partiellement inhiber l'effet antitumoral de la molécule. Ceci pourrait être lié au fait qu'une fois polarisés en M1-like, les macrophages induisent l'activation des cellules NK, qui se sont montrées importantes dans l'inhibition de la prise tumorale induite par le H89, ou avoir un effet direct sur les cellules cancéreuses. Nous envisageons donc d'effectuer une expérience de déplétion des macrophages *in vivo* à l'aide de liposomes de clodronate dans notre modèle d'étude de tumeurs coliques CT26 chez la souris BALB/c.

H89 et impact sur la réponse immunitaire adaptative

Le H89 n'a pas seulement une activité prophylactique, mais également un effet antitumoral une fois que la tumeur est établie. Nous montrons que l'effet antitumoral du H89 dépend des LT, plus particulièrement la déplétion des LT CD8⁺, et l'analyse détaillée de l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs traitées avec le H89, montre une augmentation du nombre de LT CD8⁺ effecteurs mémoire, des LT CD4⁺ Th1, ainsi qu'une augmentation des cytokines comme l'IFN γ et le Granzyme B, importantes dans l'activité de ces cellules. De plus, une diminution de l'infiltrat Treg, cellules à activité immunosuppressive, vient compléter le cadre qui tend vers une stimulation de la réponse immunitaire antitumorale induite par le H89. Il est maintenant bien établi qu'un infiltrat CD8⁺ et Th1 est lié au bon pronostic des patients, tandis que l'infiltrat Treg est essentiellement lié à un mauvais pronostic (Tosolini *et al.*, 2011). Le H89 a également montré un effet direct sur la polarisation et l'activation des cellules T *in vitro*, ce qui nous permet de confirmer le rôle de cet inhibiteur de kinases sur la stimulation d'une réponse immunitaire antitumorale. L'étude de la capacité des petites molécules inhibitrices de kinases à induire le recrutement des cellules immunitaires dans le MET, ainsi que leur activation, est un champ de recherche nouveau, ce qui rend cette étude originale. La volonté d'utiliser le modèle CT26 dérive du fait que ces tumeurs sont considérées comme « froides » et cela permet d'émettre des hypothèses encourageantes pour le traitement des patients atteints de cancer colorectal qui ne répondent pas à l'immunothérapie.

Le H89 a également un effet direct sur l'expression des points de contrôle immunitaires au sein des LT et des cellules tumorales *in vitro*. En effet, il est capable de diminuer l'expression de PD-1 à la surface des LT CD4⁺ de souris ainsi que des cellules MOLT-4 (une lignée CD8-like), mais module également l'expression de son ligand PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses coliques CT26. Le H89 diminue également l'expression de CD80, un des ligands de CTLA-4, à la surface des cellules CT26. Le CD86, deuxième ligand de CTLA-4 n'est, en revanche, pas impacté par le H89. Le H89 est également capable de diminuer la concentration de Kⁱ, qui constitue un autre mécanisme que les cellules cancéreuses mettent en place afin d'échapper à la surveillance immunitaire (Eil *et al.*, 2016). Nous avons également étudié l'expression d'autres PCIs en réponse au traitement avec le H89, aussi bien au niveau des cellules tumorales que des LT. Nos résultats montrent que le H89 ne module pas l'expression des

récepteurs CTLA-4 ou de TIM-3 à la surface des LT CD4⁺ et CD8⁺, ni l'expression génique (ARNm) de BTLA-4 dans les LT CD8⁺. Au niveau des cellules cancéreuses, le H89 ne module pas l'expression d'HVEM, ligand de BTLA. En revanche, il diminue l'expression de la Galectine-9 (Gal-9), ligand de TIM-3. Le rôle de la Gal-9 est controversé, parce qu'étant le ligand de TIM-3 la liaison des deux inhibe l'activation des LT et contribue à leur épuisement, ce qui est lié à un mauvais pronostic (Wang *et al.*, 2018b). Mais plusieurs études montrent qu'une augmentation de l'expression de la Gal-9 serait capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses, ou que cela est associé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer gastrique (Jiang *et al.*, 2013; Fujita *et al.*, 2017). Les traitements actuels bloquant les PCIs ne sont malheureusement pas efficaces chez la plupart des patients atteints de cancer colorectal, mis à part les tumeurs de type MSI-high, et le fait que le H89 puisse moduler ces récepteurs est prometteur (Ganesh *et al.*, 2019).

Toujours en lien avec l'activation des voies des PCIs, nous avons étudié l'impact du H89 sur l'activité enzymatique de la phosphatase PP2A. En effet, cette phosphatase est activée par les récepteurs inhibiteurs PD-1 et CTLA-4, ainsi que par l'accumulation de K⁺_i et induit la cascade de la signalisation responsable de leur épuisement (Parry *et al.*, 2005; Eil *et al.*, 2016). Nous avons montré que le H89 diminue l'activité de la PP2A et nous observons une augmentation de p-Akt associée à la diminution de l'activité de la phosphatase, ce qui laisse penser que le H89 est capable de lever l'inhibition que celle-ci exerce sur la kinase Akt. Les résultats obtenus avec l'inhibition de la PP2A sont intéressants dans une perspective de développement d'immunothérapie, car cette phosphatase constitue une cible intéressante afin de restaurer une réponse immunitaire antitumorale efficace (Zhou *et al.*, 2014). En effet, une étude récente montre que l'inhibition de la PP2A avec le LB-100, un inhibiteur spécifique, augmente l'efficacité d'un anti-PD-1 dans un modèle de glioblastome chez la souris (Maggio *et al.*, 2020). D'autres phosphatases comme SHP-1 et SHP-2 interagissent avec PP2A dans la voie de signalisation conduisant à l'épuisement des LT et leur inhibition est prometteuse en immunothérapie (Liu *et al.*, 2020). Pour cela, l'étude de l'impact du H89 sur celles-ci constitue une perspective de travail intéressante et envisagée.

H89 et voie de l'IL-15

L'analyse RNAseq des tumeurs traitées avec le H89, montre que de nombreux gènes sont modulés, dont celui du récepteur à l'IL-15, le IL-15RA. Ce récepteur est impliqué aussi bien dans l'activation des cellules NK, que des LT CD8⁺ mémoire et constitue une cible intéressante en thérapie anti-cancéreuse. En effet, une quinzaine d'études cliniques qui utilisent des super-agonistes de l'IL-15 sont actuellement en cours et la voie de cette cytokine a un potentiel croissant en immunothérapie (Guo *et al.*, 2017). Or, l'effet du H89 implique aussi bien les cellules NK, que les LT CD8⁺, ce qui fait de ce récepteur un objet d'étude intéressant. Nous avons donc bloqué *in vivo* la signalisation du récepteur IL-15RA afin d'en étudier l'impact sur l'effet antitumoral du H89. Les résultats montrent que le blocage du récepteur annule complètement l'effet antitumoral de la molécule. Cela est en accord avec nos précédents résultats, étant celui-ci impliqué aussi bien dans l'activation des cellules NK que des CD8⁺, qui sont indispensables pour l'effet du H89. Malgré les résultats de l'analyse RNAseq, une vérification de l'expression protéique du récepteur au sein des tumeurs traitées avec le H89 reste nécessaire et est envisagée. De plus, le fait que le H89 module le récepteur IL-15RA au sein de la tumeur ne donne pas une réponse sur l'effet direct que cela pourrait engendrer au niveau des cellules CD8⁺ et NK. Nous envisageons donc d'évaluer l'expression du récepteur dans ces cellules *ex vivo*. Nous montrons également une augmentation de l'expression en ARNm de la cytokine *IL-15* dans les tumeurs traitées avec le H89, mais ce résultat reste à confirmer avec des expériences ELISA sur des lysats tumoraux. Nous avons également montré que le H89 induit l'augmentation de l'expression de l'ARNm de l'*IL-15 in vitro* dans la lignée CT26, qui reste également à confirmer par ELISA. Ces résultats nous font émettre l'hypothèse qu'au sein de la tumeur le H89 pourrait induire une augmentation de la sécrétion d'IL-15 par les cellules cancéreuses, mais nous ne connaissons pas l'impact sur les cellules immunitaires. Il serait donc intéressant d'évaluer également l'effet direct du H89 sur la sécrétion d'IL-15 par les LT CD8⁺ *ex vivo*. La voie de l'IL-15 apparaît, donc, comme un mécanisme important de l'effet immunomodulateur et antitumoral du H89.

Autres cibles potentielles du H89

L'analyse RNAseq a montré la modulation de plusieurs autres gènes par le H89, pouvant constituer des cibles intéressantes en thérapie anti-cancéreuse. Nous observons une augmentation de la protéine G P2ry14 (*P2Y purinoceptor 14*), qui induit le recrutement des cellules immunitaires dans le MET, avec bon pronostic chez les patients atteints de carcinome de la tête et du cou (Meng *et al.*, 2021). L'expression du récepteur à l'IL-18, IL-18r1 (*IL-18 receptor 1*), est également augmentée par le H89. Ce dernier est sur-exprimé chez les LT CD8⁺ activés et il est peu exprimé dans le cancer colorectal, ce qui augmente l'inflammation intestinale et l'apparition du cancer (Li *et al.*, 2019). Le FT STAT2, impliqué dans la signalisation IFN α , est également sur-exprimé dans les tumeurs traitées avec le H89 (Schubert *et al.*, 2019). Nous observons également une surexpression du récepteur de chimiokines CCR9 (*C-C Chemokine Receptor type 9*), qui peut être exprimé dans chez les LT CD8⁺ activés. L'augmentation de son ligand, le CCL25 (*C-C motif Ligand 25*), dans le MET augmente l'effet de l'immunothérapie dans le cancer du sein triple négatif (Chen *et al.*, 2020a). Parmi les gènes qui, au contraire, voient leur expression diminuée par le H89, nous retrouvons le canal potassique Kir6.1, augmenté chez les patients atteints de cancer de l'œsophage, et la protéine FAT2 (*FAT Atypical Cadherin 2*), dont l'expression est corrélée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer gastrique (Li *et al.*, 2017). Ces résultats ouvrent d'autres perspectives potentielles au mode d'action et à l'effet antitumoral induit par le H89.

H89 : un inhibiteur de kinases à large spectre

Le H89 est un inhibiteur de kinases à large spectre, connu comme inhibiteur de la PKA, mais capable d'inhiber d'autres kinases telles que S6K1, MSK1, ROCK-II et PKB α (autre nom d'Akt), pouvant avoir un rôle dans l'immunorégulation (Davies *et al.*, 2000). Par exemple, la kinase S6K1 est une cible de mTOR dans la voie PI3K/Akt, et régule l'activation des LT et des cellules NK (Li *et al.*, 2020a). Même si Davies *et al.* ont initialement décrit le H89 comme inhibiteur de ces kinases, nos résultats montrent que la molécule est capable d'induire la phosphorylation d'Akt dans les LT, qui est en amont de cette voie de signalisation pouvant induire l'activation de S6K1 (Pópulo, Lopes and Soares, 2012). D'autres résultats obtenus précédemment au sein de l'équipe avaient déjà montré la capacité du H89 à induire la phosphorylation d'Akt et de S6K1 au sein des cellules cancéreuses coliques (Ali-Boina *et al.*, 2013). Une étude récente effectuée par Chase H Melick et collaborateurs montre que le H89

est capable de stabiliser la phosphorylation d'Akt et de S6K1 et prévient leur déphosphorylation induite par des inhibiteurs de mTOR tels que Torin1 (Melick and Jewell, 2020). Néanmoins, des études montrent que l'augmentation de p-S6K1 est retrouvée chez les patients atteints de cancer colorectal, et que cela est corrélé avec une augmentation de la protéine NLRP3 (*NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*) dans les tissus tumoraux. L'inhibition de ces voies serait donc prometteur dans le traitement de certains patients (Wang *et al.*, 2020). Le rôle de la kinase S6K1 est donc controversé. S6K1 peut être promoteur de l'activation des LT en favorisant la réponse immunitaire antitumorale, mais également un facteur de mauvais pronostic chez certains patients, probablement lorsqu'elle est activée dans les cellules tumorales et non pas immunitaires. Dans notre étude, le H89 étant capable d'activer Akt, nous nous situons dans un contexte où la molécule vise plutôt l'activation des cellules immunitaires au sein de la tumeur, ce qui est indispensable pour l'efficacité de l'immunothérapie. Il serait donc intéressant d'observer la régulation de la phosphorylation de S6K1 suite au traitement avec le H89 dans notre système, dans le but de compléter les résultats déjà obtenus avec p-Akt. Concernant la kinase MSK1, c'est une cible des kinases ERK1/2 dans la voie des MAPK très exprimée dans les cellules immunitaires et ayant plutôt un rôle anti-inflammatoire via la production d'IL-10 (Reyskens and Arthur, 2016; Cohen, 2009). Dans un contexte d'échappement de la tumeur à la surveillance du système immunitaire, la production d'IL-10 est un facteur de mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer colorectal (Li *et al.*, 2019). C'est pourquoi son inhibition pourrait avoir des effets bénéfiques. La kinase ROCK-II, quant à elle, est associée à un phénotype invasif dans le cancer colorectal, via l'activation des métalloprotéases MMP-2 et MMP-13 (Vishnubhotla *et al.*, 2007). Sebbagh et collaborateurs montrent que le Granzyme B est capable d'induire le clivage direct de ROCK-II, ce qui engendre la mort des cellules cancéreuses de manière caspase-indépendante. Cela a l'avantage de surmonter l'activité déficiente des caspases que l'on retrouve souvent dans les cellules cancéreuses (Sebbagh *et al.*, 2005). Or, non seulement le H89 est connu pour inhiber cette kinase, mais dans notre étude nous montrons aussi sa capacité à induire la production de Granzyme B par les LT CD8⁺ en augmentant leur cytotoxicité. Ces données sont donc en faveur d'une activité stimulant le système immunitaire induite par le H89.

Autres perspectives de travail

Au cours de notre étude nous avons effectué une analyse RNAseq sur des PBMCs de donneurs sains, traitées *in vitro* avec le H89. Les résultats de l'analyse montrent que la molécule est capable de moduler plusieurs gènes impliqués dans la réponse immunitaire antitumorale (résultats non montrés). Par exemple, le H89 est capable d'augmenter l'expression de l'IL-5RA chez tous les donneurs, et active des voies de signalisation stimulant la réponse immunitaire médiée par les LT CD8⁺. Le récepteur IL-5RA est exprimé par les LB activés, et la cytokine IL-5 est sécrétée en grande partie par les LT (Takatsu, 2011). Cette cytokine est donc importante pour la mise en place de la réponse humorale et son blocage diminue l'inflammation dans certaines maladies chroniques comme l'asthme (Lalani, Simmons and Ahmed, 1999). Dans un contexte lié à la réponse immunitaire antitumorale, la stimulation de la production d'anticorps par les cellules B est bénéfique à l'éradication de la tumeur (Sharonov *et al.*, 2020). De plus, une étude effectuée par Ikutani et collaborateurs montre que l'IL-5 produite par les cellules de l'immunité innée induit le recrutement des éosinophiles dans les poumons, ce qui diminue le développement de métastases (Ikutani *et al.*, 2012). Le H89 se montre également capable de diminuer l'expression du récepteur CD163. Il a été montré que ce récepteur est fortement exprimé dans les MAT et son blocage est intéressant en thérapie anti-cancéreuse (Skytthe, Graversen and Moestrup, 2020). Etant donné la modulation du H89 sur l'expression de gènes impliqués dans la réponse contre la tumeur dans les cellules humaines, il serait intéressant de mieux étudier l'impact du H89 sur ces cellules.

Une autre perspective de travail repose sur la structure de la molécule H89. En effet, cet inhibiteur de kinases possède également une fonction sulfamide, qui est connue pour ses propriétés antimicrobiennes et antifongiques, étant au cœur d'une famille d'antibiotiques : les antibiotiques sulfamidés (Ricken *et al.*, 2015). Un travail effectué par des collaborateurs a mis en évidence la capacité du H89 à réduire l'inflammation intestinale, via l'élimination du champignon opportuniste *Candida albicans*. De plus, le H89 diminue la croissance des souches bactériennes *Escherichia coli* et *Enterococcus faecalis* et stimule la croissance des souches de *Lactobacillus johnsonii*, ce qui module la composition du microbiote intestinal des animaux (Dumortier *et al.*, 2020). Le rôle du microbiote intestinal dans la réponse des patients à l'immunothérapie est maintenant bien établi (Elkrief *et al.*, 2019). L'espèce bactérienne *Lactobacillus johnsonii*, dont la prolifération est stimulée par le H89, augmente la réponse aux

inhibiteurs des PCIs chez la souris (Mager *et al.*, 2020). Nous avons effectué une expérience préliminaire de suivi de croissance tumorale chez la souris BALB/c porteuse de tumeurs CT26, en traitant avec le H89 en présence ou en absence d'antibiotiques. Le but était celui de détruire la flore bactérienne intestinale et évaluer si l'effet antitumoral du H89 pouvait en être impacté. Nous avons observé qu'en présence d'antibiotiques le H89 perd son potentiel antitumoral, ce qui suggère que la molécule pourrait agir au niveau du microbiote (résultats non montrés). Bien que ces résultats restent préliminaires, la relation entre H89 et modulation du microbiote intestinale pourrait constituer une perspective de travail intéressante.

Globalement, nos résultats montrent que le H89 semble avoir une action activatrice sur les cellules de l'immunité adaptative, induisant l'augmentation du recrutement des cellules à activité antitumorale au sein de la tumeur *in vivo*, ainsi que leur activation *in vitro*. Il reste à approfondir le rôle des cellules NK, qui se montrent impliquées dans l'effet prophylactique du H89, mais nous n'avons pas encore de preuves d'une action directe de la molécule sur ces cellules *in vitro*. Tous les éléments de l'étude semblent donc prometteurs pour l'utilisation du H89 en immunothérapie. Par la suite, nous envisageons également de mieux comprendre le rôle du récepteur IL-15RA dans l'effet antitumoral du H89, afin d'approfondir nos connaissances sur son mode d'action.

PARTIE 2 : NOUVELLES STRATEGIES THERAPEUTIQUES DANS LE CANCER DU SEIN TRIPLE NEGATIF : ROLE DU GLYCERYL TRINITRATE DANS LA MODULATION DE LA VOIE DE LA CYTOKINE IL-6

PRESENTATION DE L'ARTICLE 2 : Publié dans le journal *International Journal of Molecular Sciences*, le 6 août 2021.

« Nitric Oxide-Releasing Drug Glycerol Trinitrate Targets JAK2/STAT3 Signaling, Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells »

Sarra Bouaouiche^{1,2*}, **Silvia Ghione**^{1,2*}, Randa Sghaier^{1,2}, Olivier Burgy³, Cindy Racœur^{1,2}, Valentin Derangère⁴, Ali Bettaieb^{1,2}, Stéphanie Plenchette^{1,2}

¹ Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France

² Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), EA7269, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

³ INSERM U1231, UFR Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche Comté, 21000 Dijon, France

⁴ Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon, France

*These authors contributed equally to the work.

1. LE CANCER DU SEIN

1.1 Epidémiologie et classification

Le cancer du sein est le sous-type de cancer le plus répandu chez la population féminine française, avec 58 500 nouveaux cas enregistrés en 2018 en France métropolitaine. Même si ce type de cancer reste le plus meurtrier chez la femme, sa mortalité diminue au fil des années et, si dépisté assez tôt, le pronostic reste globalement assez bon. En effet, le cancer du sein se développe en moyenne assez lentement en comparaison avec d'autres types de cancer, et sa survenue peut prendre plusieurs mois/années, donc un bon dépistage permet de détecter la maladie suffisamment tôt pour la traiter avec succès (taux de survie de 87%) (InVs). La classification TNM s'applique aussi au cancer du sein, mais une classification moléculaire est actuellement utilisée. Selon cette classification, le cancer du sein peut être divisé en cinq grands sous-types : le **luminal A**, le **luminal B**, le **Her2+**, le **normal like** et le **basal like** (Prat *et al.*, 2015). Les formes luminal A et B sont les plus fréquentes et se forment à partir des cellules épithéliales des canaux lactifères ou des lobules, du côté de la lumière, d'où leur nom. Le point commun entre ces deux sous-types est l'expression des récepteurs aux œstrogènes (RO), plus exprimés dans les cancers de type A par rapport aux B. Les récepteurs à la progestérone (RP) sont, quant à eux, présents dans le type A et absents dans le B (Gao and Swain, 2018; Ades *et al.*, 2014). Les trois autres sous-types n'expriment pas de RO. Les cancers Her2+ se caractérisent par une augmentation de l'onco-protéine Her2 (appartenant à la superfamille des récepteurs à l'EGF) à la surface des cellules cancéreuses, ce qui provoque une prolifération accrue des cellules tumorales (Figueroa-Magalhães *et al.*, 2014). Les deux derniers sous-types se ressemblent, car ne présentent pas de récepteurs hormonaux à la surface, ni de surexpression du récepteur Her2 (totalement absent dans les normal-like, peu présent dans les basal-like) (Prat and Perou, 2011). La grande différence entre les deux, repose sur l'origine des cellules tumorales. Dans les cas des normal-like, les cellules possèdent un profil génique dérivant des cellules mammaires normales et du tissu adipeux. Dans le sous-type basal-like les cellules cancéreuses ressemblent à celles de la membrane basale des canaux lactifères (Figure 15) (Roulot *et al.*, 2016). Enfin, le cancer du sein dit triple négatif est apparenté au sous-type basal-like et sera discuté de manière plus détaillée dans le paragraphe suivant.

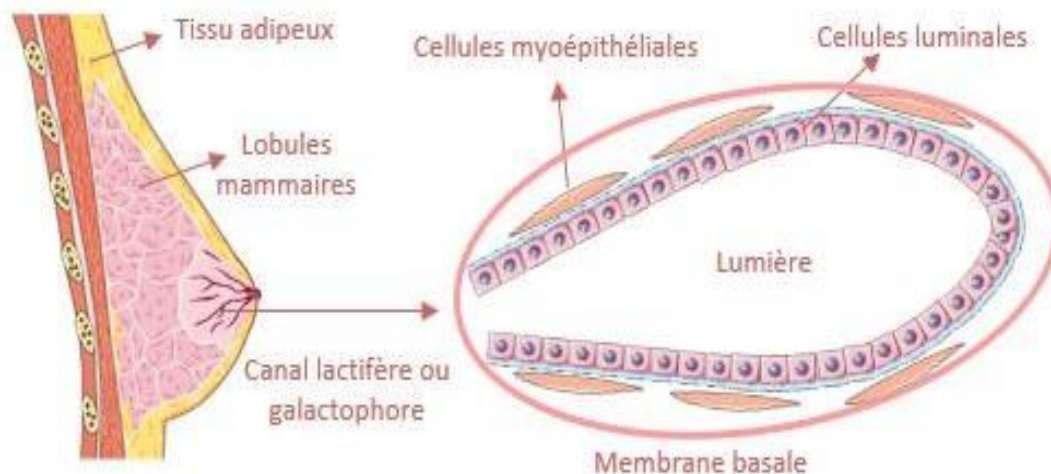


Figure 15. Schéma simplifié de l'anatomie du sein et du canal lactifère. Le canal lactifère, également connu sous le nom de canal galactophore, est une structure tubulaire qui fait partie d'un réseau ramifié, conduisant le lait aux glandes mammaires, par lesquelles il est excrété. Ces canaux sont constitués d'un épithélium de cellules dites luminales, qui donnent vers la lumière du canal, desquelles dérivent les cellules cancéreuses des sous-types luminal A et B. Les cellules luminales sont entourées de cellules myoépithéliales et d'une membrane basale. De cette dernière dérivent les cellules tumorales du type basal like. Les cellules tumorales du sous-type normal-like dérivent des cellules mammaires normales des lobules et du tissu adipeux situés en dehors des canaux galactophores.

1.2 Le cancer du sein triple négatif (CSTN)

1.2.1 Définition

Le CSTN est apparenté au sous-type basal-like, même si ces deux typologies de cancer restent distinctes. En effet, le CSTN présente une hétérogénéité intra-tumorale plus importante par rapport aux tumeurs basal-like. Ces tumeurs n'expriment généralement pas de RO, de RP et le Her2 (d'où leur nom triple négatif). Malgré cela, certains cancers triple négatifs expriment faiblement le récepteur Her2 et expriment également le récepteur à l'EGFR. Ce sous-type de cancer est très agressif et représente 10 à 20 % des cancers du sein métastatiques, avec une incidence majeure dans la population américaine et africaine, plutôt chez les femmes de moins de cinquante ans (Kumar and Aggarwal, 2016).

1.2.2 Traitement

Le traitement du CSTN reste plus difficile par rapport aux sous-types luminal et Her2+, d'une part à cause de son hétérogénéité, d'autre part parce que l'absence de RO, RP et Her2 rend impossible la thérapie ciblée (dans ce cas l'hormonothérapie), efficace chez d'autres sous-types de cancer. La première stratégie thérapeutique du CSTN repose sur l'exérèse chirurgicale. Dans le cas du cancer mammaire il y a deux types d'interventions chirurgicales, la chirurgie conservatrice et la chirurgie non conservatrice. La première consiste à éliminer seulement le tissu cancéreux (tumorectomie), dans le deuxième cas l'intégralité du sein porteur de la tumeur est enlevée (mastectomie) (Won and Spruck, 2020). Un traitement néo-adjuvant peut être mis en place avant la chirurgie, afin de réduire la taille de la tumeur avant l'acte. Les stratégies néo-adjuvantes peuvent faire appel à la radiothérapie ou à la chimiothérapie. La chimiothérapie n'est pas utilisée seulement en néo-adjuvant, mais aussi en adjuvant, soit après l'exérèse chirurgicale (Chaudhary, Wilkinson and Kong, 2018). La thérapie adjuvante est prescrite soit quand la tumeur est agressive, et donc pour écarter tout risque de récurrence même si la masse tumorale a été enlevée, mais aussi quand la tumeur est à un stade avancé avec présence de métastases et/ou invasion ganglionnaire (Al-Mahmood *et al.*, 2018).

1.2.2.1 La chimiothérapie systémique

Le CSTN est un sous-type de cancer du sein très agressif et la chimiothérapie adjuvante est mise systématiquement en place afin d'augmenter la chance de survie des patientes. Cependant, le taux de récurrence des patients sur 5 ans est nettement majeur comparé aux autres sous-types de cancer du sein. De plus, contrairement à d'autres sous-types de cancer du sein pour lesquels existent des thérapies ciblées efficaces (comme l'hormonothérapie par exemple), dans le CSTN la chimiothérapie systémique demeure la seule solution thérapeutique actuellement envisageable. La réponse des patients aux traitements est variable et il n'existe malheureusement aucun moyen fiable pour prédire l'efficacité de ces thérapies chez les patientes (Lebert *et al.*, 2018). Parmi les traitements de chimiothérapie classique du CSTN nous retrouvons des drogues qui appartiennent à la famille des taxanes, comme le paclitaxel (TAXOL®) et le docétaxel (TAXOTERE®), mais aussi la doxorubicine qui, quant à elle, appartient à la famille des anthracyclines. Ces traitements sont souvent associés

aux sels de platine, comme le cisplatine, le carboplatine et l'oxaliplatine (OXA) qui en augmentent l'efficacité.

Le paclitaxel est défini comme un « poison du fuseau mitotique », car il interfère avec la dépolymérisation de microtubules et, donc, avec la division cellulaire. Les cellules cancéreuses sont capables de se diviser de manière incontrôlée et ces drogues en atténuent la prolifération. Les taxanes, comme toutes les chimiothérapies systémiques, ne sont pas spécifiques des cellules tumorales et ont une toxicité sur les cellules saines, ce qui engendre des nombreux effets secondaires (Gajria, Seidman and Dang, 2010).

La doxorubicine appartient à la famille des anthracyclines, et est donc un agent intercalant de l'ADN qui s'insère entre deux paires de bases G-C avec formation de liaison hydrogène avec la guanine (Cutts *et al.*, 2005). De plus, cette molécule est capable d'interférer avec la topoisomérase II, enzyme impliquée dans le maintien de la structure 3D lors des mécanismes de transcription et réplication en « démêlant » les nœuds d'ADN, mais également dans la réparation de l'ADN en cas d'erreur. Avec la doxorubicine, les complexes brins d'ADN/topoisomérase II sont fixés de manière irréversible, et cela empêche la réplication de l'ADN ainsi que sa réparation avec comme résultat la mort par apoptose des cellules cancéreuses. Ces traitements ciblent très bien les cellules tumorales qui, à cause de leur réplication incontrôlée, surexpriment la topoisomérase II (Swift *et al.*, 2006). Mais, comme tous les traitements systémiques, des nombreux effets secondaires sont observés au niveau des cellules à haut taux prolifératif, comme les globules blancs. Pour cette raison, un important effet secondaire à ces traitements est le développement de leucémies. Pour cette raison, la recherche vise au développement de nouveaux inhibiteurs de topoisomérase II plus spécifiques, capables de créer des coupures ciblées sur des gènes impliquées dans le cancer, ce qui réduirait la toxicité au niveau des cellules saines (Carvalho *et al.*, 2009).

Les sels de platine comprennent des molécules telles que le cisplatine, le carboplatine et l'OXA (ce dernier a déjà été développé dans la section cancer colorectal, paragraphe 1.2.1). Leur mécanisme d'action est le même et fonctionnent comme des agents alkylants de l'ADN en se fixant sur les purines (A et G), ce qui engendre un changement de conformation locale qui a comme conséquence une inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN. Cela induit la mort des cellules cancéreuses mais, comme tous les autres traitements systémiques, on observe des effets secondaires non négligeables sur les cellules saines (Cutts *et al.*, 2005;

Oun, Moussa and Wheate, 2018). Les sels de platine, comme dit précédemment, ne sont pas utilisés seuls dans le traitement du CSTN, mais couplés aux taxanes ou à la doxorubicine pour en améliorer l'efficacité. Un essai clinique de Phase III en cours étudie l'efficacité du paclitaxel seul ou combiné au carboplatine chez des patientes atteintes de CSTN. Les résultats de cette étude sont encourageants et montrent que la combinaison des deux traitements est une alternative thérapeutique efficace (Yu *et al.*, 2020).

1.2.2.2 Autres stratégies thérapeutiques à l'essai

Le traitement par chimiothérapie reste la principale solution pour les patients atteints de CSTN, mais le développement de résistances est fréquent, avec rechute des patientes et diminution de la survie globale. Pour cela, d'autres thérapies ont été mise en place dans des nombreuses essais cliniques, afin d'améliorer la prise en charge des patients. Parmi les essais cliniques plus prometteurs nous retrouvons 1) **les inhibiteurs de Poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP)**, 2) **les inhibiteurs du VEGF**, 3) **les inhibiteurs de l'EGFR**, 4) **les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt**, 5) **les inhibiteurs des PCIs** et 6) **les anticorps conjugués à un agent cytotoxiques (ADC)**.

a. Les inhibiteurs de PARP

Les PARPs comprennent de nombreuses enzymes, avec PARP1 et 2 comme les formes les plus communes, qui sont impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN simple brin (phase de réplication). Les inhibiteurs de PARP sont donc en cours d'étude dans le CSTN. L'*iniparib*, un inhibiteur irréversible de PARP1, a été testé en clinique mais les résultats n'ont pas été à la hauteur des espoirs. Une étude clinique de Phase III a été complétée en 2020 (résultats non publiés) afin d'évaluer l'efficacité de la combinaison *veliparib* (un inhibiteur de PARP) en combinaison avec différentes chimiothérapies conventionnelles sur 634 patientes (Loibl *et al.*, 2018).

b. Les inhibiteurs du VEGF

La voie du VEGF est une cible de traitement intéressante dans le CSTN. Parmi les traitements disponibles pour bloquer cette voie de signalisation, nous retrouvons des anticorps monoclonaux ciblant le VEGF, comme le bevacizumab (Avastin®) (Sikov *et al.*, 2015). Malgré les nombreux essais cliniques avec le bevacizumab utilisé en combinaison avec des chimiothérapies, son utilisation a été bloquée par la FDA à cause de la trop forte toxicité de ce médicament pour le peu d'efficacité prouvée (Proposal To Withdraw Approval for the Breast Cancer Indication for Bevacizumab, FDA-2010-N-0621). Pour cela, les inhibiteurs de tyrosine kinases ciblant plutôt de récepteur au VEGF (VEGFR) sont également en cours d'étude. Une étude clinique de Phase II montre des résultats prometteurs dans la combinaison du sorafenib, inhibiteur de VEGFR, avec le cisplatine et le paclitaxel (ClinicalTrials.gov NCT01194869).

c. Les inhibiteurs de l'EGFR

Beaucoup de patientes atteintes de CSTN surexpriment le récepteur à l'EGF (EGFR), ce qui est de mauvais pronostic pour la progression de la maladie. Pour cela, l'EGFR est une cible intéressante dans ce type de cancer (Shen *et al.*, 2019). L'anticorps monoclonal cetuximab a montré des résultats prometteurs si combiné au cisplatine (Shamseddine and Farhat, 2011) (Figure 16). Comme dans le cas du VEGF, non seulement des anticorps monoclonaux mais également des inhibiteurs chimiques de kinases sont actuellement en cours d'étude.

d. Les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est une voie de prolifération cellulaire souvent suractivée dans le cancer, et particulièrement dans le CSTN. Diverses molécules ciblent donc cette voie, aussi bien au niveau de l'inhibition de PI3K, en amont, que d'Akt et mTOR, en aval. Plusieurs essais cliniques actuellement en cours testent la combinaison de ces inhibiteurs avec des chimiothérapies conventionnelles, la plupart sont en Phase I ou II et ont des résultats prometteurs (Figure 16) (Costa, Han and Gradishar, 2018).

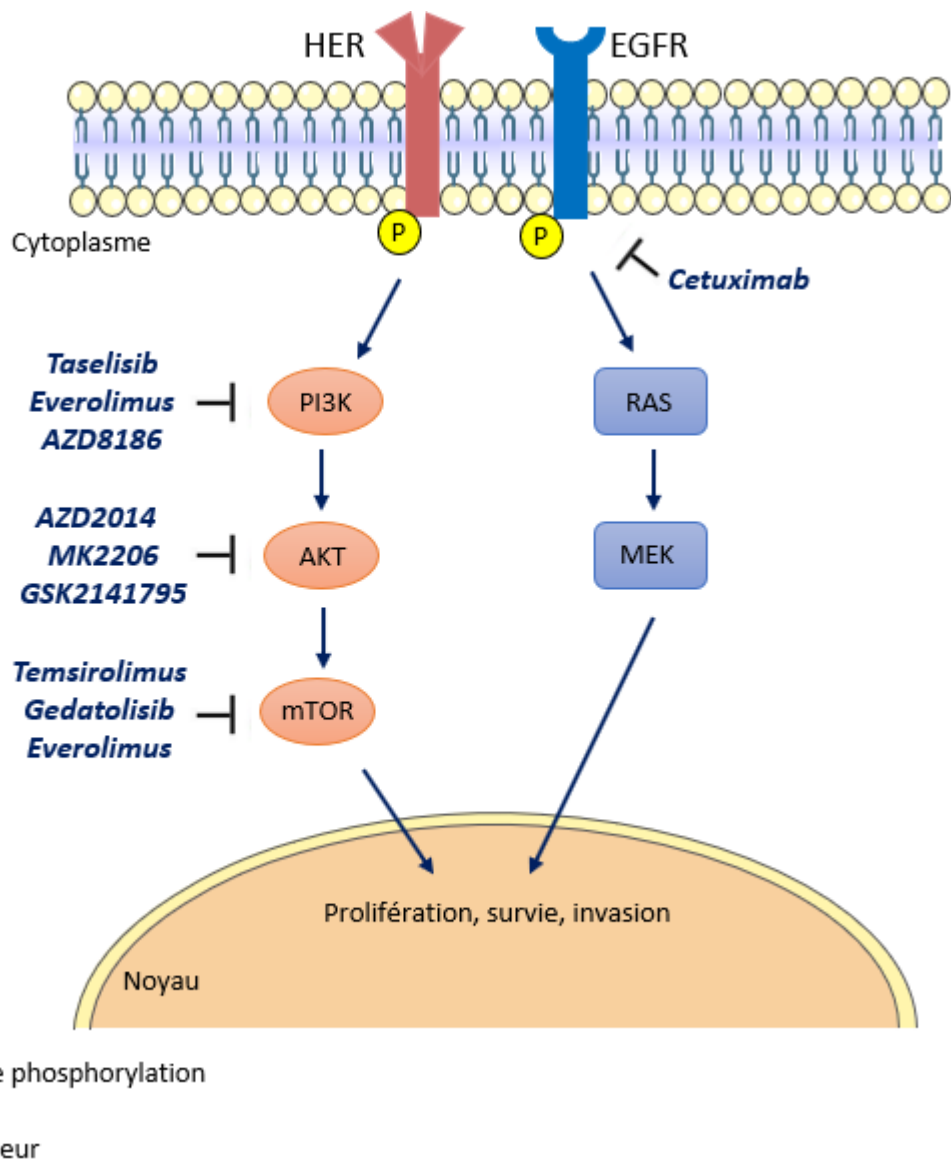


Figure 16. Inhibiteurs de la voie PI3K/AKT et de l'EGFR dans le CSTN. Schéma récapitulatif des principaux inhibiteurs en cours d'évaluation pour le traitement du CSTN. Les inhibiteurs de la voie PI3K/Akt/mTOR ciblent ces protéines, en aval du récepteur. Dans le cas de l'EGFR l'inhibiteur utilisé de manière plus courante est le cetuximab, ciblant directement le récepteur en inhibant son activité tyrosine kinase. (Schéma modifié d'après (Costa, Han and Gradishar, 2018).

e. Les « Antibody-Drug Conjugate » ou ADC

Les ADC ce sont des anticorps conjugués à un agent cytotoxique, qui permettent de cibler de manière spécifique les cellules cancéreuses. Actuellement un seul anticorps est approuvé par la FDA et utilisé dans le traitement du cancer du sein Her2+, l'ado-trastuzumab emtansine (T-DMI) (von Minckwitz *et al.*, 2019). En ce qui concerne le CSTN rien n'est encore mis sur le marché, mais une étude clinique prometteuse de Phase II est actuellement en cours pour le sacituzimab govitecan (appelé IMMU-132, délivrant le SN-38, un composé toxique dérivant du métabolisme de l'irinotecan et inhibiteur de la Topo-I) chez des patientes métastatiques PD-L1 négatives (ClinicalTrials.gov NCT04468061).

La recherche de nouvelles stratégies thérapeutique reste, donc, un défi de taille pour le traitement de ce type de cancer du sein très agressif. Nombreuses sont les voies de signalisation au sein des tumeurs qui peuvent être ciblées en thérapie anti-cancéreuse, et dans ce projet nous nous sommes particulièrement intéressés à celle de la cytokine pro-inflammatoire IL-6.

2. LA VOIE DE LA CYTOKINE IL-6

La réponse inflammatoire joue un rôle très important dans le développement du cancer, aussi bien pour l'initiation de la tumeur, que pour sa progression et la formation de métastases. Pour cela, les cytokines sont des médiateurs essentiels, faisant le lien entre l'inflammation et le développement tumoral, et sont donc des cibles d'intérêt en thérapie anti-cancéreuse. Parmi les cytokines pro-inflammatoires présentes dans le MET, l'IL-6 fait partie des plus exprimées et des plus étudiées (Taniguchi and Karin, 2014).

2.1 La cytokine IL-6 et son récepteur

La cytokine IL-6 est un polypeptide glycosylé d'environ 185 acides aminés, avec un poids moléculaire compris entre 25 et 30 kDa, selon les glycosylations. Elle est également phosphorylable au niveau des résidus de sérine, mais cette modification post-traductionnelle n'a pas d'impact sur son activité biologique (Scheller *et al.*, 2011). Cette cytokine est un important médiateur inflammatoire très présent dans le MET. Les sources les plus importantes d'IL-6 dans le MET sont aussi bien les cellules cancéreuses elles-mêmes, mais également les

cellules immunitaires infiltrant la tumeur, comme les TAMs, les LT CD4⁺, les MDSCs, les granulocytes, et les cellules non immunitaires du MET comme les fibroblastes (CAFs, de Cancer-Associated Fibroblasts) et les adipocytes (Bode *et al.*, 1999; Nagasaki *et al.*, 2014; Oh *et al.*, 2013). Dans le MET, l'IL-6 stimule le développement tumoral soit en agissant directement sur les cellules cancéreuses, soit en agissant sur les cellules stromales environnantes qui indirectement stimulent leur croissance (Fisher, Appenheimer and Evans, 2014). La stimulation de la croissance tumorale médiée par l'IL-6 peut se faire aussi bien de manière autocrine que paracrine (Lederle *et al.*, 2011). L'activation classique de la voie de signalisation de l'IL-6 se fait via la liaison de la cytokine avec son récepteur membranaire IL-6R α , aussi connu sous le nom de gp80 ou CD126. Deux monomères d'IL-6R α , chacun lié à une molécule d'IL-6, s'associent pour former un homodimère induisant le recrutement de récepteur IL-6R β (gp130 ou CD130). En effet, les récepteurs IL-6R α à eux seuls ne peuvent pas induire la transduction du signal, et les récepteurs IL-6R β sont indispensables afin de recruter dans le cytoplasme différentes protéines de signalisation, comme les JAKs (Janus kinase) et les STATs (Signal transducer and activator of transcription) (Heinrich *et al.*, 2003). Le complexe IL-6/IL-6R α /IL-6R β est donc indispensable à l'activation de la voie de signalisation. Mais le récepteur IL-6R α possède aussi une forme soluble (sIL-6R α), dérivée d'épissage alternatif ou du clivage de la forme membranaire par les métalloprotéases. Le sIL-6R α peut également lier l'IL-6 présente dans le microenvironnement et se rapprocher de la membrane cellulaire, induisant le recrutement des récepteurs IL-6R β pour la transduction du signal. Cette voie est connue sous le nom de voie de trans-signalisation de l'IL-6, très utilisée par les cellules cancéreuses dans le MET (Figure 17) (Hunter and Jones, 2015).

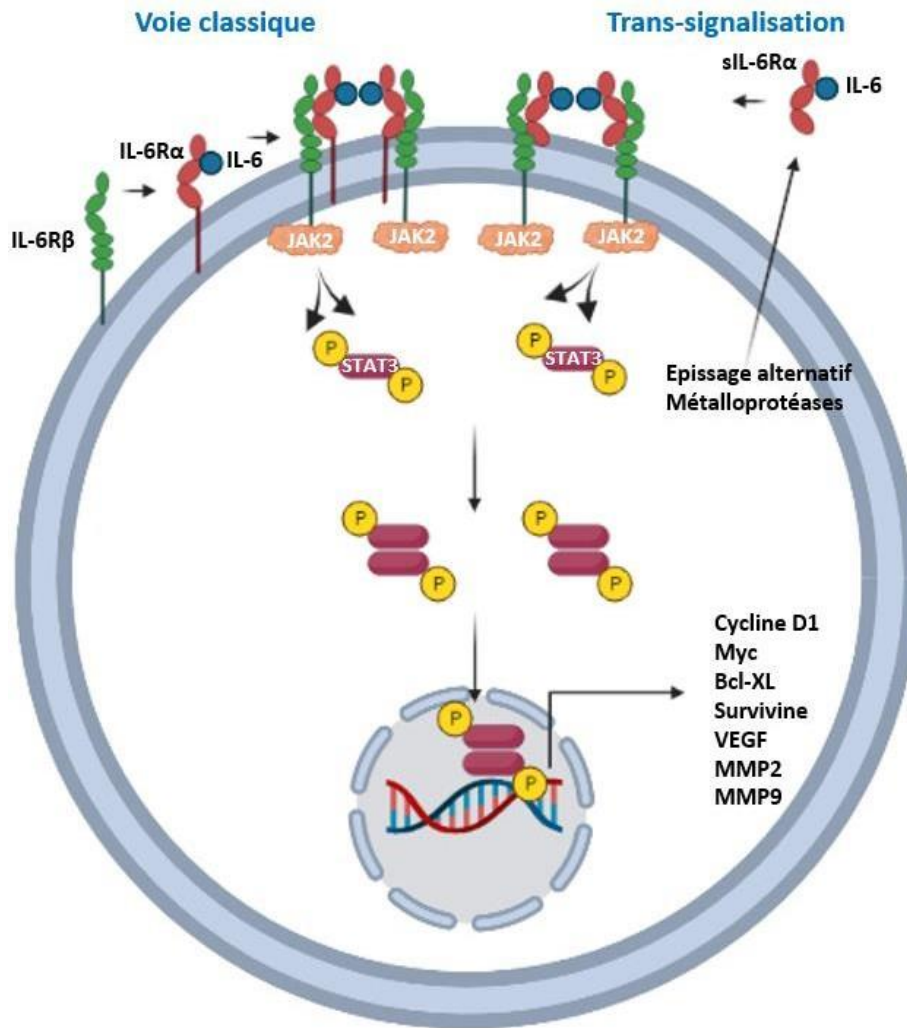


Figure 17. Activation de la voie de l'IL-6. La cytokine IL-6 présente dans le microenvironnement tumoral se lie au récepteur membranaire IL-6R α , induisant le recrutement du récepteur IL-6R β . Cela induit la formation d'un hétérotétramère composé de deux récepteurs IL-6R α liant deux molécules d'IL-6, plus deux récepteurs IL-6R β , qui sont indispensables à la transduction du signal. Cela constitue ce que l'on appelle la voie classique de l'IL-6, à droite du schéma. Le récepteur IL-6R α possède également une forme soluble, le sIL-6R α , liant l'IL-6 pour former une structure hétéro-tétramérique comme dans la voie classique, composée de deux récepteurs sIL-6R α , recrutant deux récepteurs IL-6R β et induisant la transduction du signal par celle que l'on appelle la voie de trans-signalisation. Les deux voies induisent le recrutement de la kinase JAK2, qui se fait grâce aux domaines cytoplasmiques du récepteur IL-6R β . Après son recrutement, JAK2 phosphoryle le domaine intracellulaire d'IL-6R β , ce qui permet le recrutement de STAT3. JAK2 phosphoryle ensuite STAT3 (Tyr 705), ce qui induit sa dimérisation et son action en tant que facteur de transcription. Une fois dans le noyau, le dimère STAT3 active la transcription de gènes de prolifération (cycline D1, Myc), survie (Bcl-XL, survivine), angiogenèse (VEGF) et migration/invasion (MMP2, MMP9). Schéma réalisé avec le logiciel BioRender.

2.2 La voie IL-6/JAK2/STAT3

2.2.1 Les protéines JAK2 et STAT3

La protéine JAK2 est une tyrosine kinase faisant partie d'une famille de protéines, les JAKs. Cette famille inclut JAK1, JAK2, JAK3 et TYK2 (tyrosine kinase 2) : JAK1, JAK2 et TYK2 sont présentes dans tous les types cellulaires, alors que JAK3 est propre seulement aux cellules lymphoïdes et myéloïdes (Babon *et al.*, 2014). La structure de la protéine JAK2, de N à C-terminal, comporte un domaine FERM, suivi par un domaine SH2 (Src homology), permettant l'association de JAK2 avec le domaine intracellulaire des récepteurs comme IL-6R β . Après le domaine SH2, au niveau de la partie C-terminale, suivent les domaines JH2 (Jak homology) et JH1 (Figure 18) (Saharinen, Takaluoma and Silvennoinen, 2000; Ungureanu *et al.*, 2011). Le domaine JH2 est défini comme pseudokinase, n'ayant pas une activité catalytique directe, mais induisant l'activité kinase exercée par le domaine JH1 (Silvennoinen *et al.*, 2013).

La protéine STAT3 fait aussi partie d'une famille de sept protéines, avec STAT1, STAT2, STAT4, STAT5a, STAT5b et STAT6. Elle possède trois domaines importants pour son activation et son activité transcriptionnelle : le domaine de liaison à l'ADN, le domaine SH2 et le domaine C-terminal de transactivation (Figure 18). Le domaine de liaison à l'ADN se situe entre les acides aminés 320 et 480 et permet l'activation de STAT3 avec l'ADN suite à sa dimérisation. Le domaine SH2 permet la liaison avec les tyrosines phosphorylées des protéines mais également sa dimérisation et, par conséquent, le transfert au noyau. Le domaine C-terminal de transactivation contient la Tyr 705, qui est phosphorylée par JAK2 et qui induit la dimérisation de STAT3. Ce domaine est également important dans la liaison à l'ADN (Ma *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2000).

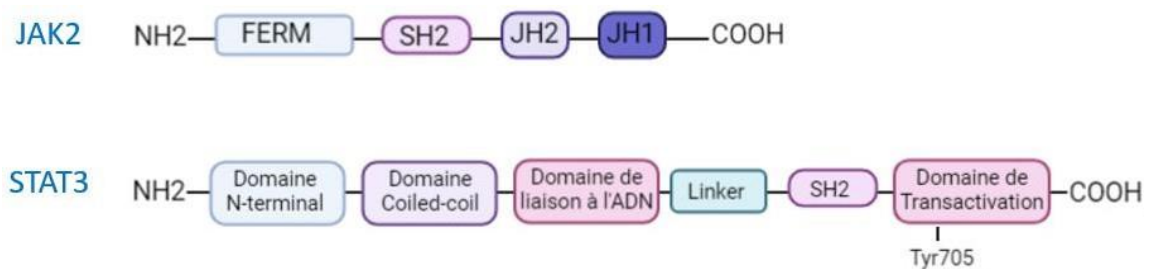


Figure 18. Les domaines des protéines JAK2 et STAT3. La protéine JAK2 est constituée de 4 domaines, de N-terminal à C-terminal : FERM, SH2, JH2 et JH1. Le domaine SH2 est indispensable pour le recrutement et l'association de JAK2 aux récepteurs tyrosine kinase membranaires induisant la transduction du signal. Le domaine JH2 n'a pas d'activité catalytique, est défini comme pseudokinase : il induit l'activité catalytique du domaine JH1, celui qui exerce l'activité tyrosine kinase sur les protéines cible. La protéine STAT3 est constituée de plusieurs domaines, dont les plus importants sont essentiellement : le domaine de liaison à l'ADN, le domaine SH2 et le domaine de transactivation. Ces domaines interviennent aussi bien dans la stabilisation du dimère STAT3, ainsi que sa translocation au niveau du noyau et son activité transcriptionnelle via sa liaison aux acides nucléiques. Schéma réalisé avec BioRender.

2.2.2 L'activation de la voie

La liaison de l'IL-6 avec les récepteurs IL-6R α (membranaire ou soluble) et IL-6R β induit la formation d'un hexamère conduisant au recrutement et à l'activation de la protéine JAK2, qui s'associe aux domaines transmembranaires des récepteurs IL-6R β . Une fois activée, JAK2 phosphoryle plusieurs sites au niveau du domaine cytoplasmique d'IL-6R β , ce qui permet le recrutement de STAT3. JAK2 phosphoryle ensuite STAT3 au niveau de la Tyr 705, qui se dimérise et agit comme FT, au niveau du noyau cellulaire (Figure 17) (Looyenga *et al.*, 2012). La translocation du dimère de STAT3 vers le noyau induit l'expression de différentes protéines et FT impliqués dans la prolifération des cellules cancéreuses (comme la cycline D et Myc), dans leur survie (comme Bcl-XL et la survivine), dans l'angiogenèse (VEGF) ou encore la migration et l'invasion (MMP2/MMP9)(Nicolas *et al.*, 2012).

2.3 Les inhibiteurs de la voie JAK/STAT en thérapie anti-cancéreuse

La voie de la cytokine IL-6 est très importante dans le développement tumoral et l'axe IL-6/JAK2/STAT3 constitue une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de plusieurs types de cancer. Différentes stratégies thérapeutiques sont actuellement disponibles, ou en essai clinique, ciblant ces voies et se regroupent essentiellement en trois catégories : les **inhibiteurs de l'IL-6 ou de son récepteur IL-6R**, les **inhibiteurs de JAK2** et les **inhibiteurs de STAT3** (Garbers *et al.*, 2018).

2.3.1 Les inhibiteurs de l'IL-6 et son récepteur

La cytokine IL-6 peut se lier au récepteur IL-6R α , membranaire ou soluble, via un site spécifique appelé le site I. Ce site est la cible de deux médicaments, le siltuximab et le clazakizumab (Garbers *et al.*, 2018). Le siltuximab est un anticorps monoclonal chimérique (homme-souris), approuvé pour le traitement de la maladie de Castelman (lymphome non hodgkinien malin à cellules B) (van Rhee *et al.*, 2014), mais qui a également fait ses preuves dans plusieurs essais cliniques dans le cancer de la prostate, le cancer du poumon et le cancer de l'ovaire (Guo *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2014; Cavarretta *et al.*, 2008). Le clazakizumab, quant à lui, est un anticorps monoclonal humanisé utilisé dans le traitement du cancer du poumon non à petites cellules et les cancers de la tête et du cou (Bayliss *et al.*, 2011). Ces deux médicaments n'ont pas encore été testés dans le traitement du cancer du sein (Masjedi *et al.*, 2018). Même si le blocage de la cytokine s'est montré efficace dans le traitement de certains cancers, les effets secondaires liés à l'accumulation du complexe IL-6/anticorps sont nombreux (Lu *et al.*, 1992). Pour cela, une stratégie alternative voit le blocage du récepteur, l'IL-6R. Le tocilizumab est un anticorps monoclonal humanisé ciblant aussi bien la forme membranaire que la forme soluble du récepteur IL-6R α , qui a montré son efficacité dans le traitement du cancer rénal, du cancer du poumon et du cancer du sein (Jiang *et al.*, 2011; Nagasaki *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018a). Hormis les anticorps, d'autres petites molécules chimiques inhibant les récepteurs et leur association sont étudiées *in vitro* et *in vivo*. Par exemple, le SANT-7, un super-antagoniste de l'IL-6, a montré son efficacité *in vitro* et *in vivo* dans le myélome (Hönemann *et al.*, 2001). Deux antagonistes de l'IL-6R, l'ERBF et l'ERBA ont été testés *in vitro* sur plusieurs lignées cancéreuses, mais leur efficacité *in vivo* reste actuellement peu connue (Hönemann *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 2002; Enomoto *et al.*, 2004).

2.3.2 Les inhibiteurs de JAK2

Une autre stratégie dans le blocage de la voie de signalisation, consiste à inhiber la kinase JAK2 initiatrice de la cascade de signalisation induisant la prolifération et l'invasion des cellules tumorales. Les inhibiteurs de JAK2 peuvent être spécifiques, qui ciblent de manière précise la kinase ou les membres de la même famille, ou aspécifiques. Le ruxolitinib est un inhibiteur de kinases synthétique qui cible spécifiquement JAK1 et JAK2, faisant l'objet d'essais cliniques de Phase I et II pour le traitement de la leucémie myéloïde (Assi *et al.*, 2018; Pemmaraju *et al.*, 2015). D'autres inhibiteurs synthétiques spécifiques ont montré leur efficacité *in vitro* et *in vivo*. Le TG101209, par exemple, induit l'apoptose des cellules cancéreuses et diminue la croissance tumorale dans un modèle de cancer du poumon (Sun *et al.*, 2011). Une autre molécule ciblant spécifiquement JAK2 et JAK3 a récemment été identifiée, le composé NSC13626, qui diminue le développement des cellules cancéreuses coliques en diminuant la phosphorylation de STAT3 (Lin *et al.*, 2018). Parmi les inhibiteurs aspécifiques, nous retrouvons le sorafenib, plus connu comme inhibiteur de VEGFR mais qui inhibe également la kinase JAK2 en montrant son efficacité *in vitro* dans l'inhibition de la prolifération cellulaire dans le glioblastome (Yang *et al.*, 2010).

2.3.3 Les inhibiteurs de STAT3

L'inhibition de la voie IL-6/JAK2/STAT3 peut également se faire via le blocage de la phosphorylation du FT STAT3. Or, le blocage de STAT3 reste plus compliqué du fait de sa localisation cellulaire, ce qui exclut les anticorps et impose l'utilisation de molécules très perméables (Miklossy, Hilliard and Turkson, 2013). Actuellement les inhibiteurs de STAT3 sont peu testés en clinique. La molécule STA-21 a fait l'objets d'études cliniques de Phase I et II dans le traitement du psoriasis, mais pas dans le traitement du cancer où son efficacité a été testée *in vitro* dans le sarcome (Miklossy, Hilliard and Turkson, 2013; Chen *et al.*, 2007). Des petites molécules inhibitrices ciblant le domaine SH2 de STAT3 sont l'OPB-31121 et l'OPB-51602. Le premier montre une activité antitumorale *in vitro* sur les cellules tumorales gastriques et a également fait l'objet d'un essai clinique de Phase I sur différentes tumeurs solides avec des résultats prometteurs (Kim *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2015). L'OPB-51602 a fait ses preuves dans une étude clinique de Phase I chez les patients atteints de leucémie myéloïde aigüe ou myélome (Ogura *et al.*, 2015). Une autre stratégie d'inhibition de STAT3 se base sur

le développement de siRNA (small interfering RNA). Une approche dans ce genre a récemment eu l'approbation de la FDA pour le démarrage d'une étude clinique de Phase I dans le lymphome diffus à cellules B (Kortylewski and Moreira, 2017). D'autres molécules ont été testée *in vitro* et *in vivo* en se montrant efficaces dans le traitement du cancer du sein, comme la molécule S31-201 (Yue and Turkson, 2009).

Malgré les nombreuses avancées dans le blocage de la voie IL-6/JAK2/STAT3 en thérapie anti-cancéreuse, ces traitements ne sont pas utilisés en clinique dans le traitement du cancer du sein. Pour cela, la recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant la voie de l'IL-6 s'avère intéressante dans le traitement de ce type de cancer. Nous nous intéressons particulièrement au potentiel antitumoral du monoxyde d'azote (NO) libéré par un médicament donneur de NO, le glyceryl trinitrate (GTN). Le GTN a déjà fait l'objet de plusieurs essais cliniques, notamment chez les patients atteints de cancer du poumon non à petites cellules et de la prostate. Ainsi, nous avons poursuivi l'étude des mécanismes à l'origine de son activité antitumorale, plus particulièrement dans le CSTN.

3. LE MONOXYDE D'AZOTE (NO•) ET SON POTENTIEL ANTI-CANCEREUX

3.1 Généralités

Le NO est une petite molécule gazeuse radicalaire (NO•), non chargée, hautement réactive et lipophile. Ces caractéristiques lui permettent de traverser facilement la membrane plasmique des cellules, ainsi que les membranes des organelles intracellulaires afin d'exercer ses fonctions biologiques (Holotiuk *et al.*, 2019). La production de NO• dépend d'une famille d'enzymes, les NO• synthases (NOS) (Bredt, 1999). Trois NOS sont responsables de cette synthèse : la NOS neuronale (nNOS ou NOS1), la NOS endothéliale (eNOS ou NOS3) et la NOS inducible (iNOS ou NOS2) (Alderton, Cooper and Knowles, 2001). La nNOS et la eNOS sont exprimées de manière constitutive, et leur activité dépend d'une forte concentration en ions calcium (Ca²⁺), tandis que l'activité de la iNOS est indépendante du Ca²⁺ et son expression est inducible en réponse à l'inflammation et aux infections. Contrairement à la nNOS et l'eNOS, l'activation de la iNOS génère des fortes concentrations en NO• (de l'ordre du micromolaire) et elle est exprimée principalement dans certaines cellules impliquées dans la réponse inflammatoire, telles que les monocytes, les macrophages de type M1, les neutrophiles, mais

également d'autres cellules comme les cellules gliales, endothéliales, épithéliales et les hépatocytes (Alderton, Cooper and Knowles, 2001; Switzer *et al.*, 2012b; Litvinova *et al.*, 2015). Toutes ces enzymes se localisent au niveau du cytosol ou du noyau, mais récemment une nouvelle NOS a été mise en évidence, la mNOS avec localisation dans la mitochondrie et qui pourrait avoir un rôle important dans son fonctionnement (Kamm *et al.*, 2019). La production de NO \cdot catalysée par les NOS est définie comme étant endogène. Ces enzymes catalysent la production de NO \cdot à partir de la L-Arginine en présence d'oxygène (O $_2$) et de cofacteurs tels que NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate), FAD (Flavine Adénine Dinucléotide), FMN (Flavine Mono Nucléotide), BH $_4$ (Tetrahydrobioptine) et calmoduline +/- Ca $^{2+}$. La L-Arginine est ainsi convertie en L-Citrulline + NO (Kamm *et al.*, 2019). Une fois libéré dans la cellule, le NO \cdot agit à différents niveaux (lipides, ADN, protéines) afin de réguler des processus physiologiques ou pathologiques, comme dans le cas du cancer. Mais la production de NO \cdot ne se limite pas aux sources endogènes, car cela dérive aussi de la réduction de nitrites (NO $_2^-$) et des nitrates (NO $_3^-$) apportés aux cellules par des sources exogènes, par exemple via l'alimentation ou via des molécules appelées « donneurs de NO \cdot » (Kamm *et al.*, 2019).

3.2 Les donneurs de NO \cdot

En raison de la nature hautement réactive du NO \cdot , il est difficile de prédire ses effets biologiques sur un système donné. Ainsi, les donneurs de NO \cdot capables d'assurer une libération prolongée sont devenus des outils indispensables dans l'étude de propriétés biologiques du NO \cdot (Huerta, Chilka and Bonavida, 2008). Ces molécules se différencient essentiellement par la façon dont laquelle le NO \cdot est libéré dans la cellule. Nous retrouvons ainsi trois grands groupes de composés, 1) les molécules libérant du NO \cdot de manière spontanée, c'est-à-dire les nitrosothiols, 2) les molécules libérant du NO \cdot suite à une réaction chimique non enzymatique avec des acides, des bases, des métaux ou les thiols, 3) les molécules nécessitant l'action d'une enzyme (Alimoradi *et al.*, 2019). Parmi le dernier groupe, les nitrates organiques, des esters d'alcools à base d'acide nitrique (RONO $_2$), sont les plus anciens et les plus utilisés (Münzel, Steven and Daiber, 2014). Un des nitrates organiques couramment utilisés est le glyceryl trinitrate (GTN), couramment employé comme agent thérapeutique vasodilatateur dans le traitement de l'angine de la poitrine (Parker and Parker,

1998). Le GTN est une prodrogue, qui nécessite une action enzymatique afin de libérer le NO[•]. L'enzyme responsable de la libération de NO[•] à partir du GTN est l'aldéhyde déshydrogénase de type 2 (ALDH2) mitochondriale, via une réaction d'oxydoréduction donnant du 1,2-glyceryl dinitrate (GDN) plus NO₂⁻ ou directement du NO[•] (GTN + ALDH2_{red} → 1,2-GDN + NO₂⁻ + ALDH2_{ox}) (Klemenska and Beresewicz, 2009; Chen, Zhang and Stamler, 2002). L'utilisation du GTN en thérapie anti-cancéreuse est de plus en plus fréquente, et sera discutée plus en détail dans le paragraphe 3.3.1.3.

3.3 Le rôle du NO[•] dans le cancer

Le rôle du NO[•] dans de nombreux processus physiologiques est actuellement bien décrit. Le NO[•] agit comme vasodilatateur, mais il est également responsable de processus neurologiques comme la neurotransmission et la mémoire, et également dans la réponse immunitaire anti-inflammatoire (recrutement et activation des macrophages sur le site infectieux, extravasation des leucocytes et agrégation plaquettaire) (Blaise *et al.*, 2005; Maher, Abdel Rahman and Gad, 2017; Holotiuk *et al.*, 2019). Mais le NO[•] est également impliqué dans certaines situations pathologiques, comme l'hypertension, les accidents vasculaires cérébraux, l'asthme, la maladie d'Alzheimer et le cancer (Fischer *et al.*, 2002; Keshet and Erez, 2018; Maher, Abdel Rahman and Gad, 2017; Torre, Pugliese and Speranza, 2002). Le rôle du NO[•] dans le cancer est ambivalent, car il est décrit comme étant aussi bien protumoral qu'antitumoral, avec une ambivalence dépendante de nombreux facteurs, incluant 1) sa concentration, 2) son origine, 3) la durée d'exposition, 4) le type cellulaire et sa sensibilité au NO[•] et 5) le statut redox de la cellule (Dimmeler *et al.*, 1997; Fukumura *et al.*, 2001; Huerta-Yepez *et al.*, 2009; Jeannin *et al.*, 2008; Millet *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2014). Des faibles concentrations en NO[•] ont un effet plutôt protumoral, contribuant à la prolifération et la migration des cellules cancéreuses, tandis que des fortes concentrations induisent la mort cellulaire par apoptose (Wink *et al.*, 1991).

Les effets biologiques du NO[•] dépendent de deux types de signalisation cellulaire : la signalisation canonique, et la signalisation non canonique. La première implique l'enzyme guanylate cyclase cytosolique soluble (sGC), une protéine dimérique constituée de deux sous-unités, chacune présentant un groupement hème capable de lier le NO[•]. La liaison du NO[•] avec les groupements hème de la sGC induit l'activation de l'enzyme, qui catalyse la

production de GMP cyclique (cGMP, cyclic Guanosine Mono Phosphate) à partir du GTP (Guanosine Triphosphate), induisant l'activation de plusieurs kinases cellulaires impliquées dans différentes voies de signalisation (Gow *et al.*, 2004; Murad, 2006; Martínez-Ruiz and Lamas, 2009). La voie non canonique implique différents mécanismes indépendants de la sGC et du GMPc, soit la capacité du NO[•] à interagir avec d'autres molécules comme l'O₂ et ses espèces radicalaires (ion superoxyde O₂^{•-}), le glutathion (GSH) et les résidus de cystéine et tyrosine des protéines (Martínez-Ruiz and Lamas, 2009). L'interaction du NO[•] avec les résidus de cystéine et tyrosine induit la modification post-traductionnelle des protéines, comme la S-nitrosylation et la nitration, ce qui modifie leur activité biologique. De nombreuses protéines sont modifiées par le NO[•], et cela a un rôle important dans le cancer (Holotiuk *et al.*, 2019).

3.3.1 Les modifications post-traductionnelles induites par le NO[•] dans le cancer

3.3.1.1 La nitration

La nitration est une modification post-traductionnelle consistant à lier de manière covalente un groupement NO[•] (dioxyde d'azote, NO₂) sur les carbones des résidus de tyrosine. Cela se fait via l'oxydation des nitrites (NO₂⁻) en dioxyde de diazote (N₂O₂) qui, à son tour, induit la nitration des tyrosines. En plus du N₂O₂ d'autres composés induisent la nitration, comme les espèces réactives de l'azote (RNS en anglais, de Reactive Nitrogen Species) telles que les péroxynitrites (ONOO⁻) et le trioxyde de diazote (N₂O₃) (Ischiropoulos, 2003; Turko and Murad, 2002). La réaction de nitration est catalysée principalement par des métalloprotéases comme la myéloperoxydase, la myoglobine et le cytochrome P-450 (Ischiropoulos, 2003). La nitration touche plusieurs protéines et peut altérer leur activité biologique, avec gain ou perte de fonction, et peut également empêcher d'autres modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation (Turko and Murad, 2002). Un effet possible dû à la nitration est le changement de conformation des protéines, conduisant à l'apparition de nouveaux sites, préalablement cachés, pouvant induire par exemple le clivage via les caspases (Prévotat *et al.*, 2006). Les modifications induites sur les protéines impactent plusieurs processus, comme la transduction du signal, le métabolisme cellulaire et mitochondrial, la réponse immunitaire, la mort cellulaire et le cancer (Zhan *et al.*, 2018). Dans le cadre du cancer, une étude menée en 2012 par Ridnour et collaborateurs, montre un rôle primordial de la nitration chez les patientes atteintes de cancer du sein. En effet, ces chercheurs montrent que certaines

patientes sur-exprimant la iNOS présentait une diminution de la survie à cause d'une activation de la voie de prolifération PI3K/Akt dans les cellules cancéreuses. Cela est dû à la nitration de la protéine TIMP-1 (Tissue Inhibitor Matrix Metalloproteinase-1) sur deux résidus de tyrosine, induisant la fixation au récepteur CD63 et, donc, l'activation de la voie PI3K/Akt/Bad (Ridnour *et al.*, 2012). Une autre étude réalisée en 2006 au sein de notre équipe de recherche, montre que le traitement des cellules par un donneur de NO, le GTN, induit l'apoptose des cellules cancéreuses coliques humaines via la nitration de la β -caténine (une protéine impliquée dans l'adhésion et dans la prolifération) (Prévotat *et al.*, 2006).

3.3.1.2 La nitrosylation

La nitrosylation est une autre modification post-traductionnelle induite par le NO \cdot , et peut être essentiellement de deux types : 1) la S-nitrosylation, qui consiste à la liaison covalente réversible (dénitrosylation) d'un groupement NO \cdot au niveau du groupement thiol (SH) des cystéines avec formation de S-nitrosothiol (SNO), 2) la Métal-nitrosylation, correspondante à la fixation du groupement NO \cdot sur des métaux, principalement le fer, induisant la formation de complexes métal-nitrosyles (Stamler, 1994). La fixation du NO \cdot sur les protéines étant réversible, il existe des mécanismes de transfert d'un groupement NO \cdot d'une protéine S-nitrosylée à un autre, connus sous le nom de trans-nitrosylation (Nakamura *et al.*, 2010). Tout comme la nitration des tyrosines, la S-nitrosylation induit des changements de conformation et de fonction des protéines (Rizza and Filomeni, 2020; Plenchette *et al.*, 2016).

a. La S-nitrosylation

La S-nitrosylation intervient dans la modification de centaines de protéines et reste le moyen principal via lequel le NO \cdot induit des modifications post-traductionnelles (Fernando *et al.*, 2019; Plenchette *et al.*, 2016; Plenchette, 2015). Parmi les processus cellulaires régulés par la S-nitrosylation, nous retrouvons, entre autres, le cycle cellulaire, le métabolisme tumoral, la réparation de l'ADN et l'apoptose (Napoli *et al.*, 2013; López-Sánchez, Aranda and Rodríguez-Ariza, 2020; Tang, Wei and Liu, 2012; Hara *et al.*, 2005).

- *S-nitrosylation et régulation des voies de prolifération cellulaire*

La dérégulation des voies de prolifération cellulaires dans le développement du cancer est un processus bien établi, et la S-nitrosylation des protéines impliquées dans ces voies est donc un phénomène important dans la régulation de la croissance des cellules cancéreuses.

La S-nitrosylation de l'EGFR sur les cystéines 166 (Cys¹⁶⁶) et 305 (Cys³⁰⁵) du domaine extracellulaire inhibe la fixation du ligand et l'activation de la voie de prolifération (Murillo-Carretero *et al.*, 2009). A contrario, une autre étude montre que la S-nitrosylation d'EGFR et Src induit leur activation, ce qui a comme conséquence l'activation des voies oncogénique d'Akt, c-Myc, STAT3 induisant l'apparition du cancer du sein basal-like (Switzer *et al.*, 2012a).

Les protéines ERK1/2, faisant partie de la voie proliférative des MAPK, peuvent également être S-nitrosylées au niveau de la Cys¹⁸³, qui prévient la phosphorylation par les protéines MEK et induit la mort des cellules cancéreuses (Feng *et al.*, 2013).

Au niveau de la voie de prolifération PI3K/Akt/mTOR, plusieurs sont des protéines cibles du NO. La S-nitrosylation d'Akt inhibe son activité et induit la progression tumorale (Yasukawa *et al.*, 2005). De même, la S-nitrosylation de TSC2 empêche la formation du complexe TSC1/TSC2 induisant l'activation de mTOR et bloque la prolifération des cellules cancéreuses (Lopez-Rivera *et al.*, 2014). La protéine PTEN, inhibiteur de la voie PI3K/Akt/mTOR, peut être S-nitrosylée au niveau de la Cys⁸³, ce qui bloque sa fonction et induit la prolifération des cellules cancéreuses (Yu, Li and Whorton, 2005).

La voie Wnt/ β -caténine est aussi importante dans la progression tumorale, et la S-nitrosylation de la β -caténine empêche l'activation du FT TCF-4 (T cell factor-4) impliqué dans l'initiation de la phase G1 du cycle cellulaire et induisant la prolifération des cellules tumorales coliques et du sein (Nath *et al.*, 2003; Nath *et al.*, 2009)

Enfin, la S-nitrosylation de la protéine p53, impliquée dans la réparation de l'ADN et dans la suppression de tumeurs, empêche son activité normale et induit la carcinogénèse (Wang, 2012).

- *S-nitrosylation et mort cellulaire*

Tout comme les voies de prolifération cellulaire, les voies induisant la mort des cellules cancéreuses sont dérégulées dans le cancer. Le NO[•] est capable de réguler la sensibilité ou la résistance à la mort des cellules cancéreuses via la S-nitrosylation de protéines clés des voies de signalisation induites, par exemple, par les récepteurs de mort.

Une étude menée en 2006 par Tang et collaborateurs, montre que le nitrosylcobalamine (NO-Cbl), un donneur de NO[•], induit la S-nitrosylation du récepteur de mort TRAIL (DR4) au niveau de la Cys³³⁶ dans une lignée de cancer rénal (ACHN), de cancer de l'ovaire (OVCAR-3) et de mélanome (A375) et que l'inhibition de ce processus avec mutation de la cystéine impliqué, augmente la résistance à l'apoptose des cellules tumorales (Tang *et al.*, 2006).

Dans le même contexte, le NO[•] libéré par le GTN induit la S-nitrosylation du récepteur Fas au niveau de la Cys³⁰⁴, ce qui facilite son agrégation à la membrane et l'activation de la voie de signalisation induisant la mort des cellules cancéreuses coliques par apoptose (Leon-Bollotte *et al.*, 2011).

La S-nitrosylation de la protéine cIAP1 au niveau des Cys⁵⁷¹ et Cys⁵⁷⁴ induite par le GTN inhibe son activité E3-ubiquitine ligase, ce qui induit la formation d'un complexe de mort cellulaire et contrecarre la voie de prolifération NFκB induite par TNFα/TNFR1 (Romagny *et al.*, 2018).

La protéine anti-apoptotique Bcl-2 peut également être S-nitrosylée au niveau des Cys¹⁵⁸ et Cys²²⁹, ce qui augmente sa stabilité en empêche sa dégradation via le protéasome, avec comme résultat une inhibition de l'apoptose des cellules cancéreuses (Azad *et al.*, 2006).

Toutes ces études montrent que le rôle de la S-nitrosylation dans le développement tumoral est contexte-dépendant et protéine-dépendant. D'une manière plus générale, la S-nitrosylation induit le développement tumoral si la balance S-nitrosylation/dénitrosylation est perturbée. Si le stress induit par le NO[•] est trop important, cela est souvent corrélé à la progression tumorale (Rizza and Filomeni, 2020). En effet, la iNOS est souvent surexprimée dans de nombreux cancers, comme le mélanome, le cancer du foie, le cancer de l'ovaire et du col de l'utérus, le cancer du sein, et le cancer colorectal (Thomas and Wink, 2017; Ambis *et al.*, 1998). Une surexpression de la iNOS est, en effet, corrélée au mauvais pronostic chez les patientes atteintes de cancer du sein RO- (Glynn *et al.*, 2010).

3.3.1.3 Utilisation du GTN en thérapie anti-cancéreuse

Le GTN a fait l'objet de plusieurs études cliniques dans le traitement du cancer.

Dans le **cancer du poumon non à petites cellules**, plusieurs études ont montré l'effet bénéfique du GTN. Une étude clinique de Phase II montre que l'administration de GTN sous forme de patch améliore l'efficacité de la vinorelbine/cisplatine, des chimiothérapies standard utilisées dans le traitement de ces cancers, avec augmentation de la survie globale des patients (Yasuda *et al.*, 2006b). Un deuxième essai clinique de Phase II montre que l'association du GTN au docétaxel et au carboplatine, induit une diminution du VEGF dans le plasma des patients et augmente le taux de réponse à la chimiothérapie (Yasuda *et al.*, 2006a). Une étude clinique de Phase II plus récente, terminée en 2017 montre l'effet bénéfique de la nitroglycérine (autre nom du GTN) administré par inhalation chez les patients atteints de cancer du poumon, avec augmentation de la survie globale (Reymen *et al.*, 2020). Néanmoins, une étude de Phase III sur le même type de patients recevant la combinaison GTN/carboplatine (+/- gemcitabine ou paclitaxel) n'a montré aucun effet bénéfique (Davidson *et al.*, 2015; Dingemans *et al.*, 2015). Toutefois, un autre essai clinique de Phase II effectué sur la combinaison carboplatine/paclitaxel/bevacizumab et GTN n'a pas montré d'effets bénéfiques chez les patients (Dingemans *et al.*, 2015)

L'utilisation du GTN a également fait ses preuves dans le traitement du **cancer de la prostate**. L'administration de faibles doses de GTN chez certains patients ayant subi une prostatectomie suivi d'une radiothérapie et ayant rechuté, retarde la progression de la maladie (Siemens *et al.*, 2009).

Un autre essai clinique de Phase I sur la combinaison de la nitroglycérine et le 5-FU plus radiothérapie chez les patients atteints de **cancer du rectum**, montre que la combinaison est bien tolérée (Illum *et al.*, 2015).

RATIONNEL DE L'ETUDE

Le CSTN est un sous-type de cancer du sein très agressif pour lequel la plupart des traitements demeurent inefficaces. Le traitement de ce type de cancer se base essentiellement sur l'exérèse de la tumeur par chirurgie, accompagnée par la chimiothérapie à base de taxanes. Le développement des thérapies ciblées est de plus en plus important, afin de trouver des traitements plus efficaces et moins toxiques que la chimiothérapie. Parmi les voies de signalisation les plus étudiées dans le cancer, nous retrouvons la voie de la cytokine IL-6, important médiateur inflammatoire induisant le développement tumoral. Cette cytokine active de nombreuses voies de signalisation, notamment celle qui implique la kinase JAK2 et le facteur de transcription STAT3. De nombreuses thérapies ciblent cette voie, aussi bien au niveau de la cytokine et son récepteur, qu'au niveau de JAK2 et STAT3, et les études cliniques dans ce domaine se montrent prometteuses dans le traitement de certains cancers. Or, le traitement du CSTN reste difficile et aucun médicament ciblant cette voie de signalisation est actuellement utilisé ou en étude clinique.

Dans notre équipe de recherche nous étudions le potentiel antitumoral d'un donneur de NO[•], le GTN. Une de nos études, montre que le GTN induit l'apoptose des cellules cancéreuses coliques humaines (Millet *et al.*, 2002) et mammaires, en les rendant plus sensibles à la mort cellulaire par apoptose via le récepteur de mort Fas (Leon-Bollotte *et al.*, 2011). En 2015 l'équipe a montré que le GTN était capable d'induire la mort des cellules cancéreuses coliques si associé à un inhibiteur de kinases, le H89 (Cortier *et al.*, 2015). De plus, le NO[•] produit par la iNOS via l'activation de la voie TLR4 (Tool-like receptor 4)/IFN γ diminue les métastases pulmonaires dans le cancer du sein (Lamrani *et al.*, 2016). Le GTN induit également la mort des cellules cancéreuses coliques et de CSTN via la S-nitrosylation de la protéine cIAP1 (Romagny *et al.*, 2018). Ces travaux ont d'ailleurs montré que l'OXA (*in vitro* dans les cellules cancéreuses coliques) ainsi que le FOLFOX et le FOLFIRI (chez les patients atteints de cancer colorectal) sont capables d'augmenter la production de TNF α .

Dans l'objectif de potentialiser l'effet des chimiothérapies grâce au GTN, nous nous sommes intéressés à étudier la capacité de plusieurs lignées de CSTN à produire la cytokine pro-inflammatoire IL-6 sous l'effet de différentes chimiothérapies utilisées à des doses

subtoxiques (comme le cisplatine et le carboplatine) *in vitro*. L'IL-6 est surexprimée dans le CSTN (comme dans d'autres types de cancer) et son accumulation dans le MET est principalement dû aux cellules tumorales et aux fibroblastes, ce qui stimule la prolifération des cellules cancéreuses et la formation de métastases (Masjedi 30372844). L'étude des voies de signalisation impliquant l'IL-6 présente donc un intérêt particulier dans le traitement de ce type de cancer. Les résultats obtenus ont ainsi orienté notre étude sur la voie de signalisation IL-6/JAK2/STAT3 dans le CSTN.

Dans cette étude nous montrons que le GTN cible la voie de l'IL-6 via la S-nitrosylation de JAK2, ce qui empêche l'activation de STAT3, avec diminution de la migration des cellules cancéreuses triple négatives, aussi bien *in vitro*, qu'*in vivo* dans un modèle de métastases pulmonaires.

ARTICLE 2: « NITRIC OXIDE-RELEASING DRUG GLYCERYL TRINITRATE
TARGETS JAK2/STAT3 SIGNALING, MIGRATION AND INVASION OF
TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER CELLS »

Sarra Bouaouiche^{1,2†}, **Silvia Ghione**^{1,2†}, Randa Sghaier^{1,2}, Olivier Burgy³, Cindy Racoeur^{1,2}, Valentin Derangère⁴, Ali Bettaieb^{1,2}, Stéphanie Plenchette^{1,2*}

¹Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), EA7269,
Univ. Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

²LIIC, EPHE, PSL Research University, Paris, France

³INSERM U1231, Dijon, France

⁴ Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, Centre Georges François
Leclerc, Dijon, France

† These authors contributed equally to the work



Article

Nitric Oxide-Releasing Drug Glyceryl Trinitrate Targets JAK2/STAT3 Signaling, Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells

Sarra Bouaouiche ^{1,2,†}, Silvia Ghione ^{1,2,†}, Randa Sghaier ^{1,2}, Olivier Burgy ³, Cindy Racœur ^{1,2}, Valentin Derangère ⁴, Ali Bettaieb ^{1,2} and Stéphanie Plenchette ^{1,2,*}

- ¹ Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France; bouaouiche.sarra@gmail.com (S.B.); silvi.ghio50@gmail.com (S.G.); sg.randa@yahoo.fr (R.S.); Cindy.Racœur@u-bourgogne.fr (C.R.); ali.bettaieb@u-bourgogne.fr (A.B.)
² Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), EA7269, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France
³ INSERM U1231, UFR Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche Comté, 21000 Dijon, France; Olivier.Burgy@u-bourgogne.fr
⁴ Plateforme de Transfert en Biologie du Cancer, Centre Georges-François Leclerc, 21000 Dijon, France; VDerangere@cgfl.fr
* Correspondence: stephanie.plenchette@u-bourgogne.fr or stephanie.plenchette-colas@ephe.psl.eu; Tel.: +33-3-80-39-33-59; Fax: +33-3-80-39-34-34
† These authors contributed equally to the work.



Citation: Bouaouiche, S.; Ghione, S.; Sghaier, R.; Burgy, O.; Racœur, C.; Derangère, V.; Bettaieb, A.; Plenchette, S. Nitric Oxide-Releasing Drug Glyceryl Trinitrate Targets JAK2/STAT3 Signaling, Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 8449. <https://doi.org/10.3390/ijms22168449>

Academic Editor: Michael Welsh

Received: 15 July 2021

Accepted: 30 July 2021

Published: 6 August 2021

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



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

Abstract: Triple-negative breast cancer (TNBC) is a highly aggressive disease with invasive and metastasizing properties associated with a poor prognosis. The STAT3 signaling pathway has shown a pivotal role in cancer cell migration, invasion, metastasis and drug resistance of TNBC cells. IL-6 is a main upstream activator of the JAK2/STAT3 pathway. In the present study we examined the impact of the NO-donor glyceryl trinitrate (GTN) on the activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway and subsequent migration, invasion and metastasis ability of TNBC cells through in vitro and in vivo experiments. We used a subtoxic dose of carboplatin and/or recombinant IL-6 to activate the JAK2/STAT3 signaling pathway and its functional outcomes. We found an inhibitory effect of GTN on the activation of the JAK2/STAT3 signaling, migration and invasion of TNBC cells. We discovered that GTN inhibits the activation of JAK2, the upstream activator of STAT3, and mediates the S-nitrosylation of JAK2. Finally, the effect of GTN (Nitronal) on lung metastasis was investigated to assess its antitumor activity in vivo.

Keywords: cancer; nitric oxide; signaling; migration; invasion; metastasis

1. Introduction

Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive subtype of breast cancer among women worldwide. TNBCs represent 10–15% of all subtypes of breast cancers and are so named because of the absence of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR) and no overexpression of human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) [1]. Consequently, standard targeted therapies used for treating other subtypes of breast cancers (hormone receptor-positive or HER2-positive) are not a therapeutic option. The therapeutic care of patients afflicted with early or advanced TNBC remains chemotherapy. Although TNBC patients present higher chemosensitivity than for other subtypes of breast cancer, their prognosis remains worse [2]. In recent years, much emphasis has been put on TNBC molecular features to identify new therapeutic targets and options of treatment.

The signal transducers and activators of transcription (STAT) family encompasses key transcription factors involved in breast cancer disease. Importantly, STAT3 signaling pathways, activated through many cytokines (such as Interleukin-6 (IL-6), IL-10) and growth

factors (epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), insulin-like growth factor (IGF)), promote breast cancer progression, proliferation, apoptosis, metastasis and chemoresistance [3]. It is well established that the tumor microenvironment plays a crucial role for tumor development, tumor progression and response to anticancer therapies [4,5]. A continuous dynamic cross talk between tumor cells and stroma cells accounts tremendously for tumor fate and patient prognosis. A variety of stroma cells including immune cells (from the innate and adoptive response), cancer-associated fibroblasts (CAFs) and blood vasculature mainly populate the tumor microenvironment [4,6]. Inflammatory cytokines, chemokines and growth factors are active players in the communications within the tumor microenvironment that support tumor growth, invasion, migration and initiate the metastatic cascade [7].

IL-6 is a major pro-inflammatory cytokine secreted in the tumor microenvironment from both tumor and stromal cells which influences almost all hallmarks of cancer to promote cancer growth and progression [8]. The autocrine and paracrine action of IL-6 is associated with multiple signaling pathways that support not only aggressive features of cancer cells such as invasion, migration and metastasis, but also tumor growth, survival angiogenesis, regulation of immune response and chemoresistance [9]. Tumor-associated macrophages (TAMs), cancer-associated fibroblasts (CAFs) or myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) are major sources of IL-6 and play an important role in invasiveness and metastasis [10,11]. Various clinical studies have correlated high circulating IL-6 levels in patients with malignant tumors, as for breast cancer [12,13], prostate cancer [14], head and neck squamous cell carcinoma [15] or renal cancer [16]. Even though several studies positively correlated elevated serum IL-6 levels with a poor prognosis, further studies are required to clearly determine whether IL-6 is a cause or consequence in different types of cancer [17]. Nevertheless, in breast cancer, elevated systemic IL-6 seems to reflect poor prognosis, advanced disease and distant metastasis [13]. The classical and alternative IL-6 signaling pathways activate JAKs with subsequent activation of the signal transducer and activator of transcription-3 (STAT3), a key transcription factor inducing numerous effector genes involved in cancer promotion and malignancy [18–20]. IL-6/STAT3 activity is also often associated with metastatic processes including epithelial-mesenchymal transition (EMT), degradation of extracellular matrix and cell migration [20]. Typically, IL-6 exerts its effect through two functional receptor complexes composed of a transmembrane form IL-6 receptor alpha (mIL-6 R α) or a soluble form (sIL-6 R) that provides IL-6 binding specificity and interaction with the signal-transducing chains (gp130). JAK1 and JAK2 are critical tyrosine kinases that trigger the phosphorylation and activation of STAT3 on tyrosine 705 (Tyr 705) and subsequent dimer formation that initiates its translocation into the nucleus [19]. The IL-6/JAK2/STAT3 axis represents an important therapeutic target [18]. IL-6 also mediates its effect through the activation of other oncogenic signaling pathways including PI3K/AKT and MAPK/ERK pathways [8]. Thus, neutralizing either IL-6 or related signaling pathways represent an attractive therapeutic target in cancer. However, anti-IL-6 therapies have mainly demonstrated no benefit in several types of cancer [21]. Hence, new anticancer strategies targeting the IL-6 signaling axis are needed. Here, we considered a nitric oxide (NO)-based strategy to prevent the IL-6/JAK2/STAT3 axis. NO is an important signaling molecule now understood to play a dual role in cancer as a positive or negative regulator of multiple signaling pathways [22]. Some phase II clinical trials in advanced non-small cell lung cancer and prostate cancer patients reveal that the use of glyceryl trinitrate (GTN) may have beneficial effects in combination with chemotherapy (vinorelbine and cisplatin) and/or radiotherapy [23,24]. Interestingly, cisplatin can increase IL-6 cytokine production and then cellular migration and proliferation in non-small cell lung cancer cells [25]. However, further phase III trials in advanced non-small cell lung cancer patients treated with platinum-based doublet as first-line therapy (carboplatin/gemcitabine or carboplatin/paclitaxel) with GTN did not present clinical benefit [26]. Better knowledge is required to define how GTN should be utilized in cancer therapy.

In the present study we investigated the effect of carboplatin in promoting IL-6-mediated TNBC cell migration. We then examined the ability of GTN, a NO-releasing drug, to counteract the IL-6/JAK2/STAT3 axis migration, invasion and metastasis of TNBC cells.

2. Results

2.1. Effect of Carboplatin on the Production of IL-6 in TNBC Cells

Firstly, we investigated the effect of carboplatin on the expression of the pro-inflammatory cytokine IL-6 in TNBC cells from mouse (4T1 cells) and human (MDA-MB-231) origin. The 4T1 cells and MDA-MB-231 cells were exposed to a subtoxic concentration of carboplatin for 6 h (Supplementary Figure S1). We found that carboplatin induces an increase in IL-6 at the mRNA level in TNBC cells. A significant augmentation of the level of IL-6 mRNA was found in 4T1 cells after 6 h of treatment with carboplatin (Figure 1A). Similarly, we found that carboplatin induces the expression of IL-6 in MDA-MB-231 cells after 6 h of treatment (Figure 1B). Exposure of RAW 264.7 cells to a subtoxic concentration of carboplatin showed no significant changes in IL-6 mRNA levels, neither after 48 h of treatment (Figure 1C), nor at 6 h and 24 h (data not shown).

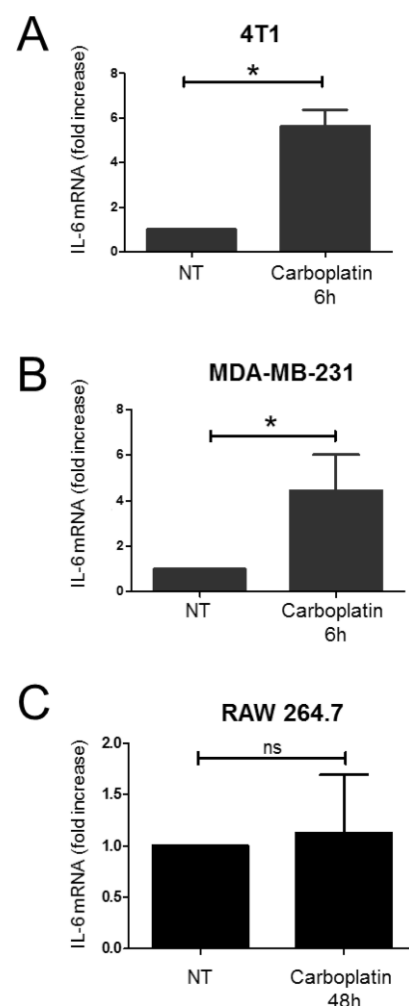


Figure 1. Carboplatin increases IL-6 production in TNBC cells. (A) 4T1 cells, (B) MDA-MB-231 cells and (C) RAW 264.7 cells were treated with carboplatin (10 μ M, 750 nM and 10 μ M, respectively) at the indicated time and IL-6 mRNA levels were determined by RT-qPCR. Data are shown as fold increase with mean \pm SD of three independent experiments performed in duplicate. *p* values were determined using a one-tailed Mann–Whitney test. Statistically significant differences are indicated: * *p* < 0.05; ns: not significant.

2.2. GTN Inhibits JAK2/STAT3 Signaling Pathway

The JAK2/STAT3 signaling pathway can be activated by IL-6. By immunoblotting analyses, we confirmed that the JAK2/STAT3 signaling pathway, in 4T1 and MDA-MB-231 cells, is activated as attested by the phosphorylation of JAK2 (Tyr1007/1008) and STAT3 (Tyr705), either by carboplatin or recombinant IL-6 treatment (Figure 2A–D). We investigated the effect of the NO donor GTN on the JAK2/STAT3 signaling pathway activation following carboplatin or recombinant IL-6 treatment. GTN induces the release of NO as attested by the increase in nitrite (NO_2^-) levels. This effect is not modified upon carboplatin exposure (Supplementary Figure S2). GTN induces a modest cytotoxic effect against 4T1 and MDA-MB-231 cells after 48 h, but not after 24 h exposure (Supplementary Figure S3). In agreement, GTN has no significant impact on early apoptosis in TNBC cells (4T1 and MDA-MB-231) after 24 h and 48 h of treatment. It induces only a low amount of early/late apoptosis in MDA-MB-231 cells after 48 h treatment (Supplementary Figure S4). GTN treatment in combination with either carboplatin or IL-6 significantly decreased p-JAK2 and subsequent p-STAT3 in TNBC cells (Figure 2A–D). To confirm the capacity of carboplatin to activate the JAK2/STAT3 signaling pathway through IL-6, we treated 4T1 cells with carboplatin with or without an IL-6 neutralizing antibody. Immunoblot analysis revealed that elevated levels of p-STAT3 and p-JAK2 stimulated by carboplatin can be blocked by the IL-6 neutralizing antibody and confirm the role of carboplatin in mediating IL-6 production and JAK2/STAT3 activation (Figure 2E).

These results suggest that GTN can inhibit the activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway. We further explored the effect of NO on the phosphorylation state of JAK2. We therefore employed the erythroleukemic cell line HEL 92.1.7, characterized by the single point mutation JAK2-V617F, a gain-of-function mutant form of JAK2, versus the erythroleukemic cell line K562 that contains the non-mutated form of JAK2. As expected, a high level of basal expression of p-JAK2 was observed in the HEL 92.1.7 cell line as compared to K562 cells. Treatment of HEL 92.1.7 cells with GTN results in a significant decrease in p-JAK2 and subsequent diminution of p-STAT3 (Figure 2F).

Taken together, these results indicated that NO can counteract the JAK2/STAT3 pathway via the inhibition of p-JAK2.

2.3. NO Promotes JAK2 S-Nitrosylation

A myriad of signaling pathways regulated by NO occur through protein post-translational modification by S-nitrosylation. We investigated whether NO donors could promote the S-nitrosylation of JAK2 that may inhibit its kinase activity and downstream activation of the signaling pathway. To examine whether JAK2 can be S-nitrosylated, MDA-MB-231 and 4T1 cells were treated with GTN, with or without carboplatin, or another NO donor (S-nitrosocysteine (SNOC)) and then subjected to biotin-switch assay. We identified JAK2 as a target of NO. Interestingly, GTN alone only slightly induces the S-nitrosylation of JAK2, as seen only in MDA-MB-231 cells (Figure 3A). Interestingly, in both MDA-MB-231 and 4T1 cell lines, the combination therapy GTN/carboplatin markedly induced the S-nitrosylation of JAK2 (Figure 3A,B). In addition, SNOC (massive and rapid delivery of NO) induced the S-nitrosylation of JAK2 in both cell lines.

This result suggested that S-nitrosylation may be a regulatory mechanism for JAK2 activity.

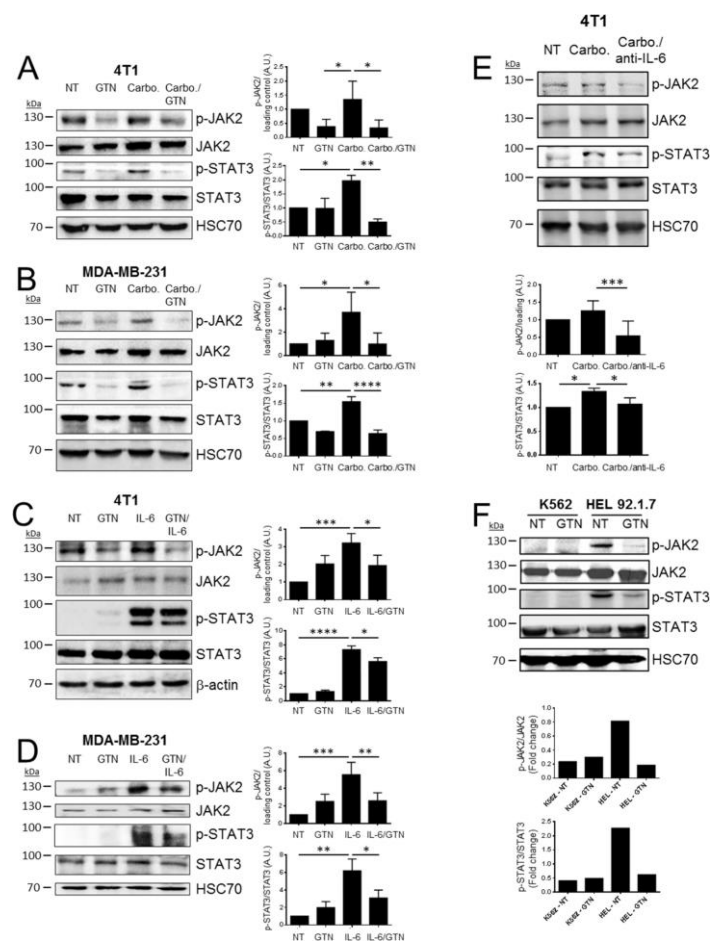


Figure 2. GTN inhibits IL-6-mediated JAK2/STAT3 signaling in TNBC cells. **(A)** 4 T1 cells and **(B)** MDA-MB-231 cells were treated with glyceryl trinitrate (GTN, 250 μ M) and/or carboplatin (10 μ M for 4T1 cells, 750 nM for MDA-MB-231 cells) or left untreated (non-treated, NT) for 48 h. **(C)** 4T1 cells and **(D)** MDA-MB-231 cells were treated with GTN (250 μ M), recombinant murine or human IL-6 (rec-IL-6, 10 ng/mL), rec-IL-6/GTN or left untreated (non-treated, NT) for 6 h and 24 h respectively. **(E)** 4T1 cells were treated with carboplatin in presence or absence of neutralizing IL-6 antibody (anti-IL-6), or left untreated (non-treated, NT). **(F)** K562 and HEL 92.1.7 were treated with GTN 250 μ M for 48 h. **(A–F)** The levels of phosphorylated JAK2 (p-JAK2), total JAK2, phosphorylated STAT3 (p-STAT3) and total STAT3 were analyzed by Western blot. HSC70 or β -actin was used as a loading control in all Western blots performed. The blots presented are representative of at least three independent experiments. **(A–E)** The histograms present quantification using densitometric analyses of at least three independent experiments: mean ratio p-JAK2/loading control (p-JAK2 normalized to the loading control either HSC70 or β -actin due to non-specific increase in JAK2 basal levels in 4T1 cells in response to treatment) and mean ratio p-STAT3/STAT3. **(F)** The histograms present quantification of one representative experiment (from three independent experiments). Statistically significant differences were determined using a one-way ANOVA test (with a Fisher's LSD test). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$; **** $p < 0.00001$. **(E)** Statistical analysis for ratio p-STAT3/STAT3: * $p < 0.1$.

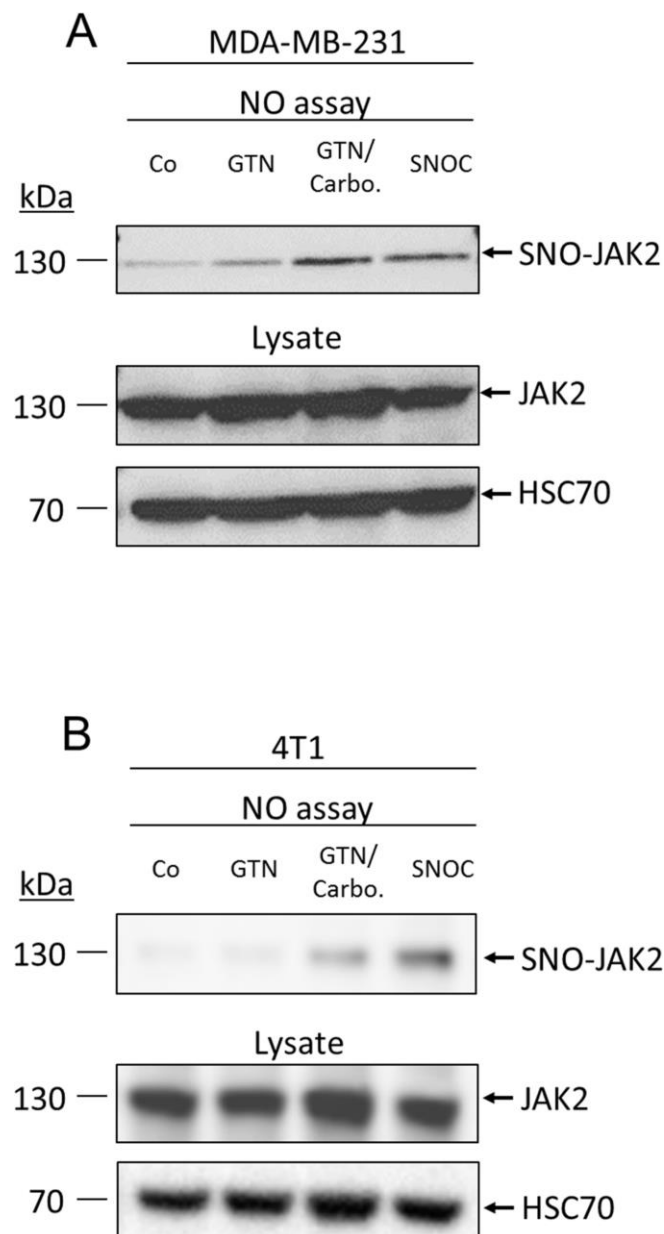


Figure 3. GTN promotes JAK2 S-nitrosylation. (A) MDA-MB-231 cells or (B) 4T1 cells were treated with carboplatin (750 nM and 10 μ M, respectively) and/or GTN (250 μ M) for 24 h, and S-nitrosocysteine (SNO-C 1 mM) for 15 min. S-nitrosylation of JAK2 was demonstrated by using the biotin switch assay method. Total lysates were immunoblotted with JAK2 and HSC70 as a loading control.

2.4. Effect of GTN on IL-6-Mediated Wound Healing in TNBC Cells

IL-6 plays an important role as a migration factor *in vitro* and *in vivo*. Wound healing assays were performed with recombinant IL-6 added to TNBC cells. To completely preclude any stimulation of cell proliferation by IL-6, we performed an MTS assay. We demonstrated that IL-6, upon 24 h of treatment, induced no modification in the rate of proliferation of TNBC cells (Figure 4A,B). We found that recombinant IL-6 increases the wound healing ability of both 4T1 and MDA-MB-231 cells (Figure 4C,D). We explored the effect of GTN on the ability of IL-6 to stimulate wound healing in TNBC cells. The wound healing activity of TNBC cells remains unchanged following treatment with GTN alone in comparison with non-treated (NT) control cells. However, combined treatment of IL-6 with GTN inhibits the wound healing activity of both 4T1 and MDA-MB-231 cells (Figure 4C,D). To confirm the

role of NO in the inhibition of the wound healing by the NO donor GTN, cells stimulated with IL-6 along with GTN were treated in presence or absence of the NO scavenger cPTIO. We showed that in presence of cPTIO, the inhibitory effect of GTN on IL-6-mediated wound healing is abrogated in both 4T1 and MDA-MB-231 cells (Figure 4E,F).

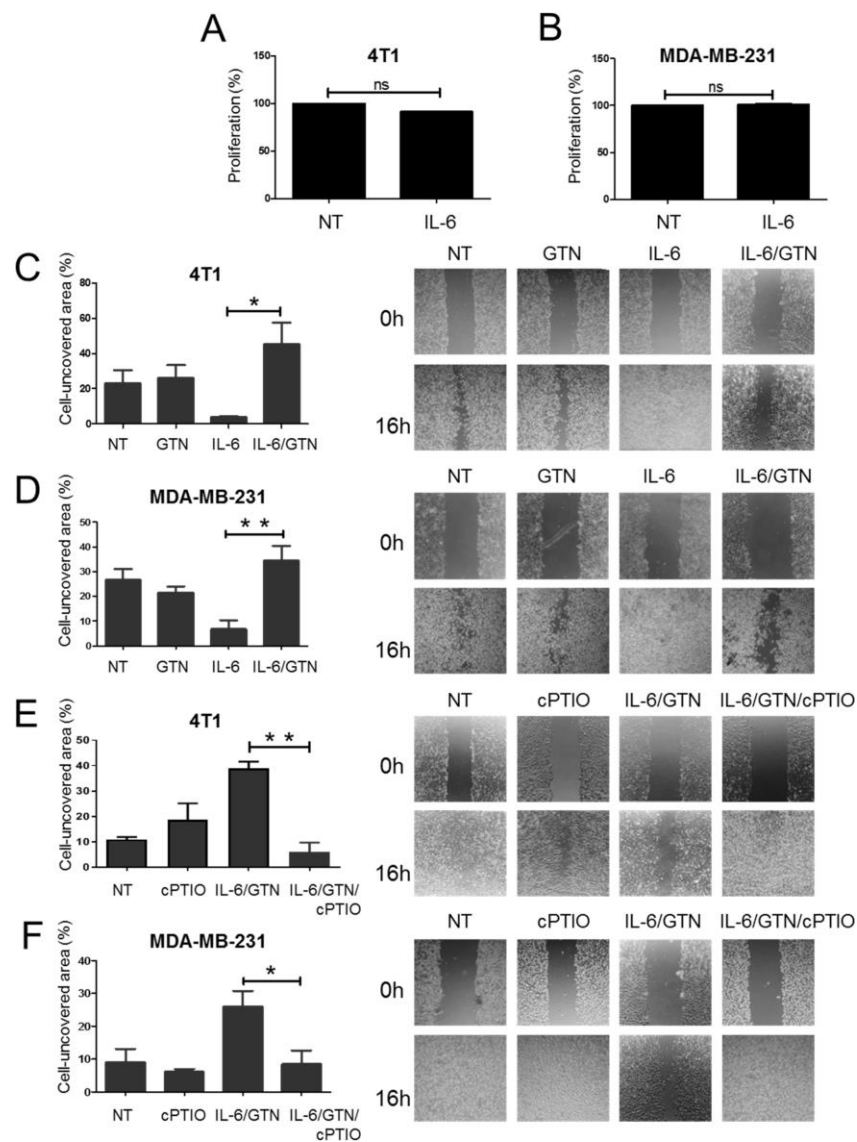


Figure 4. GTN prevents recombinant IL-6-induced wound healing in TNBC cells. **(A)** 4T1 and **(B)** MDA-MB-231 cells were treated with murine or human recombinant IL-6 (10 ng/mL), respectively, for 24 h and MTS proliferation assay analysis was performed. Results indicate means \pm SD of three independent experiments. **(C–F)** The in vitro wound healing assays. **(C)** 4T1 and **(D)** MDA-MB-231 cells were treated for 16 h with GTN (250 μ M), and/or recombinant IL-6 (10 ng/mL) or left untreated (NT). Data are shown as percentage of cell-covered area. **(E)** 4T1 and **(F)** MDA-MB-231 cells were treated for 16 h with IL-6/GTN, and/or cPTIO (50 μ M) or left untreated (NT). Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments. Images are representative of three independent experiments. Statistically significant differences were determined using a one-way ANOVA test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; ns: not significant.

Altogether, these data suggested that GTN can counteract the IL-6 responsiveness of TNBC for wound healing migration in a NO-dependent manner.

2.5. *In Vitro* Effects of GTN on Migration and Invasion of TNBC Cells

To further address cell migration, we explored the impact of GTN on TNBC cells using the transwell cell migration assay. The 4T1 cells were seeded in the upper compartment and conditioned medium from carboplatin-treated 4T1 cells was incubated in the lower compartment. To figure out whether IL-6 secreted from carboplatin-treated cells could promote 4T1 cell migration, an IL-6 neutralizing antibody was added to the conditioned medium in the lower compartment. We found significant effect of the IL-6 neutralizing antibody on carboplatin-mediated 4T1 migration activity. Moreover, the addition of GTN into the conditioned medium significantly abrogated carboplatin-mediated 4T1 migration activity (Figure 5A). We then performed a co-culture experiment using the transwell migration system. The 4T1 cells were seeded in the upper compartment while co-cultured 4T1 and RAW 264.7 cells (ratio 3:1) were seeded in the lower compartment and stimulated with the indicated treatment. The percentage of 4T1 cells migrating is more important in the presence of co-cultured 4T1/RAW 264.7 cells compared to 4T1 cells alone (data not shown). Carboplatin treatment slightly increases 4T1 cell migration. The addition of an IL-6 neutralizing antibody along with carboplatin treatment significantly affected 4T1 cell migration, and even more following GTN treatment (Figure 5B). The transwell cell invasion assays were performed with conditioned media from carboplatin-treated 4T1 cells, then treated without or with an IL-6-neutralizing antibody (lower chamber) or GTN (upper-chamber). We observed a significant increase in 4T1 cell invasion in the presence of conditioned media from carboplatin-treated 4T1 cells. Cell invasion in response to GTN was significantly reduced. In the presence of the IL-6-neutralizing antibody, there seemed to be a trend that approximated but did not reach statistical significance (Figure 5C). We investigated the role of GTN on the EMT process. The EMT was stimulated by TGF- β 1 in 4T1 cells attested by the upregulation of mesenchymal markers [27]. We found that TGF- β 1-induced EMT in 4T1 cells increased the level of expression of the mesenchymal markers MMP9, Vimentin, Snail and Twist, and to a further extent upon carboplatin exposure. However, in response to GTN, the level of the mesenchymal markers was reduced (Figure 5D).

Altogether, these results indicate that GTN may have a broader impact on 4T1 cell invasion than the IL-6-neutralizing antibody.

2.6. *In Vivo* Effect of GTN in a Syngeneic Model of Murine Metastatic TNBC

The anti-metastatic effect of GTN was undertaken *in vivo* using a syngeneic model of murine TNBC with 4T1 cells which metastasize to the lungs. Mice were injected with 4T1 cells, and after seven days, mice were treated twice a week with Nitronal (glyceryl trinitrate) infusion solution or saline (NaCl). After a month, we analyzed the lung tissue for the presence of metastases by hematoxylin-eosin staining of formalin-fixed paraffin-embedded lung sections from five untreated and five Nitronal-treated mice (Figure 6A). The areas of tumor lesions (% of lung sections) were evaluated for each mouse in both the control and treated groups. Compared to control mice, Nitronal-treated mice showed a decrease in the area of tumor lesions (%). The one-sided *p*-value from the Mann-Whitney test is 0.086 (statistical significance considering a 90% confidence interval ($p < 0.1$)) (Figure 6B).

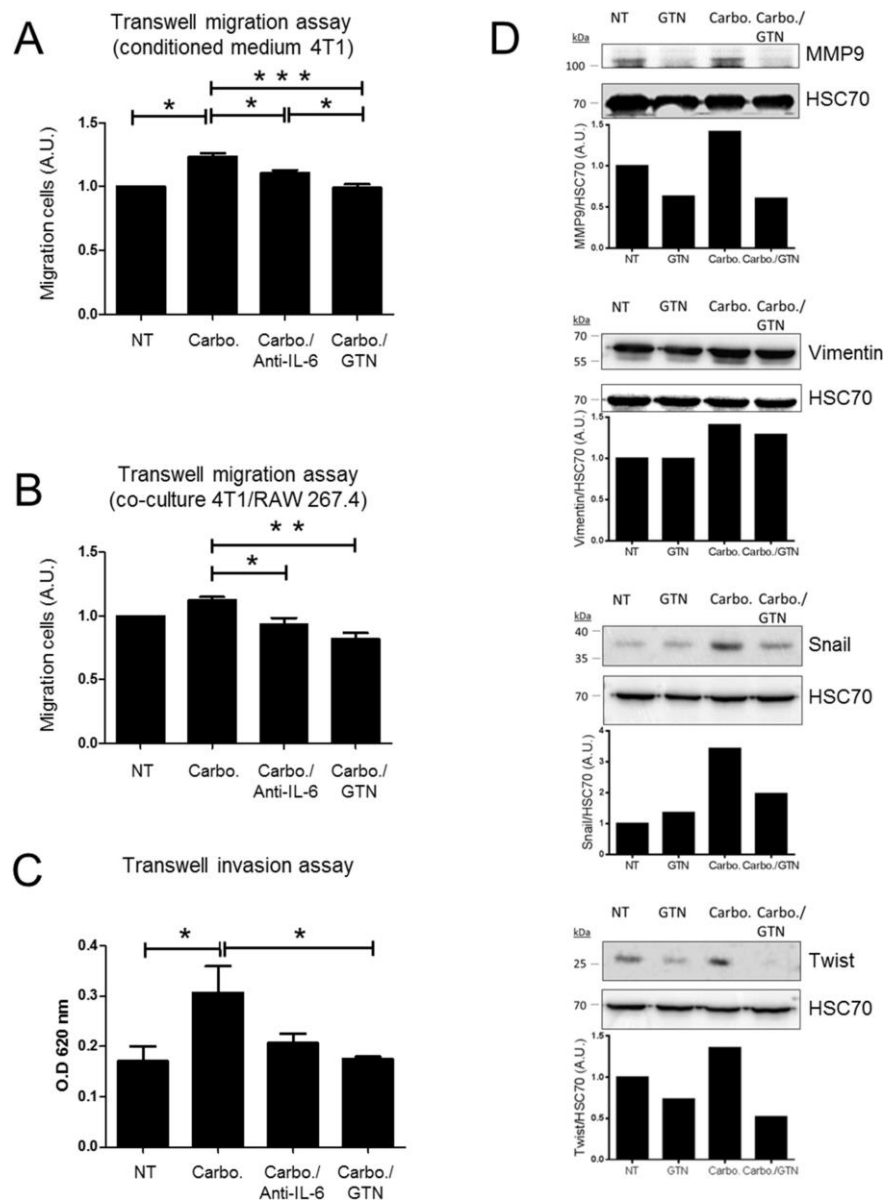


Figure 5. GTN prevents carboplatin-induced 4T1 cell migration and invasion in transwell systems. **(A)** Transwell migration assays were performed using 4T1 cells (upper chamber) incubated with conditioned media from 4T1 cells previously treated or not with carboplatin (10 μ M) for 48 h (lower chamber). IL-6 neutralizing antibody (100 ng/mL) or GTN (250 μ M) were added for an additional 16 h of treatment. **(B)** Transwell migration assays were performed using 4T1 cells (upper chamber) incubated with 4T1/RAW 267.4 co-culture (ratio 3:1) (lower chamber) treated with carboplatin (10 μ M) alone or with either IL-6 neutralizing antibody (100 ng/mL) or GTN (250 μ M) for 16 h of treatment. **(A,B)** The migration of control 4T1 cells is set at 1 arbitrary unit (A.U.) and the cancer cell migration following the indicated treatment is compared to control cells. **(C)** Transwell invasion assays were carried out using 4T1 cells (upper chamber) incubated with conditioned media from 4T1 cells previously treated or not with carboplatin (10 μ M) for 48 h (lower chamber). GTN (250 μ M) or IL-6 neutralizing antibody (100 ng/mL) was added within the conditioned media (lower chamber) for 16 h. Migrating and invading cells were stained with crystal violet and quantified by measuring the optical density (OD) at 620 nm. Results are means \pm SEM of three independent experiments. **(D)** Western blot analysis of MMP9, Snail, Vimentin and Twist in 4T1 cells treated with TGF- β 1 (10 ng/mL) for 24 h, and then treated with GTN (250 μ M), carboplatin (10 μ M), carboplatin/GTN for 24 h. Densitometric analysis of proteins relative to HSC70 levels (one experiment representative of three independent experiments). Statistically significant differences were determined using a one-way ANOVA test.

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.0001$.

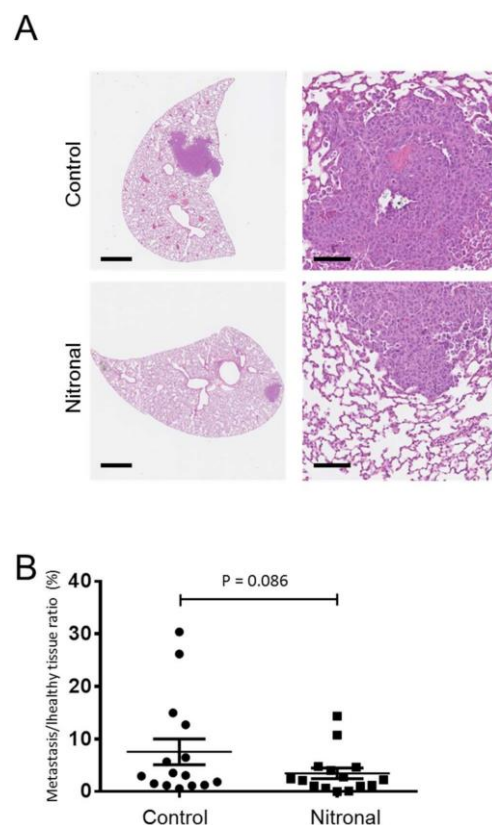


Figure 6. In vivo effect of Nitronal on lung metastases of 4T1 TNBC cells. **(A)** Representative immunohistochemistry images of lung sections from control or treated mice bearing 4T1 tumors. Lung metastases are visualized by hematoxylin-eosin staining of formalin-fixed paraffin-embedded sections. **(B)** Metastatic areas per lung sections for each animal were quantified as described in material and methods. Graph shows mean \pm SEM of 15 mice per group. Scale bar (left panel, 1 mm; right panel, 100 μ m). Statistically significant differences were determined using a t-test with 90% confidence level and *, $p < 0.1$, considered statistically significant.

3. Discussion

TNBC is an aggressive disease with a high rate of metastasis, poor prognosis and few therapeutic options. One current therapeutic strategy for TNBC targets DNA repair complexes (by means of platinum derivatives and taxanes). Cisplatin- or carboplatin-containing regimens (cisplatin/gemcitabine, carboplatin/paclitaxel, carboplatin/gemcitabine) are recommended for first-line and second-line therapy [28]. A platinum-based regimen including carboplatin is recommended for patients with TNBC to increase pathologic complete response [29]. However, chemoresistance to platinum derivatives arose in various types of solid cancers. In this study we show that carboplatin enhances IL-6 expression and secretion by TNBC cells to activate the JAK2/STAT3 signaling pathway and cell migration. In TNBCs and many other human cancers, IL-6 is recognized as a major cytokine produced by multiple cell types within the tumor microenvironment, and which has important roles in tumor development and progression. IL-6 is involved in various oncogenic activities (cell proliferation, cell survival, migration, invasiveness and resistance towards anticancer therapy), therefore making IL-6 signaling cascades in breast cancer a target of choice.

Therapeutic strategies of IL-6 signaling blockade have been developed for several inflammatory diseases [21,30]. However, up to now, IL-6-based therapies have demonstrated no clinical efficacy in breast cancers and also in other various types of cancer patients [30,31]. More recently, a phase II clinical trial evaluating a selective JAK1/2 inhibitor in patients with metastatic triple-negative breast cancer (tumors demonstrating p-STAT3 expression) also demonstrated limited clinical efficacy [32]. A better understanding of IL-6/IL-6 R

regulation and signaling needs to be taken into account to improve IL-6-based therapies in breast cancers.

NO-releasing drugs have gained growing interest as anti-cancer agents offering new treatment options for targeting various signaling pathways simultaneously [22,33]. NO is a free radical and highly reactive molecule that exerts a dual role in cancer, either pro-tumoral or anti-tumoral [22]. Protein post-translation modification by S-nitrosylation display decisive roles in regulating several signaling pathways involved in growth, cell survival or invasion. In this study we report that GTN inhibits TNBC cell migration and invasion in vitro, most likely via the IL-6/JAK2/STAT3 axis. We demonstrate that GTN prevents carboplatin-induced IL-6 to activate the JAK2-STAT3 pathway. We also report for the first time that GTN promoted the S-nitrosylation of JAK2 which may be associated with the inhibition of phosphorylation and activation of JAK2 and STAT3. The S-nitrosylation of JAK2 had never been reported so far; however, JAK2 nitration (Tyr1007 and Tyr1008) was described to prevent its activity [34]. Strikingly, data from the biotin switch assay demonstrates that the level of S-nitrosylated JAK2 is more important in TNBC cells treated with GTN along with carboplatin, than with GTN alone. The S-nitrosylation of JAK2 most likely directly regulate its kinase activity. Our finding is in agreement with a previous report that provided evidence for a cysteine-based redox-sensitive switch that regulates JAK2 catalytic activity [35]. Furthermore, it has been demonstrated that another NO donor, S-nitrosoglutathione (GSNO), selectively S-nitrosylates STAT3 at Cys259 and inhibits its accessibility to JAK2 [36,37]. Further studies would determine whether STAT3 would be targeted in this context. Altogether, these results suggest that NO can lead to IL-6 signaling blockade. Although p53 is a downstream target of STAT3, known to be attenuated by IL-6 via the JAK/STAT3 pathway in various cell types such as LNCap (p53 wild-type) and 22Rv1 (one wild-type copy of p53 and one mutated copy of p53) prostate cancer cells [38], we did not find any changes in p53 level upon IL-6 exposure on MDA-MB-231 cells (data not shown).

Conversely, high expression of iNOS in TNBC correlates with tumor aggressiveness (progression and metastasis), chemoresistance and poor outcome [39]. The role of iNOS inhibitors on TNBC aggressiveness has been studied. Importantly, preclinical studies using the pan-NOS inhibitor L-NMMA has demonstrated efficacy in decreasing tumorigenicity of TNBC, reducing tumor growth and lung metastasis [40]. Furthermore, the use of L-NMMA in combination with docetaxel has demonstrated enhanced chemotherapy response in TNBC PDX models and represents an interesting therapeutic approach [41].

Nevertheless, the dual nature of NO in cancer, pro- or anti-tumorigenic, is still a subject of intense debate. NO action and cellular outcomes largely rely on the role of many factors in the tumor microenvironment, particularly for TNBC, a subtype of breast cancer characterized by a profound intratumoral heterogeneity.

A growing number of studies provide evidence that coordinated cytokine expression is critical for the growth and malignancy of TNBCs.

Together, IL-6 and CCL5 are key enhancers of TNBC tumor growth and metastasis [42]. Indeed, within the tumor microenvironment, IL-6 secreted by TNBC cells upregulates CCL5 expression in lymphatic endothelial cells by activating the IL-6 receptor, STAT3, which subsequently enhances transcription of the *CCL5* gene. Importantly, the simultaneous blockade of CCR5 and IL-6 receptor signaling firmly inhibits TNBC tumor growth and prevents TNBC metastasis [42].

In TNBC, the tandem expression of IL-6 and IL-8 is also critical for growth and resistance to apoptosis [43]. Importantly, several reports suggest that both IL-6 and IL-8 play a critical role in the aggressiveness of breast cancer and of other types of cancer [44]. Recently, a study demonstrated that a synergistic IL-6 and IL-8 signaling pathway is required to influence cancer cell motility and metastases. Mechanistically, the pathway likely occurs through the downstream signaling of WASF3 and Arp2/3 and subsequent regulation of actin cytoskeleton dynamics [45]. Simultaneous inhibition of IL-6 and IL-8 receptors decreases the expression of WASF3 and Arp2/3, and reduces metastasis in

mice [45]. In accordance with this finding, previous clinical studies had shown that the elevated serum concentrations of IL-6 and IL-8 of breast cancer patients correlate with the stage of the disease, the recurrence, and are indicators of poor prognosis [46–48]. However, the prognostic role of IL-6 and IL-8 association in breast cancer may differ according to breast cancer subtype. Indeed, high levels of IL-6 and IL-8 are associated with breast cancer recurrence only among patients with HER2 tumors [12].

In our current study we found that carboplatin enhances the expression of IL-8 at the mRNA level (data not shown). However, further studies are needed to determine whether GTN could block both IL-6 and IL-8 signaling to prevent cell migration and invasion. In support to this, our *in vivo* studies indicate a decrease in metastatic lesions upon the NO-donor GTN. Various clinical trials to evaluate the effectiveness of GTN in a combined regimen (chemotherapy and/or radiotherapy) has been conducted [23,24,26,49–51]. Although some clinical benefit were observed for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients (GTN combined with vinorelbine and cisplatin) and prostate cancer patients (GTN after surgery or radiotherapy) in phase II clinical trials [23,24], additional data are required to define how GTN should be utilized in cancer therapy. Although we cannot extrapolate to humans the concentration of GTN used for our *in vitro* and *in vivo* findings, we provide here a new rationale to overcome chemotherapy-induced IL-6 production that should be considered for future GTN-based clinical trials.

In conclusion, we demonstrated that GTN can act upstream of STAT3 activation within the JAK2-STAT3 signaling. Our study provides evidence to consider the potential efficacy of IL-6 blockade in TNBC by the NO-donor GTN.

4. Materials and Methods

4.1. Cancer Cell Lines

Human MDA-MB-231 and murine 4T1 TNBC cell lines and murine macrophage-like cell line RAW 264.7 were obtained from ATCC. All cell lines were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) (37 °C, 5% CO₂), and were tested and certified as mycoplasma-free before use.

4.2. Drug, Reagents and Recombinant Proteins

The NO-releasing drug glyceryl trinitrate (GTN) was purchased from Merk (Lyon, France). Nitronal (GTN) infusion solution, 1 mg/mL (Pohl-Boskamp, Hohenlockstedt, Germany) was used for *in vivo* experiments. S-nitrosocysteine (SNOC), was prepared as described previously [52]. Carboplatin was obtained from the Centre Georges François Leclerc (CGFL) pharmacy. S-methylmethane thiosulfonate (MMTS), and carboxyP-TIO (cPTIO) were purchased from Sigma-Aldrich and biotin-HPDP from Perbio Science (Brebrières, France). Recombinant murine and human IL-6 were purchased from Peprotech (Neuilly sur Seine, France) and TGF- β 1 from R&D systems (Bio-Techne, Lille, France).

4.3. Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)

Total RNA was extracted from cells using Trizol (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Using M-MLV reverse transcriptase, random primers and RNase inhibitor, 500 ng of RNA were reverse transcribed into cDNA according manufacturer's protocol (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). cDNA was quantified by real-time PCR with Sybr Green PCR Master mix (Invitrogen) on a 7500 fast Real-Time PCR System (Life technologies, Thermo Fischer Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). mRNA abundance was calculated according to the change-in-cycling-threshold (Δ Ct) method and data represented relatively to reference gene mRNA (β -actin). Primers: hIL-6 for: ACCCCCAGGAGAAGATTCCA; hIL-6 rev: GGGTCAGGGGTGGTTATTGC; hAct β for: AGAGCTACGAGCTGCCTGAC; hAct β rev: AGCACTGTGTTGGCGTACAG; mL-6 for: AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGAT; mL-6 rev: GAGAGCATTGGAAATTGGGGT; mAct β for: TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT; mAct β rev: ATGGAGGGGAATACAGCCCC.

4.4. Griess Assay

The Griess assay quantifies the conversion of NO to nitrite (NO₂⁻). Cells were seeded in 96-well plates in complete RPMI medium (200 µL/well). After 24 h and 48 h of treatment, NO₂⁻ level was quantified by incubating 100 µL of culture supernatant with 100 µL of Griess' reagents (solutions A and B at 1:1 ratio). Solution A composition: N-1-(Naphthyl)ethylenediamine hypochlorite. Solution B composition: p-aminobenzene-sulfonamide/H₃PO₄ 5%. After 15 min incubation, absorbance was read at 550 nm (corrected at 690 nm).

4.5. Proliferation Assay (MTS)

Cells were seeded in 96-well plates in complete RPMI medium (200 µL/well). After 48 h of treatment, cell proliferation was evaluated by adding MTS ((3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) (Promega). Absorbance was read after 2 h at 490 nm.

4.6. Apoptosis Quantification

Cells were seeded in 6-well plates in complete RPMI medium (2 mL/well). After 24 h and 48 h of treatment, apoptosis was evaluated by flow cytometry using AnnexinV-FITC/7-AAD staining (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). The percentage of apoptotic cells were evaluated.

4.7. Wound Healing Assay

MDA-MB-231 and 4T1 cells were seeded into 6-well tissue culture plate at a density that, after growth overnight, allowed cells to reach approximately 80% confluence as a monolayer. A straight scratch was made on the monolayer using a 200 µL pipette tip. Then, the cells were washed gently with PBS three times and further cultured with RPMI complete medium. Representative pictures were taken, to measure gap width at 0 h and after 16 h of incubation. Four pictures per experimental condition and time point were used to measure gap width using ImageJ software (Rockville, MD, USA)

4.8. Transwell Migration and Invasion Assays

Migration and invasion assays were performed using transwell systems (24-well inserts without or with Matrigel, respectively, 8 µm pore size; Corning). Briefly, 4T1 cells were seeded onto the top chamber in RPMI complete medium. The bottom chamber was filled with RPMI complete medium (10% FBS) in the presence or absence of the indicated treatment. After 16 h, cells were removed gently from the top side of the transwell using a cotton-tipped swab. Each insert was fixed with methanol, stained with crystal violet and solubilized with 37% acetic acid. Then, optical density at 620 nm was measured.

4.9. Biotin Switch Assay (BSA)

The BSA was performed as described previously [53]. Briefly, 50 × 10⁶ of cells were treated with GTN or SNO at the indicated concentration and for the indicated time. Cells were harvested, washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and lysed in non denaturing nitrosothiol, SNO lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 300 mM NaCl, 5 mM ethylenediaminetetraacetic (EDTA), 0.1 mM neocuproine, 1% Triton X-100) supplemented with 1 X protease inhibitors cocktail. All protein samples were normalized to 0.5 mg/mL in 10 mL of lysis buffer and free thiols were blocked by four volumes of blocking buffer (HENS buffer: 250 mM Hepes, pH 7.7, 1 mM EDTA, 0.1 mM neocuproine, 1% sodium dodecyl sulfate; containing 20 mM methyl methanethiosulfonate (MMTS)) at 50 °C for 20 min. After removing excess MMTS and washing proteins extracts twice by acetone precipitation, protein pellets were re-suspended in 1 mL of HENS buffer containing 1 mM ascorbate and 1 mM biotin-HPDP. Proteins were then recovered by two precipitations with acetone. Total biotinylated proteins were purified by precipitation on neutravidin beads and eluted with 2X blue Laemmli buffer (10 min, 95 °C) for further analysis by Western blotting.

4.10. Animal and Ethics Statement

Seven-week-old female Balb/c mice (total number of animals used $n = 15$) were purchased from the animal care facility at the University of Burgundy (France). The mice were acclimatized to the conventional housing system for 7 days before the period of study. All animals were observed by the animal care staff on a daily basis. Behavioral observations during the experiment were monitored by the research staff. Mice were housed at 22 ± 2 °C in a 12 h light/dark cycle. For ethical reasons, when the volume of the primary tumor reached ~ 1500 mm³, mice are sacrificed. During the period of this study, no mice were excluded. The experiments were approved by the local Ethics Committee "Comité d'éthique de l'expérimentation animale Grand Campus Dijon" (C2 EA Grand Campus Dijon no 105) protocol code 23450.

4.11. In Vivo Syngeneic Mouse Model of Breast Metastasis Formation

Mice (one cage of 10 mice in a first experiment and one cage of 20 mice in a second experiment) were subcutaneously inoculated in the right flank with mycoplasma-free 4T1 cells (1×10^4 cells in 100 μ L) under anesthesia by continuous inhalation of 4% isoflurane gas. After 1 week, mice were randomly assigned to two groups ($n = 5$ per cage in the first experiment and $n = 10$ in the second experiment), control group (0.9% NaCl) or treated group (Nitronal[®] 1 mg/mL, Pohl Boskamp, Hohenlockstedt, Germany). No sample size calculation was done. S.G., O.B., C.R. and S.P. were aware of the group allocation at the different stages of the experiment. Both groups were injected subcutaneously twice a week with (100 μ L of either Nitronal or 0.9% NaCl). All mice received 9 injections in total (either Nitronal or 0.9% NaCl), over a time period of 29 days. After, all the mice were sacrificed and lung tissues were excised, inflated and fixed in formalin for histology analysis [54].

4.12. Histology and Metastases Assessment

Several sections of lungs were paraffin-embedded and stained by hematoxylin and eosin (H&E) (Histology facility CellimaP, University of Burgundy). Metastatic areas per total lung section areas were quantified using QuPath software (Version: 0.2.3, University of Edinburgh [55]). The result is reported as the percentage (%) of metastatic area to total lung area per lung section.

4.13. Western Blotting

Whole-cell lysates were prepared by lysing the cells in lysis buffer (150 mM NaCl, 150 mM Tris HCl, pH 7.4, 1% SDS and 1 mM sodium orthovanadate, supplemented with 1 X protease inhibitor cocktail). Viscosity of protein extract was reduced by sonication or reduced by several passages through a 26-gauge needle. Protein concentrations were measured using the Bio-Rad DC protein assay kit (Marnes-la-Coquette, France). Thirty or fifty micrograms of protein were incubated in loading buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10% β -mercaptoethanol, 4.6% SDS, 20% glycerol and 0.003% bromophenol blue) for 5 min at 95 °C. Proteins were separated by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were blocked in Tris-buffered saline (TBS) containing 8% BSA at room temperature for one hour, and incubated with primary antibody diluted in TBS 0.1% Tween-20 with 2% BSA overnight at 4 °C. Membranes were washed three times in TBS 0.1% Tween-20 and further incubated with corresponding secondary antibody for one hour at room temperature. After 3 washes in TBS 0.1% Tween-20, proteins were revealed using the enhanced chemiluminescence detection kit and ChemiDoc imager (Bio-Rad).

4.14. Antibodies

The antibodies used in this study included the following: anti-IL-6 neutralizing antibody (R&D systems), rabbit anti-JAK2, rabbit anti-phospho (Tyr1007-10008)-JAK2, rabbit anti-STAT3, rabbit anti-phospho (Tyr705)-STAT3, rabbit anti-Vimentin, rabbit anti-Snail (Cell Signaling); mouse anti-Twist, mouse anti-MMP9, goat anti- β -actin, mouse

anti-HSC70 (Santa Cruz); peroxidase affini-pure anti-mouse IgG and peroxidase affini-pure anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch).

4.15. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism software (version 6.01, www.graphpad.com, 21 September 2012). Significant differences were evaluated using the one-way ANOVA test or the one-tailed Mann–Whitney test used for comparing data (means \pm SEM) from in vitro experiments. For in vivo analysis, the one-tailed Mann–Whitney non-parametrical test was used to compare the control group versus the treated group (means with SEM) with 90% confidence level. $p < 0.1$ was considered statistically significant.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms22168449/s1>.

Author Contributions: Conceptualization, S.P.; Formal analysis, S.B., S.G., R.S., O.B., C.R., V.D., A.B. and S.P.; Funding acquisition, S.P.; Investigation, S.B., S.G., R.S., O.B., C.R. and S.P.; Methodology, S.B., S.G., R.S., O.B., C.R., V.D. and S.P.; Project administration, S.P.; Software, V.D.; Supervision, S.P.; Validation, S.B., S.G., R.S., O.B. and C.R.; Visualization, S.B., S.G., R.S. and S.P.; Writing—original draft, S.B., S.G. and S.P.; Writing—review & editing, S.B., S.G., R.S., O.B., C.R., V.D., A.B. and S.P. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The authors acknowledge the financial support from “Région Bourgogne” and “La Ligue Contre le Cancer–Conférence de Coordination InterRégionale Est (CCIR Est) (grant no. 2019-0043)”. S. Bouaouiche is a recipient of a PhD fellowship from “La Ligue Contre le Cancer” (grant no. GB/MA/CD/EP-12014). O. Burgy is supported by the French “Investissements d’Avenir” program, project ISITE-BFC (contract ANR-15-IDEX-0003).

Institutional Review Board Statement: The study was approved by the local Ethics Committee “Comité d’éthique de l’expérimentation animale Grand Campus Dijon” (C2 EA Grand Campus Dijon no 105), protocol code 23450, date of approval (December 2019).

Acknowledgments: We thank T. Ponnelle for immunohistochemistry analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Bianchini, G.; Balko, J.M.; Mayer, I.A.; Sanders, M.E.; Gianni, L. Triple-negative breast cancer: Challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2016**, *13*, 674–690. [[CrossRef](#)]
- Di Leo, A.; Curigliano, G.; Diéras, V.; Malorni, L.; Sotiriou, C.; Swanton, C.; Thompson, A.; Tutt, A.; Piccart, M. New approaches for improving outcomes in breast cancer in Europe. *Breast* **2015**, *24*, 321–330. [[CrossRef](#)]
- Ma, J.H.; Qin, L.; Li, X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*, 33. [[CrossRef](#)]
- Qiu, S.Q.; Waaijer, S.J.H.; Zwager, M.C.; de Vries, E.G.E.; van der Vegt, B.; Schröder, C.P. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player? *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *70*, 178–189. [[CrossRef](#)]
- Martins, D.; Schmitt, F. Microenvironment in breast tumorigenesis: Friend or foe? *Histol. Histopathol.* **2018**, 18021. [[CrossRef](#)]
- Barbazán, J.; Matic Vignjevic, D. Cancer associated fibroblasts: Is the force the path to the dark side? *Curr. Opin. Cell Biol.* **2018**, *56*, 71–79. [[CrossRef](#)]
- Yaacoub, K.; Pedoux, R.; Tarte, K.; Guillaudeux, T. Role of the tumor microenvironment in regulating apoptosis and cancer progression. *Cancer Lett.* **2016**, *378*, 150–159. [[CrossRef](#)]
- Heinrich, P.C.; Behrmann, I.; Haan, S.; Hermanns, H.M.; Müller-Newen, G.; Schaper, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.* **2003**, *374*, 1–20. [[CrossRef](#)]
- Grivnenkov, S.; Karin, M. Autocrine IL-6 signaling: A key event in tumorigenesis? *Cancer Cell* **2008**, *13*, 7–9. [[CrossRef](#)]
- Landskron, G.; De la Fuente, M.; Thuwajit, P.; Thuwajit, C.; Hermoso, M.A. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Res.* **2014**, *2014*, 149185. [[CrossRef](#)]
- Hou, L.; Xie, S.; Li, G.; Xiong, B.; Gao, Y.; Zhao, X.; Hu, J.; Deng, S.; Jiang, J. IL-6 Triggers the Migration and Invasion of Oestrogen Receptor-Negative Breast Cancer Cells via Regulation of Hippo Pathways. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **2018**, *123*, 549–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cho, Y.A.; Sung, M.K.; Yeon, J.Y.; Ro, J.; Kim, J. Prognostic role of interleukin-6, interleukin-8, and leptin levels according to breast cancer subtype. *Cancer Res. Treat.* **2013**, *45*, 210–219. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Dethlefsen, C.; Højfeldt, G.; Hojman, P. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **2013**, *138*, 657–664. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Nakashima, J.; Tachibana, M.; Horiguchi, Y.; Oya, M.; Ohigashi, T.; Asakura, H.; Murai, M. Serum interleukin 6 as a prognostic factor in patients with prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* **2000**, *6*, 2702–2706.
15. Nakashima, J. Prognostic significance of interleukin-6 in patients with prostate cancer. *Nihon Rinsho* **2002**, *60*, 165–169.
16. Gudbrandsdottir, G.; Aarstad, H.H.; Bostad, L.; Hjelle, K.M.; Aarstad, H.J.; Bruserud, Ø.; Tvedt, T.H.A.; Beisland, C. Serum levels of the IL-6 family of cytokines predict prognosis in renal cell carcinoma (RCC). *Cancer Immunol. Immunother.* **2021**, *70*, 19–30. [[CrossRef](#)]
17. Lippitz, B.E.; Harris, R.A. Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1093722. [[CrossRef](#)]
18. Bournazou, E.; Bromberg, J. Targeting the tumor microenvironment: JAK-STAT3 signaling. *JAKSTAT* **2013**, *2*, e23828. [[CrossRef](#)]
19. Yu, H.; Lee, H.; Herrmann, A.; Buettner, R.; Jove, R. Revisiting STAT3 signalling in cancer: New and unexpected biological functions. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 736–746. [[CrossRef](#)]
20. Yu, H.; Pardoll, D.; Jove, R. STATs in cancer inflammation and immunity: A leading role for STAT3. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 798–809. [[CrossRef](#)]
21. Rossi, J.F.; Lu, Z.Y.; Jourdan, M.; Klein, B. Interleukin-6 as a therapeutic target. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 1248–1257. [[CrossRef](#)]
22. Plenchette, S.; Romagny, S.; Laurens, V.; Bettaieb, A. NO and cancer: Itinerary of a double agent. *Med. Sci. (Paris)* **2016**, *32*, 625–633. [[CrossRef](#)]
23. Yasuda, H.; Yamaya, M.; Nakayama, K.; Sasaki, T.; Ebihara, S.; Kanda, A.; Asada, M.; Inoue, D.; Suzuki, T.; Okazaki, T.; et al. Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 688–694. [[CrossRef](#)]
24. Siemens, D.R.; Heaton, J.P.; Adams, M.A.; Kawakami, J.; Graham, C.H. Phase II study of nitric oxide donor for men with increasing prostate-specific antigen level after surgery or radiotherapy for prostate cancer. *Urology* **2009**, *74*, 878–883. [[CrossRef](#)]
25. Kiss, E.; Abdelwahab, E.H.M.M.; Steib, A.; Papp, E.; Torok, Z.; Jakab, L.; Smuk, G.; Sarosi, V.; Pongracz, J.E. Cisplatin treatment induced interleukin 6 and 8 production alters lung adenocarcinoma cell migration in an oncogenic mutation dependent manner. *Respir Res* **2020**, *21*, 120. [[CrossRef](#)]
26. Davidson, A.; Veillard, A.S.; Tognela, A.; Chan, M.M.; Hughes, B.G.; Boyer, M.; Briscoe, K.; Begbie, S.; Abdi, E.; Crombie, C.; et al. A phase III randomized trial of adding topical nitroglycerin to first-line chemotherapy for advanced nonsmall-cell lung cancer: The Australasian lung cancer trials group NITRO trial. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 2280–2286. [[CrossRef](#)]
27. Hao, Y.; Baker, D.; Ten Dijke, P. TGF- β -Mediated Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 2767. [[CrossRef](#)]
28. Wahba, H.A.; El-Hadaad, H.A. Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer. *Cancer Biol. Med.* **2015**, *12*, 106–116. [[CrossRef](#)]
29. Korde, L.A.; Somerfield, M.R.; Carey, L.A.; Crews, J.R.; Denduluri, N.; Hwang, E.S.; Khan, S.A.; Loibl, S.; Morris, E.A.; Perez, A.; et al. Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline. *J. Clin. Oncol.* **2021**, JCO2003399. [[CrossRef](#)]
30. Heo, T.H.; Wahler, J.; Suh, N. Potential therapeutic implications of IL-6/IL-6R/gp130-targeting agents in breast cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 15460–15473. [[CrossRef](#)]
31. Kang, S.; Tanaka, T.; Narazaki, M.; Kishimoto, T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity* **2019**, *50*, 1007–1023. [[CrossRef](#)]
32. Stover, D.G.; Gil Del Alcazar, C.R.; Brock, J.; Guo, H.; Overmoyer, B.; Balko, J.; Xu, Q.; Bardia, A.; Tolaney, S.M.; Gelman, R.; et al. Phase II study of ruxolitinib, a selective JAK1/2 inhibitor, in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *NPJ Breast Cancer* **2018**, *4*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Plenchette, S.; Romagny, S.; Laurens, V.; Bettaieb, A. S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 507–515. [[CrossRef](#)]
34. Elsasser, T.H.; Kahl, S.; Li, C.J.; Sartin, J.L.; Garrett, W.M.; Rodrigo, J. Caveolae nitration of Janus kinase-2 at the 1007Y-1008Y site: Coordinating inflammatory response and metabolic hormone readjustment within the somatotrophic axis. *Endocrinology* **2007**, *148*, 3803–3813. [[CrossRef](#)]
35. Smith, J.K.; Patil, C.N.; Patlolla, S.; Gunter, B.W.; Booz, G.W.; Duhé, R.J. Identification of a redox-sensitive switch within the JAK2 catalytic domain. *Free Radic. Biol. Med.* **2012**, *52*, 1101–1110. [[CrossRef](#)]
36. Singh, I.; Kim, J.; Singh, A.K.; Sharma, A.K.; Won, J.S. STAT3 Regulation By S-Nitrosylation: Implication In Cancer. *Redox Biol.* **2015**, *5*, 416–417. [[CrossRef](#)]
37. Kim, J.; Won, J.S.; Singh, A.K.; Sharma, A.K.; Singh, I. STAT3 regulation by S-nitrosylation: Implication for inflammatory disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 2514–2527. [[CrossRef](#)]
38. Cheteh, E.H.; Sarne, V.; Ceder, S.; Bianchi, J.; Augsten, M.; Rundqvist, H.; Egevad, L.; Östman, A.; Wiman, K.G. Interleukin-6 derived from cancer-associated fibroblasts attenuates the p53 response to doxorubicin in prostate cancer cells. *Cell Death Discov.* **2020**, *6*, 42. [[CrossRef](#)]
39. Walsh, E.M.; Keane, M.M.; Wink, D.A.; Callagy, G.; Glynn, S.A. Review of Triple Negative Breast Cancer and the Impact of Inducible Nitric Oxide Synthase on Tumor Biology and Patient Outcomes. *Crit. Rev. Oncog.* **2016**, *21*, 333–351. [[CrossRef](#)]

40. Granados-Principal, S.; Liu, Y.; Guevara, M.L.; Blanco, E.; Choi, D.S.; Qian, W.; Patel, T.; Rodriguez, A.A.; Cusimano, J.; Weiss, H.L.; et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* **2015**, *17*, 25. [[CrossRef](#)]
41. Dávila-González, D.; Choi, D.S.; Rosato, R.R.; Granados-Principal, S.M.; Kuhn, J.G.; Li, W.F.; Qian, W.; Chen, W.; Kozielski, A.J.; Wong, H.; et al. Pharmacological Inhibition of NOS Activates ASK1/JNK Pathway Augmenting Docetaxel-Mediated Apoptosis in Triple-Negative Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 1152–1162. [[CrossRef](#)]
42. Jin, K.; Pandey, N.B.; Popel, A.S. Simultaneous blockade of IL-6 and CCL5 signaling for synergistic inhibition of triple-negative breast cancer growth and metastasis. *Breast Cancer Res.* **2018**, *20*, 54. [[CrossRef](#)]
43. Hartman, Z.C.; Poage, G.M.; den Hollander, P.; Tsimelzon, A.; Hill, J.; Panupinthu, N.; Zhang, Y.; Mazumdar, A.; Hilsenbeck, S.G.; Mills, G.B.; et al. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3470–3480. [[CrossRef](#)]
44. Chavey, C.; Bibeau, F.; Gourgou-Bourgade, S.; Burlinchnon, S.; Boissière, F.; Laune, D.; Roques, S.; Lazennec, G. Oestrogen receptor negative breast cancers exhibit high cytokine content. *Breast Cancer Res.* **2007**, *9*, R15. [[CrossRef](#)]
45. Jayatilaka, H.; Tyle, P.; Chen, J.J.; Kwak, M.; Ju, J.; Kim, H.J.; Lee, J.S.H.; Wu, P.H.; Gilkes, D.M.; Fan, R.; et al. Synergistic IL-6 and IL-8 paracrine signalling pathway infers a strategy to inhibit tumour cell migration. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15584. [[CrossRef](#)]
46. Salgado, R.; Junius, S.; Benoy, I.; Van Dam, P.; Vermeulen, P.; Van Marck, E.; Huget, P.; Dirix, L.Y. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int. J. Cancer* **2003**, *103*, 642–646. [[CrossRef](#)]
47. Bachelot, T.; Ray-Coquard, I.; Menetrier-Caux, C.; Rastkha, M.; Duc, A.; Blay, J.Y. Prognostic value of serum levels of interleukin 6 and of serum and plasma levels of vascular endothelial growth factor in hormone-refractory metastatic breast cancer patients. *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 1721–1726. [[CrossRef](#)]
48. Benoy, I.H.; Salgado, R.; Van Dam, P.; Geboers, K.; Van Marck, E.; Scharpé, S.; Vermeulen, P.B.; Dirix, L.Y. Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 7157–7162. [[CrossRef](#)]
49. Dingemans, A.M.; Groen, H.J.; Herder, G.J.; Stigt, J.A.; Smit, E.F.; Bahce, I.; Burgers, J.A.; van den Borne, B.E.; Biesma, B.; Vincent, A.; et al. A randomized phase II study comparing paclitaxel-carboplatin-bevacizumab with or without nitroglycerin patches in patients with stage IV nonsquamous non-small-cell lung cancer: NVALT12 (NCT01171170)†. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 2286–2293. [[CrossRef](#)]
50. Yasuda, H.; Nakayama, K.; Watanabe, M.; Suzuki, S.; Fuji, H.; Okinaga, S.; Kanda, A.; Zayasu, K.; Sasaki, T.; Asada, M.; et al. Nitroglycerin treatment may enhance chemosensitivity to docetaxel and carboplatin in patients with lung adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2006**, *12*, 6748–6757. [[CrossRef](#)]
51. Arrieta, O.; Blake, M.; de la Mata-Moya, M.D.; Corona, F.; Turcott, J.; Orta, D.; Alexander-Alatorre, J.; Gallardo-Rincón, D. Phase II study. Concurrent chemotherapy and radiotherapy with nitroglycerin in locally advanced non-small cell lung cancer. *Radiother. Oncol.* **2014**, *111*, 311–315. [[CrossRef](#)]
52. Jourd’heuil, D.; Gray, L.; Grisham, M.B. S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2000**, *273*, 22–26. [[CrossRef](#)]
53. Bettaieb, A.; Paul, C.; Plenchette, S. Exploration of Fas S-Nitrosylation by the Biotin Switch Assay. *Methods Mol. Biol.* **2017**, *1557*, 199–206. [[CrossRef](#)]
54. Burgy, O.; Bellaye, P.S.; Causse, S.; Beltramo, G.; Wettstein, G.; Boutanquoi, P.M.; Goirand, F.; Garrido, C.; Bonniaud, P. Pleural inhibition of the caspase-1/IL-1 β pathway diminishes profibrotic lung toxicity of bleomycin. *Respir. Res.* **2016**, *17*, 162. [[CrossRef](#)]
55. Bankhead, P.; Loughrey, M.B.; Fernández, J.A.; Dombrowski, Y.; McArt, D.G.; Dunne, P.D.; McQuaid, S.; Gray, R.T.; Murray, L.J.; Coleman, H.G.; et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16878. [[CrossRef](#)]

Supplementary Figure S1

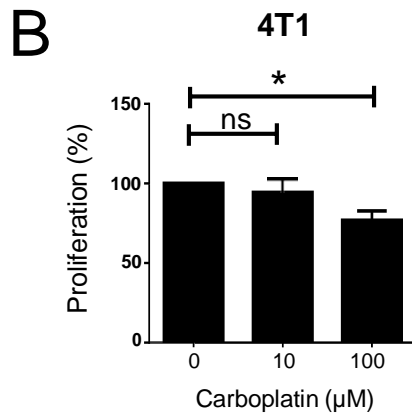
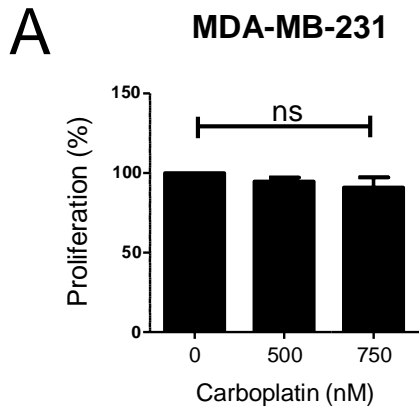


Figure S1. Effect of carboplatin on MDA-MB-231 and 4T1 cell proliferation. **(A)** MDA-MB-231 and **(B)** 4T1 cells were treated with the indicated concentration of carboplatin for 48 h and MTS proliferation assay analysis was performed. Results indicate means \pm SD of three independent experiments. Statistically significant differences were determined using a one-way ANOVA test. * $p < 0.05$; ns: not significant.

Supplementary Figure S2

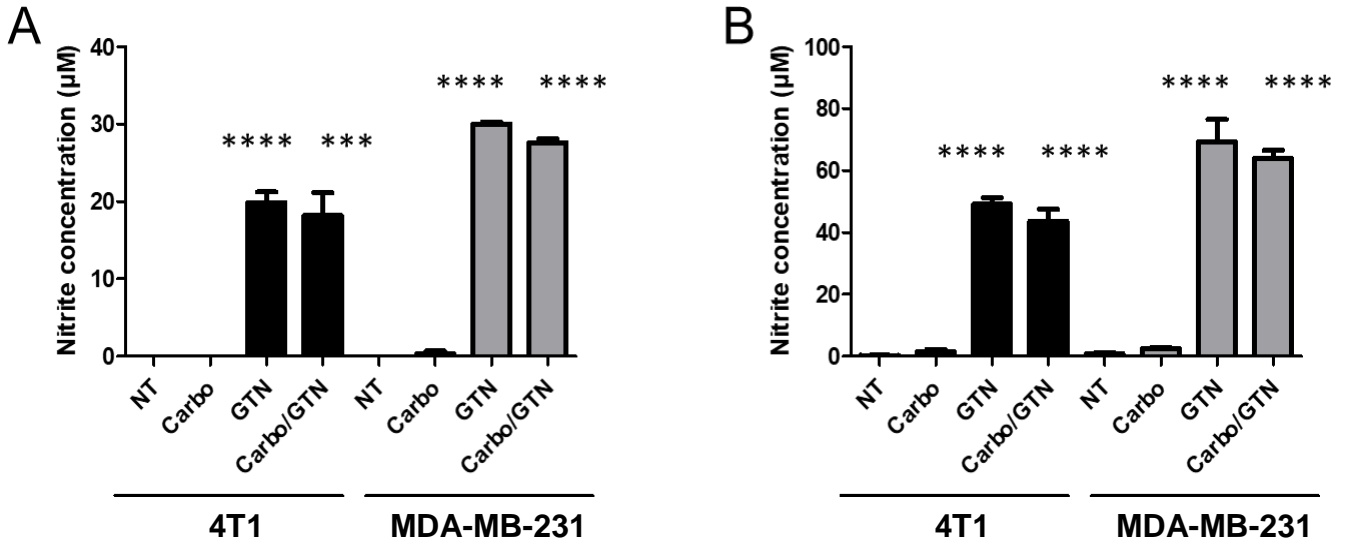


Figure S2. Determination of NO_2^- concentration. The 4T1 and MDA-MB-231 cells were or were not treated with carboplatin (10 μM and 750 nM, respectively), GTN (250 μM), Carboplatin/GTN for (A) 24 h and (B) 48 h, and the Griess reaction assay was performed to measure the concentration of the NO stable end product NO_2^- . Error bars represent SEM of three independent experiments. Significant difference from control was determined using a one-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple comparison post-test. *** $p < 0.01$; **** $p < 0.001$.

Supplementary Figure S3

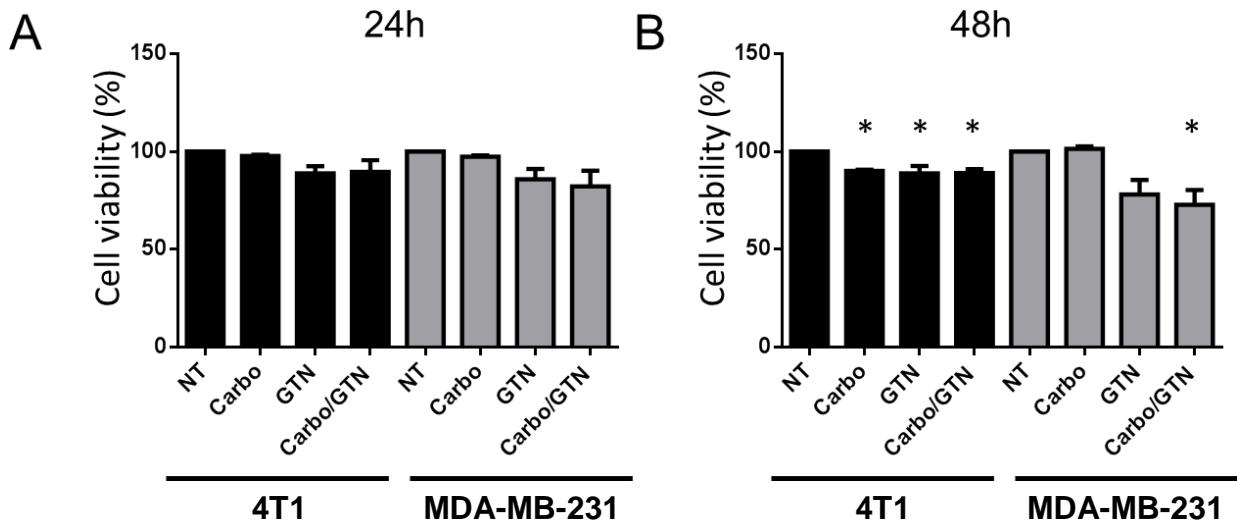


Figure S3. In vitro cytotoxicity on TNBC cell lines after treatment with GTN (250 μ M) alone or in combination with carboplatin. MTS assays evaluating cytotoxicity on 4T1 and MDA-MB-231 cells treated with carboplatin, GTN or carboplatin/GTN after (A) 24 h and (B) 48 h. Experiments were performed in triplicate and repeated three times. Error bars represent SEM. Significant difference from control was determined using a one-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple comparison post-test. * $p < 0.05$.

Supplementary Figure S4

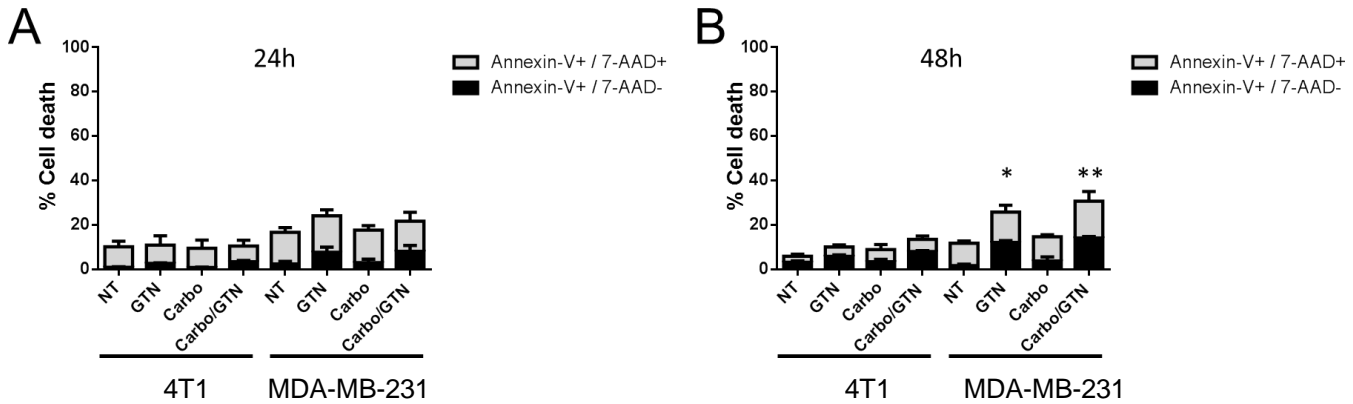


Figure S4. Effect of GTN on apoptosis in 4T1 and MDA-MB-231 cells. The 4T1 and MDA-MB-231 cells were treated with GTN (250 μ M), carboplatin (10 μ M and 750 nM, respectively) and carboplatin/GTN for (A) 24 h and (B) 48 h. Annexin-V/7-AAD double staining was used to assess the quantification of early apoptotic cells (Annexin-V+/7-AAD-) and late apoptotic/necrotic cells (Annexin-V+/7-AAD+). Significant difference from control was determined using a one-way ANOVA test followed by a Bonferroni's multiple comparison post-test. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans le but de trouver des nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement du CSTN, nous avons étudié la capacité du GTN à diminuer la migration et la formation de métastases des cellules cancéreuses, dans un contexte de traitement avec une chimiothérapie standard, le carboplatine. Le choix du CSTN comme modèle d'étude dérive du fait que ce sous-type de cancer du sein reste très difficile à traiter. Il touche principalement des patientes jeunes et est associé à un mauvais pronostic avec formation de foyers métastatiques. La recherche de nouvelles thérapies est donc nécessaire dans ce type de cancer, car la chimiothérapie est, à l'heure actuelle, le seul traitement de référence.

Chimiothérapie et inflammation

Un des problèmes majeurs liés au traitement par chimiothérapie dans le CSTN est la chimiorésistance induite par l'inflammation que ces traitements causent. L'inflammation est due aux cytokines pro-inflammatoires, sécrétées principalement par les adipocytes du tissu mammaire et par les cellules du stroma. Les modifications du tissu adipeux induisent l'inflammation, ainsi que l'accumulation de macrophages sécrétant des forts taux de cytokines pro-inflammatoires (Zahid, Simpson and Brown, 2016; Dieli-Conwright *et al.*, 2018). Les principales cytokines pro-inflammatoires impliquées sont le TNF- α , l'IL-1 β , l'IL-8 et l'IL-6, et sont associées au développement de métastases et à l'agressivité du CSTN. Par exemple, l'accumulation d'IL-8 sécrétée par les CAFs dans le MET, augmente l'inflammation du stroma et la formation de métastases dans le CSTN (Liubomirski *et al.*, 2019). Les CAFs secrètent également de l'IL-6, stimulant la croissance et la prolifération des cellules cancéreuses mammaires, et le « cross-talk » entre ces deux types cellulaires induit la migration et la formation de métastases (Kikuchi *et al.*, 2017). En effet, la cytokine IL-6 joue un rôle prépondérant dans le développement du CSTN. L'accumulation de l'IL-6 dans le MET induit l'activation des voies de signalisation prolifératives au sein des cellules cancéreuses, avec comme conséquence l'accumulation de macrophages M2-like, immunosuppresseurs, induisant le développement d'un phénotype invasif (Malone *et al.*, 2020; Weng *et al.*, 2019). Une étude effectuée par Wang et collaborateurs sur 78 patientes atteintes de CSTN, montre

que 71,4% d'entre elles présentent un fort taux d'IL-6 secrété par les MAT et que cela est lié à un mauvais pronostic (Wang *et al.*, 2016a). La chimiothérapie peut induire l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires dans le MET et contribue à la résistance des cellules cancéreuses vis-à-vis des traitements (Simone *et al.*, 2018). Les sels de platine dont le carboplatine fait partie, ont une forte activité pro-inflammatoire (Jin *et al.*, 2020). Une étude effectuée par Wang et collaborateurs dans le cancer colorectal montre que le carboplatine induit la production d'IL-6 et l'activation du FT STAT3. Cela stimule la prolifération des cellules cancéreuses dans le MET et la combinaison avec un inhibiteur d'IL-6 augmente l'efficacité du traitement (Wang *et al.*, 2016b). L'utilisation du tocilizumab, un anticorps monoclonal ciblant l'IL-6R, est capable de potentialiser l'effet cytotoxique du cisplatine dans le CSTN (Alraouji *et al.*, 2020). Inhiber la voie de l'IL-6 constitue donc une stratégie thérapeutique intéressante pour contrecarrer les mécanismes inflammatoires induits par la chimiothérapie, responsables de la diminution de l'efficacité de ces traitements (Jayatilaka *et al.*, 2017). Dans notre étude nous montrons que le carboplatine induit la production d'IL-6 dans les cellules cancéreuses mammaires triple négatives. Nous nous situons donc dans un contexte inflammatoire post-chimiothérapie, et l'étude du potentiel du GTN sur l'inhibition de la voie de l'IL-6 représente un axe d'étude prometteur.

Le GTN bloque la voie de signalisation de l'IL-6 via JAK2 et STAT3

La capacité du NO à moduler les voies de prolifération cellulaire est un concept bien établi. Par exemple, le NO est capable de moduler la voie de prolifération TNF α /TNFR1, qui induit l'activation de NF κ B. Cette modulation peut se faire à différents niveaux, comme la S-nitrosylation d'IKK β , de p50 ou de p55 (Reynaert *et al.*, 2004; Plenchette *et al.*, 2015; Kelleher *et al.*, 2007). Au sein de notre équipe nous avons montré que le GTN est également capable de bloquer la voie de prolifération TNF α /TNFR1 via la S-nitrosylation de la protéine cIAP1 (Romagny *et al.*, 2018). Dans le but de comprendre l'effet du GTN sur l'activation de la voie de l'IL-6 induite par le carboplatine, nous nous sommes d'abord focalisés sur deux acteurs importants de cette voie de signalisation : la kinase JAK2 et le FT STAT3. Nous avons montré que le carboplatine est, en effet, capable d'activer la voie en induisant une augmentation de la phosphorylation de JAK2 et de STAT3, indispensable à leur activation (Wu *et al.*, 2017). Nous montrons que le GTN est capable de contrecarrer l'augmentation du taux de p-JAK2 et p-STAT3 induit par le carboplatine et, donc, l'activation de la voie. Cet effet est dû au NO libéré

une fois le GTN métabolisé par les cellules, induisant des modifications post traductionnelles comme la S-nitrosylation. En effet, nous montrons pour la première fois que le GTN est capable d'induire la S-nitrosylation de JAK2, ce qui est corrélé à la diminution de sa phosphorylation, ainsi que la diminution du taux de p-STAT3 qui est la cible de JAK2 activée. Dans la littérature, il est connu que JAK2 peut être cible de modifications induites par le NO, comme la nitration au niveau des Tyr^{1007/1008} (Elsasser *et al.*, 2007). Bien que nous montrons la S-nitrosylation de JAK2 par le GTN, nous n'avons pas identifié les cystéines ciblées par cette modification. Cependant, le logiciel GPS-NO nous a permis d'identifier plusieurs cystéines susceptibles d'être S-nitrosylées, dont la Cys⁸⁶⁶ et la Cys⁹¹⁷. Ces cystéines sont intéressantes parce qu'elles sont directement impliquées dans l'activité catalytique de JAK2, et leur inhibition éventuelle induite par le GTN pourrait expliquer la perte de fonction de la protéine que nous avons observée (Mamoon *et al.*, 2007). Afin de démontrer l'implication de ces cystéines dans la S-nitrosylation induite par le GTN, des expériences de mutagenèse dirigée de JAK2 pourraient être effectuées. La protéine STAT3 peut également être S-nitrosylée. Une étude effectuée par Kim et collaborateurs, identifie la Cys²⁵⁹ comme site de S-nitrosylation induite par le S-nitrosoglutathione (GSNO, un donneur de NO), ce qui empêche l'activation de la protéine via l'inhibition de la phosphorylation de la Tyr⁷⁰⁵ (Kim *et al.*, 2014). Dans notre étude nous avons observé qu'en parallèle d'une S-nitrosylation de JAK2, le GTN induit également la S-nitrosylation de STAT3 (données non publiées). La S-nitrosylation de STAT3 pourrait dériver d'une action directe du GTN sur la protéine, ou bien d'un phénomène de trans-nitrosylation. En effet, le NO pourrait être transféré de JAK2 à STAT3 si les deux protéines se trouvent à proximité, mais nous n'avons pas approfondi cet éventuel mécanisme. De plus, étant JAK2 en aval de STAT3, l'inhibition de JAK2 dans notre système suffit pour observer l'effet biologique escompté, soit une diminution de la migration des cellules cancéreuses.

Le rôle du GTN dans la diminution de la migration et des métastases

La diminution de l'activation de JAK2 et STAT3 se traduit avec une perte du pouvoir migratoire et d'invasion des cellules cancéreuses (Zheng *et al.*, 2014). En effet, nous montrons que le carboplatine, à la dose testée, est capable d'induire la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vitro*, et que le GTN est capable de contrecarrer cet effet. Nous montrons également que le carboplatine augmente l'expression des marqueurs de la

TEM, comme MMP9, vimentine, SNAIL et TWIST, et que la combinaison carboplatine/GTN rétabli l'expression basale de ces marqueurs. De plus, cet effet est reproductible *in vivo*, car le GTN se montre capable de diminuer la formation de métastases pulmonaires dans le modèle syngénique 4T1 de cancer du sein triple-négatif chez la souris BALB/c. Mais le rôle du NO dans la diminution de la migration des cellules tumorales n'est pas nouveau, car d'autres donneurs de NO ont montré cet effet. C'est le cas du DETA/NONOate un donneur de NO qui à capable, à des fortes concentrations (supérieures à 500 μ M), d'inhiber l'expression de MMP9 et de contrecarrer la migration des cellules cancéreuses mammaires (Porshneva *et al.*, 2019; Sinha *et al.*, 2006). Le DETA/NONOate, à des fortes concentrations (1 mM) est également capable de bloquer la TEM dans les cellules cancéreuses prostatiques PC-3 via l'inhibition du FT SNAIL (Baritaki *et al.*, 2010). En revanche, des faibles concentrations de NO peuvent avoir l'effet contraire et induire la TEM et la formation de métastases, avec en association un mauvais pronostic chez les patientes atteintes de CSTN (Switzer *et al.*, 2012b). Cela est lié au fait que le rôle antitumoral du NO est strictement lié à sa concentration et contexte-dépendant (Soni *et al.*, 2020).

Cibler la voie de l'IL-6 : le potentiel du NO

Contrecarrer la voie IL-6/JAK2/STAT3 est donc très prometteur en cancérologie et le NO possède un vrai potentiel thérapeutique. Une étude récente a montré l'effet bénéfique de l'utilisation d'une molécule inhibitrice de STAT3 capable de libérer du NO et de bloquer la prolifération des cellules de mélanome mutées BRAF (Kaoud *et al.*, 2020). A l'heure actuelle, aucune étude ne montre le potentiel de la combinaison GTN-carboplatine, mais l'effet bénéfique de la combinaison donneurs de NO – chimiothérapie est de plus en plus considéré. En effet, cela induit une diminution de la TEM avec l'utilisation de doses subtoxiques de chimiothérapie, ce qui pourrait constituer un réel bénéfice dans le traitement des patients (Bonavida and Garban, 2015). Le GTN a donc sa place dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques bloquant la voie de la cytokine IL-6 et pourrait constituer une alternative prometteuse dans le traitement d'un sous-type de cancer mammaire qui reste encore difficilement curable.

Autres perspectives de travail

Comme cité précédemment, l'IL-8 est également importante dans la prolifération des cellules cancéreuses ainsi que le développement de métastases (Jayatilaka *et al.*, 2017). Au cours de notre étude, nous avons étudié l'effet du carboplatine sur l'expression de l'IL-8, en montrant une modulation de cette cytokine au même titre que l'IL-6 (données non publiées). Il est possible que le GTN module également la voie de signalisation de cette cytokine, et cela constitue donc une perspective de travail intéressante.

Enfin, bien que nous montrons la capacité du GTN seul à diminuer la formation de métastases *in vivo*, l'effet de la combinaison avec le carboplatine reste encore à étudier.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans nos études nous montrons deux stratégies thérapeutiques intéressantes pour le traitement de deux types de cancer : le cancer colorectal et le CSTN. Dans le cadre du cancer colorectal, nous montrons le potentiel du H89 à stimuler le système immunitaire afin de freiner la prise et la croissance tumorale, tandis que dans le cas du CSTN nous avons étudié le potentiel du GTN, via le NO, à bloquer la voie proliférative liée à la cytokine IL-6 dans les cellules cancéreuses. Ces deux molécules agissent en ciblant des kinases clés dans le développement tumoral : Akt qui est cruciale dans l'activation lymphocytaire et JAK2 qui intervient dans la prolifération des cellules cancéreuses et dans le développement d'un phénotype invasif. Dans les deux cas, et dans la perspective de développement de thérapies innovantes chez les patients, l'administration de ces molécules seules n'est pas envisageable mais elle présente un intérêt dans une démarche de combinaison thérapeutique.

Dans le cas du H89, nous avons testé sa combinaison avec le 5-FU, mais nous n'avons pas approfondi les mécanismes moléculaires associés à cette combinaison. Cependant cette combinaison est intéressante, car le H89 potentialise l'effet de la chimiothérapie, condition recherchée et essentielle dans le développement de nouvelles thérapies. Des études plus poussées seront nécessaires afin de mieux comprendre les voies de signalisation associées à l'effet du H89. Ces études permettraient de mieux comprendre avec quelles autres molécules associer cet inhibiteur de kinases, que ce soit des traitements en chimiothérapie, d'autres inhibiteurs de kinases ou des inhibiteurs de PCI.

Dans le cas du NO et l'inhibition de la voie de l'IL-6, nous avons testé la combinaison GTN/carboplatine *in vitro*, mais nous n'avons effectué aucune étude sur l'efficacité de la combinaison *in vivo*. Cette étude sera importante afin de mieux comprendre le potentiel de ce traitement combiné et envisager une application en clinique. De plus, il serait intéressant d'étudier la combinaison avec d'autres sels de platine (comme le cisplatine).

Le développement des combinaisons thérapeutiques avec nos molécules, aussi bien dans le cas du H89 que dans le cas du GTN, ouvre des nouvelles options thérapeutiques. Nous savons que la multi-thérapie permet de retarder les mécanismes de résistance qui sont

fréquents avec les monothérapies. De plus, l'utilisation de plusieurs traitements concomitants permet d'obtenir un effet synergique et de les utiliser potentiellement à plus faible dose. Des études plus approfondies restent donc à effectuer afin de mieux comprendre le potentiel thérapeutique de nos molécules et leur combinaison avec d'autres traitements anti-cancéreux, mais nos résultats restent prometteurs.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (InVs), I. d. V. S.
- Abdelgalil, A. A., Al-Kahtani, H. M. and Al-Jenoobi, F. I. (2020) 'Erlotinib', *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 45, pp. 93-117.
- Abdelgalil, A. A., Alkahtani, H. M. and Al-Jenoobi, F. I. (2019) 'Sorafenib', *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 44, pp. 239-266.
- Ades, F., Zardavas, D., Bozovic-Spasojevic, I., Pugliano, L., Fumagalli, D., de Azambuja, E., Viale, G., Sotiriou, C. and Piccart, M. (2014) 'Luminal B breast cancer: molecular characterization, clinical management, and future perspectives', *J Clin Oncol*, 32(25), pp. 2794-803.
- Ai, L., Xu, A. and Xu, J. (2020) 'Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond', *Adv Exp Med Biol*, 1248, pp. 33-59.
- Al-Mahmood, S., Sapiezynski, J., Garbuzenko, O. B. and Minko, T. (2018) 'Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options', *Drug Deliv Transl Res*, 8(5), pp. 1483-1507.
- Alderton, W. K., Cooper, C. E. and Knowles, R. G. (2001) 'Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition', *Biochem J*, 357(Pt 3), pp. 593-615.
- Alimoradi, H., Greish, K., Gamble, A. B. and Giles, G. I. (2019) 'Controlled Delivery of Nitric Oxide for Cancer Therapy', *Pharm Nanotechnol*, 7(4), pp. 279-303.
- Alraouji, N. N., Al-Mohanna, F. H., Ghebeh, H., Arafah, M., Almeer, R., Al-Tweigeri, T. and Aboussekhra, A. (2020) 'Tocilizumab potentiates cisplatin cytotoxicity and targets cancer stem cells in triple-negative breast cancer', *Mol Carcinog*, 59(9), pp. 1041-1051.
- Ambts, S., Merriam, W. G., Bennett, W. P., Felley-Bosco, E., Ogunfusika, M. O., Oser, S. M., Klein, S., Shields, P. G., Billiar, T. R. and Harris, C. C. (1998) 'Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression', *Cancer Res*, 58(2), pp. 334-41.
- Anfray, C., Umbarino, A., Andón, F. T. and Allavena, P. (2019) 'Current Strategies to Target Tumor-Associated-Macrophages to Improve Anti-Tumor Immune Responses', *Cells*, 9(1).
- Angelova, M., Charoentong, P., Hackl, H., Fischer, M. L., Snajder, R., Krogsdam, A. M., Waldner, M. J., Bindea, G., Mlecnik, B., Galon, J. and Trajanoski, Z. (2015) 'Characterization of the immunophenotypes and antigenomes of colorectal cancers reveals distinct tumor escape mechanisms and novel targets for immunotherapy', *Genome Biol*, 16, pp. 64.
- Ansell, S. M., Lesokhin, A. M., Borrello, I., Halwani, A., Scott, E. C., Gutierrez, M., Schuster, S. J., Millenson, M. M., Cattry, D., Freeman, G. J., Rodig, S. J., Chapuy, B., Ligon, A. H., Zhu, L., Grosso, J. F., Kim, S. Y., Timmerman, J. M., Shipp, M. A. and Armand, P. (2015) 'PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma', *N Engl J Med*, 372(4), pp. 311-9.
- Aruga, T., Suzuki, E., Saji, S., Horiguchi, S., Horiguchi, K., Sekine, S., Kitagawa, D., Funata, N., Toi, M., Sugihara, K. and Kuroi, K. (2009) 'A low number of tumor-infiltrating FOXP3-positive cells during primary systemic chemotherapy correlates with favorable anti-tumor response in patients with breast cancer', *Oncol Rep*, 22(2), pp. 273-8.
- Assi, R., Kantarjian, H. M., Garcia-Manero, G., Cortes, J. E., Pemmaraju, N., Wang, X., Nogueras-Gonzalez, G., Jabbour, E., Bose, P., Kadia, T., Dinardo, C. D., Patel, K., Bueso-Ramos, C., Zhou, L., Pierce, S., Gergis, R., Tuttle, C., Borthakur, G., Estrov, Z., Luthra, R., Hidalgo-Lopez, J., Verstovsek, S. and Daver, N. (2018) 'A phase II trial of ruxolitinib in combination with azacytidine in myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasms', *Am J Hematol*, 93(2), pp. 277-285.

- Azad, N., Vallyathan, V., Wang, L., Tantishaiyakul, V., Stehlik, C., Leonard, S. S. and Rojanasakul, Y. (2006) 'S-nitrosylation of Bcl-2 inhibits its ubiquitin-proteasomal degradation. A novel antiapoptotic mechanism that suppresses apoptosis', *J Biol Chem*, 281(45), pp. 34124-34.
- Babon, J. J., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Nicola, N. A. and Varghese, L. N. (2014) 'The molecular regulation of Janus kinase (JAK) activation', *Biochem J*, 462(1), pp. 1-13.
- Balkwill, F. (2009) 'Tumour necrosis factor and cancer', *Nat Rev Cancer*, 9(5), pp. 361-71.
- Baritaki, S., Huerta-Yepez, S., Sahakyan, A., Karagiannides, I., Bakirtzi, K., Jazirehi, A. and Bonavida, B. (2010) 'Mechanisms of nitric oxide-mediated inhibition of EMT in cancer: inhibition of the metastasis-inducer Snail and induction of the metastasis-suppressor RKIP', *Cell Cycle*, 9(24), pp. 4931-40.
- Barrios, D. M., Do, M. H., Phillips, G. S., Postow, M. A., Akaike, T., Nghiem, P. and Lacouture, M. E. (2020) 'Immune checkpoint inhibitors to treat cutaneous malignancies', *J Am Acad Dermatol*, 83(5), pp. 1239-1253.
- Bashraheel, S. S., Domling, A. and Goda, S. K. (2020) 'Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine', *Biomed Pharmacother*, 125, pp. 110009.
- Batchu, R. B., Gruzdyn, O. V., Kolli, B. K., Dachepalli, R., Umar, P. S., Rai, S. K., Singh, N., Tavva, P. S., Weaver, D. W. and Gruber, S. A. (2021) 'IL-10 Signaling in the Tumor Microenvironment of Ovarian Cancer', *Adv Exp Med Biol*, 1290, pp. 51-65.
- Bayliss, T. J., Smith, J. T., Schuster, M., Dragnev, K. H. and Rigas, J. R. (2011) 'A humanized anti-IL-6 antibody (ALD518) in non-small cell lung cancer', *Expert Opin Biol Ther*, 11(12), pp. 1663-8.
- Becht, E., de Reyniès, A., Giraldo, N. A., Pilati, C., Buttard, B., Lacroix, L., Selves, J., Sautès-Fridman, C., Laurent-Puig, P. and Fridman, W. H. (2016) 'Immune and Stromal Classification of Colorectal Cancer Is Associated with Molecular Subtypes and Relevant for Precision Immunotherapy', *Clin Cancer Res*, 22(16), pp. 4057-66.
- Benjamin, D., Colombi, M., Moroni, C. and Hall, M. N. (2011) 'Rapamycin passes the torch: a new generation of mTOR inhibitors', *Nat Rev Drug Discov*, 10(11), pp. 868-80.
- Berg, D. J., Davidson, N., Kühn, R., Müller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M. W. and Rennick, D. (1996) 'Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses', *J Clin Invest*, 98(4), pp. 1010-20.
- Bierie, B. and Moses, H. L. (2006) 'TGF-beta and cancer', *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(1-2), pp. 29-40.
- Blaise, G. A., Gauvin, D., Gangal, M. and Authier, S. (2005) 'Nitric oxide, cell signaling and cell death', *Toxicology*, 208(2), pp. 177-92.
- Bode, J. G., Nimmesgern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitt, M., Frisch, W., Häussinger, D., Heinrich, P. C. and Graeve, L. (1999) 'LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages', *FEBS Lett*, 463(3), pp. 365-70.
- Bonavida, B. and Garban, H. (2015) 'Nitric oxide-mediated sensitization of resistant tumor cells to apoptosis by chemo-immunotherapeutics', *Redox Biol*, 6, pp. 486-494.
- Bornstein, S., Schmidt, M., Choonoo, G., Levin, T., Gray, J., Thomas, C. R., Wong, M. and McWeeney, S. (2016) 'IL-10 and integrin signaling pathways are associated with head and neck cancer progression', *BMC Genomics*, 17, pp. 38.
- Bos, R. and Sherman, L. A. (2010) 'CD4+ T-cell help in the tumor milieu is required for recruitment and cytolytic function of CD8+ T lymphocytes', *Cancer Res*, 70(21), pp. 8368-77.
- Bourgeois, C., Rocha, B. and Tanchot, C. (2002) 'A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory', *Science*, 297(5589), pp. 2060-3.
- Boyman, O. and Arenas-Ramirez, N. (2019) 'Development of a novel class of interleukin-2 immunotherapies for metastatic cancer', *Swiss Med Wkly*, 149, pp. w14697.

- Bracci, L., Schiavoni, G., Sistigu, A. and Belardelli, F. (2014) 'Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer', *Cell Death Differ*, 21(1), pp. 15-25.
- Braumüller, H., Wieder, T., Brenner, E., Aßmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Häring, H. U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K. and Röcken, M. (2013) 'T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence', *Nature*, 494(7437), pp. 361-5.
- Bredt, D. S. (1999) 'Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology', *Free Radic Res*, 31(6), pp. 577-96.
- Brincks, E. L. and Woodland, D. L. (2010) 'Novel roles for IL-15 in T cell survival', *F1000 Biol Rep*, 2, pp. 67.
- Brown, J. S., O'Carrigan, B., Jackson, S. P. and Yap, T. A. (2017) 'Targeting DNA Repair in Cancer: Beyond PARP Inhibitors', *Cancer Discov*, 7(1), pp. 20-37.
- Brudno, J. N. and Kochenderfer, J. N. (2019) 'Recent advances in CAR T-cell toxicity: Mechanisms, manifestations and management', *Blood Rev*, 34, pp. 45-55.
- Buchbinder, E. I. and Desai, A. (2016) 'CTLA-4 and PD-1 Pathways: Similarities, Differences, and Implications of Their Inhibition', *Am J Clin Oncol*, 39(1), pp. 98-106.
- Campos-da-Paz, M., Dórea, J. G., Galdino, A. S., Lacava, Z. G. M. and de Fatima Menezes Almeida Santos, M. (2018) 'Carcinoembryonic Antigen (CEA) and Hepatic Metastasis in Colorectal Cancer: Update on Biomarker for Clinical and Biotechnological Approaches', *Recent Pat Biotechnol*, 12(4), pp. 269-279.
- Canel, M., Serrels, A., Frame, M. C. and Brunton, V. G. (2013) 'E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis', *J Cell Sci*, 126(Pt 2), pp. 393-401.
- Carlson, C. A. and Ethier, S. P. (2000) 'Lack of RB protein correlates with increased sensitivity to UV-radiation-induced apoptosis in human breast cancer cells', *Radiat Res*, 154(5), pp. 590-9.
- Carter, N. J. (2014) 'Regorafenib: a review of its use in previously treated patients with progressive metastatic colorectal cancer', *Drugs Aging*, 31(1), pp. 67-78.
- Carter, S. K. (1984) 'Some thoughts on resistance to cancer chemotherapy', *Cancer Treat Rev*, 11 Suppl A, pp. 3-7.
- Carvalho, C., Santos, R. X., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P. J., Santos, M. S. and Moreira, P. I. (2009) 'Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect', *Curr Med Chem*, 16(25), pp. 3267-85.
- Castelli, M. S., McGonigle, P. and Hornby, P. J. (2019) 'The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies', *Pharmacol Res Perspect*, 7(6), pp. e00535.
- Cauley, L. S. and Lefrançois, L. (2013) 'Guarding the perimeter: protection of the mucosa by tissue-resident memory T cells', *Mucosal Immunol*, 6(1), pp. 14-23.
- Cavarretta, I. T., Neuwirt, H., Zaki, M. H., Steiner, H., Hobisch, A., Nemeth, J. A. and Culig, Z. (2008) 'Mcl-1 is regulated by IL-6 and mediates the survival activity of the cytokine in a model of late stage prostate carcinoma', *Adv Exp Med Biol*, 617, pp. 547-55.
- Chambers, A. F., Groom, A. C. and MacDonald, I. C. (2002) 'Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites', *Nat Rev Cancer*, 2(8), pp. 563-72.
- Chaudhary, L. N., Wilkinson, K. H. and Kong, A. (2018) 'Triple-Negative Breast Cancer: Who Should Receive Neoadjuvant Chemotherapy?', *Surg Oncol Clin N Am*, 27(1), pp. 141-153.
- Cheeseman, S. L., Joel, S. P., Chester, J. D., Wilson, G., Dent, J. T., Richards, F. J. and Seymour, M. T. (2002) 'A 'modified de Gramont' regimen of fluorouracil, alone and with oxaliplatin, for advanced colorectal cancer', *Br J Cancer*, 87(4), pp. 393-9.
- Chen, C. L., Loy, A., Cen, L., Chan, C., Hsieh, F. C., Cheng, G., Wu, B., Qualman, S. J., Kunisada, K., Yamauchi-Takahara, K. and Lin, J. (2007) 'Signal transducer and activator of transcription 3

is involved in cell growth and survival of human rhabdomyosarcoma and osteosarcoma cells', *BMC Cancer*, 7, pp. 111.

- Chen, H., Cong, X., Wu, C., Wu, X., Wang, J., Mao, K., Li, J., Zhu, G., Liu, F., Meng, X., Song, J., Sun, X., Wang, X., Liu, S., Zhang, S., Yang, X., Song, Y., Yang, Y. G. and Sun, T. (2020a) 'Intratatumoral delivery of CCL25 enhances immunotherapy against triple-negative breast cancer by recruiting CCR9', *Sci Adv*, 6(5), pp. eaax4690.
- Chen, J., Ye, Y., Liu, P., Yu, W., Wei, F., Li, H. and Yu, J. (2017) 'Suppression of T cells by myeloid-derived suppressor cells in cancer', *Hum Immunol*, 78(2), pp. 113-119.
- Chen, X. R., Yuan, H. H., Guo, J. H., Zhang, W. Y., Li, Q. Q., Huang, G. D., Zhang, Y. J., Jiang, B. and Liu, F. (2020b) 'A signal peptide derived from Hsp60 induces protective cytotoxic T lymphocyte immunity against lymphoid malignancies independently of TAP and classical MHC-I', *Cancer Lett*, 494, pp. 47-57.
- Chen, Z., Zhang, J. and Stamler, J. S. (2002) 'Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12), pp. 8306-11.
- Cheng, H., Wang, L., Mollica, M., Re, A. T., Wu, S. and Zuo, L. (2014) 'Nitric oxide in cancer metastasis', *Cancer Lett*, 353(1), pp. 1-7.
- Ciardiello, D., Vitiello, P. P., Cardone, C., Martini, G., Troiani, T., Martinelli, E. and Ciardiello, F. (2019) 'Immunotherapy of colorectal cancer: Challenges for therapeutic efficacy', *Cancer Treat Rev*, 76, pp. 22-32.
- Clark, J. I., Wong, M. K. K., Kaufman, H. L., Daniels, G. A., Morse, M. A., McDermott, D. F., Agarwala, S. S., Lewis, L. D., Stewart, J. H., Vaishampayan, U., Curti, B., Gonzalez, R., Lutzky, J., Rudraptna, V., Cranmer, L. D., Jeter, J. M., Hauke, R. J., Miletello, G., Milhem, M. M., Amin, A., Richart, J. M., Fishman, M., Hallmeyer, S., Patel, S. P., Van Veldhuizen, P., Agarwal, N., Taback, B., Treisman, J. S., Ernstoff, M. S., Perritt, J. C., Hua, H., Rao, T. B., Dutcher, J. P. and Aung, S. (2017) 'Impact of Sequencing Targeted Therapies With High-dose Interleukin-2 Immunotherapy: An Analysis of Outcome and Survival of Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma From an On-going Observational IL-2 Clinical Trial: PROCLAIM', *Clin Genitourin Cancer*, 15(1), pp. 31-41.e4.
- Claudiani, S. and Apperley, J. F. (2018) 'The argument for using imatinib in CML', *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2018(1), pp. 161-167.
- Cohen, P. (2009) 'Targeting protein kinases for the development of anti-inflammatory drugs', *Curr Opin Cell Biol*, 21(2), pp. 317-24.
- Conlon, K. C., Lugli, E., Welles, H. C., Rosenberg, S. A., Fojo, A. T., Morris, J. C., Fleisher, T. A., Dubois, S. P., Perera, L. P., Stewart, D. M., Goldman, C. K., Bryant, B. R., Decker, J. M., Chen, J., Worthy, T. A., Figg, W. D., Peer, C. J., Sneller, M. C., Lane, H. C., Yovandich, J. L., Creekmore, S. P., Roederer, M. and Waldmann, T. A. (2015) 'Redistribution, hyperproliferation, activation of natural killer cells and CD8 T cells, and cytokine production during first-in-human clinical trial of recombinant human interleukin-15 in patients with cancer', *J Clin Oncol*, 33(1), pp. 74-82.
- Cooley, S., He, F., Bachanova, V., Vercellotti, G. M., DeFor, T. E., Curtsinger, J. M., Robertson, P., Grzywacz, B., Conlon, K. C., Waldmann, T. A., McKenna, D. H., Blazar, B. R., Weisdorf, D. J. and Miller, J. S. (2019) 'First-in-human trial of rhIL-15 and haploidentical natural killer cell therapy for advanced acute myeloid leukemia', *Blood Adv*, 3(13), pp. 1970-1980.
- Cortier, M., Boina-Ali, R., Racoeur, C., Paul, C., Solary, E., Jeannin, J. F. and Bettaieb, A. (2015) 'H89 enhances the sensitivity of cancer cells to glyceryl trinitrate through a purinergic receptor-dependent pathway', *Oncotarget*, 6(9), pp. 6877-86.
- Costa, N. L., Valadares, M. C., Souza, P. P., Mendonça, E. F., Oliveira, J. C., Silva, T. A. and Batista, A. C. (2013) 'Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma', *Oral Oncol*, 49(3), pp. 216-23.
- Costa, R. L. B., Han, H. S. and Gradishar, W. J. (2018) 'Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in triple-negative breast cancer: a review', *Breast Cancer Res Treat*, 169(3), pp. 397-406.
- Coussens, L. M. and Werb, Z. (2002) 'Inflammation and cancer', *Nature*, 420(6917), pp. 860-7.

- Crispin, J. C. and Tsokos, G. C. (2020) 'Cancer immunosurveillance by CD8 T cells', *F1000Res*, 9.
- Crosby, E. J., Hobeika, A. C., Niedzwiecki, D., Rushing, C., Hsu, D., Berglund, P., Smith, J., Osada, T., Gwin Iii, W. R., Hartman, Z. C., Morse, M. A. and Lyerly, H. K. (2020) 'Long-term survival of patients with stage III colon cancer treated with VRP-CEA(6D), an alphavirus vector that increases the CD8+ effector memory T cell to Treg ratio', *J Immunother Cancer*, 8(2).
- Cutts, S. M., Nudelman, A., Rephaeli, A. and Phillips, D. R. (2005) 'The power and potential of doxorubicin-DNA adducts', *IUBMB Life*, 57(2), pp. 73-81.
- D'Angelo, S. P., Russell, J., Lebbé, C., Chmielowski, B., Gambichler, T., Grob, J. J., Kiecker, F., Rabinowits, G., Terheyden, P., Zwiener, I., Bajars, M., Hennessy, M. and Kaufman, H. L. (2018) 'Efficacy and Safety of First-line Avelumab Treatment in Patients With Stage IV Metastatic Merkel Cell Carcinoma: A Preplanned Interim Analysis of a Clinical Trial', *JAMA Oncol*, 4(9), pp. e180077.
- Davidson, A., Veillard, A. S., Tognela, A., Chan, M. M., Hughes, B. G., Boyer, M., Briscoe, K., Begbie, S., Abdi, E., Crombie, C., Long, J., Boyce, A., Lewis, C. R., Varma, S., Broad, A., Muljadi, N., Chinchin, S., Espinoza, D., Coskinas, X., Pavlakis, N., Millward, M., Stockler, M. R., (ALTG), A. L. c. T. G. and ALTG, A. L. c. T. G. (2015) 'A phase III randomized trial of adding topical nitroglycerin to first-line chemotherapy for advanced nonsmall-cell lung cancer: the Australasian lung cancer trials group NITRO trial', *Ann Oncol*, 26(11), pp. 2280-6.
- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M. and Cohen, P. (2000) 'Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors', *Biochem J*, 351(Pt 1), pp. 95-105.
- de Castro-Carpeño, J., Belda-Iniesta, C., Casado Sáenz, E., Hernández Agudo, E., Feliu Batlle, J. and González Barón, M. (2008) 'EGFR and colon cancer: a clinical view', *Clin Transl Oncol*, 10(1), pp. 6-13.
- de Silva, S., Fromm, G., Shuptrine, C. W., Johannes, K., Patel, A., Yoo, K. J., Huang, K. and Schreiber, T. H. (2020) 'CD40 Enhances Type I Interferon Responses Downstream of CD47 Blockade, Bridging Innate and Adaptive Immunity', *Cancer Immunol Res*, 8(2), pp. 230-245.
- Dematteo, R. P., Ballman, K. V., Antonescu, C. R., Maki, R. G., Pisters, P. W., Demetri, G. D., Blackstein, M. E., Blanke, C. D., von Mehren, M., Brennan, M. F., Patel, S., McCarter, M. D., Polikoff, J. A., Tan, B. R., Owzar, K. and Team, A. C. o. S. O. G. A. I. A. G. S. (2009) 'Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet*, 373(9669), pp. 1097-104.
- DeNardo, D. G., Barreto, J. B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N. and Coussens, L. M. (2009) 'CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages', *Cancer Cell*, 16(2), pp. 91-102.
- Dhillon, S. (2018) 'Regorafenib: A Review in Metastatic Colorectal Cancer', *Drugs*, 78(11), pp. 1133-1144.
- Dieli-Conwright, C. M., Parmentier, J. H., Sami, N., Lee, K., Spicer, D., Mack, W. J., Sattler, F. and Mittelman, S. D. (2018) 'Adipose tissue inflammation in breast cancer survivors: effects of a 16-week combined aerobic and resistance exercise training intervention', *Breast Cancer Res Treat*, 168(1), pp. 147-157.
- Diepenbruck, M. and Christofori, G. (2016) 'Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: yes, no, maybe?', *Curr Opin Cell Biol*, 43, pp. 7-13.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M. and Zeiher, A. M. (1997) 'Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases', *J Exp Med*, 185(4), pp. 601-7.
- Dingemans, A. M., Groen, H. J., Herder, G. J., Stigt, J. A., Smit, E. F., Bahce, I., Burgers, J. A., van den Borne, B. E., Biesma, B., Vincent, A., van der Noort, V., Aerts, J. G. and group, N. s. (2015) 'A randomized phase II study comparing paclitaxel-carboplatin-bevacizumab with or without nitroglycerin patches in patients with stage IV nonsquamous nonsmall-cell lung cancer: NVALT12 (NCT01171170)+', *Ann Oncol*, 26(11), pp. 2286-93.

- Djenidi, F., Adam, J., Goubar, A., Durgeau, A., Meurice, G., de Montpréville, V., Validire, P., Besse, B. and Mami-Chouaib, F. (2015) 'CD8+CD103+ tumor-infiltrating lymphocytes are tumor-specific tissue-resident memory T cells and a prognostic factor for survival in lung cancer patients', *J Immunol*, 194(7), pp. 3475-86.
- Doedens, A. L., Rubinstein, M. P., Gross, E. T., Best, J. A., Craig, D. H., Baker, M. K., Cole, D. J., Bui, J. D. and Goldrath, A. W. (2016) 'Molecular Programming of Tumor-Infiltrating CD8+ T Cells and IL15 Resistance', *Cancer Immunol Res*, 4(9), pp. 799-811.
- Du, Z. and Lovly, C. M. (2018) 'Mechanisms of receptor tyrosine kinase activation in cancer', *Mol Cancer*, 17(1), pp. 58.
- Dudley, M. E., Yang, J. C., Sherry, R., Hughes, M. S., Royal, R., Kammula, U., Robbins, P. F., Huang, J., Citrin, D. E., Leitman, S. F., Wunderlich, J., Restifo, N. P., Thomasian, A., Downey, S. G., Smith, F. O., Klapper, J., Morton, K., Laurencot, C., White, D. E. and Rosenberg, S. A. (2008) 'Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma: evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens', *J Clin Oncol*, 26(32), pp. 5233-9.
- Dumortier, C., Charlet, R., Bettaieb, A. and Jawhara, S. (2020) 'H89 Treatment Reduces Intestinal Inflammation and', *Microorganisms*, 8(12).
- Dunn, G. P., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2004) 'The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting', *Immunity*, 21(2), pp. 137-48.
- Eil, R., Vodnala, S. K., Clever, D., Klebanoff, C. A., Sukumar, M., Pan, J. H., Palmer, D. C., Gros, A., Yamamoto, T. N., Patel, S. J., Guittard, G. C., Yu, Z., Carbonaro, V., Okkenhaug, K., Schrumpp, D. S., Linehan, W. M., Roychoudhuri, R. and Restifo, N. P. (2016) 'Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function', *Nature*, 537(7621), pp. 539-543.
- Elkrief, A., Derosa, L., Zitvogel, L., Kroemer, G. and Routy, B. (2019) 'The intimate relationship between gut microbiota and cancer immunotherapy', *Gut Microbes*, 10(3), pp. 424-428.
- Elsasser, T. H., Li, C. J., Caperna, T. J., Kahl, S. and Schmidt, W. F. (2007) 'Growth hormone (GH)-associated nitration of Janus kinase-2 at the 1007Y-1008Y epitope impedes phosphorylation at this site: mechanism for and impact of a GH, AKT, and nitric oxide synthase axis on GH signal transduction', *Endocrinology*, 148(8), pp. 3792-802.
- Engel, A. M., Svane, I. M., Mouritsen, S., Rygaard, J., Clausen, J. and Werdelin, O. (1996) 'Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression', *APMIS*, 104(9), pp. 629-39.
- Engel, A. M., Svane, I. M., Rygaard, J. and Werdelin, O. (1997) 'MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice', *Scand J Immunol*, 45(5), pp. 463-70.
- Enomoto, A., Rho, M. C., Fukami, A., Hiraku, O., Komiyama, K. and Hayashi, M. (2004) 'Suppression of cancer cachexia by 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-acetate-a novel nonpeptide IL-6 receptor antagonist', *Biochem Biophys Res Commun*, 323(3), pp. 1096-102.
- Erdman, S. E., Rao, V. P., Poutahidis, T., Ihrig, M. M., Ge, Z., Feng, Y., Tomczak, M., Rogers, A. B., Horwitz, B. H. and Fox, J. G. (2003) 'CD4(+)CD25(+) regulatory lymphocytes require interleukin 10 to interrupt colon carcinogenesis in mice', *Cancer Res*, 63(18), pp. 6042-50.
- Ettrich, T. J. and Seufferlein, T. (2018) 'Regorafenib', *Recent Results Cancer Res*, 211, pp. 45-56.
- Falk, R. E., Makowka, L., Ambus, U., Falk, J. A., Bugala, R. and Landi, S. (1983) 'Nonspecific and selective stimulation of the immune system in the treatment of carcinoma in humans', *Can Med Assoc J*, 128(12), pp. 1385-8, 1422.
- Fang, F., Xiao, W. and Tian, Z. (2017) 'NK cell-based immunotherapy for cancer', *Semin Immunol*, 31, pp. 37-54.
- Feng, X., Sun, T., Bei, Y., Ding, S., Zheng, W., Lu, Y. and Shen, P. (2013) 'S-nitrosylation of ERK inhibits ERK phosphorylation and induces apoptosis', *Sci Rep*, 3, pp. 1814.
- Fernando, V., Zheng, X., Walia, Y., Sharma, V., Letson, J. and Furuta, S. (2019) 'S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling', *Antioxidants (Basel)*, 8(9).

- Figueroa-Magalhães, M. C., Jelovac, D., Connolly, R. and Wolff, A. C. (2014) 'Treatment of HER2-positive breast cancer', *Breast*, 23(2), pp. 128-136.
- Fischer, A., Folkerts, G., Geppetti, P. and Groneberg, D. A. (2002) 'Mediators of asthma: nitric oxide', *Pulm Pharmacol Ther*, 15(2), pp. 73-81.
- Fisher, D. T., Appenheimer, M. M. and Evans, S. S. (2014) 'The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment', *Semin Immunol*, 26(1), pp. 38-47.
- Floros, T. and Tarhini, A. A. (2015) 'Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of Interferon- α 2, Interleukin (IL)-2, IL-15, IL-21, and IL-12', *Semin Oncol*, 42(4), pp. 539-48.
- Fortner, G. W. and Kripke, M. L. (1977) 'In vitro reactivity of splenic lymphocytes from normal and UV-irradiated mice against syngeneic UV-induced tumors', *J Immunol*, 118(4), pp. 1483-7.
- Fu, L. Q., Du, W. L., Cai, M. H., Yao, J. Y., Zhao, Y. Y. and Mou, X. Z. (2020) 'The roles of tumor-associated macrophages in tumor angiogenesis and metastasis', *Cell Immunol*, 353, pp. 104119.
- Fujita, K., Iwama, H., Oura, K., Tadokoro, T., Samukawa, E., Sakamoto, T., Nomura, T., Tani, J., Yoneyama, H., Morishita, A., Himoto, T., Hirashima, M. and Masaki, T. (2017) 'Cancer Therapy Due to Apoptosis: Galectin-9', *Int J Mol Sci*, 18(1).
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C. O., Buerk, D. G., Huang, P. L. and Jain, R. K. (2001) 'Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(5), pp. 2604-9.
- Gajria, D., Seidman, A. and Dang, C. (2010) 'Adjuvant taxanes: more to the story', *Clin Breast Cancer*, 10 Suppl 2, pp. S41-9.
- Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., Zinzindohoué, F., Bruneval, P., Cugnenc, P. H., Trajanoski, Z., Fridman, W. H. and Pagès, F. (2006) 'Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome', *Science*, 313(5795), pp. 1960-4.
- Ganesh, K., Stadler, Z. K., Cercek, A., Mendelsohn, R. B., Shia, J., Segal, N. H. and Diaz, L. A. (2019) 'Immunotherapy in colorectal cancer: rationale, challenges and potential', *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 16(6), pp. 361-375.
- Gao, J. J. and Swain, S. M. (2018) 'Luminal A Breast Cancer and Molecular Assays: A Review', *Oncologist*, 23(5), pp. 556-565.
- Gao, Y., Lu, J., Zeng, C., Yang, J., Huang, B., Zhang, N., Li, L. and Fu, X. (2020) 'IL-10 suppresses IFN- γ -mediated signaling in lung adenocarcinoma', *Clin Exp Med*, 20(3), pp. 449-459.
- Garbers, C., Heink, S., Korn, T. and Rose-John, S. (2018) 'Interleukin-6: designing specific therapeutics for a complex cytokine', *Nat Rev Drug Discov*, 17(6), pp. 395-412.
- Garcia, J., Hurwitz, H. I., Sandler, A. B., Miles, D., Coleman, R. L., Deurloo, R. and Chinot, O. L. (2020) 'Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook', *Cancer Treat Rev*, 86, pp. 102017.
- Gastl, G. A., Abrams, J. S., Nanus, D. M., Oosterkamp, R., Silver, J., Liu, F., Chen, M., Albino, A. P. and Bander, N. H. (1993) 'Interleukin-10 production by human carcinoma cell lines and its relationship to interleukin-6 expression', *Int J Cancer*, 55(1), pp. 96-101.
- Gattinoni, L., Speiser, D. E., Lichterfeld, M. and Bonini, C. (2017) 'T memory stem cells in health and disease', *Nat Med*, 23(1), pp. 18-27.
- Gerlach, S. U. and Herranz, H. (2020) 'Genomic instability and cancer: lessons from', *Open Biol*, 10(6), pp. 200060.
- Germolec, D. R., Shipkowski, K. A., Frawley, R. P. and Evans, E. (2018) 'Markers of Inflammation', *Methods Mol Biol*, 1803, pp. 57-79.
- Ghione, S., Mabrouk, N., Paul, C., Bettaieb, A. and Plenchette, S. (2020) 'Protein kinase inhibitor-based cancer therapies: Considering the potential of nitric oxide (NO) to improve cancer treatment', *Biochem Pharmacol*, pp. 113855.

- Ghiringhelli, F., Menard, C., Puig, P. E., Ladoire, S., Roux, S., Martin, F., Solary, E., Le Cesne, A., Zitvogel, L. and 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(5), pp. 641-8.
- Glynn, S. A., Boersma, B. J., Dorsey, T. H., Yi, M., Yfantis, H. G., Ridnour, L. A., Martin, D. N., Switzer, C. H., Hudson, R. S., Wink, D. A., Lee, D. H., Stephens, R. M. and Ambs, S. (2010) 'Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients', *J Clin Invest*, 120(11), pp. 3843-54.
- Goebeler, M. E. and Bargou, R. (2016) 'Blinatumomab: a CD19/CD3 bispecific T cell engager (BiTE) with unique anti-tumor efficacy', *Leuk Lymphoma*, 57(5), pp. 1021-32.
- Gow, A. J., Farkouh, C. R., Munson, D. A., Posencheg, M. A. and Ischiropoulos, H. (2004) 'Biological significance of nitric oxide-mediated protein modifications', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287(2), pp. L262-8.
- Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G., Veys, I., Haibe-Kains, B., Singhal, S. K., Michiels, S., Rothé, F., Salgado, R., Du villier, H., Ignatiadis, M., Desmedt, C., Bron, D., Larsimont, D., Piccart, M., Sotiriou, C. and Willard-Gallo, K. (2013) 'CD4+ follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival', *J Clin Invest*, 123(7), pp. 2873-92.
- Gugliotta, G., Castagnetti, F., Breccia, M., Levato, L., D'Adda, M., Stagno, F., Tiribelli, M., Salvucci, M., Fava, C., Martino, B., Cedrone, M., Bocchia, M., Trabacchi, E., Cavazzini, F., Usala, E., Russo Rossi, A., Bochicchio, M. T., Soverini, S., Alimena, G., Cavo, M., Pane, F., Martinelli, G., Saglio, G., Baccarani, M., Rosti, G. and Party, G. C. W. (2015) 'Long-term outcome of a phase 2 trial with nilotinib 400 mg twice daily in first-line treatment of chronic myeloid leukemia', *Haematologica*, 100(9), pp. 1146-50.
- Guo, Y., Luan, L., Patil, N. K. and Sherwood, E. R. (2017) 'Immunobiology of the IL-15/IL-15R α complex as an antitumor and antiviral agent', *Cytokine Growth Factor Rev*, 38, pp. 10-21.
- Guo, Y., Nemeth, J., O'Brien, C., Susa, M., Liu, X., Zhang, Z., Choy, E., Mankin, H., Hornicek, F. and Duan, Z. (2010) 'Effects of siltuximab on the IL-6-induced signaling pathway in ovarian cancer', *Clin Cancer Res*, 16(23), pp. 5759-69.
- Haanen, J. B. and Robert, C. (2015) 'Immune Checkpoint Inhibitors', *Prog Tumor Res*, 42, pp. 55-66.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2000) 'The hallmarks of cancer', *Cell*, 100(1), pp. 57-70.
- Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011) 'Hallmarks of cancer: the next generation', *Cell*, 144(5), pp. 646-74.
- Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou, S. K., Hester, L. D., Ferris, C. D., Hayward, S. D., Snyder, S. H. and Sawa, A. (2005) 'S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding', *Nat Cell Biol*, 7(7), pp. 665-74.
- Hartmann, J. T., Haap, M., Kopp, H. G. and Lipp, H. P. (2009) 'Tyrosine kinase inhibitors - a review on pharmacology, metabolism and side effects', *Curr Drug Metab*, 10(5), pp. 470-81.
- Harvey, R. D., Adams, V. R., Beardslee, T. and Medina, P. (2020) 'Afinib for the treatment of', *J Oncol Pharm Pract*, 26(6), pp. 1461-1474.
- Hashemi, V., Maleki, L. A., Esmaily, M., Masjedi, A., Ghalamfarsa, G., Namdar, A., Yousefi, M., Yousefi, B. and Jadidi-Niaragh, F. (2020) 'Regulatory T cells in breast cancer as a potent anti-cancer therapeutic target', *Int Immunopharmacol*, 78, pp. 106087.
- Hashimoto, M., Kamphorst, A. O., Im, S. J., Kissick, H. T., Pillai, R. N., Ramalingam, S. S., Araki, K. and Ahmed, R. (2018) 'CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions', *Annu Rev Med*, 69, pp. 301-318.
- Hayashi, M., Rho, M. C., Fukami, A., Enomoto, A., Nonaka, S., Sekiguchi, Y., Yanagisawa, T., Yamashita, A., Nogawa, T., Kamano, Y. and Komiyama, K. (2002) 'Biological activity of a novel

nonpeptide antagonist to the interleukin-6 receptor 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-formate', *J Pharmacol Exp Ther*, 303(1), pp. 104-9.

- HAYFLICK, L. and MOORHEAD, P. S. (1961) 'The serial cultivation of human diploid cell strains', *Exp Cell Res*, 25, pp. 585-621.
- He, Q. F., Xu, Y., Li, J., Huang, Z. M., Li, X. H. and Wang, X. (2019) 'CD8+ T-cell exhaustion in cancer: mechanisms and new area for cancer immunotherapy', *Brief Funct Genomics*, 18(2), pp. 99-106.
- Heidland, A., Klassen, A., Rutkowski, P. and Bahner, U. (2006) 'The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance?', *J Nephrol*, 19 Suppl 10, pp. S102-9.
- Heikkilä, K., Ebrahim, S. and Lawlor, D. A. (2008) 'Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer', *Eur J Cancer*, 44(7), pp. 937-45.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G. and Schaper, F. (2003) 'Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation', *Biochem J*, 374(Pt 1), pp. 1-20.
- Heng, D. Y. and Kollmannsberger, C. (2010) 'Sunitinib', *Recent Results Cancer Res*, 184, pp. 71-82.
- Hidaka, H., Watanabe, M. and Tokumitsu, H. (1990) 'Search for the functional substrate proteins of protein kinases and their selective inhibitors', *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res*, 24, pp. 485-90.
- Holotiuk, V. V., Kryzhanivska, A. Y., Churpiy, I. K., Tataryn, B. B. and Ivasiutyn, D. Y. (2019) 'Role of nitric oxide in pathogenesis of tumor growth and its possible application in cancer treatment', *Exp Oncol*, 41(3), pp. 210-215.
- Huerta, S., Chilka, S. and Bonavida, B. (2008) 'Nitric oxide donors: novel cancer therapeutics (review)', *Int J Oncol*, 33(5), pp. 909-27.
- Huerta-Yepez, S., Vega, M., Escoto-Chavez, S. E., Murdock, B., Sakai, T., Baritaki, S. and Bonavida, B. (2009) 'Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1', *Nitric Oxide*, 20(1), pp. 39-52.
- Hunter, C. A. and Jones, S. A. (2015) 'IL-6 as a keystone cytokine in health and disease', *Nat Immunol*, 16(5), pp. 448-57.
- Hunter, T. (1991) 'Protein kinase classification', *Methods Enzymol*, 200, pp. 3-37.
- Hönemann, D., Chatterjee, M., Savino, R., Bommert, K., Burger, R., Gramatzki, M., Dörken, B. and Bargou, R. C. (2001) 'The IL-6 receptor antagonist SANT-7 overcomes bone marrow stromal cell-mediated drug resistance of multiple myeloma cells', *Int J Cancer*, 93(5), pp. 674-80.
- Ikutani, M., Yanagibashi, T., Ogasawara, M., Tsuneyama, K., Yamamoto, S., Hattori, Y., Kouro, T., Itakura, A., Nagai, Y., Takaki, S. and Takatsu, K. (2012) 'Identification of innate IL-5-producing cells and their role in lung eosinophil regulation and antitumor immunity', *J Immunol*, 188(2), pp. 703-13.
- Illum, H., Wang, D. H., Dowell, J. E., Hittson, W. J., Torrisi, J. R., Meyer, J. and Huerta, S. (2015) 'Phase I dose escalation trial of nitroglycerin in addition to 5-fluorouracil and radiation therapy for neoadjuvant treatment of operable rectal cancer', *Surgery*, 158(2), pp. 460-5.
- Ischiropoulos, H. (2003) 'Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration', *Biochem Biophys Res Commun*, 305(3), pp. 776-83.
- Janus, A. and Robak, T. (2019) 'Moxetumomab pasudotox for the treatment of hairy cell leukemia', *Expert Opin Biol Ther*, 19(6), pp. 501-508.
- Jayatilaka, H., Tyle, P., Chen, J. J., Kwak, M., Ju, J., Kim, H. J., Lee, J. S. H., Wu, P. H., Gilkes, D. M., Fan, R. and Wirtz, D. (2017) 'Synergistic IL-6 and IL-8 paracrine signalling pathway infers a strategy to inhibit tumour cell migration', *Nat Commun*, 8, pp. 15584.
- Jeannin, J. F., Leon, L., Cortier, M., Sassi, N., Paul, C. and Bettaieb, A. (2008) 'Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells', *Nitric Oxide*, 19(2), pp. 158-63.

- Jiang, J., Jin, M. S., Kong, F., Cao, D., Ma, H. X., Jia, Z., Wang, Y. P., Suo, J. and Cao, X. (2013) 'Decreased galectin-9 and increased Tim-3 expression are related to poor prognosis in gastric cancer', *PLoS One*, 8(12), pp. e81799.
- Jiang, T., Zhou, C. and Ren, S. (2016) 'Role of IL-2 in cancer immunotherapy', *Oncoimmunology*, 5(6), pp. e1163462.
- Jiang, X. P., Yang, D. C., Elliott, R. L. and Head, J. F. (2011) 'Down-regulation of expression of interleukin-6 and its receptor results in growth inhibition of MCF-7 breast cancer cells', *Anticancer Res*, 31(9), pp. 2899-906.
- Jiao, Q., Bi, L., Ren, Y., Song, S., Wang, Q. and Wang, Y. S. (2018) 'Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance', *Mol Cancer*, 17(1), pp. 36.
- Jin, S., Muhammad, N., Sun, Y., Tan, Y., Yuan, H., Song, D., Guo, Z. and Wang, X. (2020) 'Multispecific Platinum(IV) Complex Deters Breast Cancer via Interposing Inflammation and Immunosuppression as an Inhibitor of COX-2 and PD-L1', *Angew Chem Int Ed Engl*, 59(51), pp. 23313-23321.
- Johdi, N. A. and Sukor, N. F. (2020) 'Colorectal Cancer Immunotherapy: Options and Strategies', *Front Immunol*, 11, pp. 1624.
- Johnson, D. E., O'Keefe, R. A. and Grandis, J. R. (2018) 'Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer', *Nat Rev Clin Oncol*, 15(4), pp. 234-248.
- Julien, L. A. and Roux, P. P. (2010) '[mTOR, the mammalian target of rapamycin]', *Med Sci (Paris)*, 26(12), pp. 1056-60.
- Jurczak, W., Długosz Danecka, M. and Buske, C. (2019) 'Rituximab biosimilars for lymphoma in Europe', *Expert Opin Biol Ther*, 19(10), pp. 1045-1056.
- Kaczanowski, S. (2016) 'Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging', *Phys Biol*, 13(3), pp. 031001.
- Kalbasi, A. and Ribas, A. (2020) 'Tumour-intrinsic resistance to immune checkpoint blockade', *Nat Rev Immunol*, 20(1), pp. 25-39.
- Kalos, M. and June, C. H. (2013) 'Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology', *Immunity*, 39(1), pp. 49-60.
- Kamm, A., Przychodzen, P., Kuban-Jankowska, A., Jacewicz, D., Dabrowska, A. M., Nussberger, S., Wozniak, M. and Gorska-Ponikowska, M. (2019) 'Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield', *Nitric Oxide*, 93, pp. 102-114.
- Kannaiyan, R. and Mahadevan, D. (2018) 'A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy', *Expert Rev Anticancer Ther*, 18(12), pp. 1249-1270.
- Kaoud, T. S., Mohassab, A. M., Hassan, H. A., Yan, C., Van Ravenstein, S. X., Abdelhamid, D., Dalby, K. N. and Abdel-Aziz, M. (2020) 'NO-releasing STAT3 inhibitors suppress BRAF-mutant melanoma growth', *Eur J Med Chem*, 186, pp. 111885.
- Kelleher, Z. T., Matsumoto, A., Stamler, J. S. and Marshall, H. E. (2007) 'NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65', *J Biol Chem*, 282(42), pp. 30667-72.
- Keshet, R. and Erez, A. (2018) 'Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer', *Dis Model Mech*, 11(8).
- Kikuchi, K., McNamara, K. M., Miki, Y., Moon, J. Y., Choi, M. H., Omata, F., Sakurai, M., Onodera, Y., Rai, Y., Ohi, Y., Sagara, Y., Miyashita, M., Ishida, T., Ohuchi, N. and Sasano, H. (2017) 'Effects of cytokines derived from cancer-associated fibroblasts on androgen synthetic enzymes in estrogen receptor-negative breast carcinoma', *Breast Cancer Res Treat*, 166(3), pp. 709-723.
- Kim, D. W., Tan, E., Zhou, J. M., Schell, M. J., Martinez, M., Yu, J., Carballido, E., Mehta, R., Strosberg, J., Imanirad, I. and Kim, R. D. (2021) 'A phase 1/2 trial of ibrutinib in combination with pembrolizumab in patients with mismatch repair proficient metastatic colorectal cancer', *Br J Cancer*, 124(11), pp. 1803-1808.
- Kim, J., Won, J. S., Singh, A. K., Sharma, A. K. and Singh, I. (2014) 'STAT3 regulation by S-nitrosylation: implication for inflammatory disease', *Antioxid Redox Signal*, 20(16), pp. 2514-27.

- Kim, M. J., Nam, H. J., Kim, H. P., Han, S. W., Im, S. A., Kim, T. Y., Oh, D. Y. and Bang, Y. J. (2013) 'OPB-31121, a novel small molecular inhibitor, disrupts the JAK2/STAT3 pathway and exhibits an antitumor activity in gastric cancer cells', *Cancer Lett*, 335(1), pp. 145-52.
- Klemenska, E. and Beresewicz, A. (2009) 'Bioactivation of organic nitrates and the mechanism of nitrate tolerance', *Cardiol J*, 16(1), pp. 11-9.
- Kmiecik, J., Poli, A., Brons, N. H., Waha, A., Eide, G. E., Enger, P., Zimmer, J. and Chekenya, M. (2013) 'Elevated CD3+ and CD8+ tumor-infiltrating immune cells correlate with prolonged survival in glioblastoma patients despite integrated immunosuppressive mechanisms in the tumor microenvironment and at the systemic level', *J Neuroimmunol*, 264(1-2), pp. 71-83.
- Kokaji, A. I., Hockley, D. L. and Kane, K. P. (2008) 'IL-15 transpresentation augments CD8+ T cell activation and is required for optimal recall responses by central memory CD8+ T cells', *J Immunol*, 180(7), pp. 4391-401.
- Kopetz, S., Guthrie, K. A., Morris, V. K., Lenz, H. J., Magliocco, A. M., Maru, D., Yan, Y., Lanman, R., Manyam, G., Hong, D. S., Sorokin, A., Atreya, C. E., Diaz, L. A., Allegra, C., Raghav, K. P., Wang, S. E., Lieu, C. H., McDonough, S. L., Philip, P. A. and Hochster, H. S. (2021) 'Randomized Trial of Irinotecan and Cetuximab With or Without Vemurafenib in BRAF-Mutant Metastatic Colorectal Cancer (SWOG S1406)', *J Clin Oncol*, 39(4), pp. 285-294.
- Koppolu, V. and Rekha Vasigala, V. K. (2018) 'Checkpoint immunotherapy by nivolumab for treatment of metastatic melanoma', *J Cancer Res Ther*, 14(6), pp. 1167-1175.
- Kortylewski, M. and Moreira, D. (2017) 'Myeloid cells as a target for oligonucleotide therapeutics: turning obstacles into opportunities', *Cancer Immunol Immunother*, 66(8), pp. 979-988.
- Kreitman, R. J., Dearden, C., Zinzani, P. L., Delgado, J., Karlin, L., Robak, T., Gladstone, D. E., le Coutre, P., Dietrich, S., Gotic, M., Larratt, L., Offner, F., Schiller, G., Swords, R., Bacon, L., Bocchia, M., Bouabdallah, K., Breems, D. A., Cortelezzi, A., Dinner, S., Doubek, M., Gjertsen, B. T., Gobbi, M., Hellmann, A., Lepretre, S., Maloisel, F., Ravandi, F., Rouselot, P., Rummel, M., Siddiqi, T., Tadmor, T., Troussard, X., Yi, C. A., Saglio, G., Roboz, G. J., Balic, K., Standifer, N., He, P., Marshall, S., Wilson, W., Pastan, I., Yao, N. S. and Giles, F. (2018) 'Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia', *Leukemia*, 32(8), pp. 1768-1777.
- Kudo, M., Finn, R. S., Qin, S., Han, K. H., Ikeda, K., Piscaglia, F., Baron, A., Park, J. W., Han, G., Jassem, J., Blanc, J. F., Vogel, A., Komov, D., Evans, T. R. J., Lopez, C., Dutcus, C., Guo, M., Saito, K., Kraljevic, S., Tamai, T., Ren, M. and Cheng, A. L. (2018) 'Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial', *Lancet*, 391(10126), pp. 1163-1173.
- Kumar, P. and Aggarwal, R. (2016) 'An overview of triple-negative breast cancer', *Arch Gynecol Obstet*, 293(2), pp. 247-69.
- Kunimasa, K. and Goto, T. (2020) 'Immunosurveillance and Immunoediting of Lung Cancer: Current Perspectives and Challenges', *Int J Mol Sci*, 21(2).
- Kwok, G., Yau, T. C., Chiu, J. W., Tse, E. and Kwong, Y. L. (2016) 'Pembrolizumab (Keytruda)', *Hum Vaccin Immunother*, 12(11), pp. 2777-2789.
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F. and Wils, J. (2010) 'Colon cancer', *Crit Rev Oncol Hematol*, 74(2), pp. 106-33.
- Lalani, T., Simmons, R. K. and Ahmed, A. R. (1999) 'Biology of IL-5 in health and disease', *Ann Allergy Asthma Immunol*, 82(4), pp. 317-32; quiz 332-3.
- Lamrani, M., Sassi, N., Paul, C., Yousfi, N., Boucher, J. L., Gauthier, N., Labbé, J., Seignez, C., Racœur, C., Athias, A., Guerreiro, R., Vergely, C., Rochette, L., Bettaieb, A. and Jeannin, J. F. (2016) 'TLR4/IFN γ pathways induce tumor regression via NOS II-dependent NO and ROS production in murine breast cancer models', *Oncoimmunology*, 5(5), pp. e1123369.

- Landskron, G., De la Fuente, M., Thuwajit, P., Thuwajit, C. and Hermoso, M. A. (2014) 'Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment', *J Immunol Res*, 2014, pp. 149185.
- Laxmanan, S., Robertson, S. W., Wang, E., Lau, J. S., Briscoe, D. M. and Mukhopadhyay, D. (2005) 'Vascular endothelial growth factor impairs the functional ability of dendritic cells through Id pathways', *Biochem Biophys Res Commun*, 334(1), pp. 193-198.
- Lebert, J. M., Lester, R., Powell, E., Seal, M. and McCarthy, J. (2018) 'Advances in the systemic treatment of triple-negative breast cancer', *Curr Oncol*, 25(Suppl 1), pp. S142-S150.
- Lederle, W., Depner, S., Schnur, S., Obermueller, E., Catone, N., Just, A., Fusenig, N. E. and Mueller, M. M. (2011) 'IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines', *Int J Cancer*, 128(12), pp. 2803-14.
- Lee, Y. T., Tan, Y. J. and Oon, C. E. (2018) 'Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity', *Eur J Pharmacol*, 834, pp. 188-196.
- Lei, X., Lei, Y., Li, J. K., Du, W. X., Li, R. G., Yang, J., Li, J., Li, F. and Tan, H. B. (2020) 'Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy', *Cancer Lett*, 470, pp. 126-133.
- Leon-Bollotte, L., Subramaniam, S., Cauvard, O., Plenchette-Colas, S., Paul, C., Godard, C., Martinez-Ruiz, A., Legembre, P., Jeannin, J. F. and Bettaieb, A. (2011) 'S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells', *Gastroenterology*, 140(7), pp. 2009-18, 2018.e1-4.
- Levy, L. and Hill, C. S. (2006) 'Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer', *Cytokine Growth Factor Rev*, 17(1-2), pp. 41-58.
- Li, B., Wang, F., Ma, C., Hao, T., Geng, L. and Jiang, H. (2019) 'Predictive value of IL-18 and IL-10 in the prognosis of patients with colorectal cancer', *Oncol Lett*, 18(1), pp. 713-719.
- Li, K., Shen, X., Qiu, H., Zhao, T., Ai, K., Li, C., Zhang, Y., Duan, M., Wei, X. and Yang, J. (2020a) 'S6K1/S6 axis-regulated lymphocyte activation is important for adaptive immune response of Nile tilapia', *Fish Shellfish Immunol*, 106, pp. 1120-1130.
- Li, L., Fu, L. Q., Wang, H. J., Yan, Z. L., Yu, X. C. and Wang, Y. Y. (2017) 'FAT2 is a novel independent prognostic factor for the poor prognosis of gastric carcinoma', *Int J Clin Exp Pathol*, 10(12), pp. 11603-11609.
- Li, W., Zeng, J., Luo, B., Mao, Y., Liang, Y., Zhao, W., Hu, N., Chen, G. and Zheng, X. (2020b) '[High expression of activated CD4', *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 36(2), pp. 97-103.
- Lin, J. J. and Shaw, A. T. (2016) 'Resisting Resistance: Targeted Therapies in Lung Cancer', *Trends Cancer*, 2(7), pp. 350-364.
- Lin, T. E., HuangFu, W. C., Chao, M. W., Sung, T. Y., Chang, C. D., Chen, Y. Y., Hsieh, J. H., Tu, H. J., Huang, H. L., Pan, S. L. and Hsu, K. C. (2018) 'A Novel Selective JAK2 Inhibitor Identified Using Pharmacological Interactions', *Front Pharmacol*, 9, pp. 1379.
- Ling, A., Edin, S., Wikberg, M. L., Öberg, Å. and Palmqvist, R. (2014) 'The intratumoural subsite and relation of CD8(+) and FOXP3(+) T lymphocytes in colorectal cancer provide important prognostic clues', *Br J Cancer*, 110(10), pp. 2551-9.
- Litvinova, L., Atochin, D. N., Fattakhov, N., Vasilenko, M., Zatolokin, P. and Kirienkova, E. (2015) 'Nitric oxide and mitochondria in metabolic syndrome', *Front Physiol*, 6, pp. 20.
- Liu, Q., Qu, J., Zhao, M., Xu, Q. and Sun, Y. (2020) 'Targeting SHP2 as a promising strategy for cancer immunotherapy', *Pharmacol Res*, 152, pp. 104595.
- Liu, S. V., Camidge, D. R., Gettinger, S. N., Giaccone, G., Heist, R. S., Hodi, F. S., Ready, N. E., Zhang, W., Wallin, J., Funke, R., Waterkamp, D., Foster, P., Iizuka, K. and Powderly, J. (2018) 'Long-term survival follow-up of atezolizumab in combination with platinum-based doublet chemotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer', *Eur J Cancer*, 101, pp. 114-122.

- Liu, X., Müller, F., Wayne, A. S. and Pastan, I. (2016) 'Protein Kinase Inhibitor H89 Enhances the Activity of Pseudomonas Exotoxin A-Based Immunotoxins', *Mol Cancer Ther*, 15(5), pp. 1053-62.
- Liubomirski, Y., Lerrer, S., Meshel, T., Rubinstein-Achiasaf, L., Morein, D., Wiemann, S., Körner, C. and Ben-Baruch, A. (2019) 'Tumor-Stroma-Inflammation Networks Promote Pro-metastatic Chemokines and Aggressiveness Characteristics in Triple-Negative Breast Cancer', *Front Immunol*, 10, pp. 757.
- Livshits, Z., Rao, R. B. and Smith, S. W. (2014) 'An approach to chemotherapy-associated toxicity', *Emerg Med Clin North Am*, 32(1), pp. 167-203.
- Lochner, A. and Moolman, J. A. (2006) 'The many faces of H89: a review', *Cardiovasc Drug Rev*, 24(3-4), pp. 261-74.
- Loibl, S., O'Shaughnessy, J., Untch, M., Sikov, W. M., Rugo, H. S., McKee, M. D., Huober, J., Golshan, M., von Minckwitz, G., Maag, D., Sullivan, D., Wolmark, N., McIntyre, K., Ponce Lorenzo, J. J., Metzger Filho, O., Rastogi, P., Symmans, W. F., Liu, X. and Geyer, C. E. (2018) 'Addition of the PARP inhibitor veliparib plus carboplatin or carboplatin alone to standard neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer (BrighTNess): a randomised, phase 3 trial', *Lancet Oncol*, 19(4), pp. 497-509.
- Looyenga, B. D., Hutchings, D., Cherni, I., Kingsley, C., Weiss, G. J. and Mackeigan, J. P. (2012) 'STAT3 is activated by JAK2 independent of key oncogenic driver mutations in non-small cell lung carcinoma', *PLoS One*, 7(2), pp. e30820.
- Lopez-Rivera, E., Jayaraman, P., Parikh, F., Davies, M. A., Ekmekcioglu, S., Izadmehr, S., Milton, D. R., Chipuk, J. E., Grimm, E. A., Estrada, Y., Aguirre-Ghiso, J. and Sikora, A. G. (2014) 'Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2', *Cancer Res*, 74(4), pp. 1067-78.
- Lu, Z. Y., Brochier, J., Wijdenes, J., Brailly, H., Bataille, R. and Klein, B. (1992) 'High amounts of circulating interleukin (IL)-6 in the form of monomeric immune complexes during anti-IL-6 therapy. Towards a new methodology for measuring overall cytokine production in human in vivo', *Eur J Immunol*, 22(11), pp. 2819-24.
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. and Xia, B. (2012) 'CD4⁺T cells: differentiation and functions', *Clin Dev Immunol*, 2012, pp. 925135.
- López-Sánchez, L. M., Aranda, E. and Rodríguez-Ariza, A. (2020) 'Nitric oxide and tumor metabolic reprogramming', *Biochem Pharmacol*, 176, pp. 113769.
- Ma, J., Zhang, T., Novotny-Diermayr, V., Tan, A. L. and Cao, X. (2003) 'A novel sequence in the coiled-coil domain of Stat3 essential for its nuclear translocation', *J Biol Chem*, 278(31), pp. 29252-60.
- Mabrouk, N., Ghione, S., Laurens, V., Plenchette, S., Bettaieb, A. and Paul, C. (2020) 'Senescence and Cancer: Role of Nitric Oxide (NO) in SASP', *Cancers (Basel)*, 12(5).
- Maciver, S. K. (1996) 'Myosin II function in non-muscle cells', *Bioessays*, 18(3), pp. 179-82.
- Madan, R. A., Bilusic, M., Heery, C., Schlom, J. and Gulley, J. L. (2012) 'Clinical evaluation of TRICOM vector therapeutic cancer vaccines', *Semin Oncol*, 39(3), pp. 296-304.
- Mager, L. F., Burkhard, R., Pett, N., Cooke, N. C. A., Brown, K., Ramay, H., Paik, S., Stagg, J., Groves, R. A., Gallo, M., Lewis, I. A., Geuking, M. B. and McCoy, K. D. (2020) 'Microbiome-derived inosine modulates response to checkpoint inhibitor immunotherapy', *Science*, 369(6510), pp. 1481-1489.
- Maggio, D., Ho, W. S., Breese, R., Walbridge, S., Wang, H., Cui, J., Heiss, J. D., Gilbert, M. R., Kovach, J. S., Lu, R. O. and Zhuang, Z. (2020) 'Inhibition of protein phosphatase-2A with LB-100 enhances antitumor immunity against glioblastoma', *J Neurooncol*, 148(2), pp. 231-244.
- Maher, A., Abdel Rahman, M. F. and Gad, M. Z. (2017) 'The Role of Nitric Oxide from Neurological Disease to Cancer', *Adv Exp Med Biol*, 1007, pp. 71-88.

- Mahmoud, S. M., Paish, E. C., Powe, D. G., Macmillan, R. D., Grainge, M. J., Lee, A. H., Ellis, I. O. and Green, A. R. (2011) 'Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer', *J Clin Oncol*, 29(15), pp. 1949-55.
- Maj, T., Wang, W., Crespo, J., Zhang, H., Wei, S., Zhao, L., Vatan, L., Shao, I., Szeliga, W., Lyssiotis, C., Liu, J. R., Kryczek, I. and Zou, W. (2017) 'Oxidative stress controls regulatory T cell apoptosis and suppressor activity and PD-L1-blockade resistance in tumor', *Nat Immunol*, 18(12), pp. 1332-1341.
- Malone, M. K., Smrekar, K., Park, S., Blakely, B., Walter, A., Nasta, N., Park, J., Considine, M., Danilova, L. V., Pandey, N. B., Fertig, E. J., Popel, A. S. and Jin, K. (2020) 'Cytokines secreted by stromal cells in TNBC microenvironment as potential targets for cancer therapy', *Cancer Biol Ther*, 21(6), pp. 560-569.
- Mamoon, N. M., Smith, J. K., Chatti, K., Lee, S., Kundrapu, K. and Duhé, R. J. (2007) 'Multiple cysteine residues are implicated in Janus kinase 2-mediated catalysis', *Biochemistry*, 46(51), pp. 14810-8.
- Mandal, P. K., Biswas, S., Mandal, G., Purohit, S., Gupta, A., Majumdar Giri, A., Roy Chowdhury, S. and Bhattacharyya, A. (2018) 'CCL2 conditionally determines CCL22-dependent Th2-accumulation during TGF- β -induced breast cancer progression', *Immunobiology*, 223(2), pp. 151-161.
- Mantovani, A. and Sica, A. (2010) 'Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity', *Curr Opin Immunol*, 22(2), pp. 231-7.
- Marabondo, S. and Kaufman, H. L. (2017) 'High-dose interleukin-2 (IL-2) for the treatment of melanoma: safety considerations and future directions', *Expert Opin Drug Saf*, 16(12), pp. 1347-1357.
- Markham, A. (2016) 'Atezolizumab: First Global Approval', *Drugs*, 76(12), pp. 1227-32.
- Marofi, F., Motavalli, R., Safonov, V. A., Thangavelu, L., Yumashev, A. V., Alexander, M., Shomali, N., Chartrand, M. S., Pathak, Y., Jarahian, M., Izadi, S., Hassanzadeh, A., Shirafkan, N., Tahmasebi, S. and Khiavi, F. M. (2021) 'CAR T cells in solid tumors: challenges and opportunities', *Stem Cell Res Ther*, 12(1), pp. 81.
- Martínez-Ruiz, A. and Lamas, S. (2009) 'Two decades of new concepts in nitric oxide signaling: from the discovery of a gas messenger to the mediation of nonenzymatic posttranslational modifications', *IUBMB Life*, 61(2), pp. 91-8.
- Masjedi, A., Hashemi, V., Hojjat-Farsangi, M., Ghalamfarsa, G., Azizi, G., Yousefi, M. and Jadidi-Niaragh, F. (2018) 'The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer', *Biomed Pharmacother*, 108, pp. 1415-1424.
- Massagué, J. (2008) 'TGF β in Cancer', *Cell*, 134(2), pp. 215-30.
- Masuishi, T., Tsuji, A., Kotaka, M., Nakamura, M., Kochi, M., Takagane, A., Shimada, K., Denda, T., Segawa, Y., Tanioka, H., Hara, H., Sagawa, T., Watanabe, T., Takahashi, T., Negoro, Y., Manaka, D., Fujita, H., Suto, T., Takeuchi, M., Ichikawa, W. and Fujii, M. (2020) 'Phase 2 study of irinotecan plus cetuximab rechallenge as third-line treatment in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: JACCRO CC-08', *Br J Cancer*, 123(10), pp. 1490-1495.
- Mauri, G., Gori, V., Bonazzina, E., Amatu, A., Tosi, F., Bencardino, K., Ruggieri, L., Patelli, G., Arena, S., Bardelli, A., Siena, S. and Sartore-Bianchi, A. (2020) 'Oxaliplatin retreatment in metastatic colorectal cancer: Systematic review and future research opportunities', *Cancer Treat Rev*, 91, pp. 102112.
- Mauro, M. J., O'Dwyer, M., Heinrich, M. C. and Druker, B. J. (2002) 'STI571: a paradigm of new agents for cancer therapeutics', *J Clin Oncol*, 20(1), pp. 325-34.
- Maximiano, S., Magalhães, P., Guerreiro, M. P. and Morgado, M. (2016) 'Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer', *BioDrugs*, 30(2), pp. 75-86.
- McCawley, L. J. and Matrisian, L. M. (2000) 'Matrix metalloproteinases: multifunctional contributors to tumor progression', *Mol Med Today*, 6(4), pp. 149-56.

- Melick, C. H. and Jewell, J. L. (2020) 'Small molecule H89 renders the phosphorylation of S6K1 and AKT resistant to mTOR inhibitors', *Biochem J*, 477(10), pp. 1847-1863.
- Mellman, I., Coukos, G. and Dranoff, G. (2011) 'Cancer immunotherapy comes of age', *Nature*, 480(7378), pp. 480-9.
- Meng, L., He, X., Hong, Q., Qiao, B., Zhang, X., Wu, B., Wei, Y., Li, J., Ye, Z. and Xiao, Y. (2021) *Front Oncol*, 11, pp. 618187.
- Miklossy, G., Hilliard, T. S. and Turkson, J. (2013) 'Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases', *Nat Rev Drug Discov*, 12(8), pp. 611-29.
- Millet, A., Bettaieb, A., Renaud, F., Prevotat, L., Hammann, A., Solary, E., Mignotte, B. and Jeannin, J. F. (2002) 'Influence of the nitric oxide donor glyceryl trinitrate on apoptotic pathways in human colon cancer cells', *Gastroenterology*, 123(1), pp. 235-46.
- Mitchell, R. E., Hassan, M., Burton, B. R., Britton, G., Hill, E. V., Verhagen, J. and Wraith, D. C. (2017) 'IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: implications for Th1 and Th2 regulation', *Sci Rep*, 7(1), pp. 11315.
- Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. and Smyth, M. J. (2014) 'New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape', *Curr Opin Immunol*, 27, pp. 16-25.
- Morrison, C. D., Parvani, J. G. and Schiemann, W. P. (2013) 'The relevance of the TGF- β Paradox to EMT-MET programs', *Cancer Lett*, 341(1), pp. 30-40.
- Morse, M. A., Overman, M. J., Hartman, L., Khoukaz, T., Brutcher, E., Lenz, H. J., Atasoy, A., Shangguan, T., Zhao, H. and El-Rayes, B. (2019) 'Safety of Nivolumab plus Low-Dose Ipilimumab in Previously Treated Microsatellite Instability-High/Mismatch Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer', *Oncologist*, 24(11), pp. 1453-1461.
- Munn, D. H. and Mellor, A. L. (2007) 'Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance', *J Clin Invest*, 117(5), pp. 1147-54.
- Murad, F. (2006) 'Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development', *N Engl J Med*, 355(19), pp. 2003-11.
- Murillo-Carretero, M., Torroglosa, A., Castro, C., Villalobo, A. and Estrada, C. (2009) 'S-Nitrosylation of the epidermal growth factor receptor: a regulatory mechanism of receptor tyrosine kinase activity', *Free Radic Biol Med*, 46(4), pp. 471-9.
- Münzel, T., Steven, S. and Daiber, A. (2014) 'Organic nitrates: update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction', *Vascul Pharmacol*, 63(3), pp. 105-13.
- Nagano, H., Tomida, C., Yamagishi, N. and Teshima-Kondo, S. (2019) 'VEGFR-1 Regulates EGF-R to Promote Proliferation in Colon Cancer Cells', *Int J Mol Sci*, 20(22).
- Nagasaki, T., Hara, M., Nakanishi, H., Takahashi, H., Sato, M. and Takeyama, H. (2014) 'Interleukin-6 released by colon cancer-associated fibroblasts is critical for tumour angiogenesis: anti-interleukin-6 receptor antibody suppressed angiogenesis and inhibited tumour-stroma interaction', *Br J Cancer*, 110(2), pp. 469-78.
- Nakamura, T., Wang, L., Wong, C. C., Scott, F. L., Eckelman, B. P., Han, X., Tzitzilonis, C., Meng, F., Gu, Z., Holland, E. A., Clemente, A. T., Okamoto, S., Salvesen, G. S., Riek, R., Yates, J. R. and Lipton, S. A. (2010) 'Transnitrosylation of XIAP regulates caspase-dependent neuronal cell death', *Mol Cell*, 39(2), pp. 184-95.
- Napoli, C., Paolisso, G., Casamassimi, A., Al-Omran, M., Barbieri, M., Sommese, L., Infante, T. and Ignarro, L. J. (2013) 'Effects of nitric oxide on cell proliferation: novel insights', *J Am Coll Cardiol*, 62(2), pp. 89-95.
- Nath, N., Kashfi, K., Chen, J. and Rigas, B. (2003) 'Nitric oxide-donating aspirin inhibits beta-catenin/T cell factor (TCF) signaling in SW480 colon cancer cells by disrupting the nuclear beta-catenin-TCF association', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22), pp. 12584-9.

- Nath, N., Vassell, R., Chattopadhyay, M., Kogan, M. and Kashfi, K. (2009) 'Nitro-aspirin inhibits MCF-7 breast cancer cell growth: effects on COX-2 expression and Wnt/beta-catenin/TCF-4 signaling', *Biochem Pharmacol*, 78(10), pp. 1298-304.
- Neugut, A. I., Lin, A., Raab, G. T., Hillyer, G. C., Keller, D., O'Neil, D. S., Accordino, M. K., Kiran, R. P., Wright, J. and Hershman, D. L. (2019) 'FOLFOX and FOLFIRI Use in Stage IV Colon Cancer: Analysis of SEER-Medicare Data', *Clin Colorectal Cancer*, 18(2), pp. 133-140.
- Nicolas, C. S., Csaba, Z., Fafouri, A., Javalet, C., Gressens, P., Dournaud, P. and Peineau, S. (2012) '[JAK/STAT: from inflammation to memory]', *Med Sci (Paris)*, 28(5), pp. 456-8.
- Ogura, M., Uchida, T., Terui, Y., Hayakawa, F., Kobayashi, Y., Taniwaki, M., Takamatsu, Y., Naoe, T., Tobinai, K., Munakata, W., Yamauchi, T., Kageyama, A., Yuasa, M., Motoyama, M., Tsunoda, T. and Hatake, K. (2015) 'Phase I study of OPB-51602, an oral inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3, in patients with relapsed/refractory hematological malignancies', *Cancer Sci*, 106(7), pp. 896-901.
- Oh, D. Y., Lee, S. H., Han, S. W., Kim, M. J., Kim, T. M., Kim, T. Y., Heo, D. S., Yuasa, M., Yanagihara, Y. and Bang, Y. J. (2015) 'Phase I Study of OPB-31121, an Oral STAT3 Inhibitor, in Patients with Advanced Solid Tumors', *Cancer Res Treat*, 47(4), pp. 607-15.
- Oh, K., Lee, O. Y., Shon, S. Y., Nam, O., Ryu, P. M., Seo, M. W. and Lee, D. S. (2013) 'A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model', *Breast Cancer Res*, 15(5), pp. R79.
- Ohta, A. and Sitkovsky, M. (2014) 'Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells', *Front Immunol*, 5, pp. 304.
- Oishi, Y. and Manabe, I. (2018) 'Macrophages in inflammation, repair and regeneration', *Int Immunol*, 30(11), pp. 511-528.
- Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S. and Honjo, T. (2013) 'A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application', *Nat Immunol*, 14(12), pp. 1212-8.
- Oliveira, A. F., Bretes, L. and Furtado, I. (2019) 'Review of PD-1/PD-L1 Inhibitors in Metastatic dMMR/MSI-H Colorectal Cancer', *Front Oncol*, 9, pp. 396.
- Oshi, M., Asaoka, M., Tokumaru, Y., Yan, L., Matsuyama, R., Ishikawa, T., Endo, I. and Takabe, K. (2020) 'CD8 T Cell Score as a Prognostic Biomarker for Triple Negative Breast Cancer', *Int J Mol Sci*, 21(18).
- Oun, R., Moussa, Y. E. and Wheate, N. J. (2018) 'The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: a review for chemists', *Dalton Trans*, 47(19), pp. 6645-6653.
- Parker, J. D. and Parker, J. O. (1998) 'Nitrate therapy for stable angina pectoris', *N Engl J Med*, 338(8), pp. 520-31.
- Parkhurst, M. R., Yang, J. C., Langan, R. C., Dudley, M. E., Nathan, D. A., Feldman, S. A., Davis, J. L., Morgan, R. A., Merino, M. J., Sherry, R. M., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Phan, G. Q., Lim, R. M., Wank, S. A., Restifo, N. P., Robbins, P. F., Laurencot, C. M. and Rosenberg, S. A. (2011) 'T cells targeting carcinoembryonic antigen can mediate regression of metastatic colorectal cancer but induce severe transient colitis', *Mol Ther*, 19(3), pp. 620-6.
- Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B. and Riley, J. L. (2005) 'CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms', *Mol Cell Biol*, 25(21), pp. 9543-53.
- Paulík, A., Nekvindová, J. and Filip, S. (2020) 'Irinotecan toxicity during treatment of metastatic colorectal cancer: focus on pharmacogenomics and personalized medicine', *Tumori*, 106(2), pp. 87-94.
- Pavlova, N. N. and Thompson, C. B. (2016) 'The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism', *Cell Metab*, 23(1), pp. 27-47.
- Pemmaraju, N., Kantarjian, H., Kadia, T., Cortes, J., Borthakur, G., Newberry, K., Garcia-Manero, G., Ravandi, F., Jabbour, E., Deltasala, S., Pierce, S. and Verstovsek, S. (2015) 'A phase

I/II study of the Janus kinase (JAK)1 and 2 inhibitor ruxolitinib in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia', *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 15(3), pp. 171-6.

- Piawah, S. and Venook, A. P. (2019) 'Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer', *Cancer*, 125(23), pp. 4139-4147.
- Pistritto, G., Trisciuglio, D., Ceci, C., Garufi, A. and D'Orazi, G. (2016) 'Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies', *Aging (Albany NY)*, 8(4), pp. 603-19.
- Plenchette, S. (2015) 'Role Of S-Nitrosylation In The Extrinsic Apoptotic Signalling Pathway In Cancer', *Redox Biol*, 5, pp. 415.
- Plenchette, S., Romagny, S., Laurens, V. and Bettaieb, A. (2015) 'S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer', *Redox Biol*, 6, pp. 507-15.
- Plenchette, S., Romagny, S., Laurens, V. and Bettaieb, A. (2016) '[NO and cancer: itinerary of a double agent]', *Med Sci (Paris)*, 32(6-7), pp. 625-33.
- Plitas, G., Konopacki, C., Wu, K., Bos, P. D., Morrow, M., Putintseva, E. V., Chudakov, D. M. and Rudensky, A. Y. (2016) 'Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer', *Immunity*, 45(5), pp. 1122-1134.
- Porshneva, K., Papiernik, D., Psurski, M., Łupicka-Słowik, A., Matkowski, R., Ekiert, M., Nowak, M., Jarosz, J., Banach, J., Milczarek, M., Goszczyński, T. M., Sieńczyk, M. and Wietrzyk, J. (2019) 'Temporal inhibition of mouse mammary gland cancer metastasis by CORM-A1 and DETA/NO combination therapy', *Theranostics*, 9(13), pp. 3918-3939.
- Prat, A. and Perou, C. M. (2011) 'Deconstructing the molecular portraits of breast cancer', *Mol Oncol*, 5(1), pp. 5-23.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A. and Muñoz, M. (2015) 'Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer', *Breast*, 24 Suppl 2, pp. S26-35.
- Prévotat, L., Filomenko, R., Solary, E., Jeannin, J. F. and Bettaieb, A. (2006) 'Nitric oxide-induced down-regulation of beta-catenin in colon cancer cells by a proteasome-independent specific pathway', *Gastroenterology*, 131(4), pp. 1142-52.
- Pópulo, H., Lopes, J. M. and Soares, P. (2012) 'The mTOR signalling pathway in human cancer', *Int J Mol Sci*, 13(2), pp. 1886-918.
- Radomski, M., Zeh, H. J., Edington, H. D., Pingpank, J. F., Butterfield, L. H., Whiteside, T. L., Wieckowski, E., Bartlett, D. L. and Kalinski, P. (2016) 'Prolonged intralymphatic delivery of dendritic cells through implantable lymphatic ports in patients with advanced cancer', *J Immunother Cancer*, 4, pp. 24.
- Rahamata, A.-B., Marion, C., Nathalie, D., Cindy, R.-G., Cédric, S., Myriam, L., Jean-François, J., Catherine, P. and Ali, B. (2013) 'Activation of Akt by the Mammalian Target of Rapamycin Complex 2 Renders Colon Cancer Cells Sensitive to Apoptosis Induced by Nitric Oxide and Akt Inhibitor', *Journal of Carcinogenesis and Mutagenesis*.
- Ramjiawan, R. R., Griffioen, A. W. and Duda, D. G. (2017) 'Anti-angiogenesis for cancer revisited: Is there a role for combinations with immunotherapy?', *Angiogenesis*, 20(2), pp. 185-204.
- Raskov, H., Orhan, A., Christensen, J. P. and Gögenur, I. (2021) 'Cytotoxic CD8', *Br J Cancer*, 124(2), pp. 359-367.
- Raskovalova, T., Lokshin, A., Huang, X., Su, Y., Mandic, M., Zarour, H. M., Jackson, E. K. and Gorelik, E. (2007) 'Inhibition of cytokine production and cytotoxic activity of human antimelanoma specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by adenosine-protein kinase A type I signaling', *Cancer Res*, 67(12), pp. 5949-56.
- Rawluk, J. and Waller, C. F. (2018) 'Gefitinib', *Recent Results Cancer Res*, 211, pp. 235-246.

- Rech, A. J. and Vonderheide, R. H. (2009) 'Clinical use of anti-CD25 antibody daclizumab to enhance immune responses to tumor antigen vaccination by targeting regulatory T cells', *Ann N Y Acad Sci*, 1174, pp. 99-106.
- Reck, M., Borghaei, H. and O'Byrne, K. J. (2019) 'Nivolumab plus ipilimumab in non-small-cell lung cancer', *Future Oncol*, 15(19), pp. 2287-2302.
- Reichardt, P. (2018) 'The Story of Imatinib in GIST - a Journey through the Development of a Targeted Therapy', *Oncol Res Treat*, 41(7-8), pp. 472-477.
- Reymen, B. J. T., van Gisbergen, M. W., Even, A. J. G., Zegers, C. M. L., Das, M., Vegt, E., Wildberger, J. E., Mottaghy, F. M., Yaromina, A., Dubois, L. J., van Elmpt, W., De Ruyscher, D. and Lambin, P. (2020) 'Nitroglycerin as a radiosensitizer in non-small cell lung cancer: Results of a prospective imaging-based phase II trial', *Clin Transl Radiat Oncol*, 21, pp. 49-55.
- Reynaert, N. L., Ckless, K., Korn, S. H., Vos, N., Guala, A. S., Wouters, E. F., van der Vliet, A. and Janssen-Heininger, Y. M. (2004) 'Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(24), pp. 8945-50.
- Reyskens, K. M. and Arthur, J. S. (2016) 'Emerging Roles of the Mitogen and Stress Activated Kinases MSK1 and MSK2', *Front Cell Dev Biol*, 4, pp. 56.
- Ricken, B., Fellmann, O., Kohler, H. P., Schäffer, A., Corvini, P. F. and Kolvenbach, B. A. (2015) 'Degradation of sulfonamide antibiotics by Microbacterium sp. strain BR1 - elucidating the downstream pathway', *N Biotechnol*, 32(6), pp. 710-5.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F. and Matzinger, P. (1998) 'A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell', *Nature*, 393(6684), pp. 474-8.
- Ridnour, L. A., Barasch, K. M., Windhausen, A. N., Dorsey, T. H., Lizardo, M. M., Yfantis, H. G., Lee, D. H., Switzer, C. H., Cheng, R. Y., Heinecke, J. L., Brueggemann, E., Hines, H. B., Khanna, C., Glynn, S. A., Ambs, S. and Wink, D. A. (2012) 'Nitric oxide synthase and breast cancer: role of TIMP-1 in NO-mediated Akt activation', *PLoS One*, 7(9), pp. e44081.
- Rizza, S. and Filomeni, G. (2020) 'Exploiting S-nitrosylation for cancer therapy: facts and perspectives', *Biochem J*, 477(19), pp. 3649-3672.
- Romagny, S., Bouaouiche, S., Lucchi, G., Ducoroy, P., Bertoldo, J. B., Terenzi, H., Bettaieb, A. and Plenchette, S. (2018) 'S-Nitrosylation of cIAP1 Switches Cancer Cell Fate from TNF α /TNFR1-Mediated Cell Survival to Cell Death', *Cancer Res*, 78(8), pp. 1948-1957.
- Rosen, A. W., Degett, T. H. and Gögenur, I. (2016) '[Individualized treatment of colon cancer]', *Ugeskr Laeger*, 178(31).
- Ross, S. H. and Cantrell, D. A. (2018) 'Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes', *Annu Rev Immunol*, 36, pp. 411-433.
- Roulot, A., Héquet, D., Guinebretière, J. M., Vincent-Salomon, A., Lerebours, F., Dubot, C. and Rouzier, R. (2016) 'Tumoral heterogeneity of breast cancer', *Ann Biol Clin (Paris)*, 74(6), pp. 653-660.
- Röhrle, N., Knott, M. M. L. and Anz, D. (2020) 'CCL22 Signaling in the Tumor Environment', *Adv Exp Med Biol*, 1231, pp. 79-96.
- Sabado, R. L., Balan, S. and Bhardwaj, N. (2017) 'Dendritic cell-based immunotherapy', *Cell Res*, 27(1), pp. 74-95.
- Sabat, R., Grütz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K. and Geginat, J. (2010) 'Biology of interleukin-10', *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(5), pp. 331-44.
- Saharinen, P., Takaluoma, K. and Silvennoinen, O. (2000) 'Regulation of the Jak2 tyrosine kinase by its pseudokinase domain', *Mol Cell Biol*, 20(10), pp. 3387-95.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999) 'Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions', *Nature*, 401(6754), pp. 708-12.
- Sawa-Wejksza, K. and Kandefer-Szerszeń, M. (2018) 'Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy', *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 66(2), pp. 97-111.

- Sawant, D. V., Yano, H., Chikina, M., Zhang, Q., Liao, M., Liu, C., Callahan, D. J., Sun, Z., Sun, T., Tabib, T., Pennathur, A., Corry, D. B., Luketich, J. D., Lafyatis, R., Chen, W., Poholek, A. C., Bruno, T. C., Workman, C. J. and Vignali, D. A. A. (2019) 'Adaptive plasticity of IL-10', *Nat Immunol*, 20(6), pp. 724-735.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. (2011) 'The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6', *Biochim Biophys Acta*, 1813(5), pp. 878-88.
- Schenkel, J. M. and Masopust, D. (2014) 'Tissue-resident memory T cells', *Immunity*, 41(6), pp. 886-97.
- Schluck, M., Hammink, R., Figdor, C. G., Verdoes, M. and Weiden, J. (2019) 'Biomaterial-Based Activation and Expansion of Tumor-Specific T Cells', *Front Immunol*, 10, pp. 931.
- Schlumberger, M., Tahara, M., Wirth, L. J., Robinson, B., Brose, M. S., Elisei, R., Habra, M. A., Newbold, K., Shah, M. H., Hoff, A. O., Gianoukakis, A. G., Kiyota, N., Taylor, M. H., Kim, S. B., Krzyzanowska, M. K., Dutcus, C. E., de las Heras, B., Zhu, J. and Sherman, S. I. (2015) 'Lenvatinib versus placebo in radioiodine-refractory thyroid cancer', *N Engl J Med*, 372(7), pp. 621-30.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. and Melief, C. J. (1998) 'T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions', *Nature*, 393(6684), pp. 480-3.
- Schreiber, R. D., Old, L. J. and Smyth, M. J. (2011) 'Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion', *Science*, 331(6024), pp. 1565-70.
- Schubert, C., Allhoff, M., Tillmann, S., Maié, T., Costa, I. G., Lipka, D. B., Schemionek, M., Feldberg, K., Baumeister, J., Brümmendorf, T. H., Chatain, N. and Koschmieder, S. (2019) 'Differential roles of STAT1 and STAT2 in the sensitivity of JAK2V617F- vs. BCR-ABL-positive cells to interferon alpha', *J Hematol Oncol*, 12(1), pp. 36.
- Sebbagh, M., Hamelin, J., Bertoglio, J., Solary, E. and Bréard, J. (2005) 'Direct cleavage of ROCK II by granzyme B induces target cell membrane blebbing in a caspase-independent manner', *J Exp Med*, 201(3), pp. 465-71.
- Seruga, B., Zhang, H., Bernstein, L. J. and Tannock, I. F. (2008) 'Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer', *Nat Rev Cancer*, 8(11), pp. 887-99.
- Shamseddine, A. I. and Farhat, F. S. (2011) 'Platinum-based compounds for the treatment of metastatic breast cancer', *Chemotherapy*, 57(6), pp. 468-87.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2001) 'IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity', *Nature*, 410(6832), pp. 1107-11.
- Sharma, A., Subudhi, S. K., Blando, J., Scutti, J., Vence, L., Wargo, J., Allison, J. P., Ribas, A. and Sharma, P. (2019) 'Anti-CTLA-4 Immunotherapy Does Not Deplete FOXP3', *Clin Cancer Res*, 25(4), pp. 1233-1238.
- Sharma, P., Retz, M., Siefker-Radtke, A., Baron, A., Necchi, A., Bedke, J., Plimack, E. R., Vaena, D., Grimm, M. O., Bracarda, S., Arranz, J., Pal, S., Ohyama, C., Sazi, A., Qu, X., Lambert, A., Krishnan, S., Azrilevich, A. and Galsky, M. D. (2017) 'Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial', *Lancet Oncol*, 18(3), pp. 312-322.
- Sharonov, G. V., Serebrovskaya, E. O., Yuzhakova, D. V., Britanova, O. V. and Chudakov, D. M. (2020) 'B cells, plasma cells and antibody repertoires in the tumour microenvironment', *Nat Rev Immunol*, 20(5), pp. 294-307.
- Shen, M., Jiang, Y. Z., Wei, Y., Ell, B., Sheng, X., Esposito, M., Kang, J., Hang, X., Zheng, H., Rowicki, M., Zhang, L., Shih, W. J., Celià-Terrassa, T., Liu, Y., Cristea, I., Shao, Z. M. and Kang, Y. (2019) 'Tinagl1 Suppresses Triple-Negative Breast Cancer Progression and Metastasis by Simultaneously Inhibiting Integrin/FAK and EGFR Signaling', *Cancer Cell*, 35(1), pp. 64-80.e7.

- Siemens, D. R., Heaton, J. P., Adams, M. A., Kawakami, J. and Graham, C. H. (2009) 'Phase II study of nitric oxide donor for men with increasing prostate-specific antigen level after surgery or radiotherapy for prostate cancer', *Urology*, 74(4), pp. 878-83.
- Sikov, W. M., Berry, D. A., Perou, C. M., Singh, B., Cirrincione, C. T., Tolaney, S. M., Kuzma, C. S., Pluard, T. J., Somlo, G., Port, E. R., Golshan, M., Bellon, J. R., Collyar, D., Hahn, O. M., Carey, L. A., Hudis, C. A. and Winer, E. P. (2015) 'Impact of the addition of carboplatin and/or bevacizumab to neoadjuvant once-per-week paclitaxel followed by dose-dense doxorubicin and cyclophosphamide on pathologic complete response rates in stage II to III triple-negative breast cancer: CALGB 40603 (Alliance)', *J Clin Oncol*, 33(1), pp. 13-21.
- Silvennoinen, O., Ungureanu, D., Niranjana, Y., Hammaren, H., Bandaranayake, R. and Hubbard, S. R. (2013) 'New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2', *Biochem Soc Trans*, 41(4), pp. 1002-7.
- Simone, B. A., Palagani, A., Strickland, K., Ko, K., Jin, L., Lim, M. K., Dan, T. D., Sarich, M., Monti, D. A., Cristofanilli, M. and Simone, N. L. (2018) 'Caloric restriction counteracts chemotherapy-induced inflammation and increases response to therapy in a triple negative breast cancer model', *Cell Cycle*, 17(13), pp. 1536-1544.
- Sinha, I., Hannawa, K. K., Ailawadi, G., Woodrum, D. T., Ford, J. W., Henke, P. K., Stanley, J. C., Eagleton, M. J. and Upchurch, G. R. (2006) 'The nitric oxide donor DETA-NONOate decreases matrix metalloproteinase-9 expression and activity in rat aortic smooth muscle and abdominal aortic explants', *Ann Vasc Surg*, 20(1), pp. 92-8.
- Sivori, S., Pende, D., Quatrini, L., Pietra, G., Della Chiesa, M., Vacca, P., Tumino, N., Moretta, F., Mingari, M. C., Locatelli, F. and Moretta, L. (2021) 'NK cells and ILCs in tumor immunotherapy', *Mol Aspects Med*, 80, pp. 100870.
- Skytthe, M. K., Graversen, J. H. and Moestrup, S. K. (2020) 'Targeting of CD163', *Int J Mol Sci*, 21(15).
- Slade, D. (2020) 'PARP and PARG inhibitors in cancer treatment', *Genes Dev*, 34(5-6), pp. 360-394.
- Soldevilla, M. M., Villanueva, H., Martinez-Velez, N., Meraviglia-Crivelli, D., Alonso, M. M., Cebollero, J., Menon, A. P., Puigdellosos, M. and Pastor, F. (2018) 'Intratumoral injection of activated B lymphoblast in combination with PD-1 blockade induces systemic antitumor immunity with reduction of local and distal tumors', *Oncoimmunology*, 7(8), pp. e1450711.
- Song, L., Smith, M. A., Doshi, P., Sasser, K., Fulp, W., Altiock, S. and Haura, E. B. (2014) 'Antitumor efficacy of the anti-interleukin-6 (IL-6) antibody siltuximab in mouse xenograft models of lung cancer', *J Thorac Oncol*, 9(7), pp. 974-982.
- Soni, Y., Softness, K., Arora, H. and Ramasamy, R. (2020) 'The Yin Yang Role of Nitric Oxide in Prostate Cancer', *Am J Mens Health*, 14(1), pp. 1557988320903191.
- Sousa, S., Brion, R., Lintunen, M., Kronqvist, P., Sandholm, J., Mönkkönen, J., Kellokumpu-Lehtinen, P. L., Lauttia, S., Tynninen, O., Joensuu, H., Heymann, D. and Määttä, J. A. (2015) 'Human breast cancer cells educate macrophages toward the M2 activation status', *Breast Cancer Res*, 17, pp. 101.
- Stamler, J. S. (1994) 'Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide', *Cell*, 78(6), pp. 931-6.
- Stanton, S. E. and Disis, M. L. (2016) 'Clinical significance of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer', *J Immunother Cancer*, 4, pp. 59.
- Stine, Z. E., Walton, Z. E., Altman, B. J., Hsieh, A. L. and Dang, C. V. (2015) 'MYC, Metabolism, and Cancer', *Cancer Discov*, 5(10), pp. 1024-39.
- Suhail, Y., Cain, M. P., Vanaja, K., Kurywchak, P. A., Levchenko, A., Kalluri, R. and Kshitiz (2019) 'Systems Biology of Cancer Metastasis', *Cell Syst*, 9(2), pp. 109-127.
- Sun, Y., Moretti, L., Giacalone, N. J., Schleicher, S., Speirs, C. K., Carbone, D. P. and Lu, B. (2011) 'Inhibition of JAK2 signaling by TG101209 enhances radiotherapy in lung cancer models', *J Thorac Oncol*, 6(4), pp. 699-706.

- Suttorp, M., Bornhäuser, M., Metzler, M., Millot, F. and Schleyer, E. (2018) 'Pharmacology and pharmacokinetics of imatinib in pediatric patients', *Expert Rev Clin Pharmacol*, 11(3), pp. 219-231.
- Suzman, D. L., Agrawal, S., Ning, Y. M., Maher, V. E., Fernandes, L. L., Karuri, S., Tang, S., Sridhara, R., Schroeder, J., Goldberg, K. B., Ibrahim, A., McKee, A. E., Pazdur, R. and Beaver, J. A. (2019) 'FDA Approval Summary: Atezolizumab or Pembrolizumab for the Treatment of Patients with Advanced Urothelial Carcinoma Ineligible for Cisplatin-Containing Chemotherapy', *Oncologist*, 24(4), pp. 563-569.
- Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D. R. and Cutts, S. M. (2006) 'Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death', *Cancer Res*, 66(9), pp. 4863-71.
- Switzer, C. H., Glynn, S. A., Cheng, R. Y., Ridnour, L. A., Green, J. E., Ambs, S. and Wink, D. A. (2012a) 'S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer', *Mol Cancer Res*, 10(9), pp. 1203-15.
- Switzer, C. H., Ridnour, L. A., Cheng, R., Heinecke, J., Burke, A., Glynn, S., Ambs, S. and Wink, D. A. (2012b) 'S-Nitrosation Mediates Multiple Pathways That Lead to Tumor Progression in Estrogen Receptor-Negative Breast Cancer', *For Immunopathol Dis Therap*, 3(2), pp. 117-124.
- Szlosarek, P., Charles, K. A. and Balkwill, F. R. (2006) 'Tumour necrosis factor-alpha as a tumour promoter', *Eur J Cancer*, 42(6), pp. 745-50.
- Takatsu, K. (2011) 'Interleukin-5 and IL-5 receptor in health and diseases', *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 87(8), pp. 463-85.
- Tang, C. H., Wei, W. and Liu, L. (2012) 'Regulation of DNA repair by S-nitrosylation', *Biochim Biophys Acta*, 1820(6), pp. 730-5.
- Tang, Z., Bauer, J. A., Morrison, B. and Lindner, D. J. (2006) 'Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4', *Mol Cell Biol*, 26(15), pp. 5588-94.
- Taniguchi, K. and Karin, M. (2014) 'IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer', *Semin Immunol*, 26(1), pp. 54-74.
- Tas, F. and Erturk, K. (2020) 'BRAF V600E mutation as a prognostic factor in cutaneous melanoma patients', *Dermatol Ther*, 33(2), pp. e13270.
- Terme, M., Pernet, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A. F., Tartour, E. and Taieb, J. (2013) 'VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer', *Cancer Res*, 73(2), pp. 539-49.
- Thomas, D. D. and Wink, D. A. (2017) 'NOS2 as an Emergent Player in Progression of Cancer', *Antioxid Redox Signal*, 26(17), pp. 963-965.
- Torre, D., Pugliese, A. and Speranza, F. (2002) 'Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe?', *Lancet Infect Dis*, 2(5), pp. 273-80.
- Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W. H., Pagès, F. and Galon, J. (2011) 'Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer', *Cancer Res*, 71(4), pp. 1263-71.
- Trapani, J. A. and Darcy, P. K. (2017) 'Immunotherapy of cancer', *Aust Fam Physician*, 46(4), pp. 194-199.
- Turko, I. V. and Murad, F. (2002) 'Protein nitration in cardiovascular diseases', *Pharmacol Rev*, 54(4), pp. 619-34.
- UICC TNM Classification of Malignant Tumors - 8th Edition.
- Umeda, D., Yamada, K. and Tachibana, H. (2008) 'H89 (N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide) induces reduction of myosin regulatory light chain phosphorylation and inhibits cell proliferation', *Eur J Pharmacol*, 590(1-3), pp. 61-6.
- Ungureanu, D., Wu, J., Pekkala, T., Niranjana, Y., Young, C., Jensen, O. N., Xu, C. F., Neubert, T. A., Skoda, R. C., Hubbard, S. R. and Silvennoinen, O. (2011) 'The pseudokinase domain of JAK2

is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling', *Nat Struct Mol Biol*, 18(9), pp. 971-6.

- *Union and (UICC), f. I. C. C.*
- Van Cutsem, E., Huijberts, S., Grothey, A., Yaeger, R., Cuyle, P. J., Elez, E., Fakih, M., Montagut, C., Peeters, M., Yoshino, T., Wasan, H., Desai, J., Ciardiello, F., Gollerkeri, A., Christy-Bittel, J., Maharry, K., Sandor, V., Schellens, J. H. M., Kopetz, S. and Tabernero, J. (2019) 'Binimetinib, Encorafenib, and Cetuximab Triplet Therapy for Patients With', *J Clin Oncol*, 37(17), pp. 1460-1469.
- van de Ven, K. and Borst, J. (2015) 'Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential', *Immunotherapy*, 7(6), pp. 655-67.
- van Rhee, F., Wong, R. S., Munshi, N., Rossi, J. F., Ke, X. Y., Fosså, A., Simpson, D., Capra, M., Liu, T., Hsieh, R. K., Goh, Y. T., Zhu, J., Cho, S. G., Ren, H., Cavet, J., Bandekar, R., Rothman, M., Puchalski, T. A., Reddy, M., van de Velde, H., Vermeulen, J. and Casper, C. (2014) 'Siltuximab for multicentric Castleman's disease: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial', *Lancet Oncol*, 15(9), pp. 966-74.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. and Thompson, C. B. (2009) 'Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation', *Science*, 324(5930), pp. 1029-33.
- Vasekar, M., Degraff, D. and Joshi, M. (2016) 'Immunotherapy in Bladder Cancer', *Curr Mol Pharmacol*, 9(3), pp. 242-251.
- Velcheti, V. and Schalper, K. (2016) 'Basic Overview of Current Immunotherapy Approaches in Cancer', *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 35, pp. 298-308.
- Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. and Smyth, M. J. (2011) 'Natural innate and adaptive immunity to cancer', *Annu Rev Immunol*, 29, pp. 235-71.
- Viallard, C. and Larrivée, B. (2017) 'Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets', *Angiogenesis*, 20(4), pp. 409-426.
- Villarreal, D. O., L'Huillier, A., Armington, S., Mottershead, C., Filippova, E. V., Coder, B. D., Petit, R. G. and Princiotta, M. F. (2018) 'Targeting CCR8 Induces Protective Antitumor Immunity and Enhances Vaccine-Induced Responses in Colon Cancer', *Cancer Res*, 78(18), pp. 5340-5348.
- Vishnubhotla, R., Sun, S., Huq, J., Bulic, M., Ramesh, A., Guzman, G., Cho, M. and Glover, S. C. (2007) 'ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging', *Lab Invest*, 87(11), pp. 1149-58.
- Vodenkova, S., Buchler, T., Cervena, K., Veskrnova, V., Vodicka, P. and Vymetalkova, V. (2020) '5-fluorouracil and other fluoropyrimidines in colorectal cancer: Past, present and future', *Pharmacol Ther*, 206, pp. 107447.
- von Minckwitz, G., Huang, C. S., Mano, M. S., Loibl, S., Mamounas, E. P., Untch, M., Wolmark, N., Rastogi, P., Schneeweiss, A., Redondo, A., Fischer, H. H., Jacot, W., Conlin, A. K., Arce-Salinas, C., Wapnir, I. L., Jackisch, C., DiGiovanna, M. P., Fasching, P. A., Crown, J. P., Wülfing, P., Shao, Z., Rota Caremoli, E., Wu, H., Lam, L. H., Tesarowski, D., Smitt, M., Douthwaite, H., Singel, S. M., Geyer, C. E. and Investigators, K. (2019) 'Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer', *N Engl J Med*, 380(7), pp. 617-628.
- Waller, C. F. (2018) 'Imatinib Mesylate', *Recent Results Cancer Res*, 212, pp. 1-27.
- Wang, B., Li, H., Wang, X. and Zhu, X. (2020) 'The association of aberrant expression of NLRP3 and p-S6K1 in colorectal cancer', *Pathol Res Pract*, 216(1), pp. 152737.
- Wang, D., Xu, J., Liu, B., He, X., Zhou, L., Hu, X., Qiao, F., Zhang, A., Xu, X., Zhang, H., Wicha, M. S., Zhang, L., Shao, Z. M. and Liu, S. (2018a) 'IL6 blockade potentiates the anti-tumor effects of γ -secretase inhibitors in Notch3-expressing breast cancer', *Cell Death Differ*, 25(2), pp. 330-339.
- Wang, D., Zhang, B., Gao, H., Ding, G., Wu, Q., Zhang, J., Liao, L. and Chen, H. (2014) 'Clinical research of genetically modified dendritic cells in combination with cytokine-induced killer cell treatment in advanced renal cancer', *BMC Cancer*, 14, pp. 251.

- Wang, J., Chen, H., Chen, X. and Lin, H. (2016a) 'Expression of Tumor-Related Macrophages and Cytokines After Surgery of Triple-Negative Breast Cancer Patients and its Implications', *Med Sci Monit*, 22, pp. 115-20.
- Wang, X., Wong, K., Ouyang, W. and Rutz, S. (2019) 'Targeting IL-10 Family Cytokines for the Treatment of Human Diseases', *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 11(2).
- Wang, Y., Shi, J., Chai, K., Ying, X. and Zhou, B. P. (2013) 'The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis', *Curr Cancer Drug Targets*, 13(9), pp. 963-972.
- Wang, Y., Zhao, E., Zhang, Z., Zhao, G. and Cao, H. (2018b) 'Association between Tim-3 and Gal-9 expression and gastric cancer prognosis', *Oncol Rep*, 40(4), pp. 2115-2126.
- Wang, Z. (2012) 'Protein S-nitrosylation and cancer', *Cancer Lett*, 320(2), pp. 123-9.
- Wang, Z. Y., Zhang, J. A., Wu, X. J., Liang, Y. F., Lu, Y. B., Gao, Y. C., Dai, Y. C., Yu, S. Y., Jia, Y., Fu, X. X., Rao, X., Xu, J. F. and Zhong, J. (2016b) 'IL-6 Inhibition Reduces STAT3 Activation and Enhances the Antitumor Effect of Carboplatin', *Mediators Inflamm*, 2016, pp. 8026494.
- Wculek, S. K., Cueto, F. J., Mujal, A. M., Melero, I., Krummel, M. F. and Sancho, D. (2020) 'Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy', *Nat Rev Immunol*, 20(1), pp. 7-24.
- Weng, Y. S., Tseng, H. Y., Chen, Y. A., Shen, P. C., Al Haq, A. T., Chen, L. M., Tung, Y. C. and Hsu, H. L. (2019) 'MCT-1/miR-34a/IL-6/IL-6R signaling axis promotes EMT progression, cancer stemness and M2 macrophage polarization in triple-negative breast cancer', *Mol Cancer*, 18(1), pp. 42.
- Wink, D. A., Kasprzak, K. S., Maragos, C. M., Elespuru, R. K., Misra, M., Dunams, T. M., Cebula, T. A., Koch, W. H., Andrews, A. W. and Allen, J. S. (1991) 'DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors', *Science*, 254(5034), pp. 1001-3.
- Won, K. A. and Spruck, C. (2020) 'Triple-negative breast cancer therapy: Current and future perspectives (Review)', *Int J Oncol*, 57(6), pp. 1245-1261.
- Woo, S. R., Corrales, L. and Gajewski, T. F. (2015) 'Innate immune recognition of cancer', *Annu Rev Immunol*, 33, pp. 445-74.
- Wu, X., Hsu, D. K., Wang, K. H., Huang, Y., Mendoza, L., Zhou, Y. and Hwang, S. T. (2019) 'IL-10 is overexpressed in human cutaneous T-cell lymphoma and is required for maximal tumor growth in a mouse model', *Leuk Lymphoma*, 60(5), pp. 1244-1252.
- Wu, X., Tao, P., Zhou, Q., Li, J., Yu, Z., Wang, X., Li, C., Yan, M., Zhu, Z., Liu, B. and Su, L. (2017) 'IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway', *Oncotarget*, 8(13), pp. 20741-20750.
- Xie, B., Wang, D. H. and Spechler, S. J. (2012) 'Sorafenib for treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review', *Dig Dis Sci*, 57(5), pp. 1122-9.
- Xu, L., Xu, W., Wen, Z. and Xiong, S. (2011) 'In situ prior proliferation of CD4+ CCR6+ regulatory T cells facilitated by TGF- β secreting DCs is crucial for their enrichment and suppression in tumor immunity', *PLoS One*, 6(5), pp. e20282.
- Xun, Q., Wang, Z., Hu, X., Ding, K. and Lu, X. (2020) 'Small-Molecule CSF1R Inhibitors as Anticancer Agents', *Curr Med Chem*, 27(23), pp. 3944-3966.
- Yan, W. L., Shen, K. Y., Tien, C. Y., Chen, Y. A. and Liu, S. J. (2017) 'Recent progress in GM-CSF-based cancer immunotherapy', *Immunotherapy*, 9(4), pp. 347-360.
- Yang, F., Brown, C., Buettner, R., Hedvat, M., Starr, R., Scuto, A., Schroeder, A., Jensen, M. and Jove, R. (2010) 'Sorafenib induces growth arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the dephosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3', *Mol Cancer Ther*, 9(4), pp. 953-62.
- Yang, J., Zhang, W., Evans, P. M., Chen, X., He, X. and Liu, C. (2006) 'Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells', *J Biol Chem*, 281(26), pp. 17751-7.
- Yasuda, H., Nakayama, K., Watanabe, M., Suzuki, S., Fuji, H., Okinaga, S., Kanda, A., Zayasu, K., Sasaki, T., Asada, M., Suzuki, T., Yoshida, M., Yamanda, S., Inoue, D., Kaneta, T., Kondo, T.,

Takai, Y., Sasaki, H., Yanagihara, K. and Yamaya, M. (2006a) 'Nitroglycerin treatment may enhance chemosensitivity to docetaxel and carboplatin in patients with lung adenocarcinoma', *Clin Cancer Res*, 12(22), pp. 6748-57.

- Yasuda, H., Yamaya, M., Nakayama, K., Sasaki, T., Ebihara, S., Kanda, A., Asada, M., Inoue, D., Suzuki, T., Okazaki, T., Takahashi, H., Yoshida, M., Kaneta, T., Ishizawa, K., Yamanda, S., Tomita, N., Yamasaki, M., Kikuchi, A., Kubo, H. and Sasaki, H. (2006b) 'Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer', *J Clin Oncol*, 24(4), pp. 688-94.
- Yasukawa, T., Tokunaga, E., Ota, H., Sugita, H., Martyn, J. A. and Kaneki, M. (2005) 'S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance', *J Biol Chem*, 280(9), pp. 7511-8.
- Ye, L., Li, Y., Tang, H., Liu, W., Chen, Y., Dai, T., Liang, R., Shi, M., Yi, S., Chen, G. and Yang, Y. (2019) 'CD8+CXCR5+T cells infiltrating hepatocellular carcinomas are activated and predictive of a better prognosis', *Aging (Albany NY)*, 11(20), pp. 8879-8891.
- Younes, S. A., Freeman, M. L., Mudd, J. C., Shive, C. L., Reynaldi, A., Panigrahi, S., Estes, J. D., Deleage, C., Lucero, C., Anderson, J., Schacker, T. W., Davenport, M. P., McCune, J. M., Hunt, P. W., Lee, S. A., Serrano-Villar, S., Debernardo, R. L., Jacobson, J. M., Canaday, D. H., Sekaly, R. P., Rodriguez, B., Sieg, S. F. and Lederman, M. M. (2016) 'IL-15 promotes activation and expansion of CD8+ T cells in HIV-1 infection', *J Clin Invest*, 126(7), pp. 2745-56.
- Yu, C. X., Li, S. and Whorton, A. R. (2005) 'Redox regulation of PTEN by S-nitrosothiols', *Mol Pharmacol*, 68(3), pp. 847-54.
- Yu, K. D., Ye, F. G., He, M., Fan, L., Ma, D., Mo, M., Wu, J., Liu, G. Y., Di, G. H., Zeng, X. H., He, P. Q., Wu, K. J., Hou, Y. F., Wang, J., Wang, C., Zhuang, Z. G., Song, C. G., Lin, X. Y., Toss, A., Ricci, F., Shen, Z. Z. and Shao, Z. M. (2020) 'Effect of Adjuvant Paclitaxel and Carboplatin on Survival in Women With Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 3 Randomized Clinical Trial', *JAMA Oncol*, 6(9), pp. 1390-1396.
- Yu, M., Liu, T., Chen, Y., Li, Y. and Li, W. (2018) 'Combination therapy with protein kinase inhibitor H89 and Tetrandrine elicits enhanced synergistic antitumor efficacy', *J Exp Clin Cancer Res*, 37(1), pp. 114.
- Yue, P. and Turkson, J. (2009) 'Targeting STAT3 in cancer: how successful are we?', *Expert Opin Investig Drugs*, 18(1), pp. 45-56.
- Zagorulya, M., Duong, E. and Spranger, S. (2020) 'Impact of anatomic site on antigen-presenting cells in cancer', *J Immunother Cancer*, 8(2).
- Zahid, H., Simpson, E. R. and Brown, K. A. (2016) 'Inflammation, dysregulated metabolism and aromatase in obesity and breast cancer', *Curr Opin Pharmacol*, 31, pp. 90-96.
- Zhan, R., Wang, F., Wu, Y., Wang, Y., Qian, W., Liu, M., Liu, T., He, W., Ren, H. and Luo, G. (2018) 'Nitric oxide promotes epidermal stem cell proliferation via FOXG1-c-Myc signalling', *Nitric Oxide*, 73, pp. 1-8.
- Zhang, P., Hu, P., Shen, H., Yu, J., Liu, Q. and Du, J. (2014) 'Prognostic role of Twist or Snail in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis', *Eur J Clin Invest*, 44(11), pp. 1072-94.
- Zhang, S., Zhao, J., Bai, X., Handley, M. and Shan, F. (2021) 'Biological effects of IL-15 on immune cells and its potential for the treatment of cancer', *Int Immunopharmacol*, 91, pp. 107318.
- Zhang, T., Kee, W. H., Seow, K. T., Fung, W. and Cao, X. (2000) 'The coiled-coil domain of Stat3 is essential for its SH2 domain-mediated receptor binding and subsequent activation induced by epidermal growth factor and interleukin-6', *Mol Cell Biol*, 20(19), pp. 7132-9.
- Zhang, Y., Gu, W. and Sun, B. (2014) 'TH1/TH2 cell differentiation and molecular signals', *Adv Exp Med Biol*, 841, pp. 15-44.

- Zhao, H. J., Jiang, X., Hu, L. J., Yang, L., Deng, L. D., Wang, Y. P. and Ren, Z. P. (2020) 'Activation of GLP-1 receptor enhances the chemosensitivity of pancreatic cancer cells', *J Mol Endocrinol*, 64(2), pp. 103-113.
- Zheng, Q., Han, L., Dong, Y., Tian, J., Huang, W., Liu, Z., Jia, X., Jiang, T., Zhang, J., Li, X., Kang, C. and Ren, H. (2014) 'JAK2/STAT3 targeted therapy suppresses tumor invasion via disruption of the EGFRvIII/JAK2/STAT3 axis and associated focal adhesion in EGFRvIII-expressing glioblastoma', *Neuro Oncol*, 16(9), pp. 1229-43.
- Zhou, L., Chong, M. M. and Littman, D. R. (2009) 'Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation', *Immunity*, 30(5), pp. 646-55.
- Zhou, P., Shaffer, D. R., Alvarez Arias, D. A., Nakazaki, Y., Pos, W., Torres, A. J., Cremasco, V., Dougan, S. K., Cowley, G. S., Elpek, K., Brogdon, J., Lamb, J., Turley, S. J., Ploegh, H. L., Root, D. E., Love, J. C., Dranoff, G., Hacohen, N., Cantor, H. and Wucherpfennig, K. W. (2014) 'In vivo discovery of immunotherapy targets in the tumour microenvironment', *Nature*, 506(7486), pp. 52-7.

ANNEXES



Review

Protein kinase inhibitor-based cancer therapies: Considering the potential of nitric oxide (NO) to improve cancer treatment

Silvia Ghione^{a,b,1}, Nesrine Mabrouk^{a,b,1}, Catherine Paul^{a,b}, Ali Bettaieb^{a,b},
Stéphanie Plenchette^{a,b,*}

^a Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers, EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France

^b LIIC, EA7269, Université de Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Kinase
Kinase inhibitor
Cancer
Nitric oxide
Post-translational modification

ABSTRACT

The deregulation of a wide variety of protein kinases is associated with cancer cell initiation and tumor progression. Owing to their indispensable function in signaling pathways driving malignant cell features, protein kinases constitute major therapeutic targets in cancer. Over the past two decades, intense efforts in drug development have been dedicated to this field. The development of protein kinase inhibitors (PKIs) have been a real breakthrough in targeted cancer therapy. Despite obvious successes across patients with different types of cancer, the development of PKI resistance still prevails. Combination therapies are part of a comprehensive approach to address the problem of drug resistance. The therapeutic use of nitric oxide (NO) donors to bypass PKI resistance in cancer has never been tested in clinic yet but several arguments suggest that the combination of PKIs and NO donors may exert a potential anticancer effect. The present review summarized the current state of knowledge on common targets to both PKIs and NO. Herein, we attempt to provide the rationale underlying a potential combination of PKIs and NO donors for future directions and design of new combination therapies in cancer.

1. Introduction

Phosphorylation events are the most common and extensively studied protein post-translational modifications in mammalian systems. Coordinated by a large and diverse family of kinases, phosphorylation is a pivotal biochemical phenomenon involved in signal transduction and

multiple cellular functions including cell survival, differentiation, proliferation and migration. The human kinome, which comprises approximately 535 protein kinases, controls many signaling pathways and their crosstalk that leads to virtually all fundamental biological processes [1,2]. It is now well established that protein kinase activities disorders exert a crucial role in cancer development and progression

Abbreviations: 5-FU, 5-Fluorouracil; AKT, Akt serine/threonine kinase; Bcr-Abl, Breakpoint cluster region-protein Abelson; BTK, Bruton tyrosine kinase; CNS, Central nervous system; cIAP1, Cellular inhibitor of apoptosis protein 1; CLL, Chronic lymphoid leukemia; CML, Chronic myeloid leukemia; CRC, Colorectal carcinoma; EGFR, Endothelial growth factor receptor; eNOS, Endothelial nitric oxide synthase; EMT, Epithelial to mesenchymal transition; ERK, Extracellular signal-regulated kinases; FasL, Fas Ligand; FGF, Fibroblast growth factor; FGFR, Fibroblast growth factor receptor; FL, Follicular lymphoma; FDA, Food and Drugs Administration; GIST, Gastrointestinal stromal tumors; GC, Guanylate cyclase; HCC, Hepatocellular carcinoma; Ido1, Indoleamine 2,3-dioxygenase 1; iNOS, Inducible nitric oxide synthase; IL, Interleukin; JAK2, Janus kinase 2; M1/M2, Macrophage 1/2 phenotype; mTOR, Mammalian target of rapamycin; MET, MET proto-oncogene receptor tyrosine kinase; MAPK, Mitogen-activated protein kinase; MEK, Mitogen extracellular kinases; miRNA, Micro RNA; MDSC, Myeloid-derived suppressor cells; H89, (N-[2-bromocinnamylamino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide); nNOS, Neuronal nitric oxide synthase; NO, Nitric Oxide; NTG, Nitroglycerin; L-NMMA, NG-monomethyl-L-arginine monoacetate; NHL, Non-Hodgkin lymphoma; NSCLC, Non-small-cell lung carcinoma; OS, Overall survival; PTEN, Phosphatase and tensin homolog; PI3K, Phosphoinositide-3 kinase; PDGFR, Platelet-derived growth factor receptor; PFS, Progression free survival; EP2, Prostaglandin E receptor 2; PKA, Protein kinase A; PKI(s), Protein kinase inhibitor(s); RR-DTC, Radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer; Rheb, Ras homolog enriched in brain; ROS, Reactive oxygen species; RFS, Recurrence-free survival; RCC, Renal cell carcinoma; STAT3, Signal transducer and activator of transcription 3; RSNO, S-nitrosothiols; Shp2, Src homology 2 domain-containing phosphatase 2; TSC, Tuberous sclerosis complex; TNF, Tumor necrosis factor; TRAIL, Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand; TKI, Tyrosine kinase inhibitor; VEGFR, Vascular endothelial growth factor receptor

* Corresponding author at: Laboratoire d'Immunologie et Immunothérapie des Cancers (LIIC), UFR Sciences de Santé, 7 Boulevard Jeanne d'Arc, BP 87900, F-21000 Dijon, France.

E-mail addresses: Stephanie.plenchette@u-bourgogne.fr, stephanie.plenchette-colas@ephe.psl.eu (S. Plenchette).

¹ Equal contribution.

<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.113855>

Received 30 November 2019; Accepted 10 February 2020

Available online 13 February 2020

0006-2952/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

[3]. As such, protein kinases are frequently found to be oncogenic by distinct mechanisms including somatic mutations, chromosomal translocation, amplification and also epigenetic regulation [4]. Since, many efforts have been made to develop new therapeutic strategies to restrict protein kinase activities for clinical application in oncology.

In the past two decades, a wide range of protein kinase inhibitors (PKIs) types, with various properties and mode of action *i.e.* including different selectivity and modes of binding to kinases, have entered different phases of clinical development and several are currently approved by the FDA. Thus, PKIs have become a major class of cancer drugs and their therapeutic potential is still an area of increased interest. Indeed, the study of kinase biology associated with the development of PKIs is a significant component of targeted therapies. Despite encouraging clinical benefits for patients, the use of PKIs, as cancer therapeutics, remains frequently overshadowed by drug resistance mechanisms [5].

The dynamic evolution of cancer cells reflected by constant acquired mutations and genomic instability toward various protein kinases has a dramatic impact on PKI-based therapy effectiveness. The ability of cancer cells to resist to PKI therapies gives rise to a need to develop new therapeutic options. For this reason, new generation PKIs were developed and tested in an attempt to overcome resistance. Despite therapeutic benefit of PKIs to cancer patients, primary and acquired resistance still represent a major challenge in kinase-targeted drug development for cancer therapy. New combinatorial PKI-based approach that would selectively target cancer cells would open new therapeutic windows to neutralize cancer cell evasion from targeted therapies. Basically, two possible approaches might be considered to lower cancer cell resistance to PKI. Combinatorial strategies of PKI with drugs that would target the same protein kinase or alternate signaling pathways. As a key post-translational modification, protein phosphorylation has been the foundation for signal transduction therapy for cancer. Beside phosphorylation, a number of proteins involved in signal transduction pathways are also a target of a multitude of other post-translational modifications such as glycosylation, ubiquitination, SUMOylation, acetylation or methylation among others, revealing a complex regulatory network. Such post-translation modifications modulating cellular signaling represent putative antitumor strategies that could be considered along the use of PKI.

Nitric oxide (NO)-mediated protein post-translation modifications have gained increasing consideration in the context of cancer. Studies have demonstrated that NO can regulate many classes of protein associated with signaling pathways involved either in cancer development, progression or inhibition [6–8]. Several features such as localization, concentration, cellular time exposure or the redox environment dictate the complex dichotomous action of NO in cancers: either pro-tumoral or anti-tumoral [9]. NO production is generally assumed to play a crucial role in cancer cell fate decisions. Low rate of NO can contribute to tumorigenesis and progression whereas high rate of NO can promote cancer cell death [10–12]. The insights gained into NO mode of action revealed that both S-nitrosylation (the covalent binding of NO moiety to a free cysteine of target protein), and nitration (the covalent binding of NO moiety to a tyrosine residue) are key regulatory protein post-translational modifications in cellular signaling.

As a highly selective and rapidly reversible protein post-translational modification, S-nitrosylation has probably one of the most significant biochemical impact over protein function inducing multiple changes in protein activity, conformation, localization or interaction with other protein partners [6]. Enzymes are a class of protein frequently targeted by NO. Although protein post-translational modifications induced by NO have the ability to both activate or inhibit kinases, a wide range of enzymes involved in cell survival, proliferation or cell death signaling pathways are negatively regulated by NO post-translational modifications [6].

The purpose of this review is to survey the PKIs from the perspective of how NO could have a beneficial anti-tumoral effect on PKI-based

therapies. The current review will discuss the link between PKIs and NO with the aim of considering NO as potential novel combination therapies using PKIs and NO donors.

2. Background on the main PKIs

The discovery of PKIs and their clinical use have revolutionized targeted therapy in cancer. The real benefit of PKIs over conventional chemotherapy, results in less cytotoxicity for non-cancerous cells because of more selectivity and lower toxic manifestations. Despite the low toxicity, these molecules have specific toxicity profile, and the understanding of the mechanisms of action is necessary to understand this process [13,14].

The development of imatinib, the first PKI used in cancer therapy, allows to block the kinase activity of the aberrant protein breakpoint cluster region-protein Abelson (Bcr-Abl, characterized by a chromosomal translocation between chromosome 9 and chromosome 22 in the hematological malignancy chronic myeloid leukemia (CML)), and increases overall survival (OS). Because Bcr-Abl recombination is a driver oncogenic process in CML, patients are more sensitive to PKIs-based therapies than for patients with solid tumors because of high heterogeneity and mutational rate [15]. Imatinib is not specific for Bcr-Abl kinase, and targets other oncogenic kinases. Then, imatinib (STI-571) is approved by the FDA not only for the treatment of CML but also for gastrointestinal stromal tumors (GIST) harbouring c-Kit mutation [5,16,17] and dermatofibrosarcoma protuberans [15,18]. Imatinib is able to block the tyrosine kinase activity because it is an ATP competitor, which can interact with the inactive catalytic site of the kinase [19,20]. Other PKIs have the same mechanism of action, such as sorafenib, which is a multi-kinase inhibitor that blocks various kinases such as vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), BRAF and c-Kit [21]. Because of his multi-target activity, sorafenib is actually used for the treatment of GISTs such as imatinib [22]. Levatinib and regorafenib have the same mechanism of action. The first one principally inhibits VEGFR, and is approved for the treatment of iodine-refractory differentiated thyroid cancer and metastatic renal cell carcinoma (RCC) [23]. Regorafenib also targets VEGFR, PDGFR and BRAF and is mainly used for the treatment of advanced GIST, advanced hepatocellular carcinoma (HCC) and advanced colorectal carcinoma (CRC) [24].

Other PKIs, such as gefitinib, sunitinib and vemurafenib, are also ATP competitors [25]. Gefitinib is used to block the activation of mutated tyrosine kinase receptor EGFR (either deleted in exon 19 or L858R point mutated within exon 21) in NSCLC resulting in permanent activation of the ATP-binding site in absence of the ligand [26]. Sunitinib is not specific to endothelial growth factor receptor (EGFR), but can also inhibit VEGFR and c-Kit and for this reason, it can be used to treat GISTs in people who do not respond to imatinib treatment [27]. More recently, FDA approves osimertinib as first-line treatment of metastatic NSCLC patients based on the FLAURA trial [28]. Vemurafenib is used in patients with BRAF V600E mutated melanoma. This mutation can switch on the serine/threonine kinase activity, with an abnormal activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinases (ERK) proliferating signaling pathway. Vemurafenib block the activation of the mutated protein, stopping cancer cells proliferation. Unfortunately, this drug shows side effects on healthy cells. Indeed, vemurafenib also targets the wild type form of BRAF, causing a kinase overactivation of MAPK/ERK signaling pathway in healthy cells. Despite this side effect, vemurafenib is an established efficient therapy [29,30].

Some PKI can block the kinase activity in an allosteric manner, by binding outside the catalytic ATP-binding site such as trametinib, a mitogen extracellular kinases (MEK) inhibitor [31,32]. Another mechanism of action relies on the covalent bond between the PKI and the catalytic site of the kinase, as for ibrutinib, a Bruton tyrosine kinase (BTK) inhibitor [33,34].

Even though PKIs increase OS in many cancer subtypes, primary and secondary resistances are still frequently observed. Numerous potential mechanisms of resistance to PKIs have been described, requiring the use of second, third or fourth generation PKIs for patients refractory to treatment. Therefore, the development of novel combinational therapies may represent an attractive way to overcome PKI-resistant cancer cells [35].

3. Clinical use of the main PKIs in cancer

3.1. Bcr-Abl tyrosine kinase inhibitors

3.1.1. CML

The clinical development of imatinib has been a considerable leap in CML therapy. Indeed, in a phase II study involving 452 patients with CML who had failed to respond to interferon α therapy, Kantarjian et al. demonstrated that imatinib treatment induced high rates of cytogenetic (60% of patients) and hematologic responses (95% of patients). Moreover, after a median follow-up of 18 months, 95% of patients were alive [36]. The last update of the ISIS study comparing interferon treatment versus imatinib (ISIS: international randomized study of interferon versus STI-571) showed an estimated OS of 83% at 10 years [37].

Imatinib resistance mechanisms were classified according to two criteria: Bcr-Abl dependent and independent mechanisms [38]. Bcr-Abl dependent mechanisms of resistance are associated with different point mutations which totally or partially impair the catalytic domain of Bcr-Abl or the imatinib-binding sites to this kinase. Almost 57 residues were identified, mostly in the ATP-binding loop (P-loop), the SH2 binding site, and the A-loop, which then dictate the efficacy of imatinib but also future therapeutic strategies to overcome imatinib-resistance [39,40]. Because of patients refractory to imatinib treatment, more PKIs were FDA-approved for the treatment of CML such as dasatinib (inhibitor of c-KIT, PDGFR-A and B for example) [41,42], nilotinib and bosutinib, three second generation PKIs. Another example, ponatinib, a third generation PKI is used to overcome T315I mutation (a frequent Bcr-Abl resistance mutation) not only for imatinib-resistant patients [43] but also for patients refractory to treatment with multiple PKIs [5].

The *ABL* gene deletion in 9q is another mechanism of imatinib resistance and poor prognosis in CML [44,45]. Moreover, microRNAs (miRNAs) such as miR-199b and miR-219-2 (centromeric to the *Abl* gene frequently lost in CML patients) were downregulated in patients bearing 9q deletion and associated with imatinib resistance [46].

3.1.2. GIST

Imatinib has also revolutionized the medical treatment of KIT-driven GISTs. In a randomized phase III, Dematteo et al. showed that imatinib significantly improved recurrence-free survival compared with placebo (98% vs 83%) at 1 year [47]. Moreover, in another randomized phase III study including patients with KIT-positive GIST showed that, compared with a 1-year only treatment, post-operative imatinib administered for 3 years allowed longer recurrence-free survival (RFS) (47.9 vs 65.6% respectively) and longer OS (81.7% vs 92%, respectively) [48].

Furthermore, it has been shown that mutations in KIT or PDGFRA were frequently found in GISTs patients that are primary refractory to imatinib. These mutations seem to be present within an exon that render the protein less sensitive to imatinib, and contribute then to the development of drug resistance [49].

3.2. EGFR tyrosine kinase inhibitors

3.2.1. NSCLC

It is recognized that EGFR is overexpressed in ~80% and mutated in 20% of NSCLC [50,51]. Phosphorylation of EGFR (e.g. Y1173; Y1068; Y1045; and Y854 residues) is required to initiate cellular

signaling [52]. EGFR tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) such as erlotinib, gefitinib and afatinib (non-exhaustive list) are widely used in cancer treatment. Erlotinib was the first EGFR-TKI assessed as first-line treatment for patients with NSCLC with EGFR mutations [5,53]. In the EURTAC randomized phase III trial, erlotinib treatment showed beneficial results with a progression-free survival (PFS) of 9.7 months compared to standard chemotherapy with a PFS of 5.2 months [54]. Gefitinib is also a first-generation EGFR-TKIs approved by FDA in 2015 for treatment of NSCLC patients with EGFR mutations. Indeed, Douillard et al. showed in a phase IV clinical trial that gefitinib as a first line treatment was effective and well tolerated in patients with stage IIIa/B/IV EGFR mutation-positive NSCLC [55]. Afatinib is a second-generation EGFR TKI and the first irreversible oral blocker of the ErbB family. This TKI has been approved by the FDA for the treatment of locally advanced or metastatic patients with NSCLC after the two randomized phase III studies Lux-Lung3 and Lux-lung6. In these studies, afatinib improves overall survival only in patients with del19EGFR mutations (33.3 months vs 21.1 months in the chemotherapy group) [56].

Many acquired resistance mechanisms to gefitinib, erlotinib and afatinib EGFR-TKIs have been reported and can be classified into three categories: target gene mutation, bypass signaling pathway activation and histological transformation [57,58]. The main mechanism of EGFR-TKIs resistance arises from the site mutation T790M in EGFR (detected in 50–60% of resistant cases), which prevents EGFR-TKIs binding [59–61]. Importantly, osimertinib has been found to prolong the survival for metastatic NSCLC patients with EGFR mutations (with or without the T790M mutation) [62].

3.3. VEGFR tyrosine kinase inhibitors

Several VEGFR-TKIs have been developed and used to treat different types of cancer. These PKIs include (but are not limited to) sorafenib, sunitinib, pazopanib, cabozantinib, lenvatinib, vandetanib, regorafenib, as multi-targeted TKIs, and axitinib as the only VEGFR specific inhibitor.

3.3.1. Sorafenib

As a non-specific inhibitor, sorafenib can also target PDGFRs, FLT3 receptor, BRAF, RET and c-kit [63]. Sorafenib has been the first TKI approved by the FDA for the treatment of RCC in 2005, based on the positive results of the randomized phase III TARGET trial. In this clinical trial, the sorafenib group was compared with a placebo group in a cohort of 903 patients with RCC that was resistant to standard therapy. PFS for these patients was significantly prolonged (5.5 months vs 2.8 months for placebo) [63]. This TKI is also used in HCC patients. Indeed, in a multicenter phase III trial, patients with advanced HCC receiving sorafenib had median survival, as well as time to radiologic progression nearly 3 months longer than patients receiving placebo [64].

However, multiple mechanisms that lead to sorafenib resistance have been reported including for example EGFR, Akt or c-Jun activation [65,66]. Furthermore, cancer stem cells, Src homology 2 domain-containing phosphatase 2 (Shp2) and upregulation of fibroblast growth factor (FGF) signaling pathway may also play a role [66]. As described for imatinib drug resistance, some miRNAs such as miR-181a [67], and miR-429 [68] can also be responsible for drug resistance.

Yet, some drug combination therapies have been used successfully. Sorafenib combined with capecitabine, in advanced solid tumors, including HCC, improved anti-tumor response and survival [69]. In addition, a phase II clinical trial combining sorafenib with doxorubicin shows a synergistically inhibition of tumor cells proliferation and new blood vessels formation in tumor nodules [70]. Moreover, combination of sorafenib with low-dose of 5-fluorouracil (5-FU) in HCC patients showed a positive response, which could reduce adverse effects by decreasing 5-FU dose intensity [66]. Other combinatory strategies reported better curative effect with decreased side effects, as uracil-

tegafur [71] or octreotide [72]. Furthermore, a clinical trial in patients with castration-resistant prostate cancer, reported that sorafenib can be combined safely with chemotherapy [73].

3.3.2. Sunitinib

Sunitinib is also a non-specific tyrosine kinase inhibitor approved by the FDA for the treatment of metastatic RCC and imatinib-resistant GIST based on the results of several randomized phase III trials [74,75].

However, sunitinib efficacy appeared to be influenced by primary KIT gene mutations (located in exon 11) [22,76,77] and secondary mutations in KIT exons 17 or 18 [76,78-80]. Furthermore, Tran et al., showed that sunitinib resistance was correlated with the upregulation of FGF1, in RCC cell line [81]. Alterations in some miRNAs expression either increased (miR-575, miR-642b-3p, miR-4430) or decreased (miR-18a-5p, miR-29b-1-5p, miR-431-3p, miR-4521) were associated with sunitinib resistance. [82].

Regorafenib is another TKI with an activity against VEGFR, but also KIT, PDGFRA and BRAF used as a third line therapy for GISTs patients refractory to imatinib and sunitinib treatment that was found to increase PFS [83-86]. Tomida and collaborators, showed that the blockade of VEGFR by regorafenib, stimulates PDGFR and FGF receptor (FGFR) activation and increases cancer cells malignancy [87].

3.3.3. Lenvatinib

Lenvatinib (Lenvima®) is approved since February 2015 by the FDA for the treatment of radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer (RR-DTC) [88]. This drug is generally a well-tolerated treatment that offers a good alternative to sorafenib (because of its ability to stop the epithelial to mesenchymal transition (EMT) process in combination with the histone desacetylase inhibitor HNHA), another PKI currently approved in RR-DTC [89,90]. Furthermore, most patients with diffuse thyroid diseases develop resistance to lenvatinib, with two principal mechanisms: upregulation of receptors (such as c-Met) or activation of alternative pathways (MEK and phosphoinositide-3 kinase (PI3K)/Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathways) [35,91-95].

3.4. BRAF V600E

BRAF mutations are common in cancer cells, with BRAF V600E mutation being the most frequent one, particularly in melanoma (nearly 50% of patients affected) [96-98]. Even though the FDA approved vemurafenib in 2011 for the treatment of metastatic melanoma associated with BRAF V600E mutation, a short term increase in patient survival and secondary resistance quickly appears [99]. Overactivation of MAPK/ERK or PI3K/Akt/mTOR signaling pathways, either driven by upstream receptors (EGFR, FGFR and PDGFR) or by alteration of component of signal cascades confer resistance to BRAF V600E mutated tumor cells [100-104]. Jazirehi and coworkers showed also KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase and MET expression in resistant cell lines [105]. Of note, the association of BRAF and MEK inhibitors represents a new strategy to treat metastatic melanoma resistant to vemurafenib [106].

4. Regulatory relationships between protein kinases, PKIs and NO in cancer

It is worthy to note that there is little knowledge available with regard to the relationship between protein kinases, their inhibitors and NO. Nevertheless, some arguments are in favor of a complex regulatory network in which PKIs may exert an influence on endogenous production of NO, and on the other way round, NO (from other sources, mainly NO donors) may have an impact on protein kinases. We reviewed the role of NO as a negative and positive regulator of protein kinases to evaluate whether NO could provide added value to the action of PKIs in cancer to ultimately overcome PKIs-mediated resistance

(Fig. 1).

4.1. Involvement of NO in PKIs-mediated antitumor potential

It was reported that mTOR inhibitors such as rapamycin and RAD001 increased inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and NO production in glioma-activated microglia cells (involved in central nervous system (CNS) cancers) to express a macrophage 1 (M1) phenotype (antitumoral). In parallel, rapamycin and RAD001 prevented the acquisition of a M2 phenotype (protumoral) by reducing both arginase and *interleukin (IL)-10 gene* expression, possibly resulting in antitumor action [107]. Another study reported that ibrutinib, an inhibitor of BTK and IL-2-inducible T-cell kinase, clinically used for the treatment of B-cell malignancies, modulates myeloid-derived suppressor cells (MDSC) function and generation. This inhibitory function is associated with ibrutinib-impaired iNOS and arginase 1 expression in MDSC cells (a hallmark for MDSC exhaustion) while indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) trended towards increased expression, revealing a potential strategy for enhancing immune-bases therapy in cancer [108]. Similarly, axitinib, a selective inhibitor of VEGFR tyrosine kinases, indicated in the treatment of patients with advanced renal cell carcinoma after failure of previous treatment with sunitinib or cytokine, induced the same effect as ibrutinib. Indeed, axitinib suppressed the lung metastasis of melanoma cells, prolonged survival of tumor-bearing mice and reduced the proportion of MDSC. Furthermore, axitinib inhibited the expression of iNOS in MDSC cells affecting their immunosuppressive function [109]. A translational study determined the NO levels in CML patients after imatinib therapy, one of the most effective treatment for Bcr-Abl+ CML patients. In this study, the authors showed that the imatinib decreased the plasma level of NO by three times (41.48 to 14.26 $\mu\text{mol/L}$). The authors concluded that NO levels might be used as a prognostic indicator in CML patients treated with imatinib [110].

While cancer treatment with the kinase inhibitors listed above decreases the NO level, other kinase inhibitors have the opposite effect, exemplified by vemurafenib and sorafenib. On the one hand, Yu et al. reported that vemurafenib initiates apoptosis and growth inhibition of BRAF V600E mutant human melanoma cell line A375, which is correlated with vemurafenib-inducing production of intracellular NO [111]. Such effect was abolished with NG-monomethyl-L-arginine monoacetate (L-NMMA), an iNOS inhibitor [111]. Caraglia et al. showed that in patients with advanced HCC, sorafenib induced an increase of 40% of serum NO levels [112]. This effect was observed only in sensitive patients to the treatment [112]. Thereby, the determination of the NO status in patient's serum could have high value in the prediction of response to sorafenib therapy in HCC patients.

4.2. NO favours PKIs toxicity

It is a proven fact that the use of PKIs, as well as antibodies directed against tumor-inducing signaling pathways, has shown very beneficial effects in several types of cancer. However, this benefit is associated with some toxicities. We will focus on those involving NO, known to regulate blood pressure. Indeed, whether many PKIs induced hypertension some others do the opposite. It is well documented that bevacizumab treatment (targeting VEGF pathway) of patients with a variety of solid tumors [113] was associated with a significant increased risk of developing raised blood pressure (grade 1-2, 25%; grade 3-4, 10%) [114,115]. The results also suggest that significant rise in blood pressure was associated with bevacizumab was dose-dependent. Indeed, high-dose of bevacizumab caused high blood pressure. In addition, increased blood pressure with high dose of bevacizumab was observed in patients with RCC and breast cancer, but not in patients with NSCLC, CRC and pancreatic cancer [115]. Although in this later work the involvement of NO in the raise of blood pressure was not investigated, other kinase inhibitors of the VEGF signaling pathway

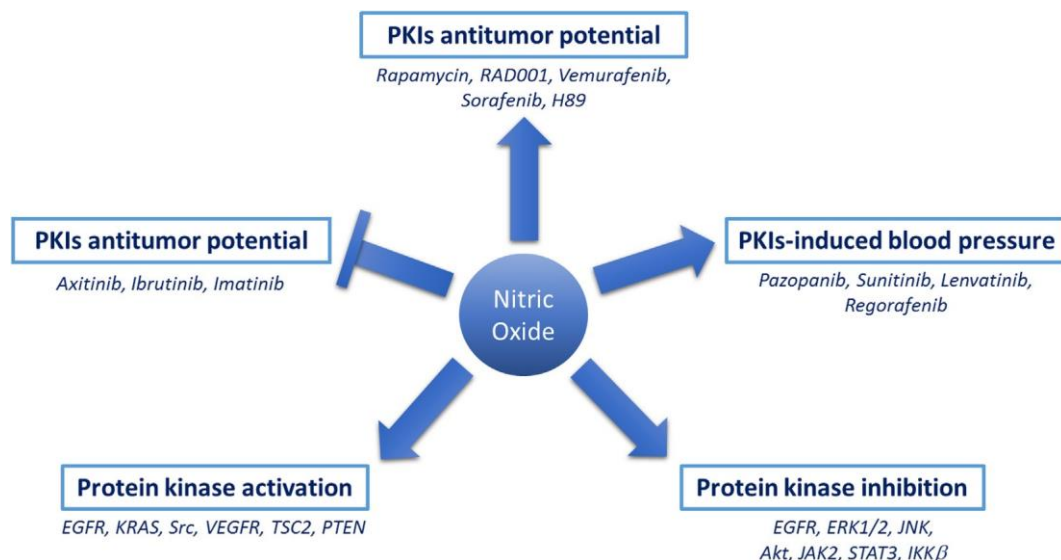


Fig. 1. Impact of NO on protein kinases and PKIs activities. Summary of the ambivalent impact of NO toward PKI (either promoting or inhibiting PKI's antitumoral potential) and protein kinases function (regulated at the transcriptional or the post-translational level by NO).

have also shown a NO-dependent increase in blood pressure. It is the case of pazopanib and sunitinib in the treatment of advanced RCC in which it was shown that pazopanib-treatment was associated with hypertension and decreased urine and plasma nitrite/nitrate, the stable NO-metabolites [116]. Similarly, the urine nitrate concentration was lower in sunitinib-treated patients that developed hypertension [117]. It is also the case of lenvatinib and regorafenib, targeting the VEGF signaling pathway, which showed an increase in blood pressure that it was associated with a decrease of NO in sera of differentiated thyroid carcinoma [118] and in GISTs [119].

4.3. Regulatory impact of NO on protein kinases

4.3.1. NO as a protein kinase activator

Several reports have demonstrated that the intracellular production of NO by NOS is required for the phosphorylation of subsequent activation of EGFR signaling pathways.

It is well known that overexpression of iNOS is significantly associated with tumor growth and angiogenesis, in breast cancer among other cancer types [120,121]. Indeed, high iNOS expression significantly correlates with EGFR phosphorylation, its activation and poor survival in various breast cancer subtypes [122,123]. Accordingly, in response to ionizing radiation, endothelial nitric oxide synthase (eNOS) increases NO production and EGFR phosphorylation and activation [124]. Another study has showed that eNOS-induced NO can promote EGFR S-nitrosylation and tyrosine residues phosphorylation. Donnini et al., demonstrating that the activation of iNOS/guanylate cyclase (CG) and MAPK-ERK1/2 are required to promote squamous cell carcinoma invasion and growth. This was mediated by EGFR transactivation via prostaglandin E receptor 2 (EP2)/protein kinase A (PKA) and c-Src signaling pathways [125]. Interestingly, EGFR, in the nucleus, can function as a transcription factor. Indeed the transcriptional activation of iNOS gene can result from the interaction of nuclear EGFR with signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) [126]. Together, these data indicate a possible feedback loop for the regulation of the EGFR signaling pathways.

NO derived from NO donors can also positively regulate the EGFR signaling pathways. Upon exposure of triple negative breast cancer cell lines (MDA-MB-468 and HCC1806) to the NO donor DETA/NO an increase in EGFR tyrosine phosphorylation (Y1173 in MDA-MB-468 and Y1173, Y1068 and Y1045 in HCC1806 cells) and subsequent activation were found involved in tumor cell migration and invasion [127].

Another very important tyrosine kinase receptor is VEGFR, which upon binding to its ligand VEGF leads to vasculogenesis and angiogenesis [128]. VEGF is known to be upregulated by cancer cells generating NO, which contributes to increased neovascularization and tumor metastasis [129]. Furthermore, Nakamura, Y. et al., showed that treatment of breast cancer cells MDA-MB6231 with the NO donor DETA/NONOate, induced an increase in VEGF-C expression and nitrite/nitrate production. All of these changes were correlated with lymph node metastasis [130].

NO can also positively regulate non-receptor tyrosine kinases as Src and KRAS. Indeed, NO donors such as DETANO triggered c-Src S-nitrosylation leading to tyrosine kinase activation attested by its phosphorylation at Tyr419 and increased Akt Ser473 and STAT3 Tyr705 phosphorylation [123]. Similarly, the NO donor SNP causes S-nitrosylation of c-Src at cysteine 498 to stimulate its kinase activity in fibroblasts. Similar effect was found in breast cancer cells treated with beta-estradiol via iNOS activation [131]. However iNOS can be targeted by Src. Actually Src induces Tyr1055 iNOS residue phosphorylation [132]. It is well documented that KRAS is also oncogenic. Its mutation in cancer maintained it in its activated status. KRAS activation could occur through other mechanisms. Studies showed that eNOS induces the S-nitrosylation of cysteine at position 118 and activation of wild-type Ras protein leading to the stimulation of PI3K/Akt signaling, thus promoting tumor growth [133]. The same year, Oliveira *et al.*, found that, in rabbit aortic endothelial cells, low concentrations of S-Nitrosothiols/NO (RSNO/NO) induced Ras S-nitrosylation and consequently Ras-ERK1/2 MAP kinase signaling pathway activation [134]. Lopez-Carera et al., investigated the impact of iNOS overexpression observed in melanoma and others cancer cells. They found that iNOS induced mTOR pathway activation in melanoma cells. Mechanistically, the authors showed that iNOS triggered S-nitrosylation of tuberous sclerosis complex (TSC) 2, a driver for the inhibition of dimerization of TSC2 with its inhibitory partner TSC1, increased GTPase activity of its target Ras homolog enriched in brain (Rheb), a key activator of mTOR signaling pathway [135]. NO could also activate the mTOR signaling pathway indirectly. Indeed, Zhu et al., showed that neuronal NOS (nNOS) S-nitrosylates the phosphatase and tensin homolog (PTEN) protein resulting to Akt/mTOR signaling activation, reducing autophagy and promoting the survival of nasopharyngeal carcinoma cells [136].

4.3.2. NO as a protein kinase inhibitor

In agreement with the well-documented ambivalent role of NO in cancer, various studies have reported a negative regulatory effect of NO on protein kinases. Indeed, NO can inhibit pathways involved in the proliferation and survival of cancer cells via its potential to down-regulate the activity of several protein kinases. Some of these protein kinases are the target of selective PKIs currently undergoing clinical trials.

The S-nitrosylation of EGFR cysteine residues at position 166 and 305 leads to its inactivation in fibroblast and neuroblastoma cells, respectively [137,138]. Ruano et al., also demonstrated that NO-mediated inhibition of human epidermoid carcinoma cells was correlated with the inhibition of EGFR tyrosine phosphorylation and the induction of a tyrosine phosphorylation of a nitric oxide-induced 58 kDa phosphoprotein (NOIPP-58), only in the presence of EGF [139]. Accordingly, but in another context, tyrosine nitration of EGFR, caused by NO derived from iNOS, induces a decrease in tyrosine phosphorylation and an inhibition of neural stem cell proliferation [140].

In addition, the MEK family proteins ERK1/2 that are targeted by tramatenib and cobimetinib in the treatment of *BRAF* mutated metastatic melanoma, are S-nitrosylated by NO. Indeed, NO donors SNP or GSNO led to increase in ERK1/2 S-nitrosylation at cysteine residue 183, and a reduction of ERK1/2 phosphorylation that can trigger cell growth inhibition and apoptosis of cancer cells [141,142]. Similarly, S-nitrosylated Akt (cysteine residue 224) [143] and nitrated Janus kinase-2 (JAK2) (tyrosine residues 1007 and 1008) [144] can negatively control both oncogenic PI3K/Akt and JAK2/STAT signaling pathways. These oncogenic pathways in various types of cancer are targeted by selective inhibitory molecules. Idelalisib and copenalisip (PI3K inhibitors) in the treatment of chronic lymphoid leukemia (CLL), non-Hodgkin lymphoma (NHL), follicular lymphoma (FL) and ruxolitinib (JAK2 inhibitor) in the treatment of myelofibrosis [145]. Several other protein kinases including STAT3, JNK and IKK β involved in growth factors or cytokine-mediated signaling pathways are also targeted by NO. STAT3, a key partner of JAK2 in IL-6 mediated signaling pathways, was inhibited by S-nitrosylation at cysteine residue 259 by the NO donor (GSNO) or through iNOS activation. This was associated with decreased cancer cell proliferation and increased apoptosis [146,147]. Also, JNK proteins (JNK1, 2, 3) are S-nitrosylated upon NO generation via interferon gamma (IFN γ)-induced iNOS or the NO-donor SNAP in murine microglial cells thus suppressing their interaction and kinase activity [7]. Finally, the IKK β kinase activity was also repressed by S-nitrosylation (Cysteine 179). Such effect caused inhibition of the enzymatic activity of this kinase preventing the activation of an essential cell survival pathway, the classical NF-kB pathway [148,149].

4.3.3. Effect of NO on PKIs-mediated cell death

In addition to the different relationships between NO and kinase inhibitors mentioned above, NO can synergize with certain kinase inhibitors to induce death or inhibit the proliferation of cancer cells. Studies have shown that two EGFR signaling pathway inhibitors erlotinib and ZD1839 synergized with NO donors, NO-aspirin and SNP, to induced antiproliferative effect or cell death in several lung and prostatic cancer cell lines, respectively [150,151].

A synergistic effect, between PKIs and NO in promoting cancer cell death, has been also observed with other PKIs currently undergoing preclinical studies. Indeed, H89 (N-[2-bromocinnamylamino]ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide) is a small molecule that has always been known as PKA inhibitor [152]. Although Davies and collaborators showed that H89 is able to inhibit at least 8 other kinases, such as MSK1, S6K1, ROCK II, AMPK, CHK1, KB α , MAPKAP-K1b and SGK [13]. H89 structure is similar to ATP, so this small molecule is able to inhibit kinases activity competitively with ATP [153]. Some studies used H89 to assess the role of PKA in different tissues *in vitro*, such as heart muscle, liver, smooth muscle, epithelial cells and neuronal tissue [154-158]. Moreover, H89 also has an activity *in vivo* as an anti-

inflammatory strategy to treat inflammation in mice [159]. Unfortunately, the role of H89 in cancer is not well established. Recent studies have shown that H89 is able to enhance tetrandrine (a bisbenzylisoquinoline alkaloid) and HA22 (moxetumomab pasudotox) effect on human cancer cells *in vitro* and *in vivo* [160,161]. Recently, Li and coworkers showed that H89 is able to improve the activity of the oncolytic virus M1 to induce tumor regression in various cancer cells [162]. The relationship between H89 and NO is not clearly understood. The anti-tumor effect of the NO-donor nitroglycerin (NTG) is well established in various cancer types. Some studies have shown that the combination of H89 and NTG enhances cell death in colon cancer cells. Indeed, H89 induces reactive oxygen species (ROS) production which combined with NO, triggers apoptotic cell death by caspase activation [163]. Even if H89 is primarily known for kinases inhibition, Boina-Ali and coworkers showed that the molecule induces an unexpected Akt activation. In fact, Akt activation induced by H89 sensitizes colon cancer cells to death induced by NTG and triciribine (an Akt inhibitor) [164].

5. PKIs and NO donors: Towards potential combinatory treatments?

Over the last two decades, the clinical development and approval of a growing number of novel PKIs have tremendously improved the landscape of targeted therapies to treat cancer. Despite significant clinical benefits (improvement in OS and PFS) observed for some patients, persistent tumor intrinsic resistance or acquired resistance to PKIs are still a limitation of treatment. How to make the best use of PKIs to treat cancer patients remains an open question. To this end, better knowledge of the molecular mechanisms of resistance currently represents an intensive area of research to achieve durable efficacy.

As a hallmark of cancer cell development, novel mutations mediating resistance to PKIs occurs inevitably and rapidly with the emergence of resistant tumor clones. A first strategy consisted in developing the so called “next-generation” PKIs in order to improve over and over again their potency and selectivity toward specific newly mutated kinases. Indeed, the difficulty to circumvent protein kinase mutational resistance is well exemplified by EAI045, a fourth-generation EGFR PKI under current preclinical investigation [165]. Although EAI045 seems to unveil encouraging results in terms of overcoming resistance to the third-generation EGFR PKI in advanced NSCLC models, clinical trials with EAI045 have not been conducted yet. In the era of precision medicine, the design and development of novel generation of PKIs is a perpetual challenge in an attempt to maximize clinical benefit.

The second approach consists in combining PKIs with chemotherapeutic agents. Major success on combination therapies has been realized in cancer but the design of more personalized treatment is needed. PKIs are signaling therapeutic agents designed to mainly target some of the fundamental hallmarks of cancer *i.e.* cell proliferation, cell survival and tumor angiogenesis. Various clinical trials studying combinatorial strategies of such cytostatic agents with cytotoxic agents like chemotherapeutic drugs (soliciting other hallmarks of cancer) have been focused on NSCLC patients. Many clinical trials have demonstrated the clinical benefit of certain VEGFR-PKIs when combined with chemotherapy in NSCLC patients [166]. However, whether the combinations of either VEGFR-PKIs or EGFR-PKIs with various chemotherapeutic agents present higher efficiency than with PKIs alone in advanced NSCLC remain controversial [167-169]. From a molecular perspective, one possible explanation may in part account for p53 mutational status. *TP53* tumor suppressor gene is the most frequently mutated genes in cancers. It is well documented that p53 is associated with resistance to many chemotherapeutic agents [170]. Because of high frequency p53 mutations in tumors, the activation of alternative cell death pathways in a p53-independent manner, such as apoptosis promoted by cytokines of the Tumor Necrosis Factor (TNF) family, should be considered. A growing number of studies have demonstrated

sensitizing effect of NO to tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) [171], Fas Ligand (FasL) [172], and TNF α [173] mediated apoptosis in cancer cells. A limited number of proteins modified by either S-nitrosylation or nitration processes are known to drive cell death pathways (for review [6]).

Interestingly, a substantial body of evidences indicate that NO-based treatment (particularly via NO donors) could potentially contribute to overcome resistance to PKIs in cancer patients.

It is now well recognized that NO-mediated post-translational modifications influence cell signaling in a similar extent as for phosphorylation or other major post-translation modification such as ubiquitination [174]. S-nitrosylation is a critical regulator of phosphorylation, ubiquitination or acetylation for example. S-nitrosylation is also an important regulatory mechanism of several protein kinases and subsequent post-translational modification by phosphorylation. Even though protein post-translation modification by S-nitrosylation can either activate or inhibit enzymatic activities, S-nitrosylated protein kinases are most likely inhibited [174]. NO can alter protein kinase activity not only by S-nitrosylation of the cysteine residue in its catalytic domain, but also by preventing the binding to its downstream target. Consistently, tyrosine nitration can also change the function of key proteins involved in cellular signaling events. Phosphorylation and nitration can occur within the same tyrosine residue. Since tyrosine nitration rather inhibits than activate the function of proteins, tyrosine nitration may cooperate with PKIs to efficiently prevent phosphorylation events and downstream signaling pathways that control cancer cell growth. Thus, NO has the added benefit to act not only as a multi-targeted kinase inhibitor but also as inhibitor of numerous protein substrates which are of particular interest to overcome PKI resistance-mediated activation of redundant and alternative signaling pathways.

Recent preclinical reports currently abound for the development of NO donors to overcome primary or acquired resistance to PKIs. For example, NO donor/natural product hybrids represent a promising anticancer strategy to potentiate different PKIs anti-cancer properties. Indeed, an oleanolic acid/hederagenin-NO donor hybrid has demonstrated potent cytotoxicity against gefitinib-resistant (EGFR—L858R/T790M mutations) and osimertinib-resistant (EGFR-L858R/T790M/C797S mutations) NSCLC cancer cells. This novel NO-donor hybrid represents a potent compound to overcome frequent EGFR-PKI resistance in NSCLC lung cancer [175]. The design of a dual-functional inhibitor NO donor/selective STAT3 inhibitor ((NO)-releasing quinolone-1,2,4-triazole/oxime hybrid) significantly improved the cytotoxicity of melanoma cell lines with BRAF V600E mutant and resistant to BRAF inhibitors [176]. Interestingly, in a previous report, a series of NO donor/EGFR inhibitors (phenylsulfonylurea-based anilino-pyrimidines) harbouring a strong activity against EGFR T790M mutant, had yet demonstrated EGFR kinase inhibitory and antiproliferative potential against EGFR mutated NSCLC cell lines [177].

The treatment of the Bcr-Abl⁺ CML cell line K562 with the NO donor sodium nitroprusside has shown to enhance imatinib-mediated apoptosis [178]. Moreover, NAC mediated scavenging of ROS in Bcr-Abl⁺ CML cell lines and primary cells from CML patients (imatinib-resistant and imatinib-sensitive cells) co-treated with imatinib is correlated with enhanced production of NO and subsequent NO-dependent cell death [178].

Vemurafenib-mediated growth inhibition of the BRAF V600E melanoma cell line A375 has been shown to be dependent on the production of the superoxide anion O₂⁻ and NO [179]. These results suggest a peroxynitrite-dependent cytotoxicity involving protein tyrosine nitration. Thus, NO appears as a key factor for PKI efficacy which sustains the rationale for the development of novel combination therapies PKI/NO donor.

Preclinical studies demonstrated that vemurafenib-mediated anti-tumor activities can be enhanced by abrogating nucleus translocation of NF- κ B p50/p65 [179]. On the other hand, NO (either endogenously produced or released by NO donors) can inhibit the activation of the

NF- κ B pathway through the S-nitrosylation of IKK β , p50, p65 and cellular inhibitor of apoptosis protein 1 (cIAP1) [148,173,180-182].

6. Concluding remarks

The mode of action of both PKIs and NO-based protein post-translational modifications revealed functional overlaps for some oncogenic targets underlying an interest in PKIs and NO donors combination in cancer therapy. In this context, the effect of NO (S-nitrosylation or nitration) could possibly overcome PKI resistance. Whether it acts through a direct or indirect way, NO may exert a regulatory control over protein kinases involved in important cancer signaling pathways as observed with PKIs.

A growing number of clinical studies have evaluated the NO donor NTG as an anticancer drug in combination with either radiotherapy or chemotherapy agents. The majority of clinical studies were conducted in patients with NSCLC. The results obtained for the first phase II trial demonstrated clinical benefit (improved overall survival) for patients treated with the combination therapy NTG/vinorelbine and cisplatin [183].

New combinatorial treatments, designed with PKIs currently approved by the FDA and NO donors (such as NTG), have never been explored yet. Studies are needed to determine whether the use of NO donors would enhance the effectiveness of PKIs in cancer treatment.

The authors declare no conflicts of interest

CRedit authorship contribution statement

Silvia Ghione: Writing - original draft. Nesrine Mabrouk: Writing - original draft. Catherine Paul: Writing - original draft. Ali Bettaieb: Writing - original draft. Stéphanie Plenchette: Writing - original draft, Writing - review & editing.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support from “Région Bourgogne, France”; “Ligue Contre le Cancer (Conférence de coordination Interrégionale Est JMG/SP - n°41AJ.2019), France”; “Qatar Foundation, Qatar”.

References

- [1] L.J. Wilson, A. Linley, D.E. Hammond, F.E. Hood, J.M. Coulson, D.J. MacEwan, S.J. Ross, J.R. Slupsky, P.D. Smith, P.A. Evers, I.A. Prior, New Perspectives, Opportunities, and Challenges in Exploring the Human Protein Kinome, *Cancer Res.* 78 (1) (2018) 15–29.
- [2] F. Ardito, M. Giuliani, D. Perrone, G. Troiano, L. Lo Muzio, The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review), *Int. J. Mol. Med.* 40 (2) (2017) 271–280.
- [3] J. Cienas, E. Zalyte, A. Bairoch, P. Gaudet, Kinases and Cancer, *Cancers (Basel)* 10 (3) (2018).
- [4] C. Tsatsanis, D.A. Spandidos, The role of oncogenic kinases in human cancer (Review), *Int. J. Mol. Med.* 5 (6) (2000) 583–590.
- [5] R. Kannaiyan, D. Mahadevan, A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy, *Expert Rev. Anticancer Ther.* 18 (12) (2018) 1249–1270.
- [6] S. Plenchette, S. Romagny, V. Laurens, A. Bettaieb, NO and cancer: itinerary of a double agent, *Med Sci (Paris)* 32 (6–7) (2016) 625–633.
- [7] S. Plenchette, S. Romagny, V. Laurens, A. Bettaieb, S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer, *Redox Biol.* 6 (2015) 507–515.
- [8] A. Bettaieb, S. Plenchette, C. Paul, V. Laurens, S. Romagny, J.F. Jeannin, S-Nitrosylation in Cancer Cells: To Prevent or to Cause? in: B. Bonavida (Ed.), *Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy*, Springer, 2015, pp. 97–105.
- [9] D. Vasudevan, D.D. Thomas, Insights into the diverse effects of nitric oxide on tumor biology, *Vitam. Horm.* 96 (2014) 265–298.
- [10] A.J. Burke, F.J. Sullivan, F.J. Giles, S.A. Glynn, The yin and yang of nitric oxide in cancer progression, *Carcinogenesis* 34 (3) (2013) 503–512.
- [11] M.W. Foster, D.T. Hess, J.S. Stampler, Protein S-nitrosylation in health and disease: a current perspective, *Trends Mol. Med.* 15 (9) (2009) 391–404.
- [12] L.A. Ridnour, D.D. Thomas, S. Donzelli, M.G. Espey, D.D. Roberts, D.A. Wink, J.S. Isenberg, The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology, *Antioxid. Redox Signal.* 8 (7–8) (2006) 1329–1337.
- [13] S.P. Davies, H. Reddy, M. Caivano, P. Cohen, Specificity and mechanism of action

- of some commonly used protein kinase inhibitors, *Biochem. J.* 351 (Pt 1) (2000) 95–105.
- [14] B.J. Druker, M. Talpaz, D.J. Resta, B. Peng, E. Buchdunger, J.M. Ford, N.B. Lydon, H. Kantarjian, R. Capdeville, S. Ohno-Jones, C.L. Sawyers, Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia, *N. Engl. J. Med.* 344 (14) (2001) 1031–1037.
- [15] M.J. Pishvaian, R. Slack, E.Y. Koh, J.H. Beumer, M.L. Hartley, I. Cotarla, J. Deeken, A.R. He, J. Hwang, S. Malik, K. Firozvi, M. Liu, B. Elston, S. Strychor, M.J. Egorin, J.L. Marshall, A Phase I clinical trial of the combination of imatinib and paclitaxel in patients with advanced or metastatic solid tumors refractory to standard therapy, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 70 (6) (2012) 843–853.
- [16] G.D. Demetri, M. von Mehren, C.D. Blanke, A.D. Van den Abbeele, B. Eisenberg, P.J. Roberts, M.C. Heinrich, D.A. Tuveson, S. Singer, M. Janicek, J.A. Fletcher, S.G. Silverman, S.L. Silberman, R. Capdeville, B. Kiese, B. Peng, S. Dimitrijevic, B.J. Druker, C. Corless, C.D. Fletcher, H. Joensuu, Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors, *N. Engl. J. Med.* 347 (7) (2002) 472–480.
- [17] B.J. Druker, Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML, *Blood* 112 (13) (2008) 4808–4817.
- [18] G.A. McArthur, Dermatofibrosarcoma protuberans: a surgical disease with a molecular savior, *Curr. Opin. Oncol.* 18 (4) (2006) 341–346.
- [19] I. Kufareva, R. Abagyan, Type-II kinase inhibitor docking, screening, and profiling using modified structures of active kinase states, *J. Med. Chem.* 51 (24) (2008) 7921–7932.
- [20] M. Suttorp, M. Bornhäuser, M. Metzler, F. Millot, E. Schleyer, Pharmacology and pharmacokinetics of imatinib in pediatric patients, *Expert Rev Clin Pharmacol* 11 (3) (2018) 219–231.
- [21] M.M. Gounder, M.R. Mahoney, B.A. Van Tine, V. Ravi, S. Attia, H.A. Deshpande, A.A. Gupta, M.M. Milhem, R.M. Conry, S. Movva, M.J. Pishvaian, R.F. Riedel, T. Sabagh, W.D. Tap, N. Horvat, E. Basch, L.H. Schwartz, R.G. Maki, N.P. Agaram, R.A. Lefkowitz, Y. Mazaheri, R. Yamashita, J.J. Wright, A.C. Dueck, G.K. Schwartz, Sorafenib for Advanced and Refractory Desmoid Tumors, *N. Engl. J. Med.* 379 (25) (2018) 2417–2428.
- [22] P. Rutkowski, E. Bylina, A. Klimczak, T. Switaj, S. Falkowski, J. Kroc, I. Lugowska, M. Brzeskwiniewicz, W. Melerowicz, C. Osuch, E. Mierzejewska, K. Wasielewski, A. Woźniak, U. Grzesiakowska, Z.I. Nowecki, J.A. Siedlecki, J. Limon, The outcome and predictive factors of sunitinib therapy in advanced gastrointestinal stromal tumors (GIST) after imatinib failure - one institution study, *BMC Cancer* 12 (2012) 107.
- [23] M. Capozzi, C. De Divitiis, A. Ottaiano, C. von Arx, S. Scala, F. Tatangelo, P. Delrio, S. Tafuto, Lenvatinib, a molecule with versatile application: from preclinical evidence to future development in anti-cancer treatment, *Cancer Manag Res* 11 (2019) 3847–3860.
- [24] T.J. Eittrich, T. Seufferlein, Regorafenib, *Recent Results Cancer Res.* 211 (2018) 45–56.
- [25] Y. Liu, N.S. Gray, Rational design of inhibitors that bind to inactive kinase conformations, *Nat. Chem. Biol.* 2 (7) (2006) 358–364.
- [26] A.F. Rahman, H.M. Korashy, M.G. Kassem, Gefitinib, *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 39 (2014) 239–264.
- [27] W. Yang, K. Li, J. Yu, C. Shou, Q. Zhang, Y. Hong, J. Sun, H. Yu, Y. Gao, Q. Shen, Z. Zhao, S. Zheng, Clinical outcomes of imatinib dose escalation versus sunitinib in first-line imatinib-failure gastrointestinal stromal tumour, *Scand. J. Gastroenterol.* 53 (10–11) (2018) 1328–1334.
- [28] Y. Ohe, F. Imamura, N. Nogami, I. Okamoto, T. Kurata, T. Kato, S. Sugawara, S.S. Ramalingam, H. Uchida, R. Hodge, S.L. Vowler, A. Walding, K. Nakagawa, Osimertinib versus standard-of-care EGFR-TKI as first-line treatment for EGFRm advanced NSCLC: FLAURA Japanese subset, *Jpn. J. Clin. Oncol.* 49 (1) (2019) 29–36.
- [29] W. Zhang, D. Heinzmann, J.F. Grippo, Clinical Pharmacokinetics of Vemurafenib, *Clin. Pharmacokinet.* 56 (9) (2017) 1033–1043.
- [30] M. Das Thakur, F. Salangsang, A.S. Landman, W.R. Sellers, N.K. Pryer, M.P. Levesque, R. Dummer, M. McMahon, D.D. Stuart, Modelling vemurafenib resistance in melanoma reveals a strategy to forestall drug resistance, *Nature* 494 (7436) (2013) 251–255.
- [31] V. Lamba, I. Ghosh, New directions in targeting protein kinases: focusing upon true allosteric and bivalent inhibitors, *Curr. Pharm. Des.* 18 (20) (2012) 2936–2945.
- [32] R. Zeiser, H. Andriová, F. Meiss, Trametinib (GSK1120212), *Recent Results Cancer Res.* 211 (2018) 91–100.
- [33] E.D. Deeks, Ibrutinib: A Review in Chronic Lymphocytic Leukaemia, *Drugs* 77 (2) (2017) 225–236.
- [34] M.S. Cohen, C. Zhang, K.M. Shokat, J. Taunton, Structural bioinformatics-based design of selective, irreversible kinase inhibitors, *Science* 308 (5726) (2005) 1318–1321.
- [35] B.N. Rexer, J.A. Engelman, C.L. Arteaga, Overcoming resistance to tyrosine kinase inhibitors: lessons learned from cancer cells treated with EGFR antagonists, *Cell Cycle* 8 (1) (2009) 18–22.
- [36] H. Kantarjian, C. Sawyers, A. Hochhaus, F. Guilhot, C. Schiffer, C. Gambacorti-Passerini, D. Niederwieser, D. Resta, R. Capdeville, U. Zoellner, M. Talpaz, B. Druker, J. Goldman, S.G. O'Brien, N. Russell, T. Fischer, O. Ottmann, P. Cony-Makhoul, T. Facon, R. Stone, C. Miller, M. Tallman, R. Brown, M. Schuster, T. Loughran, A. Gratwohl, F. Mandelli, G. Saglio, M. Lazzarino, D. Russo, M. Baccarani, E. Morra, I.S.C.S. Group, Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia, *N. Engl. J. Med.* 346 (9) (2002) 645–652.
- [37] G. Gugliotta, F. Castagnetti, M. Breccia, L. Levato, M. D'Adda, F. Stagno, M. Tiribelli, M. Salvucci, C. Fava, B. Martino, M. Cedrone, M. Bocchia, E. Trabacchi, F. Cavazzini, E. Usala, A. Russo Rossi, M.T. Bochicchio, S. Soverini, G. Alimena, M. Cavo, F. Pane, G. Martinelli, G. Saglio, M. Baccarani, G. Rosti, G.C.W. Party, Long-term outcome of a phase 2 trial with nilotinib 400 mg twice daily in first-line treatment of chronic myeloid leukemia, *Haematologica* 100 (9) (2015) 1146–1150.
- [38] P. Ramirez, J.F. DiPersio, Therapy options in imatinib failures, *Oncologist* 13 (4) (2008) 424–434.
- [39] M. Deininger, E. Buchdunger, B.J. Druker, The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia, *Blood* 105 (7) (2005) 2640–2653.
- [40] S. Soverini, A. Hochhaus, F.E. Nicolini, F. Gruber, T. Lange, G. Saglio, F. Pane, M.C. Müller, T. Ernst, G. Rosti, K. Porzka, M. Baccarani, N.C. Cross, G. Martinelli, BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet, *Blood* 118 (5) (2011) 1208–1215.
- [41] M.M. Schittenhelm, S. Shiraga, A. Schroeder, A.S. Corbin, D. Griffith, F.Y. Lee, C. Bokemeyer, M.W. Deininger, B.J. Druker, M.C. Heinrich, Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies, *Cancer Res.* 66 (1) (2006) 473–481.
- [42] L.J. Lombardo, F.Y. Lee, P. Chen, D. Norris, J.C. Barrish, K. Behnia, S. Castaneda, L.A. Cornelius, J. Das, A.M. Doweiko, C. Fairchild, J.T. Hunt, I. Inigo, K. Johnston, A. Kamath, D. Kan, H. Klei, P. Marathe, S. Pang, R. Peterson, S. Pitt, G.L. Schieven, R.J. Schmidt, J. Tokarski, M.L. Wen, J. Wityak, R.M. Borzilleri, Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays, *J. Med. Chem.* 47 (27) (2004) 6658–6661.
- [43] P. La Rosée, A.S. Corbin, E.P. Stoffregen, M.W. Deininger, B.J. Druker, Activity of the Bcr-Abl kinase inhibitor PD180970 against clinically relevant Bcr-Abl isoforms that cause resistance to imatinib mesylate (gleevec, STI571), *Cancer Res.* 62 (24) (2002) 7149–7153.
- [44] B.J. Huntly, A.G. Reid, A.J. Bench, L.J. Campbell, N. Telford, P. Shepherd, J. Szer, H.M. Prince, P. Turner, C. Grace, E.P. Nacheva, A.R. Green, Deletions of the derivative chromosome 9 occur at the time of the Philadelphia translocation and provide a powerful and independent prognostic indicator in chronic myeloid leukemia, *Blood* 98 (6) (2001) 1732–1738.
- [45] P.B. Sinclair, E.P. Nacheva, M. Leversha, N. Telford, J. Chang, A. Reid, A. Bench, K. Champion, B. Huntly, A.R. Green, Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia, *Blood* 95 (3) (2000) 738–743.
- [46] D. Joshi, S. Chandrakala, S. Korgaonkar, K. Ghosh, B.R. Vundinti, Down-regulation of miR-199b associated with imatinib drug resistance in 9q34.1 deleted BCR/ABL positive CML patients, *Gene* 542 (2) (2014) 109–112.
- [47] R.P. Dematteo, K.V. Ballman, C.R. Antonescu, R.G. Maki, P.W. Pisters, G.D. Demetri, M.E. Blackstein, C.D. Blanke, M. von Mehren, M.F. Brennan, S. Patel, M.D. McCarter, J.A. Polikoff, B.R. Tan, K. Owzar, A.C.O.S.O.G.A.I.A.G.S. Team, Adjuvant imatinib mesylate after resection of localised, primary gastrointestinal stromal tumour: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial, *Lancet* 373 (9669) (2009) 1097–1104.
- [48] H. Joensuu, M. Eriksson, K. Sundby Hall, J.T. Hartmann, D. Pink, J. Schütte, G. Ramadori, P. Hohenberger, J. Duyster, S.E. Al-Batran, M. Schlemmer, S. Bauer, E. Wardelmann, M. Sarlomo-Rikala, B. Nilsson, H. Sihto, O.R. Monge, P. Bono, R. Kallio, A. Vehtari, M. Leinonen, T. Alvegård, P. Reichardt, One vs three years of adjuvant imatinib for operable gastrointestinal stromal tumor: a randomized trial, *JAMA* 307 (12) (2012) 1265–1272.
- [49] M.C. Heinrich, C.L. Corless, G.D. Demetri, C.D. Blanke, M. von Mehren, H. Joensuu, L.S. McGreevey, C.J. Chen, A.D. Van den Abbeele, B.J. Druker, B. Kiese, B. Eisenberg, P.J. Roberts, S. Singer, C.D. Fletcher, S. Silberman, S. Dimitrijevic, J.A. Fletcher, Kinase mutations and imatinib response in patients with metastatic gastrointestinal stromal tumor, *J. Clin. Oncol.* 21 (23) (2003) 4342–4349.
- [50] T.J. Lynch, D.W. Bell, R. Sordella, S. Gurubhagavatula, R.A. Okimoto, B.W. Brannigan, P.L. Harris, S.M. Haserlat, J.G. Supko, F.G. Haluska, D.N. Louis, D.C. Christiani, J. Settleman, D.A. Haber, Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N. Engl. J. Med.* 350 (21) (2004) 2129–2139.
- [51] W. Pao, J. Chmielecki, Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer, *Nat. Rev. Cancer* 10 (11) (2010) 760–774.
- [52] A.F. Gazdar, Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors, *Oncogene* 28 (Suppl 1) (2009) S24–S31.
- [53] R. Rosell, T. Morán, E. Carcereny, V. Quiroga, M.A. Molina, C. Costa, S. Benlloch, M. Tarón, Non-small-cell lung cancer harbouring mutations in the EGFR kinase domain, *Clin. Transl. Oncol.* 12 (2) (2010) 75–80.
- [54] R. Rosell, E. Carcereny, R. Gervais, A. Vergnenegre, B. Massuti, E. Felip, R. Palmero, R. Garcia-Gomez, C. Pallares, J.M. Sanchez, R. Porta, M. Cobo, P. Garrido, F. Longo, T. Moran, A. Insa, F. De Marinis, R. Corre, I. Bover, A. Illiano, E. Darrío, J. de Castro, M. Milella, N. Reguart, G. Altavilla, U. Jimenez, M. Provencio, M.A. Moreno, J. Terrasa, J. Muñoz-Langa, J. Valdivia, D. Isla, M. Domine, O. Molinier, J. Mazieres, N. Baize, R. Garcia-Campelo, G. Robinet, D. Rodriguez-Abreu, G. Lopez-Vivanco, V. Gebbia, L. Ferrera-Delgado, P. Bombaron, R. Bernabe, A. Bearz, A. Arta, E. Cortesi, C. Rolfo, M. Sanchez-Ronco, A. Drozdowskyj, C. Queralt, I. de Aguirre, J.L. Ramirez, J.J. Sanchez, M.A. Molina, M. Taron, L. Paz-Ares, S.L.C.G.I.c.w.G.F.D.P.-C.a.A.I.O. Toracic, Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European

- patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial, *Lancet Oncol* 13 (3) (2012) 239–246.
- [55] J.Y. Douillard, G. Ostoros, M. Cobo, T. Ciuleanu, R. McCormack, A. Webster, T. Milenkova, First-line gefitinib in Caucasian EGFR mutation-positive NSCLC patients: a phase-IV, open-label, single-arm study, *Br. J. Cancer* 110 (1) (2014) 55–62.
- [56] J.C. Yang, J.Y. Shih, W.C. Su, T.C. Hsia, C.M. Tsai, S.H. Ou, C.J. Yu, G.C. Chang, C.L. Ho, L.V. Sequist, A.Z. Dudek, M. Shahidi, X.J. Cong, R.M. Lorence, P.C. Yang, V.A. Miller, Afatinib for patients with lung adenocarcinoma and epidermal growth factor receptor mutations (LUX-Lung 2): a phase 2 trial, *Lancet Oncol* 13 (5) (2012) 539–548.
- [57] J. Gao, H.R. Li, C. Jin, J.H. Jiang, J.Y. Ding, Strategies to overcome acquired resistance to EGFR TKI in the treatment of non-small cell lung cancer, *Clin. Transl. Oncol* 21 (10) (2019) 1287–1301.
- [58] T. Nagano, M. Tachihara, Y. Nishimura, Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy, *Cells* 7 (11) (2018).
- [59] S. Kobayashi, T.J. Boggon, T. Dayaram, P.A. Janne, O. Kocher, M. Meyerson, B.E. Johnson, M.J. Eck, D.G. Tenen, B. Halmos, EGFR mutation and resistance of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *N. Engl. J. Med.* 352 (8) (2005) 786–792.
- [60] D.R. Camidge, W. Pao, L.V. Sequist, Acquired resistance to TKIs in solid tumours: learning from lung cancer, *Nat. Rev. Clin. Oncol* 11 (8) (2014) 473–481.
- [61] K. Uchibori, M. Satouchi, N. Sueoka-Aragane, Y. Urata, A. Sato, F. Imamura, T. Inoue, M. Tachihara, K. Kobayashi, N. Katakami, C. Kokan, T. Hirashima, K. Iwanaga, M. Mori, K. Aoe, S. Morita, S. Negoro, Phase II trial of gefitinib plus pemetrexed after relapse using first-line gefitinib in patients with non-small cell lung cancer harboring EGFR gene mutations, *Lung Cancer* 124 (2018) 65–70.
- [62] X. Hu, W. Chen, X. Li, C. Zhao, C. Zhang, F. Xiong, H. Wu, Clinical efficacy analysis of Osimertinib treatment for a patient with leptomeningeal metastasis of EGFR+ non-small cell lung cancer without the T790M mutation, *Ann Palliat Med* 8 (5) (2019) 525–531.
- [63] B. Escudier, T. Eisen, W.M. Stadler, C. Szczylik, S. Oudard, M. Siebels, S. Negrier, C. Chevreau, E. Solska, A.A. Desai, F. Rolland, T. Demkow, T.E. Hutson, M. Gore, S. Freeman, B. Schwartz, M. Shan, R. Simantov, R.M. Bukowski T.S. Group, Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 356 (2) (2007) 125–134.
- [64] J.M. Llovet, S. Ricci, V. Mazzaferro, P. Hilgard, E. Gane, J.F. Blanc, A.C. de Oliveira, A. Santoro, J.L. Raoul, A. Forner, M. Schwartz, C. Porta, S. Zeuzem, L. Bolondi, T.F. Greten, P.R. Galle, J.F. Seitz, I. Borbath, D. Häussinger, T. Giannaris, M. Shan, M. Moscovici, D. Voliotis, J. Bruix S.I.S. Group, Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 359 (4) (2008) 378–390.
- [65] L. Niu, L. Liu, S. Yang, J. Ren, P.B.S. Lai, G.G. Chen, New insights into sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Responsible mechanisms and promising strategies, *Biochim. Biophys. Acta, Rev. Cancer* 1868 (2) (2017) 564–570.
- [66] Y.J. Zhu, B. Zheng, H.Y. Wang, L. Chen, New knowledge of the mechanisms of sorafenib resistance in liver cancer, *Acta Pharmacol. Sin.* 38 (5) (2017) 614–622.
- [67] J. Azumi, T. Tsubota, T. Sakabe, G. Shiota, miR-181a induces sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells through downregulation of RASSF1 expression, *Cancer Sci.* 107 (9) (2016) 1256–1262.
- [68] L. Li, J. Tang, B. Zhang, W. Yang, M. Liu Gao, R. Wang, Y. Tan, J. Fan, Y. Chang, J. Fu, F. Jiang, C. Chen, Y. Yang, J. Gu, D. Wu, L. Guo, D. Cao, H. Li, G. Cao, M. Wu, M.Q. Zhang, L. Chen, H. Wang, Epigenetic modification of MiR-429 promotes liver tumour-initiating cell properties by targeting Rb binding protein 4, *Gut* 64 (1) (2015) 156–167.
- [69] Y. Patt, C. Rojas-Hernandez, H.M. Fekrazad, P. Bansal, F.C. Lee, Phase II Trial of Sorafenib in Combination with Capecitabine in Patients with Hepatocellular Carcinoma: INST 08–20, *Oncology* 22 (10) (2017) 1158–e116.
- [70] G.K. Abou-Alfa, P. Johnson, J.J. Knox, M. Capanu, I. Davidenko, J. Lacava, T. Leung, B. Gansukh, L.B. Saltz, Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial, *JAMA* 304 (19) (2010) 2154–2160.
- [71] C.H. Hsu, Y.C. Shen, Z.Z. Lin, P.J. Chen, Y.Y. Shao, Y.H. Ding, C. Hsu, A.L. Cheng, Phase II study of combining sorafenib with metronomic tegafur/uracil for advanced hepatocellular carcinoma, *J. Hepatol.* 53 (1) (2010) 126–131.
- [72] S.D. Prete, L. Montella, M. Caraglia, L. Maiorino, G. Cennamo, V. Montesarchio, G. Piai, A. Febraro, L. Tarantino, E. Capasso, G. Palmieri, R. Guarriasi, M. Bianco, R. Mamone, C. Savastano, A. Pisano, B. Vincenzi, A. Sabia, A. D'Agostino, V. Faiola, R. Addeo, Sorafenib plus octreotide is an effective and safe treatment in advanced hepatocellular carcinoma: multicenter phase II So.LAR. study, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66 (5) (2010) 837–844.
- [73] A. Meyer, P. Cygan, K. Tolzien, A.G. Galvez, J.D. Bitran, T.M. Lestingi, C. Nabhan, Role of sorafenib in overcoming resistance of chemotherapy-failure castration-resistant prostate cancer, *Clin Genitourin Cancer* 12 (2) (2014) 100–105.
- [74] R.J. Motzer, T.E. Hutson, P. Tomczak, M.D. Michaelson, R.M. Bukowski, O. Rixe, S. Oudard, S. Negrier, C. Szczylik, S.T. Kim, I. Chen, P.W. Bycott, C.M. Baum, R.A. Figlin, Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma, *N. Engl. J. Med.* 356 (2) (2007) 115–124.
- [75] G.D. Demetri, A.T. van Oosterom, C.R. Garrett, M.E. Blackstein, M.H. Shah, J. Verweij, G. McArthur, I.R. Judson, M.C. Heinrich, J.A. Morgan, J. Desai, C.D. Fletcher, S. George, C.L. Bello, X. Huang, C.M. Baum, P.G. Casali, Efficacy and safety of sunitinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumour after failure of imatinib: a randomised controlled trial, *Lancet* 368 (9544) (2006) 1329–1338.
- [76] M.C. Heinrich, R.G. Maki, C.L. Corless, C.R. Antonescu, A. Harlow, D. Griffith, A. Town, A. McKinley, W.B. Ou, J.A. Fletcher, C.D. Fletcher, X. Huang, D.P. Cohen, C.M. Baum, G.D. Demetri, Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastro-intestinal stromal tumor, *J. Clin. Oncol.* 26 (33) (2008) 5352–5359.
- [77] D.H. Yoon, M.H. Ryu, B.Y. Ryou, M. Beck, D.R. Choi, Y. Cho, J.L. Lee, H.M. Chang, T.W. Kim, Y.K. Kang, Sunitinib as a second-line therapy for advanced GISTs after failure of imatinib: relationship between efficacy and tumor genotype in Korean patients, *Invest. New Drugs* 30 (2) (2012) 819–827.
- [78] K.S. Gajiwala, J.C. Wu, J. Christensen, G.D. Deshmukh, W. Diehl, J.P. DiNitto, J.M. English, M.J. Greig, Y.A. He, S.L. Jacques, E.A. Lunney, M. McTigue, D. Molina, T. Quenzer, P.A. Wells, X. Yu, Y. Zhang, A. Zou, M.R. Emmett, A.G. Marshall, H.M. Zhang, G.D. Demetri, KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106 (5) (2009) 1542–1547.
- [79] T. Nishida, T. Takahashi, A. Nishitani, T. Doi, K. Shirao, Y. Komatsu, K. Nakajima, S. Hirota, S.G.O. GIST, Sunitinib-resistant gastrointestinal stromal tumors harbor cis-mutations in the activation loop of the KIT gene, *Int J Clin Oncol* 14 (2) (2009) 143–149.
- [80] J. Gao, Y. Tian, J. Li, N. Sun, J. Yuan, L. Shen, Secondary mutations of c-KIT contribute to acquired resistance to imatinib and decrease efficacy of sunitinib in Chinese patients with gastrointestinal stromal tumors, *Med. Oncol.* 30 (2) (2013) 522.
- [81] T.A. Tran, H.S. Leong, A. Pavia-Jimenez, S. Fedysyn, J. Yang, B. Kucejova, S. Sivanand, P. Spence, X.J. Xie, S. Peña-Llopis, N. Power, J. Brugarolas, Fibroblast Growth Factor Receptor-Dependent and -Independent Paracrine Signaling by Sunitinib-Resistant Renal Cell Carcinoma, *Mol. Cell. Biol.* 36 (13) (2016) 1836–1855.
- [82] N. Yamaguchi, M. Osaki, K. Onuma, T. Yumioka, H. Iwamoto, T. Sejima, H. Kugoh, A. Takenaka, F. Okada, Identification of MicroRNAs Involved in Resistance to Sunitinib in Renal Cell Carcinoma Cells, *Anticancer Res.* 37 (6) (2017) 2985–2992.
- [83] S.M. Wilhelm, J. Dumas, L. Adnane, M. Lynch, C.A. Carter, G. Schütz, K.H. Thierauch, D. Zopf, Regorafenib (BAY 73–4506): a new oral multikinase inhibitor of angiogenic, stromal and oncogenic receptor tyrosine kinases with potent preclinical antitumor activity, *Int. J. Cancer* 129 (1) (2011) 245–255.
- [84] Y. Saito, T. Takahashi, K. Tanaka, Y. Miyazaki, T. Makino, Y. Kurokawa, M. Yamasaki, K. Nakajima, S. Takiguchi, M. Mori, Y. Doki, Treatment of Regorafenib in Patients with Metastatic or Unresectable Gastrointestinal Stromal Tumor after Failure of Imatinib and Sunitinib, *Gan To Kagaku Ryoho* 45 (1) (2018) 121–123.
- [85] Z. Zhang, T. Jiang, W. Wang, D. Piao, Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumor after failure with imatinib and sunitinib treatment: A meta-analysis, *Medicine (Baltimore)* 96 (48) (2017).
- [86] G.D. Demetri, P. Reichardt, Y.K. Kang, J.Y. Blay, P. Rutkowski, H. Gelderblom, P. Hohenberger, M. Leahy, M. von Mehren, H. Joensuu, G. Badalamenti, M. Blackstein, A. Le Cesne, P. Schöffski, R.G. Maki, S. Bauer, B.B. Nguyen, J. Xu, T. Nishida, J. Chung, C. Kappeler, I. Kuss, D. Laurent, P.G. Casali, G.S. investigators, Efficacy and safety of regorafenib for advanced gastrointestinal stromal tumours after failure of imatinib and sunitinib (GRID): an international, multicentre, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial, *Lancet* 381 (9863) (2013) 295–302.
- [87] C. Tomida, H. Nagano, N. Yamagishi, T. Uchida, A. Ohno, K. Hirasaka, T. Nikawa, S. Teshima-Kondo, Regorafenib induces adaptive resistance of colorectal cancer cells via inhibition of vascular endothelial growth factor receptor, *J Med Invest* 64(3.4) (2017) 262–265.
- [88] N. Kiyota, B. Robinson, M. Shah, A.O. Hoff, M.H. Taylor, D. Li, C.E. Dutcus, E.K. Lee, S.B. Kim, M. Tahara, Defining Radioiodine-Refractory Differentiated Thyroid Cancer: Efficacy and Safety of Lenvatinib by Radioiodine-Refractory Criteria in the SELECT Trial, *Thyroid* 27 (9) (2017) 1135–1141.
- [89] J.E. Frampton, Lenvatinib: A Review in Refractory Thyroid Cancer, *Target Oncol* 11 (1) (2016) 115–122.
- [90] Y.S. Lee, S.M. Kim, B.W. Kim, H.J. Chang, S.Y. Kim, C.S. Park, K.C. Park, H.S. Chang, Anti-cancer Effects of HNHA and Lenvatinib by the Suppression of EMT-Mediated Drug Resistance in Cancer Stem Cells, *Neoplasia* 20 (2) (2018) 197–206.
- [91] M. Luo, L.W. Fu, Redundant kinase activation and resistance of EGFR-tyrosine kinase inhibitors, *Am J Cancer Res* 4 (6) (2014) 608–628.
- [92] M. Saji, M.D. Ringel, The PI3K-Akt-mTOR pathway in initiation and progression of thyroid tumors, *Mol. Cell. Endocrinol.* 321 (1) (2010) 20–28.
- [93] M. Ghidini, F. Petrelli, A. Ghidini, G. Tomasello, J.C. Hahne, R. Passalacqua, S. Barni, Clinical development of mTOR inhibitors for renal cancer, *Expert Opin. Invest. Drugs* 26 (11) (2017) 1229–1237.
- [94] F. Shojaei, J.H. Lee, B.H. Simmons, A. Wong, C.O. Esparza, P.A. Plumlee, J. Feng, A.E. Stewart, D.D. Hu-Lowe, J.G. Christensen, HGF/c-Met acts as an alternative angiogenic pathway in sunitinib-resistant tumors, *Cancer Res.* 70 (24) (2010) 10090–10100.
- [95] B. Sennino, D.M. McDonald, Controlling escape from angiogenesis inhibitors, *Nat. Rev. Cancer* 12 (10) (2012) 699–709.
- [96] T. Zhang, K. Dutton-Regester, K.M. Brown, N.K. Hayward, The genomic landscape of cutaneous melanoma, *Pigment Cell Melanoma Res* 29 (3) (2016) 266–283.
- [97] A.M. Menzies, L.E. Haydu, L. Vissintin, M.S. Carlino, J.R. Howle, J.F. Thompson, R.F. Kefford, R.A. Scolyer, G.V. Long, Distinguishing clinicopathologic features of patients with V600E and V600K BRAF-mutant metastatic melanoma, *Clin. Cancer Res.* 18 (12) (2012) 3242–3249.
- [98] H. Davies, G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson,

- C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, G. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, K. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, P.A. Futreal, Mutations of the BRAF gene in human cancer, *Nature* 417 (6892) (2002) 949–954.
- [99] P.B. Chapman, A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S.J. O’Day, J.A. Sosman, J.M. Kirkwood, A.M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R.J. Lee, K.T. Flaherty, G.A. McArthur, B.-S. Group, Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation, *N. Engl. J. Med.* 364 (26) (2011) 2507–2516.
- [100] S.M. Shaffer, M.C. Dunagin, S.R. Torborg, E.A. Torre, B. Emert, C. Krepler, M. Beqiri, K. Sproesser, P.A. Brafford, M. Xiao, E. Eggen, I.N. Anastopoulos, C.A. Vargas-Garcia, A. Singh, K.L. Nathanson, M. Herlyn, A. Raj, Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance, *Nature* 546 (7658) (2017) 431–435.
- [101] R. Nazarian, H. Shi, Q. Wang, X. Kong, R.C. Koya, H. Lee, Z. Chen, M.K. Lee, N. Attar, H. Sazegar, T. Chodon, S.F. Nelson, G. McArthur, J.A. Sosman, A. Ribas, R.S. Lo, Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation, *Nature* 468 (7326) (2010) 973–977.
- [102] Y. Shao, A.E. Aplin, BH3-only protein silencing contributes to acquired resistance to PLX4720 in human melanoma, *Cell Death Differ.* 19 (12) (2012) 2029–2039.
- [103] N. Komatsu, Y. Fujita, M. Matsuda, K. Aoki, mTORC1 upregulation via ERK-dependent gene expression change confers intrinsic resistance to MEK inhibitors in oncogenic KRas-mutant cancer cells, *Oncogene* 34 (45) (2015) 5607–5616.
- [104] W. Hu, L. Jin, C.C. Jiang, G.V. Long, R.A. Scolyer, Q. Wu, X.D. Zhang, Y. Mei, M. Wu, AEBP1 upregulation confers acquired resistance to BRAF (V600E) inhibition in melanoma, *Cell Death Dis.* 4 (2013) e914.
- [105] A.R. Jazirehi, R. Nazarian, A.X. Torres-Collado, J.S. Economou, Aberrant apoptotic machinery confers melanoma dual resistance to BRAF(V600E) inhibitor and immune effector cells: immunosensitization by a histone deacetylase inhibitor, *Am J Clin Exp Immunol* 3 (1) (2014) 43–56.
- [106] S.J. Welsh, H. Rizos, R.A. Scolyer, G.V. Long, Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? *Eur. J. Cancer* 62 (2016) 76–85.
- [107] L. Lisi, E. Laudati, P. Navarra, C. Dello Russo, The mTOR kinase inhibitors polarize glioma-activated microglia to express a M1 phenotype, *J Neuroinflammation* 11 (2014) 125.
- [108] A. Stiff, P. Trikha, R. Wesolowski, K. Kendra, V. Hsu, S. Uppati, E. McMichael, M. Duggan, A. Campbell, K. Keller, I. Landi, Y. Zhong, J. Dubovsky, J.H. Howard, L. Yu, B. Harrington, M. Old, S. Reiff, T. Mace, S. Tridandapani, N. Muthusamy, M.A. Caligiuri, J.C. Byrd, W.E. Carson, Myeloid-Derived Suppressor Cells Express Bruton’s Tyrosine Kinase and Can Be Depleted in Tumor-Bearing Hosts by Ibrutinib Treatment, *Cancer Res.* 76 (8) (2016) 2125–2136.
- [109] X. Zhang, X. Fang, Z. Gao, W. Chen, F. Tao, P. Cai, H. Yuan, Y. Shu, Q. Xu, Y. Sun, Y. Gu, Axitinib, a selective inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor, exerts an anticancer effect in melanoma through promoting antitumor immunity, *Anticancer Drugs* 25 (2) (2014) 204–211.
- [110] V.S. Ghalaut, L. Sangwan, K. Dahiya, P.S. Ghalaut, R. Dhankhar, R. Saharan, Effect of imatinib therapy with and without turmeric powder on nitric oxide levels in chronic myeloid leukemia, *J Oncol Pharm Pract* 18 (2) (2012) 186–190.
- [111] L. Yu, L.X. Gao, X.Q. Ma, F.X. Hu, C.M. Li, Z. Lu, Involvement of superoxide and nitric oxide in BRAF(V600E) inhibitor PLX4032-induced growth inhibition of melanoma cells, *Integr Biol (Camb)* 6 (12) (2014) 1211–1217.
- [112] M. Caraglia, G. Giuberti, M. Marra, R. Addeo, L. Montella, M. Murolo, P. Sperlongano, B. Vincenzi, S. Naviglio, S.D. Prete, A. Abbruzzese, P. Stiuso, Oxidative stress and ERK1/2 phosphorylation as predictors of outcome in hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib plus octreotide LAR, *Cell Death Dis.* 2 (2011) e150.
- [113] R. Dienstmann, I. Braña, J. Rodon, J. Tabernero, Toxicity as a biomarker of efficacy of molecular targeted therapies: focus on EGFR and VEGF inhibiting anticancer drugs, *Oncologist* 16 (12) (2011) 1729–1740.
- [114] S. Geiger-Gritsch, B. Stollenwerk, R. Miksad, B. Guba, C. Wild, U. Siebert, Safety of bevacizumab in patients with advanced cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Oncologist* 15 (11) (2010) 1179–1191.
- [115] M.M. An, Z. Zou, H. Shen, P. Liu, M.L. Chen, Y.B. Cao, Y.Y. Jiang, Incidence and risk of significantly raised blood pressure in cancer patients treated with bevacizumab: an updated meta-analysis, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 66 (8) (2010) 813–821.
- [116] A.R. Tinning, C. Bengtson, N.V. Jensen, L. Bastholt, B.L. Jensen, K. Madsen, Pazopanib-Induced Hypertension in Patients With Renal Cell Carcinoma Is Associated With Low Urine Excretion of NO Metabolites, *Hypertension* 71 (3) (2018) 473–480.
- [117] A. Dalbeni, C. Ciccarese, M. Bevilacqua, M. Benati, C. Caimmi, L. Cerrito, F. Famà, R. Iacovelli, A. Mantovani, F.M.A. Meneguzzi, P. Minuz, M. Montagnana, G. Orsolini, M. Rossini, G. Tortora, O. Viapiana, C. Fava, Effects of Antiangiogenic Drugs on Microcirculation and Macrocirculation in Patients with Advanced-Stage Renal Cancer, *Cancers (Basel)* 11 (1) (2018).
- [118] D. Sueta, K. Suyama, A. Sueta, N. Tabata, T. Yamashita, M. Tomiguchi, T. Takeshita, M. Yamamoto-Ibusuki, E. Yamamoto, Y. Izumiya, K. Kaikita, Y. Yamamoto, S. Hokimoto, H. Iwase, K. Tsujita, Lenvatinib, an oral multi-kinases inhibitor, -associated hypertension: Potential role of vascular endothelial dysfunction, *Atherosclerosis* 260 (2017) 116–120.
- [119] N. de Jesus-Gonzalez, E. Robinson, R. Penchev, M. von Mehren, M.C. Heinrich, W. Tap, Q. Wang, G. Demetri, S. George, B.D. Humphreys, Regorafenib induces rapid and reversible changes in plasma nitric oxide and endothelin-1, *Am. J. Hypertens.* 25 (10) (2012) 1118–1123.
- [120] S. Ekmekcioglu, J. Ellerhorst, C.M. Smid, V.G. Prieto, M. Munsell, A.C. Buzaid, E.A. Grimm, Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival, *Clin. Cancer Res.* 6 (12) (2000) 4768–4775.
- [121] M. Vakkala, K. Kahlos, E. Lakari, P. Pääkkö, V. Kinnula, Y. Soini, Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in situ and invasive breast carcinomas, *Clin. Cancer Res.* 6 (6) (2000) 2408–2416.
- [122] S.A. Glynn, B.J. Boersma, T.H. Dorsey, M. Yi, H.G. Yfantis, L.A. Ridnour, D.N. Martin, C.H. Switzer, R.S. Hudson, D.A. Wink, D.H. Lee, R.M. Stephens, S. Ambs, Increased NOS2 predicts poor survival in estrogen receptor-negative breast cancer patients, *J Clin Invest* 120 (11) (2010) 3843–3854.
- [123] C.H. Switzer, S.A. Glynn, R.Y. Cheng, L.A. Ridnour, J.E. Green, S. Ambs, D.A. Wink, S-nitrosylation of EGFR and Src activates an oncogenic signaling network in human basal-like breast cancer, *Mol. Cancer Res.* 10 (9) (2012) 1203–1215.
- [124] H.C. Lee, S. An, H. Lee, S.H. Woo, H.O. Jin, S.K. Seo, T.B. Choe, D.H. Yoo, S.J. Lee, Y.J. Hong, M.J. Park, C.H. Rhee, I.C. Park, S.I. Hong, Activation of epidermal growth factor receptor and its downstream signaling pathway by nitric oxide in response to ionizing radiation, *Mol. Cancer Res.* 6 (6) (2008) 996–1002.
- [125] S. Donnini, F. Finetti, R. Solito, E. Terzuoli, A. Sacchetti, L. Morbidelli, P. Patrignani, M. Ziche, EP2 prostanoid receptor promotes squamous cell carcinoma growth through epidermal growth factor receptor transactivation and iNOS and ERK1/2 pathways, *FASEB J.* 21 (10) (2007) 2418–2430.
- [126] H.W. Lo, S.C. Hsu, M. Ali-Seyed, M. Gunduz, W. Xia, Y. Wei, G. Bartholomewsz, J.Y. Shih, M.C. Hung, Nuclear interaction of EGFR and STAT3 in the activation of the iNOS/NO pathway, *Cancer Cell* 7 (6) (2005) 575–589.
- [127] P. Garrido, A. Shalaby, E.M. Walsh, N. Keane, M. Webber, M.M. Keane, F.J. Sullivan, M.J. Kerin, G. Callagy, A.E. Ryan, S.A. Glynn, Impact of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression on triple negative breast cancer outcome and activation of EGFR and ERK signaling pathways, *Oncotarget* 8 (46) (2017) 80568–80588.
- [128] M. Shibuya, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies, *Genes Cancer* 2 (12) (2011) 1097–1105.
- [129] S. Ambs, W.G. Merriam, M.O. Ogunfusika, W.P. Bennett, N. Ishibe, S.P. Hussain, E.E. Tzeng, D.A. Geller, T.R. Billiar, C.C. Harris, p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells, *Nat. Med.* 4 (12) (1998) 1371–1376.
- [130] Y. Nakamura, H. Yasuoka, M. Tsujimoto, K. Yoshidome, M. Nakahara, K. Nakao, M. Nakamura, K. Kakudo, Nitric oxide in breast cancer: induction of vascular endothelial growth factor-C and correlation with metastasis and poor prognosis, *Clin. Cancer Res.* 12 (4) (2006) 1201–1207.
- [131] M.A. Rahman, T. Senga, S. Ito, T. Hyodo, H. Hasegawa, M. Hamaguchi, S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxide-mediated cell invasion, *J. Biol. Chem.* 285 (6) (2010) 3806–3814.
- [132] A. Tyryshkin, F.M. Gorgun, E. Abdel Fattah, T. Mazumdar, L. Pandit, S. Zeng, N.T. Eissa, Src kinase-mediated phosphorylation stabilizes inducible nitric-oxide synthase in normal cells and cancer cells, *J. Biol. Chem.* 285 (1) (2010) 784–792.
- [133] K.H. Lim, B.B. Ancrile, D.F. Kashatus, C.M. Counter, Tumour maintenance is mediated by eNOS, *Nature* 452 (7187) (2008) 646–649.
- [134] C.J. Oliveira, M.F. Curcio, M.S. Moraes, M. Tsujita, L.R. Travassos, A. Stern, H.P. Monteiro, The low molecular weight S-nitrosothiol, S-nitroso-N-acetylpenicillamine, promotes cell cycle progression in rabbit aortic endothelial cells, *Nitric Oxide* 18 (4) (2008) 241–255.
- [135] E. Lopez-Rivera, P. Jayaraman, F. Parikh, M.A. Davies, S. Ekmekcioglu, S. Izadmehr, D.R. Milton, J.E. Chipuk, E.A. Grimm, Y. Estrada, J. Aguirre-Ghiso, A.G. Sikora, Inducible nitric oxide synthase drives mTOR pathway activation and proliferation of human melanoma by reversible nitrosylation of TSC2, *Cancer Res.* 74 (4) (2014) 1067–1078.
- [136] L. Zhu, L. Li, Q. Zhang, X. Yang, Z. Zou, B. Hao, F.M. Marincola, Z. Liu, Z. Zhong, M. Wang, X. Li, Q. Wang, K. Li, W. Gao, K. Yao, Q. Liu, NOS1, *Cell Death Discov* 3 (2017) 17011.
- [137] C. Estrada, C. Gómez, J. Martín-Nieto, T. De Frutos, A. Jiménez, A. Villalobo, Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase, *Biochem. J.* 326 (Pt 2) (1997) 369–376.
- [138] M. Murillo-Carretero, A. Torroglosa, C. Castro, A. Villalobo, C. Estrada, S-Nitrosylation of the epidermal growth factor receptor: a regulatory mechanism of receptor tyrosine kinase activity, *Free Radic Biol Med* 46 (4) (2009) 471–479.
- [139] M.J. Ruano, S. Hernández-Hernando, A. Jiménez, C. Estrada, A. Villalobo, Nitric oxide-induced epidermal growth factor-dependent phosphorylations in A431 tumour cells, *Eur. J. Biochem.* 270 (8) (2003) 1828–1837.
- [140] B.P. Carreira, I.M. Morte, A.I. Santos, A.S. Lourenço, A.F. Ambrósio, C.M. Carvalho, I.M. Araújo, Nitric oxide from inflammatory origin impairs neural stem cell proliferation by inhibiting epidermal growth factor receptor signaling, *Front. Cell. Neurosci.* 8 (2014) 343.
- [141] X. Feng, T. Sun, Y. Bei, S. Ding, W. Zheng, Y. Lu, P. Shen, S-nitrosylation of ERK inhibits ERK phosphorylation and induces apoptosis, *Sci. Rep.* 3 (2013) 1814.
- [142] L. Jin, Y. Cao, T. Zhang, P. Wang, D. Ji, X. Liu, H. Shi, L. Hua, R. Yu, S. Gao, Effects of ERK1/2 S-nitrosylation on ERK1/2 phosphorylation and cell survival in glioma cells, *Int. J. Mol. Med.* 41 (3) (2018) 1339–1348.
- [143] T. Yasukawa, E. Tokunaga, H. Ota, H. Sugita, J.A. Martyn, M. Kaneki, S-nitrosylation-dependent inactivation of Akt/protein kinase B in insulin resistance, *J. Biol. Chem.* 280 (9) (2005) 7511–7518.

- [144] T.H. Elsasser, S. Kahl, C.J. Li, J.L. Sartin, W.M. Garrett, J. Rodrigo, Caveolae nitration of Janus kinase-2 at the 1007Y-1008Y site: coordinating inflammatory response and metabolic hormone readjustment within the somatotropic axis, *Endocrinology* 148 (8) (2007) 3803-3813.
- [145] N.T. Moldogazieva, S.V. Lutsenko, A.A. Terentiev, Reactive Oxygen and Nitrogen Species-Induced Protein Modifications: Implication in Carcinogenesis and Anticancer Therapy, *Cancer Res.* 78 (21) (2018) 6040-6047.
- [146] I. Singh, J. Kim, A.K. Singh, A.K. Sharma, J.S. Won, STAT3 Regulation By S-Nitrosylation: Implication In Cancer, *Redox Biol.* 5 (2015) 416-417.
- [147] K. Kaliyaperumal, A.K. Sharma, D.G. McDonald, J.S. Dhindsa, C. Yount, A.K. Singh, J.S. Won, I. Singh, S-nitrosoglutathione-mediated STAT3 regulation in efficacy of radiotherapy and cisplatin therapy in head and neck squamous cell carcinoma, *Redox Biol.* 6 (2015) 41-50.
- [148] N.L. Reynaert, K. Ckless, S.H. Korn, N. Vos, A.S. Guala, E.F. Wouters, A. van der Vliet, Y.M. Janssen-Heininger, Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (24) (2004) 8945-8950.
- [149] V.A. Yakovlev, I.J. Barani, C.S. Rabender, S.M. Black, J.K. Leach, P.R. Graves, G.E. Kellogg, R.B. Mikkelsen, Tyrosine nitration of IkkappaBalpha: a novel mechanism for NF-kappaB activation, *Biochemistry* 46 (42) (2007) 11671-11683.
- [150] J.M. Song, P. Upadhyaya, F. Kassie, Nitric oxide-donating aspirin (NO-Aspirin) suppresses lung tumorigenesis in vitro and in vivo and these effects are associated with modulation of the EGFR signaling pathway, *Carcinogenesis* 39 (7) (2018) 911-920.
- [151] M. Mimeault, N. Jouy, P. Depreux, J.P. Hénichart, Synergistic antiproliferative and apoptotic effects induced by mixed epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 and nitric oxide donor in human prostatic cancer cell lines, *Prostate* 62 (2) (2005) 187-199.
- [152] T. Chijiwa, A. Mishima, M. Hagiwara, M. Sano, K. Hayashi, T. Inoue, K. Naito, T. Toshioka, H. Hidaka, Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells, *J. Biol. Chem.* 265 (9) (1990) 5267-5272.
- [153] H. Hidaka, M. Hagiwara, T. Chijiwa, Molecular pharmacology of protein kinases, *Neurochem. Res.* 15 (4) (1990) 431-434.
- [154] A. Ferro, M. Coash, T. Yamamoto, J. Rob, Y. Ji, L. Queen, Nitric oxide-dependent beta2-adrenergic dilatation of rat aorta is mediated through activation of both protein kinase A and Akt, *Br. J. Pharmacol.* 143 (3) (2004) 397-403.
- [155] J. Fassett, D. Tobolt, L.K. Hansen, Type I collagen structure regulates cell morphology and EGF signaling in primary rat hepatocytes through cAMP-dependent protein kinase A, *Mol. Biol. Cell* 17 (1) (2006) 345-356.
- [156] A. Robinet, G. Hoizey, H. Millart, PI 3-kinase, protein kinase C, and protein kinase A are involved in the trigger phase of beta1-adrenergic preconditioning, *Cardiovasc. Res.* 66 (3) (2005) 530-542.
- [157] K. Burvall, L. Palmberg, K. Larsson, Expression of TNFalpha and its receptors R1 and R2 in human alveolar epithelial cells exposed to organic dust and the effects of 8-bromo-cAMP and protein kinase A modulation, *Inflamm. Res.* 54 (7) (2005) 281-288.
- [158] K. Kaneishi, Y. Sakuma, H. Kobayashi, M. Kato, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate augments intracellular Ca2+ concentration and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) release in immortalized GnRH neurons in an Na+ -dependent manner, *Endocrinology* 143 (11) (2002) 4210-4217.
- [159] L.L. Reber, F. Daubeuf, S. Nemska, N. Frossard, The AGC kinase inhibitor H89 attenuates airway inflammation in mouse models of asthma, *PLoS ONE* 7 (11) (2012) e49512.
- [160] M. Yu, T. Liu, Y. Chen, Y. Li, W. Li, Combination therapy with protein kinase inhibitor H89 and Tetrandrine elicits enhanced synergistic antitumor efficacy, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37 (1) (2018) 114.
- [161] X. Liu, F. Müller, A.S. Wayne, I. Pastan, Protein Kinase Inhibitor H89 Enhances the Activity of Pseudomonas Exotoxin A-Based Immunotoxins, *Mol. Cancer Ther.* 15 (5) (2016) 1053-1062.
- [162] K. Li, J. Liang, Y. Lin, H. Zhang, X. Xiao, Y. Tan, J. Cai, W. Zhu, F. Xing, J. Hu, G. Yan, A classical PKA inhibitor increases the oncolytic effect of M1 virus via activation of exchange protein directly activated by cAMP 1, *Oncotarget* 7 (30) (2016) 48443-48455.
- [163] M. Cortier, R. Boina-Ali, C. Racoer, C. Paul, E. Solary, J.F. Jeannin, A. Bettaieb, H89 enhances the sensitivity of cancer cells to glyceryl trinitrate through a purinergic receptor-dependent pathway, *Oncotarget* 6 (9) (2015) 6877-6886.
- [164]
- R. Boina-Ali, M. Cortier, N. Decolonne, C. Racoer-Godard, C. Seigne, M. Lamrani, J.F. Jeannin, C. Paul, A. Bettaieb, Activation of Akt by mamma lian target rapamycin complex 2 renders colon cancer cells sensitive to apoptosis induced by nitric oxide and Akt inhibitor, *J. Carcinogen. Mutagen.* S8 (2013).
- [165] S. Wang, Y. Song, D. Liu, EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance, *Cancer Lett.* 385 (2017) 51-54.
- [166] L. Liu, Y. Zhang, J. Wei, Z. Chen, J. Yu, VEGFR-TKIs combined with chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer: A systematic review, *J Cancer* 10 (4) (2019) 799-809.
- [167] M. Reck, Beyond the TRIBUTE trial: integrating HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors with chemotherapy in advanced NSCLC, *Future Oncol.* 2 (1) (2006) 47-51.
- [168] M. Wen, J. Xia, Y. Sun, X. Wang, X. Fu, Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Zhou, X. Li, Combination of EGFR-TKIs with chemotherapy versus chemotherapy or EGFR-TKIs alone in advanced NSCLC patients with EGFR mutation, *Biologics* 12 (2018) 183-190.
- [169] G. Scagliotti, S. Novello, J. von Pawel, M. Reck, J.R. Pereira, M. Thomas, J.E. Abrão Miziara, B. Balint, F. De Marinis, A. Keller, O. Arén, M. Csollak, I. Albert, C.H. Barrios, F. Grossi, M. Krzakowski, L. Cupit, F. Cihon, S. Dimatteo, N. Hanna, Phase III study of carboplatin and paclitaxel alone or with sorafenib in advanced non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 28 (11) (2010) 1835-1842.
- [170] P.A. Muller, K.H. Vousden, p53 mutations in cancer, *Nat. Cell Biol.* 15 (1) (2013) 2-8.
- [171] Z. Tang, J.A. Bauer, B. Morrison, D.J. Lindner, Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4, *Mol. Cell. Biol.* 26 (15) (2006) 5588-5594.
- [172] L. Leon-Bollotte, S. Subramaniam, O. Cauvard, S. Plenchette-Colas, C. Paul, C. Godard, A. Martinez-Ruiz, P. Legembre, J.F. Jeannin, A. Bettaieb, S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells, *Gastroenterology* 140(7) 2009-18 (2018) (2011) e1-4.
- [173] S. Romagny, S. Bouaouiche, G. Lucchi, P. Ducoroy, J.B. Bertoldo, H. Terenzi, A. Bettaieb, S. Plenchette, S-Nitrosylation of cIAP1 Switches Cancer Cell Fate from TNFalpha/TNFR1-Mediated Cell Survival to Cell Death, *Cancer Res.* 78 (8) (2018) 1948-1957.
- [174] D.T. Hess, J.S. Stamler, Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification, *J. Biol. Chem.* 287 (7) (2012) 4411-4418.
- [175] Z. Chen, K.Y. Huang, Y. Ling, M. Goto, H.Q. Duan, X.H. Tong, Y.L. Liu, Y.Y. Cheng, S.L. Morris-Natschke, P.C. Yang, S.L. Yang, K.H. Lee, Discovery of an Oleanol Acid/Hederagenin-Nitric Oxide Donor Hybrid as an EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor for Non-Small-Cell Lung Cancer, *J. Nat. Prod.* 82 (11) (2019) 3065-3073.
- [176] T.S. Kaoud, A.M. Mohsabb, H.A. Hassan, C. Yan, S.X. Van Ravenstein, D. Abdelhamid, K.N. Dalby, M. Abdel-Aziz, NO-releasing STAT3 inhibitors suppress BRAF-mutant melanoma growth, *Eur. J. Med. Chem.* 186 (2020) 111885.
- [177] C. Han, Z. Huang, C. Zheng, L. Wan, Y. Lai, S. Peng, K. Ding, H. Ji, Y. Zhang, Nitric oxide donating anilino-pyrimidines: synthesis and biological evaluation as EGFR inhibitors, *Eur. J. Med. Chem.* 66 (2013) 82-90.
- [178] S. Rakshit, J. Bagchi, L. Mandal, K. Paul, D. Ganguly, S. Bhattacharjee, M. Ghosh, N. Biswas, U. Chaudhuri, S. Bandyopadhyay, N-acetyl cysteine enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl+ cells by endothelial nitric oxide synthase-mediated production of nitric oxide, *Apoptosis* 14 (3) (2009) 298-308.
- [179] J. Hao, W. Fan, Y. Li, R. Tang, C. Tian, Q. Yang, T. Zhu, C. Diao, S. Hu, M. Chen, P. Guo, Q. Long, C. Zhang, G. Qin, W. Yu, L. Li, L. Qin, J. Wang, X. Zhang, Y. Ren, P. Zhou, L. Zou, K. Jiang, W. Guo, W. Deng, Melatonin synergizes BRAF-targeting agent vemurafenib in melanoma treatment by inhibiting iNOS/hTERT signaling and cancer-stem cell traits, *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38 (1) (2019) 48.
- [180] M. Colasanti, T. Persichini, Nitric oxide: an inhibitor of NF-kappaB/Rel system in glial cells, *Brain Res. Bull.* 52 (3) (2000) 155-161.
- [181] H.E. Marshall, J.S. Stamler, Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation, *Biochemistry* 40 (6) (2001) 1688-1693.
- [182] M. Chattopadhyay, S. Goswami, D.B. Rodes, R. Kodala, C.A. Velazquez, D. Boring, J.A. Crowell, K. Kashfi, NO-releasing NSAIDs suppress NF-kB signaling in vitro and in vivo through S-nitrosylation, *Cancer Lett.* 298 (2) (2010) 204-211.
- [183] H. Yasuda, M. Yamaya, K. Nakayama, T. Sasaki, S. Ebihara, A. Kanda, M. Asada, D. Inoue, T. Suzuki, T. Okazaki, H. Takahashi, M. Yoshida, T. Kaneta, K. Ishizawa, S. Yamanda, N. Tomita, M. Yamasaki, A. Kikuchi, H. Kubo, H. Sasaki, Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.* 24 (4) (2006) 688-794.

Review

Senescence and Cancer: Role of Nitric Oxide (NO) in SASP

Nesrine Mabrouk ^{1,2,†}, Silvia Ghione ^{1,2,†}, Véronique Laurens ^{1,2}, Stéphanie Plenchette ^{1,2}, Ali Bettaieb ^{1,2} and Catherine Paul ^{1,2,*}

¹ Laboratory of Immunology and Immunotherapy of Cancers, EPHE, PSL Research University, 75000 Paris, France; nesrine_mabrouk16@yahoo.fr (N.M.); silvi.ghio50@gmail.com (S.G.); veronique.laurens-calin01@u-bourgogne.fr (V.L.); Stephanie.Plenchette-Colas@u-bourgogne.fr (S.P.); ali.bettaieb@u-bourgogne.fr (A.B.)

² Laboratory of Immunology and Immunotherapy of Cancers (LIIC), EA7269, University of Burgundy Franche-Comté, 21000 Dijon, France

* Correspondence: catherine.paul@u-bourgogne.fr or catherine.paul@ephe.psl.eu; Tel: +33-3-80-39-33-51

† These authors contributed equally to this work.

Received: 26 March 2020; Accepted: 30 April 2020; Published: 2 May 2020



Abstract: Cellular senescence is a cell state involved in both physiological and pathological processes such as age-related diseases and cancer. While the mechanism of senescence is now well known, its role in tumorigenesis still remains very controversial. The positive and negative effects of senescence on tumorigenesis depend largely on the diversity of the senescent phenotypes and, more precisely, on the senescence-associated secretory phenotype (SASP). In this review, we discuss the modulatory effect of nitric oxide (NO) in SASP and the possible benefits of the use of NO donors or iNOS inducers in combination with senotherapy in cancer treatment.

Keywords: SASP; nitric oxide; cancer treatments

1. Senescence and Cancer

Senescence is an important biological mechanism that plays a crucial role in many physiological processes, such as development and wound healing, and also in various age-related pathologies including cancer [1–3]. Indeed, there is a strong relationship between aging and cancer. In both cases, the mechanisms involve an accumulation of cellular damage over time. However, other processes seem to be in opposition, such as hyperproliferation and the increase in cell survival in cancer or the decreased function and fitness in aging [4]. However, many hallmarks of aging are found in cancer, and senescence is one of them [5]. Senescence was first described in 1961 by Hayflick and Moorhead after observing that human diploid cells have a replicative limit in culture [6]. This process, named replicative senescence, is the first form of senescence described and involves the shortening of telomeres [7]. The loss of telomeres is recognized as DNA damage and triggers a DNA-damage response (DDR), involving DNA damage kinases such as ataxia-telangiectasia-mutated protein (ATM), ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) and checkpoint kinases 1 and 2 (CHK1 and CHK2), which in turn activate cell cycle proteins such as p53 [8]. DDR is also induced by other external damaging factors such as ionizing radiation and chemotherapeutic drugs [9]. Other forms of non-telomeric senescence, called premature senescence, have been described such as stress-induced senescence, which involves reactive oxygen species (ROS), and oncogene-induced senescence (OIS). OIS was firstly described by Serrano et al. (1997) in a model of human fibroblasts expressing an oncogenic form of RAS^{G12V} [10]. Since then, more than 50 oncogenes have been described to induce senescence once activated [11]. In most OIS cases, the senescent phenotype is invariably preceded by

hyperproliferation, aberrant replication and activation of the DDR [12,13]. PICS, PTEN-loss induced cellular senescence [14] is also a form of premature senescence, occurring independently of DDR or hyper-replication [15]. The loss of two other tumor suppressors, neurofibromin 1 (NF1) and the von Hippel-Lindau factor, has also been described to induce senescence in the same manner as for PICS [9].

The senescent phenotype is often characterized by the modulation of different signaling pathways and a series of cellular events such as the activation of the DDR; cell cycle arrest via the activation of the p53/p21^{CIP1} and p16^{INK4A}/Retinoblastoma (Rb) pathways; the induction of a senescence-associated secretory phenotype (SASP); resistance against apoptosis; the induction of endoplasmic reticulum stress; and the modulation of metabolism [16]. Since all these biological aspects are not specific to the senescence process, multiple markers should be considered to accurately define the senescent phenotype. The most commonly used assay is based on the histochemical detection of Senescence-Associated beta-galactosidase (SA-β-gal) [17]. Other canonical senescence markers include senescence inducers such as CDK inhibitors (p16, p21, p15 and p27) and the phosphorylated forms of p53 and Rb, which are proteins related to senescence-associated heterochromatin foci (SAHF) and the expression of extracellular factors associated with SASP [9]. In vitro morphological changes are also a common feature of senescence. Indeed, senescent cells are often characterized by structural cell changes such as enlarged morphology, the modification of plasma membrane composition, the accumulation of lysosomes and mitochondria, and nuclear changes [16].

Cellular senescence was primarily described as a tumor suppressor mechanism [14,18–20]. Indeed, first of all, senescence can inhibit the growth of cancer cells and then induce SASP, which in turn induces the recruitment of immune cells. However, the aging of tumor microenvironment and genetic and epigenetic mutations induced by tumor progression cooperate to bypass senescence [4]. Moreover, the long-term implications of senescent cells—and more particularly, the paracrine effect of SASP—potentially favor tumor development [21–24]. Recently, in a very comprehensive review, Faget et al. (2019) highlighted the existence of different SASPs in immunosupportive or immunosuppressive scenarios [25]. To counteract the pro-tumorigenic effects of SASP, new therapies have also been developed to dampen SASP's proinflammatory effects (senomorphic) or to specifically clear senescent cells (senolytics) [26]. These senotherapies selectively kill senescent cells or stimulate their elimination by the immune system [27]. These approaches include chemical inhibitors of the nuclear factor-kappa B (NF-κB), Janus kinase (JAK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) pathways and free radical scavengers [28–30].

Nitric oxide (NO) might be included in these therapies because a lot of pathways are regulated by post-translational modifications—such as cysteine S-nitrosylation (Cys-NO), tyrosine nitration (Tyr-NO) or even metal nitrosylation [31]—and because NO is also strongly implicated in immunomodulation [32]. Here, we describe the involvement of NO in senescence via (1) the modulation of SASP pathways, (2) the regulation of apoptosis via death receptor pathway modulation, (3) immunomodulation and (4) the modulation of the senolytic effects. Altogether, these data pave the way towards the development of new therapeutic strategies based on NO.

2. SASP in Cancer: A Double-Edged Sword

It is now well established that senescent cells are able to secrete a pool of molecules that define the SASP. This condition mediates the paracrine activity of senescent cells, which results in tissue microenvironment modulation [25]. Many SASP components are actually identified, such as growth factors, cytokines, chemokines, proteases and extracellular matrix (ECM) components [26,33]. SASP soluble factors include, among others, interleukin 6 (IL-6), IL1α, IL-10, IL-13, IL-15, chemokines such as CC motif ligand 2 (CCL2), CCL5, CCL8 and C-X-C motif 1 (CXCL1), CXCL2, CXCL5, CXCL12, granulocytes macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), macrophage colony stimulating factor 1 (CSF1), and cytokines such as interferon γ (IFNγ), tumor necrosis factor α (TNFα), insulin-like growth factors (IGFs) and transforming growth factor β (TGFβ) [33,34]. In addition to soluble factors, senescent cells can secrete proteases, such as matrix metalloproteinases (MMPs) and serine proteases,

and regulators of plasminogen activation pathways, which induce ECM modifications. In fact, it is well established that ECM changes (e.g., rigidity loss) increase the metastatic properties of cancer cells and provide optimal conditions for migration. These changes in the ECM are associated with poor prognosis in cancer patients [35]. For this reason, these molecules are involved in carcinogenesis and cell migration. MMP family members involved in SASP are stromelysin-1 and -2 (also known as MMP-3 and -10) and collagenase 1 (MMP-1), while plasminogen activators include urokinase (uPA), tissue-type plasminogen activators (tPA), uPA receptor (uPAR) and inhibitors of these serine proteases (PAI-1 and 2) [24,36]. The SASP factors are summarized in Table 1.

Table 1. The senescence-associated secretory phenotype (SASP) factors (based on [24,34]).

Interleukins and Other Inflammatory Molecules	IL-1; IL-1 β ; IL-6; IL-7; IL-8; IL-13; IL-15; TGF β ; GM-CSF; G-CSF; CSF-1; IFN- γ ; BLC; MIF
Chemokines and Growth Factors/Regulators	CXCL1; CXCL2; CXCL5; CXCL12; CCL2; CCL5; CCL8; CCL13; MIP-1 α ; MIP-3 α ; HCC-4; eotaxin/eotaxin-3; TECK; ENA-78; Amphiregulin; epiregulin; heregulin; EGF; bFGF; HGF; KGF (FGF7); VEGF; angiogenin; SCF
Receptors and Ligands	ICAM-1/3; OPG; TNF α ; sTNFR1; sTNFR2; TRAIL-R3; Fas; uPAR; SGP130; EGF-R
Proteases and Extracellular Matrix Proteins	MMP-1/3/10/12/13/14; TIMP-1/2; PAI-1/2; tPA; uPA; cathepsin B
Non-Protein Molecules and Insoluble Factors	Nitric oxide; ROS; PGE2; fibronectin; collagens; laminin

The SASP molecules can modulate stromal and immune cells, with a different role in cancer development. In fact, SASP is considered as a double-edged sword because it can lead to either anti-tumorigenic or a pro-tumorigenic effects in a context-dependent manner. Indeed, several SASP factors induce the clearance of senescent pre-neoplastic cells, preserving tissue homeostasis. During the early stage of senescence transformation, these cells are recognized and eliminated by the immune system recruited by SASP, to prevent the malignant transformation [37]. For example, a high level of TGF β secreted by macrophages in the tumor microenvironment maintains cellular senescence and decreases tumor growth in aggressive B cell lymphoma [38]. Alessio et al. (2019) recently showed that the induction of acute SASP (A-SASP) in mesenchymal stem cells (MSCs) decreases immortalized prostate cancer cell PNT2 proliferation in vitro [39].

Nevertheless, long-term exposure to SASP factors or the aging of the tumor microenvironment increases inflammation and tumor progression [4,25]. Therefore, senescent cells can also contribute to tumorigenesis via SASP [40]. The accumulation of cytoplasmic DNA in senescent cells is able to activate the GMP-AMP synthase (cGAS)-stimulator of interferon genes (STING) pathway, causing chronic inflammation. cGAS binds to dsDNA, and this condition causes conformational changes in its catalytic center, inducing the catalysis of cyclic GMP-AMP (cGAMP). This second messenger stimulates STING, an endoplasmic reticulum-located protein, which induces the activation and nuclear translocation of interferon-regulatory factor 3 (IRF3) and NF- κ B. This causes the expression of, for example, type I IFN, a crucial player in inflammation [41]. STING activation is associated with inflammatory diseases, and the link between inflammation and cancer is well recognized [42]. For example, several studies reported the importance of the STING signaling pathway in 7,12dimethylbenz[α]anthracene (DMBA)-induced carcinogenesis. This compound can drive the development of skin tumors by DNA damage, which induces STING-dependent pro-inflammatory cytokine production [43,44]. Furthermore, a recent study has shown that STING-deficient mice are resistant to DMBA-induced skin tumors [45]. Another study showed that STING activation induces obesity-associated hepatocellular carcinoma (HCC) in mice [46]. The over-activation of the cGAS-STING signaling pathway was also described in lung cancer [47].

Although chemotherapy is beneficial to treat cancer, these compounds can promote SASP secretion via increased DNA damage, leading to inflammation and subsequent cancer progression [48]. It is actually known that several anti-cancer drugs, such as docetaxel, bleomycin, cyclophosphamide,

doxorubicin, vincristine, etoposide, 5-fluorouracil (5-FU), cisplatin and also ionizing radiation can mediate tumor-induced senescence [34,49]. This mechanism is principally mediated by DNA damage and inflammation in the tumor microenvironment. In this context, Tato-Costa et al. (2016) showed that the SASP induced by 5-fluorouracil (5-FU) and doxorubicin causes epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in vitro and in clinical samples from patients with rectal cancer [49]. Another important factor included in SASP is NO [50]. Senescent cells are able to secrete NO, via nitric oxide synthase (NOS). In the SASP microenvironment, fibroblasts are major NO producers, enhancing cancer cell proliferation. It is well known that NO is involved in monocyte differentiation, and these cells, under certain conditions, can induce cancer progression [51,52]. Moreover, NO is also involved in the modulation of a large number of signaling pathways [53].

3. Role of NO in the Induction of the SASP

According to previous reports, several mechanisms are involved in the regulation of SASP factors. Considering the large number of signaling molecules involved in SASP secretion, the present review is focused on the most crucial ones. The transcription factor NF- κ B plays an important role in SASP. It can be activated by several SASP inducers such as toll like receptor 2 (TLR2), TNF α , reactive oxygen species (ROS) and genotoxic agents [54,55]. The activation of NF- κ B involves I κ B phosphorylation by I κ B kinase (IKK), which leads to its degradation by the proteasome, enabling the active NF- κ B transcription factor (p65/p50) to translocate into the nucleus and thereby induce the expression of target genes such as those which code for IL-6, IL-8 and CXCL1 [56–58]. Other senescence activators such as CXCR2 ligands IL-8 and GRO/Gro1 are also upregulated in cells undergoing senescence following the activation of mitogen-activated kinases [59]. Recently, Loo et al. (2017) reported that the expression of cyclooxygenase 2 (COX-2), a rate limiting enzyme involved in prostaglandin biosynthesis, is increased in senescent hepatic stellate cells and triggers the overproduction of the SASP prostaglandin E2 (PGE2) via PGE2 receptor EP4, limiting anti-tumor immunity in obesity-associated HCC [60].

The identification of signals that can promote senescence in a given tumor type may provide new therapeutic targets for cancer. Several drugs (see below) modulate some of these signals, including NO.

NO, a highly reactive free radical, has pleiotropic functions in multiple biological processes, such as neurotransmission, vasodilatation and macrophage-mediated immunity. NO is synthesized from L-arginine by NOS in the presence of oxygen. Endothelial NOS (eNOS) and neuronal NOS (nNOS), two NOSs whose activities are dependent on calcium levels, produce low amounts of NO, while the third NOS is inducible (iNOS) and independent of calcium levels. iNOS is activated by IL-1 β , Toll Like 4 receptor agonists (TLR4), interferon γ (IFN γ) and oxidative stress and produces higher amounts of NO [61]. As a very unstable molecule, NO reacts mainly with the superoxide anion to generate peroxynitrite, a compound with high oxidative potential [62].

NO is also released from pharmacological agents. There are direct NO donors—such as sodium nitroprusside, molsidomine or diethylamino-NONOate—and donors that require metabolism such as the classic nitrovasodilators and organic nitrate and nitrite esters—including nitroglycerin (also called glyceryl trinitrate or GTN), isosorbide dinitrate, isosorbide 5-mononitrate and nicorandil—that have been used in the treatment of cardiovascular diseases [63–65].

In cancer, NO plays a role in promoting as well as inhibiting tumors [62,66,67]. This dichotomy seems to be related to its concentration, its location and its targets [68]. A few clinical studies have shown that NO donors could mediate anti-tumor activities used alone or in combination with standard therapies [69–71]. Indeed, in the first phase II clinical trial, the use of nitroglycerin combined with vinorelbine and cisplatin improved the overall response and time to disease progression in patients with non-small-cell lung cancer (NSCLC) [69]. In a second phase II study, the addition of nitroglycerin to cisplatin and vinorelbine and concurrent radiotherapy in patients with advanced NSCLC had an acceptable toxicity profile and the possibility of adding nitroglycerin to chemotherapy and radiotherapy was supported [70]. In another phase II study conducted in patients with prostate

cancer, nitroglycerin increased the prostate-specific antigen (PSA) doubling time and the safety of the drug was confirmed [71].

NO-induced survival or cell death seems to be related to its biochemical action on proteins by causing post-translational modifications [31]. S-nitrosylation, the transfer of NO to a free-SH group of a specific cysteine residue, is now considered to be essential for regulating the function of many proteins and signaling pathways including those involved in cancer regulation [72]. It modulates protein structure, function, expression, location or interaction with other protein partners [73]. The ambivalent nature of NO in cancer is dictated by the impact of S-nitrosylation on proteins involved in signaling pathways that trigger both survival and cell death. Thus, NO and its derivatives, such as peroxynitrites, are able to cause direct or indirect DNA damage. Direct damage includes DNA base deamination, adduct formation and single strand breaks in the DNA. Indirect damage is due to the interactions of NO reactive species with other molecules such as amines, thiols or lipids [74]. Furthermore, NO and its derivatives modulate SASP factors. Recently, the NO donors sodium nitroprusside dihydrate (SNP) and diethylenetriamine/nitric oxide adduct (DETA/NO) have been reported to cause DNA double-strand breaks (DSBs), initiating cellular senescence programs in numerous cell lines of different origins (cervical and lung cancers, fibroblastic cell lines). This effect is associated with the activation of the protein kinase ATM, an upstream activator of the DDR; the activation of NF- κ B; and an increase in SASP factors like IL-6 and IL-8 [75]. NO can also regulate other pathways involved in the secretion of SASP factors such as NF- κ B and the mitogen activated protein kinase c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathways [76]. Indeed, Reynaert et al. (2004) have reported that NO triggers the S-nitrosylation of the inhibitor of NF- κ B kinase subunit β (IKK β , a regulator of the classical NF- κ B pathway activation) at cysteine residue 179 and consequently results in NF- κ B inhibition [77]. In addition, NO can S-nitrosylate both the p50 and p65 NF- κ B subunits at cysteine residues 62 and 38, respectively, reducing their DNA binding and inhibiting target gene transcription [78,79]. Moreover, the tyrosine nitration of I κ B α at tyrosine 181 by endogenous NO promotes NF- κ B signaling through the dissociation of I κ B α from NF- κ B [80]. The endogenous production of NO or NO donors such S-nitro-N-acetyl-penicillamine (SNAP) can suppress JNK activation via S-nitrosylation at cysteine 116 [81]. However, the relationship of NO-induced senescence with its ability to target NF- κ B and JNK has never been reported so far (Figure 1).

NO also targets some cytokines that belong to SASP factors. For instance, the NO-aspirin derivative NCX-4016 (100 mM) inhibits the release of numerous cytokines (IL-1 β , IL-18, IL-8, IL-12, IFN γ and TNF α) in monocytes isolated from human PBMCs of healthy donors after challenge with the bacterial endotoxin, lipopolysaccharides (LPS) (1 μ g/mL). This effect is due to the inhibition of IL-1 β Converting Enzyme, also named caspase-1, required for intracellular processing/maturation of IL-1 β and IL-18 [82]. These data may suggest that in the context of senescence, the NO-mediated inhibition of these pro-inflammatory cytokines could alleviate cancer development, invasion, and metastasis [83]. Furthermore, NO also targets another SASP factor, the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), an important target in cancer therapy and a key kinase involved in the IL-6 signaling pathway. Indeed, STAT3 is regulated by the S-nitrosylation of the cysteine residue at position 259, which inhibits STAT3 phosphorylation, its downstream activation and affects IL-6-mediated cell proliferation [84]. As mentioned before, COX2 expression is significantly increased in senescent cells. The overexpression of PGE2 (the major COX-2 product), which functions as a key SASP factor in the tumor microenvironment, suppresses the anti-tumor immunity and progression [60]. A previous study has established that NO can modulate COX2 activity. Indeed, Kim et al. (2005) showed that iNOS specifically binds to the enzyme COX2, induces its S-nitrosylation and enhances its catalytic activity [85]. NO can also modulate immune cell recruitment through its action on chemokines, another group of SASP factors. Indeed, Giustizieri et al. (2002) have reported that the NO donor, S-nitrosoglutathione (GSNO), diminished, in a dose-dependent manner, both the mRNA and protein levels of CCL5 (RANTES) and CXCL1 (GRO α) in keratinocytes cultured from healthy or psoriatic patients [86]. These results were confirmed in another cellular model by Kashiwagi et al. (2002),

which showed that CCL5 and CXCL1 are up-regulated in renal cortex of rats chronically treated with an NO synthase inhibitor, and induced the recruitment of monocytes/macrophages [87] (Figure 1).

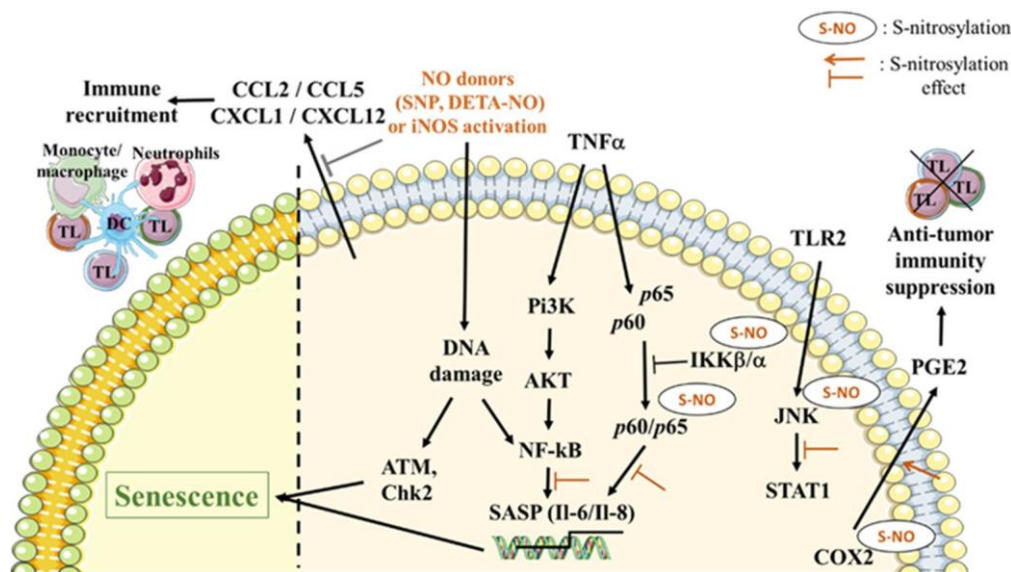


Figure 1. Impact of nitric oxide (NO) in senescence-mediated signaling pathways. NO plays important roles in different senescence-associated secretory phenotype (SASP) signaling pathways. Exogenous and endogenous NO can cause DNA damage that can lead to protein kinase ataxia-telangiectasia-mutated protein (ATM) and Chk2 activation, or NF- κ B activation and interleukin 6 (IL-6)/IL-8 gene transcription. All these changes can induce the initiation of cellular senescence programs. NO is also able to induce direct modifications in NF- κ B, either by S-nitrosylating both p60/p65 NF- κ B subunits and leading to SASP gene transcription inhibition, or by S-nitrosylating the NF- κ B kinase inhibitor subunit α (IKK α), which results in NF- κ B inhibition. S-nitrosylation can also affect the c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling pathway by leading to the inhibition of its activation. Moreover, cyclooxygenase 2 (COX2), a prostaglandin E2 (PGE2) secretion inducer, is also an NO target. The S-nitrosylation of COX2 stimulates its activity and induces anti-tumor immunity suppression. Another group of SASP factors altered by NO are chemokines such as CCL2, CCL5, CXCL1 and CXCL12, which can transcriptionally and translationally be decreased in response to NO donors, thus reducing immune cell recruitment.

4. NO Involvement in Expression/Activation of Death Receptors and Death Ligands

The tumor necrosis factor (TNF) ligand family members TNF α , Fas ligand (FasL) and Tumor-necrosis-factor related apoptosis ligand (TRAIL) are major immunoregulatory cytokines of the tumor microenvironment, also found to be important SASP components (Table 1) [24]. These cytokines exert paradoxical functions, either by sustaining tumor growth and chemoresistance or by killing tumor cells, in the tumor microenvironment in a context-dependent manner [88]. One anti-tumor strategy would consist of switching the roles of TNF α , FasL and TRAIL from their pro-apoptotic functions to favor tumor cell death. A growing number of studies indicate that NO can regulate the signaling pathways driven by TNF α , FasL and TRAIL at many different levels [89,90]. Several studies have indicated that NO may exert dual effects in cancer, that can lead, on one hand, to enhanced tumor growth and progression (genotoxicity, apoptosis resistance, angiogenesis, invasion and metastasis) and on the other hand, to tumoricidal effects (cytostatic and/or cytotoxic effects on tumor cells) [91,92]. The biological impact of NO relies on various aspects (e.g., the NO concentration, tumor redox microenvironment and duration of NO exposure). Thus, NO donor-based therapies are currently under investigation to further sustain the tumoricidal effect of NO.

Several reports have demonstrated the role of NO-mediated sensitization of cancer cells to apoptosis in many ways [88]. Thus, NO-based therapies could represent a new potential strategy to

reduce the threshold of cancer cell resistance. Various NO donors are under investigation to understand the molecular mechanisms that underly their modes of action. It is becoming even more evident that the post-translational modifications of selective proteins by NO exert an important regulatory control, either positive or negative, over various signaling pathways engaged by TNF ligands and their receptors [88,93]. The cellular response at least relies on the relative threshold of NO production (either endogenous or from NO-releasing drugs), cellular context and severity of oxidative stress. If the biological outcome of the NO-induced S-nitrosylation of Fas [94], DR4 [95] and TNFR1 [96] results in cell death induction, the molecular mechanisms that control this process have not been fully unraveled yet. Importantly, the NO donor GTN can mediate the S-nitrosylation of Fas at cysteine 304, which consequently leads to its aggregation into lipid rafts to stimulate downstream signaling and cancer cell death [94]. In agreement, the S-nitrosylation of the transcriptional repressor Ying Yang 1 (YY1) inhibits its DNA-binding capacity to the silencer region of Fas promoter and then up-regulates *FAS* gene expression and consequently sensitizes cells to apoptosis [97,98].

The S-nitrosylation of TNFR1 by the NO donor NONOate has also been described in hepatoma cells; however, the exact targeted cysteine residue is unknown [96]. As previously described, the classical NF- κ B pathway activated by the TNF α /TNFR1 system is controlled by the S-nitrosylation and nitration of specific target proteins at different levels of the molecular pathway. More recently, the S-nitrosylation of cIAP1 (a positive regulator of the NF- κ B signaling pathway), induced by the NO donor GTN (particularly at cysteine 571), appeared as a critical cornerstone for switching the cancer cell fate from TNF α /TNFR1-mediated cell survival (through the activation of the classical NF- κ B cascade) to TNF α /TNFR1-mediated cell death [90].

To date, the regulatory role of NO in the TRAIL/TRAIL receptors (TRAILR) system is less documented. Only DR4 was reported to undergo S-nitrosylation and, furthermore, by a specific NO donor (Nitrosylcobalamin), particularly at cysteine 336, and consequently foster cancer cell apoptosis [95]. Accordingly, NO disrupts the transcriptional repressor activity of YY1 not only on *FAS* but also on *DR5*, up-regulates its expression and sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis [99].

Several crucial factors of apoptosis involved in the TNF signaling pathways, such as caspases, Bcl-2 family proteins or FLIP, can undergo post-translational modifications by NO that would impact cell fate [88,93]. Although SASP components include NO, the S-nitrosylation of Fas, DR4 and TNFR1 was demonstrated exclusively via the NO released by NO donors.

Interestingly, beside their dichotomous responses in cancer, TNF ligands, particularly TNF α and FasL, can lead to the process of senescence. Indeed, cancer cells' senescent phenotype can arise in response to TNF α /TNF receptor 1 (TNFR1) through the activation of the p16^{INK4A}/Rb pathway [100]. The senescent phenotype can also occur in response to FasL/Fas in a context-dependent manner, particularly in microsatellite instability-high type colon tumors. Mechanistically, Fas-induced senescence was caused by a chronic DNA damage response via caspase-activated DNase resulting in p53 activation and p21 expression [101].

Whether the SASP could modulate the TNF ligand systems via NO, either in an autocrine or paracrine manner, remains to be demonstrated.

5. Role of NO in the SASP-Immunomodulatory Effect

Because senescent cells remain viable and exhibit the SASP phenotype with a wide spectrum of diverse physiological functions, their existence in the tumor mass can have an ambivalent impact, from tumor regression to promotion. SASP cytokines act on the recruitment and activation states of immune cells. They can cause the tumor infiltration of immunosuppressive cells like macrophages and myeloid-derived suppressor cells (MDSCs), thus promoting tumor growth. Conversely, they can also induce the tumor infiltration of natural killer cells (NK) and effector T lymphocytes and thus have anti-tumor properties [102].

In recent years, NO has emerged as an important immunomodulatory agent in the tumor microenvironment [32,103]. In situ, different sources of endogenous NO can be considered. Indeed, NO can

be produced by various types of cell expressing iNOS and eNOS. Moreover, NO, as well as ROS, can also derive from senescent cells as non-macromolecular components of the SASP [24] (Table 1). It has been demonstrated that the tumor microenvironment has all the conditions for iNOS expression and NO production, which is important for the maintenance and progression of an aggressive tumor phenotype in breast cancer [104]. iNOS has an immunosuppressive role within the tumor microenvironment via its actions on MDSCs as well as via the loss of the effector function of cytotoxic T lymphocytes (CTLs). Furthermore, two studies have shown that two NO-releasing drugs—NO-aspirin and NO-aspirin derivative (AT38)—induced, in numerous types of cancer, a feedback inhibition of iNOS in MDSCs [105,106]. Such effects result in the decreased MDSC-induced nitration of T-cell receptors, a massive infiltration of the tumor by T-cells and an enhanced efficacy of DNA cancer vaccination [105,106]. Indeed, NO from iNOS-expressing tumor cells disturbs the polarization and directional secretion of cytotoxic granules in the immune synapse of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) [107]. Nitration by iNOS-derived NO is also involved in the polarization of tumor-associated macrophages. NO leads to the suppression of the M1 macrophage signature gene activation and induces a pro-tumorigenic environment [108].

Among the SASP chemokine data for nitration, CCL2 and CXCL12 have been reported. These chemokines interact with the G-protein coupled receptors CCR2 and CXCR4, respectively, and bind to glycosaminoglycans (GAGs) present on the surface of endothelial cells and in the extracellular matrix. CCL2, also known as monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), greatly contributes to the recruitment of monocytes, memory T cells and dendritic cells into sites of inflammation and tumors. It has been shown that peroxynitrite-treated CCL2 lost its ability to recruit CD8⁺ T cells, but the recruitment of myeloid-derived suppressor cells was unaltered [106]. Nitrated CCL2 has a reduced affinity to its receptor CCR2, which may explain its failure to induce the chemotaxis of CD8⁺ T cells expressing low levels of the CCR2 but the retention of its ability to induce the migration of myeloid cells expressing high levels of CCR2 [109]. CXCL12, also known as stroma cell-derived factor-1 (SDF-1), represents the single natural ligand for the chemokine receptor CXCR4 and induces the activation and migration of most leucocytes. The nitration of tyrosine 7 in CXCL12 hampers the chemokine's ability to induce lymphocyte chemotaxis (Figure 1). This nitration of CXCL12 does not affect its ability to bind to the CXCR4 receptor but does impair its ability to signal through this receptor. If nitrated CXCL12 binds to GAGs with a similar affinity as wild type CXCL12, nitrated CCL2 has a reduced ability to bind GAGs compared to wild type CCL2, and therefore could limit further leukocyte chemotaxis. When nitration reduces receptor activation capacity without affecting receptor affinity, this influences the receptor's signaling in situations where many chemokines can bind the same receptor [110].

NO from MDSCs has been described to suppress T lymphocyte proliferation via the suppression of STAT5 phosphorylation [111]. However, as we have underlined above, the immunosuppressive effect of MDSCs can be constrained by NO-releasing drugs [105,106]. NO is also involved in STAT3 phosphorylation through src homology protein tyrosine phosphatase 2 (SHP2) nitration, known as a negative regulator of STAT3 phosphorylation [112]. This study was conducted in a mouse model of ulcerative colitis, and the impact of NO on STAT3 phosphorylation was investigated in LPS-activated macrophages but not in a tumor context or in T lymphocytes in whose activation STAT3 plays a key role.

SASP is also involved in immune resistance mechanisms, since high levels of IFN γ drive the expression of the programmed death ligand 1 (PD-L1), one of the targets of immune checkpoint inhibitor therapy (ICT). In tumors, high expression of the transcription factor YY1 modulates PD-L1 expression. Treatment with NO donors results in the inhibition of PD-L1 expression via the S-nitrosylation of YY1 [113]. By a nitroproteomic approach, authors uncover a potential mechanism for the ICT where a key protein for T cell activation is nitrated and inactivated by MDSCs. Indeed, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK), an initiating tyrosine kinase in the T cell receptor signaling cascade, is nitrated at tyrosine 394 by MDSCs [114]. After ICT, high expression of iNOS is observed in intratumoral myeloid cells and is dependent on IFN γ as evidenced using high dimensional profiling [115]. Thus, IFN γ drives the polarization of newly recruited monocytes to become iNOS-positive macrophages. This remodeling by ICT is also correlated with an increase in activated T cells and a decrease in Tregs.

Therefore, combining ICT with reactive nitrogen species reducing agents could represent treatment strategies for ICT-resistant cancers.

Growing literature suggests that the induction of senescence in the immune compartment is also a mechanism used by the immune system to regulate the immune response. Human Tregs induce senescence in responder T cells by the regulation of STAT1/STAT3 signaling [116]. Moreover, the autologous infusion of tumor antigen specific CD4⁺ Th1 lymphocyte can promote senescence in pancreatic tumor cells by releasing SASP factors such as IFN γ and TNF α . Such cytokine-induced senescence strictly requires STAT1 and TNFR1 signaling pathways, themselves affected by S-nitrosylation [100].

Since NO is present in the tumor microenvironment associated with senescent cells, it seems important to precisely determine the nitration or S-nitrosylation state of molecules detected in SASP or involved in SASP signaling.

Altogether, several studies put forward arguments to show the immunosuppressive effect of NO. In most cases, these arguments are based on the immunosuppressive effect of endogenous NO produced, in small amounts, by NOSs expressed in immune cells, particularly in MDSCs. On the other hand, NO donors generating high amounts of NO can reduce this immunosuppression. Such effects may be due to the ability of these donors to induce a feedback inhibition of iNOS, a key mechanism of MDSC-mediated immunosuppression. However, few clinical trials have tested the anti-tumor potential of the agonist TLR4, known to induce the production of iNOS and NO [117,118].

6. Senolytic Drugs and NO

As discussed in the “senescence and cancer” part, senescence can play an anti- or a pro-tumorigenic role in cancer. In fact, senescent cells correspond to cells that have irreversibly lost their capability to divide but that are very resistant to apoptotic stimuli [119]. We can distinguish six Senescent-Cell Anti-Apoptotic Pathways (SCAPs): BCL-2/BCL-XL, the PI3K/AKT/ceramide metabolic network, MDM2/p53/p21/serpin elements, Ephirins/dependence receptors/tyrosine kinases, the hypoxia inducible factor (HIF-1 α) pathway, and the heat shock protein 90 (HSP-90)-dependent pathway [27]. It seems as though the inhibition of these different pathways could induce apoptosis preferentially in senescent cells, which thus could delay age-associated pathologies [119]. Molecules used to induce senescent cell removal are called senolytics. To this group belong dasatinib and quercetin, BCL-2 family inhibitors, Forkhead box O 4 (FOXO4) inhibitors and others such as nicotinamide riboside, danazol, fisetin, piperlongumine and heat shock protein 90 (HSP90) inhibitors [34]. Thus far, many researchers view senolytics as a second wave of adjuvant tumor therapy, following chemotherapy or radiotherapy [120]. At this stage, links also exist between NO and senolytic drugs as described below.

6.1. Dasatinib/Quercetin

Dasatinib is a second-generation tyrosine kinase inhibitor that targets several kinases including breakpoint cluster region–protein Abelson (Bcr-Abl), c-Kit, and platelet-derived growth factor receptor A (PDGFRA) and B but also Src kinase family members. It is commonly used in the treatment of imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients [121,122]. Quercetin, instead, is a polyphenol compound that can be found in food like nuts, teas, vegetables and herbs and which is highlighted for its cytotoxic effects in several types of cancer without harming healthy cells [123]. Many modifications can be induced by these two senolytic drugs of NO levels. Indeed, dasatinib can induce an increase in plasma NO in pulmonary artery and smooth muscle cells [124]. Additionally, Hu et al. (2018) recently found that Src inhibition by dasatinib increases iNOS, a pro-inflammatory macrophage marker, in both intestinal and bone marrow-derived macrophages [125]. Conversely, Cruz et al. (2016) reported that dasatinib is able to reduce lung inflammation and fibrosis by promoting the polarization of macrophages from the M1 to M2 phenotype. This effect is due to the ability of dasatinib to reduce iNOS expression specifically in silicotic macrophages [126]. Concerning quercetin, all studies demonstrated that this senolytic drug induces a downregulation of iNOS expression, thus inhibiting nitric oxide production in vivo and in vitro (Table 2) [127–133].

Table 2. Senolytic-induced nitric oxide (NO) modulations.

Senolytic Drugs	NO Changes	Model	References
Dasatinib	Increased NO	Pulmonary artery endothelial cells and smooth muscle cells	[124]
	Increase iNOS expression	Intestinal and bone marrow-derived macrophages	[125]
	Decrease iNOS expression	Silicotic macrophages	[126]
Quercetin	Inhibition of iNOS		[127]
	Inhibition of mRNA iNOS	Human hepatocyte-derived cell line	[128]
	Inhibition of NO production and iNOS expression	Livers of CCl4-treated mice	[129]
		In vitro (rat hepatocyte)	[130]
		In vitro and in vivo (RAW 264.7 macrophages, primary peritoneal macrophages and Balb/c mice)	[131]
		Chronic cadmium nephrotoxicity in rats	[132]
Lung adenocarcinoma cell lines	[133]		
Hsp90 inhibitor	Reduction of NO production	Endothelial cells	[134]
	Blocked VEGF-induced increase in eNOS activity	Endothelial cells	[135]

6.2. Bcl-2 Inhibitors

The Bcl2 family is composed of a set of proteins that play an important role in promoting (Bax, Bak, Bid and Bim) but also in inhibiting (Bcl-2, Bcl-xL, and Bcl-W) apoptosis. Thus, the overexpression of anti-apoptotic members such as Bcl-2 or the downregulation or mutation of pro-apoptotic ones may be the cause of acquired resistance to apoptosis and cancer development [136]. Targeting apoptotic inhibitors represents, then, an efficient and promising cancer treatment. Post-translational modifications induced by NO on Bcl-2 have been reported. Indeed, Wright et al. (2016) revealed that Bcl-2 can be S-nitrosylated with NO donor DPTA-NONOate, thus inducing resistance to autophagy initiation in malignantly transformed lung cells [137].

6.3. Hsp90 Inhibitors

Hsp90 is a chaperone protein that assists the regulation, the folding and the stabilization/degradation of multiple proteins involved in multiple signaling pathways [138]. Proteins involved in tumor growth (EGFR, HER2, BRAF, Akt, etc.) can also be stabilized by this chaperone protein, leading to cancer development [139]. Hsp90 inhibitors are thus highlighted as anti-cancer drugs. In 1998, Garcia-Cardena et al. reported that Hsp90 can interact with eNOS and enhance its activity to induce NO production [140]. This activation seems to be induced by Hsp90 and Akt [134]. Indeed, it has been demonstrated that the Hsp90-dependent phosphorylation of eNOS at serine 1177 (human eNOS) or 1179 (bovine eNOS) is a key post-translational modification in the initiation of eNOS activation and NO synthesis [141]. The inhibition of Hsp90 by Geldanamycin [134] or taxotere [135] induced a marked reduction in eNOS activity (Table 2). eNOS can also be responsible for post-translational modifications of Hsp90 and further inhibiting eNOS activation. Martínez-Ruiz et al. (2005) were the first to determine that human Hsp90 can be S-nitrosylated at cysteine 597 in endothelial cells, which inhibits its ATPase activity in vitro [142] and in vivo [143].

In order to improve anti-cancer treatments, new combination therapies could be tested to successively induce the therapy-induced senescence (TIS) and the subsequent elimination of senescent cells by the immune system (senotherapy). Indeed, Xue et al. (2007) have shown in a p53 rescue

experiment that innate immune cells such as macrophages, neutrophils and NK cells are involved in senescent cell removal [144]. Adaptive immune cells such as the Th1 subclass of CD4⁺ cells are also involved in immune-mediated clearance in a model of OIS in murine hepatocytes [145].

More recently, the combination of senescence-inducing chemotherapy (oxaliplatin or cisplatin) with a TLR4 agonist, the lipid A OM-174, has demonstrated strong anti-tumor efficacy in a model of advanced colon carcinoma [146]. The anti-tumor efficacy of this Lipid A has previously been demonstrated in several models of tumors [147–149] and was dependent on cytokine secretion (IFN γ , IL-1 β and TNF α), iNOS activation and tumor-associated neutrophil (TAN) reprogramming into anti-tumorigenic N1 [149,150]. Moreover, the safety and tolerance at biologically active concentrations of the lipid A compound have been demonstrated in a phase I clinical trial in patients with cancers of different origins [117]. However, in our animal model with advanced colon carcinoma, lipid A—when used alone (as well as with platinum drugs)—failed to induce tumor regression, while pretreatment with oxaliplatin or cisplatin followed by lipid A injections induced a large regression of colorectal tumors [146]. The anti-tumor effect of this combination is correlated with a sequential induction of (1) cancer cell senescence and the recruitment of pro-tumorigenic TAN (N2), induced by platinum derivative drugs; and (2) apoptosis and N1 TAN recruitment triggered by lipid A.

7. Conclusions

In the fight against cancer, the search for new therapeutic combinations remains a major challenge. Senescence and, more particularly, SASP are major targets of these treatments. Indeed, many treatments currently used in anti-cancer therapies induce senescence, which is called therapy-induced senescence (TIS). These treatments include docetaxel, bleomycin, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, etoposide and oxaliplatin [48,146] but also ionizing radiation [34]. However, senescence and, more particularly, SASP have an early anti-tumorigenic effect whereas in the long term, they will have a pro-tumorigenic role via their autocrine and paracrine actions [151]. In order to avoid the negative side effects of SASP after TIS, a new type of therapy called senotherapy has emerged to either counteract these SASP effects or to specifically eliminate senescent cells. The first strategy consists of counteracting the pro-tumorigenic effects of SASP. This can be achieved with the use of telomerase inhibitors, the therapeutic modulation of the cell cycle, p53 and myc targeting, the use of immunotherapy that targets MDSCs, and the reprogramming of SASP [34]. In this review, we highlighted NO as an innovative approach to modulate SASP effects. Even though NO has been described to induce the senescence of tumor cells [75], it also mainly modulates the expression of SASP factors, as well as other senomorphic agents [34], by regulating numerous signaling pathways such as NF- κ B and STAT3 [84,93]. The second therapeutic strategy consists of inducing senescence and subsequently clearing the senescent cells either specifically, by inducing their apoptosis, or by activating the immune system. The use of NO donors as senotherapy seems to be a promising solution since they are described to potentiate the apoptosis induced by death ligands such as FasL, TNF α and TRAIL. In addition, several clinical trials have shown the advantage of using an NO donor such as GTN in combination with TIS agents such as vincristine, cisplatin and radiotherapy in the treatment of non-small cell lung cancer [69,71]. NO, through its immunomodulatory potential, can also be used to eliminate senescent cells. Thus, the combination of TIS agents such as oxaliplatin and cisplatin with an immunomodulatory agent such as lipid A has significant anti-tumor efficacy in an advanced cancer model [146]. Overall, the recent clinical trials that involved either TLR4 agonists [117,118] or NO donors [69–71] suggest that these therapies, used alone or in combination with TIS, might be beneficial to treat cancer. These results prompt us to reconsider the commonly accepted pro-tumorigenic effect of NO based on its production by immunosuppressive MDSCs. Further studies will be needed to better understand the pathophysiological conditions that determine whether NO will tip the balance to tumor progression or cancer cure.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: The authors acknowledge the financial support from Région Bourgogne, La Ligue Contre le Cancer (Conférence de coordination Interrégionale Est) and Qatar Foundation, but also acknowledge Olivier Burgy for manuscript editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Davaapil, H.; Brockes, J.P.; Yun, M.H. Conserved and novel functions of programmed cellular senescence during vertebrate development. *Development* **2017**, *144*, 106–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Lee, J.S. Cellular senescence, aging, and age-related disease: Special issue of BMB Reports in 2019. *BMB Rep.* **2019**, *52*, 1–2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Cerella, C.; Grandjennette, C.; Dicato, M.; Diederich, M. Roles of Apoptosis and Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Curr. Drug Targets* **2016**, *17*, 405–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fane, M.; Weeraratna, A.T. How the ageing microenvironment influences tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 89–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Aunan, J.R.; Cho, W.C.; Søreide, K. The Biology of Aging and Cancer: A Brief Overview of Shared and Divergent Molecular Hallmarks. *Aging Dis.* **2017**, *8*, 628–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Hayflick, L.; Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **1961**, *25*, 585–621. [[CrossRef](#)]
7. Harley, C.B.; Futcher, A.B.; Greider, C.W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* **1990**, *345*, 458–460. [[CrossRef](#)]
8. Campisi, J.; d’Adda di Fagagna, F. Cellular senescence: When bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 729–740. [[CrossRef](#)]
9. Muñoz-Espín, D.; Serrano, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2014**, *15*, 482–496. [[CrossRef](#)]
10. Serrano, M.; Lin, A.W.; McCurrach, M.E.; Beach, D.; Lowe, S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* **1997**, *88*, 593–602. [[CrossRef](#)]
11. Gorgoulis, V.G.; Halazonetis, T.D. Oncogene-induced senescence: The bright and dark side of the response. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2010**, *22*, 816–827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Di Micco, R.; Fumagalli, M.; Cicalese, A.; Piccinin, S.; Gasparini, P.; Luise, C.; Schurra, C.; Garre, M.; Nuciforo, P.G.; Bensimon, A.; et al. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* **2006**, *444*, 638–642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bartkova, J.; Rezaei, N.; Liontos, M.; Karakaidos, P.; Kletsas, D.; Issaeva, N.; Vassiliou, L.V.; Kolettas, E.; Niforou, K.; Zoumpourlis, V.C.; et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* **2006**, *444*, 633–637. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chen, Z.; Trotman, L.C.; Shaffer, D.; Lin, H.K.; Dotan, Z.A.; Niki, M.; Koutcher, J.A.; Scher, H.I.; Ludwig, T.; Gerald, W.; et al. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature* **2005**, *436*, 725–730. [[CrossRef](#)]
15. Alimonti, A.; Nardella, C.; Chen, Z.; Clohessy, J.G.; Carracedo, A.; Trotman, L.C.; Cheng, K.; Varmeh, S.; Kozma, S.C.; Thomas, G.; et al. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J. Clin. Investig.* **2010**, *120*, 681–693. [[CrossRef](#)]
16. Hernandez-Segura, A.; Nehme, J.; Demaria, M. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol.* **2018**, *28*, 436–453. [[CrossRef](#)]
17. Dimri, G.P.; Lee, X.; Basile, G.; Acosta, M.; Scott, G.; Roskelley, C.; Medrano, E.E.; Linskens, M.; Rubelj, I.; Pereira-Smith, O. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 9363–9367. [[CrossRef](#)]
18. Michaloglou, C.; Vredeveld, L.C.; Soengas, M.S.; Denoyelle, C.; Kuilman, T.; van der Horst, C.M.; Majoor, D.M.; Shay, J.W.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. BRAF^{V600E}-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature* **2005**, *436*, 720–724. [[CrossRef](#)]
19. Braig, M.; Lee, S.; Loddenkemper, C.; Rudolph, C.; Peters, A.H.; Schlegelberger, B.; Stein, H.; Dörken, B.; Jenuwein, T.; Schmitt, C.A. Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development. *Nature* **2005**, *436*, 660–665. [[CrossRef](#)]

20. Collado, M.; Gil, J.; Efeyan, A.; Guerra, C.; Schuhmacher, A.J.; Barradas, M.; Benguría, A.; Zaballos, A.; Flores, J.M.; Barbacid, M.; et al. Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* **2005**, *436*, 642. [[CrossRef](#)]
21. Krtolica, A.; Parrinello, S.; Lockett, S.; Desprez, P.Y.; Campisi, J. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 12072–12077. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Milanovic, M.; Fan, D.N.Y.; Belenki, D.; Däbritz, J.H.M.; Zhao, Z.; Yu, Y.; Dörr, J.R.; Dimitrova, L.; Lenze, D.; Monteiro Barbosa, I.A.; et al. Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* **2018**, *553*, 96–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Acosta, J.C.; Banito, A.; Wuestefeld, T.; Georgilis, A.; Janich, P.; Morton, J.P.; Athineos, D.; Kang, T.W.; Lasitschka, F.; Andrulis, M.; et al. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 978–990. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Coppé, J.P.; Desprez, P.Y.; Krtolica, A.; Campisi, J. The senescence-associated secretory phenotype: The dark side of tumor suppression. *Annu. Rev. Pathol.* **2010**, *5*, 99–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Faget, D.V.; Ren, Q.; Stewart, S.A. Unmasking senescence: Context-dependent effects of SASP in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2019**, *19*, 439–453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Sun, Y.; Coppé, J.P.; Lam, E.W. Cellular Senescence: The Sought or the Unwanted? *Trends Mol. Med.* **2018**, *24*, 871–885. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sikora, E.; Bielak-Zmijewska, A.; Mosieniak, G. Targeting normal and cancer senescent cells as a strategy of senotherapy. *Ageing Res. Rev.* **2019**, *55*, 100941. [[CrossRef](#)]
28. Laberge, R.M.; Sun, Y.; Orjalo, A.V.; Patil, C.K.; Freund, A.; Zhou, L.; Curran, S.C.; Davalos, A.R.; Wilson-Edell, K.A.; Liu, S.; et al. mTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1049–1061. [[CrossRef](#)]
29. Herranz, N.; Gallage, S.; Mellone, M.; Wuestefeld, T.; Klotz, S.; Hanley, C.J.; Raguz, S.; Acosta, J.C.; Innes, A.J.; Banito, A.; et al. Erratum: mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 1370. [[CrossRef](#)]
30. Fuhrmann-Stroissnigg, H.; Ling, Y.Y.; Zhao, J.; McGowan, S.J.; Zhu, Y.; Brooks, R.W.; Grassi, D.; Gregg, S.Q.; Stripay, J.L.; Dorransoro, A.; et al. Identification of HSP90 inhibitors as a novel class of senolytics. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 422. [[CrossRef](#)]
31. Leon, L.; Jeannin, J.F.; Beltaieb, A. Post-translational modifications induced by nitric oxide (NO): Implication in cancer cells apoptosis. *Nitric Oxide* **2008**, *19*, 77–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Bogdan, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol.* **2015**, *36*, 161–178. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Tchkonja, T.; Zhu, Y.; van Deursen, J.; Campisi, J.; Kirkland, J.L. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: Therapeutic opportunities. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 966–972. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Calcinotto, A.; Kohli, J.; Zagato, E.; Pellegrini, L.; Demaria, M.; Alimonti, A. Cellular Senescence: Aging, Cancer, and Injury. *Physiol. Rev.* **2019**, *99*, 1047–1078. [[CrossRef](#)]
35. Kaur, A.; Ecker, B.L.; Douglass, S.M.; Kugel, C.H.; Webster, M.R.; Almeida, F.V.; Somasundaram, R.; Hayden, J.; Ban, E.; Ahmadzadeh, H.; et al. Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 64–81. [[CrossRef](#)]
36. Lopes-Paciencia, S.; Saint-Germain, E.; Rowell, M.C.; Ruiz, A.F.; Kalegari, P.; Ferbeyre, G. The senescence-associated secretory phenotype and its regulation. *Cytokine* **2019**, *117*, 15–22. [[CrossRef](#)]
37. Zeng, S.; Shen, W.H.; Liu, L. Senescence and Cancer. *Cancer Transl. Med.* **2018**, *4*, 70–74. [[CrossRef](#)]
38. Reimann, M.; Lee, S.; Loddenkemper, C.; Dörr, J.R.; Tabor, V.; Aichele, P.; Stein, H.; Dörken, B.; Jenuwein, T.; Schmitt, C.A. Tumor stroma-derived TGF-beta limits myc-driven lymphomagenesis via Suv39h1-dependent senescence. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 262–272. [[CrossRef](#)]
39. Alessio, N.; Aprile, D.; Squillaro, T.; Di Bernardo, G.; Finicelli, M.; Melone, M.A.; Peluso, G.; Galderisi, U. The senescence-associated secretory phenotype (SASP) from mesenchymal stromal cells impairs growth of immortalized prostate cells but has no effect on metastatic prostatic cancer cells. *Ageing (Albany N.Y.)* **2019**, *11*, 5817–5828. [[CrossRef](#)]
40. Loo, T.M.; Miyata, K.; Tanaka, Y.; Takahashi, A. Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype via the cGAS-STING signaling pathway in cancer. *Cancer Sci.* **2020**, *111*, 304–311. [[CrossRef](#)]

41. Glück, S.; Ablasser, A. Innate immunosensing of DNA in cellular senescence. *Curr. Opin. Immunol.* **2019**, *56*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Barber, G.N. STING: Infection, inflammation and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 760–770. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Salcedo, R.; Cataisson, C.; Hasan, U.; Yuspa, S.H.; Trinchieri, G. MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends Immunol.* **2013**, *34*, 379–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Swann, J.B.; Vesely, M.D.; Silva, A.; Sharkey, J.; Akira, S.; Schreiber, R.D.; Smyth, M.J. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 652–656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ahn, J.; Xia, T.; Konno, H.; Konno, K.; Ruiz, P.; Barber, G.N. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 5166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Takahashi, A.; Loo, T.M.; Okada, R.; Kamachi, F.; Watanabe, Y.; Wakita, M.; Watanabe, S.; Kawamoto, S.; Miyata, K.; Barber, G.N.; et al. Downregulation of cytoplasmic DNases is implicated in cytoplasmic DNA accumulation and SASP in senescent cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kitajima, S.; Ivanova, E.; Guo, S.; Yoshida, R.; Campisi, M.; Sundararaman, S.K.; Tange, S.; Mitsuishi, Y.; Thai, T.C.; Masuda, S.; et al. Suppression of STING Associated with LKB1 Loss in KRAS-Driven Lung Cancer. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 34–45. [[CrossRef](#)]
48. Ewald, J.A.; Desotelle, J.A.; Wilding, G.; Jarrard, D.F. Therapy-induced senescence in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **2010**, *102*, 1536–1546. [[CrossRef](#)]
49. Tato-Costa, J.; Casimiro, S.; Pacheco, T.; Pires, R.; Fernandes, A.; Alho, I.; Pereira, P.; Costa, P.; Castelo, H.B.; Ferreira, J.; et al. Therapy-Induced Cellular Senescence Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Increases Invasiveness in Rectal Cancer. *Clin. Colorectal. Cancer* **2016**, *15*, 170–178.e3. [[CrossRef](#)]
50. Sato, I.; Morita, I.; Kaji, K.; Ikeda, M.; Nagao, M.; Murota, S. Reduction of nitric oxide producing activity associated with in vitro aging in cultured human umbilical vein endothelial cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *195*, 1070–1076. [[CrossRef](#)]
51. MacMicking, J.; Xie, Q.W.; Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.* **1997**, *15*, 323–350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Cassetta, L.; Pollard, J.W. Targeting macrophages: Therapeutic approaches in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 887–904. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bettaieb, A.; Plenchette, S.; Paul, C.; Laurens, V.; Romagny, S.; Jeannin, J.F. S-nitrosylation of cancer cells. In *Nitric Oxide and Cancer: Pathogenesis and Therapy*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; pp. 97–109.
54. Hari, P.; Millar, F.R.; Tarrats, N.; Birch, J.; Quintanilla, A.; Rink, C.J.; Fernández-Duran, I.; Muir, M.; Finch, A.J.; Brunton, V.G.; et al. The innate immune sensor Toll-like receptor 2 controls the senescence-associated secretory phenotype. *Sci. Adv.* **2019**, *5*, eaaw0254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Salminen, A.; Kauppinen, A.; Kaarniranta, K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal.* **2012**, *24*, 835–845. [[CrossRef](#)]
56. Wajapeyee, N.; Serra, R.W.; Zhu, X.; Mahalingam, M.; Green, M.R. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell* **2008**, *132*, 363–374. [[CrossRef](#)]
57. Kuilman, T.; Michaloglou, C.; Vredeveld, L.C.; Douma, S.; van Doorn, R.; Desmet, C.J.; Aarden, L.A.; Mooi, W.J.; Peeper, D.S. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell* **2008**, *133*, 1019–1031. [[CrossRef](#)]
58. Acosta, J.C.; O’Loughlen, A.; Banito, A.; Guijarro, M.V.; Augert, A.; Raguz, S.; Fumagalli, M.; Da Costa, M.; Brown, C.; Popov, N.; et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell* **2008**, *133*, 1006–1018. [[CrossRef](#)]
59. Odagiri, N.; Matsubara, T.; Higuchi, M.; Takada, S.; Urushima, H.; Sato-Matsubara, M.; Teranishi, Y.; Yoshizato, K.; Kawada, N.; Ikeda, K. Involvement of ERK1/2 activation in the gene expression of senescence-associated secretory factors in human hepatic stellate cells. *Mol. Cell Biochem.* **2019**, *455*, 7–19. [[CrossRef](#)]
60. Loo, T.M.; Kamachi, F.; Watanabe, Y.; Yoshimoto, S.; Kanda, H.; Arai, Y.; Nakajima-Takagi, Y.; Iwama, A.; Koga, T.; Sugimoto, Y.; et al. Gut Microbiota Promotes Obesity-Associated Liver Cancer through PGE. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 522–538. [[CrossRef](#)]

61. Mishra, D.; Patel, V.; Banerjee, D. Nitric Oxide and S-Nitrosylation in Cancers: Emphasis on Breast Cancer. *Breast. Cancer (Auckl.)* **2020**, *14*, 1178223419882688. [[CrossRef](#)]
62. Kamm, A.; Przychodzen, P.; Kuban-Jankowska, A.; Jacewicz, D.; Dabrowska, A.M.; Nussberger, S.; Wozniak, M.; Gorska-Ponikowska, M. Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield. *Nitric Oxide* **2019**, *93*, 102–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Gruetter, C.A.; Barry, B.K.; McNamara, D.B.; Gruetter, D.Y.; Kadowitz, P.J.; Ignarro, L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *J. Cyclic Nucleotide Res.* **1979**, *5*, 211–224. [[PubMed](#)]
64. Gruetter, C.A.; Barry, B.K.; McNamara, D.B.; Kadowitz, P.J.; Ignarro, L.J. Coronary arterial relaxation and guanylate cyclase activation by cigarette smoke, N'-nitrosonornicotine and nitric oxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1980**, *214*, 9–15. [[PubMed](#)]
65. Gruetter, C.A.; Gruetter, D.Y.; Lyon, J.E.; Kadowitz, P.J.; Ignarro, L.J. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: Effects of methylene blue and methemoglobin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1981**, *219*, 181–186.
66. Jeannin, J.F.; Leon, L.; Cortier, M.; Sassi, N.; Paul, C.; Bettaieb, A. Nitric oxide-induced resistance or sensitization to death in tumor cells. *Nitric Oxide* **2008**, *19*, 158–163. [[CrossRef](#)]
67. Bonavida, B.; Baritaki, S. Dual role of NO donors in the reversal of tumor cell resistance and EMT: Downregulation of the NF- κ B/Snail/YY1/RKIP circuitry. *Nitric Oxide* **2011**, *24*, 1–7. [[CrossRef](#)]
68. Ridnour, L.A.; Thomas, D.D.; Donzelli, S.; Espey, M.G.; Roberts, D.D.; Wink, D.A.; Isenberg, J.S. The biphasic nature of nitric oxide responses in tumor biology. *Antioxid. Redox Signal.* **2006**, *8*, 1329–1337. [[CrossRef](#)]
69. Yasuda, H.; Yamaya, M.; Nakayama, K.; Sasaki, T.; Ebihara, S.; Kanda, A.; Asada, M.; Inoue, D.; Suzuki, T.; Okazaki, T.; et al. Randomized phase II trial comparing nitroglycerin plus vinorelbine and cisplatin with vinorelbine and cisplatin alone in previously untreated stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 688–694. [[CrossRef](#)]
70. Siemens, D.R.; Heaton, J.P.; Adams, M.A.; Kawakami, J.; Graham, C.H. Phase II study of nitric oxide donor for men with increasing prostate-specific antigen level after surgery or radiotherapy for prostate cancer. *Urology* **2009**, *74*, 878–883. [[CrossRef](#)]
71. Arrieta, O.; Blake, M.; de la Mata-Moya, M.D.; Corona, F.; Turcott, J.; Orta, D.; Alexander-Alatorre, J.; Gallardo-Rincón, D. Phase II study. Concurrent chemotherapy and radiotherapy with nitroglycerin in locally advanced non-small cell lung cancer. *Radiother. Oncol.* **2014**, *111*, 311–315. [[CrossRef](#)]
72. Stamler, J.S.; Lamas, S.; Fang, F.C. Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* **2001**, *106*, 675–683. [[CrossRef](#)]
73. Hess, D.T.; Stamler, J.S. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 4411–4418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Felley-Bosco, E. Role of nitric oxide in genotoxicity: Implication for carcinogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* **1998**, *17*, 25–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Bagheri, M.; Nair, R.R.; Singh, K.K.; Saini, D.K. ATM-ROS-iNOS axis regulates nitric oxide mediated cellular senescence. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2017**, *1864*, 177–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Picco, V.; Pagès, G. Linking JNK Activity to the DNA Damage Response. *Genes Cancer* **2013**, *4*, 360–368. [[CrossRef](#)]
77. Reynaert, N.L.; Ckless, K.; Korn, S.H.; Vos, N.; Guala, A.S.; Wouters, E.F.; van der Vliet, A.; Janssen-Heininger, Y.M. Nitric oxide represses inhibitory kappaB kinase through S-nitrosylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 8945–8950. [[CrossRef](#)]
78. Kelleher, Z.T.; Matsumoto, A.; Stamler, J.S.; Marshall, H.E. NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 30667–30672. [[CrossRef](#)]
79. Marshall, H.E.; Stamler, J.S. Inhibition of NF-kappa B by S-nitrosylation. *Biochemistry* **2001**, *40*, 1688–1693. [[CrossRef](#)]
80. Yakovlev, V.A.; Barani, I.J.; Rabender, C.S.; Black, S.M.; Leach, J.K.; Graves, P.R.; Kellogg, G.E.; Mikkelsen, R.B. Tyrosine nitration of IkappaBalpha: A novel mechanism for NF-kappaB activation. *Biochemistry* **2007**, *46*, 11671–11683. [[CrossRef](#)]

81. Park, H.S.; Park, E.; Kim, M.S.; Ahn, K.; Kim, I.Y.; Choi, E.J. Selenite inhibits the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase (JNK/SAPK) through a thiol redox mechanism. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 2527–2531. [[CrossRef](#)]
82. Fiorucci, S.; Santucci, L.; Cirino, G.; Mencarelli, A.; Familiari, L.; Soldato, P.D.; Morelli, A. IL-1 beta converting enzyme is a target for nitric oxide-releasing aspirin: New insights in the antiinflammatory mechanism of nitric oxide-releasing nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 5245–5254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Wang, S.; Song, Y.; Liu, D. EAI045: The fourth-generation EGFR inhibitor overcoming T790M and C797S resistance. *Cancer Lett.* **2017**, *385*, 51–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Kim, J.; Won, J.S.; Singh, A.K.; Sharma, A.K.; Singh, I. STAT3 regulation by S-nitrosylation: Implication for inflammatory disease. *Antioxid. Redox Signal.* **2014**, *20*, 2514–2527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Kim, S.F.; Huri, D.A.; Snyder, S.H. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2. *Science* **2005**, *310*, 1966–1970. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Giustizieri, M.L.; Albanesi, C.; Scarponi, C.; De Pità, O.; Girolomoni, G. Nitric oxide donors suppress chemokine production by keratinocytes in vitro and in vivo. *Am. J. Pathol.* **2002**, *161*, 1409–1418. [[CrossRef](#)]
87. Kashiwagi, M.; Masutani, K.; Shinozaki, M.; Hirakata, H. MCP-1 and RANTES are expressed in renal cortex of rats chronically treated with nitric oxide synthase inhibitor. Involvement in macrophage and monocyte recruitment. *Nephron* **2002**, *92*, 165–173. [[CrossRef](#)]
88. Plenchette, S.; Romagny, S.; Laurens, V.; Bettaieb, A. NO and cancer: Itinerary of a double agent. *Med. Sci. (Paris)* **2016**, *32*, 625–633. [[CrossRef](#)]
89. Plenchette, S. Role Of S-Nitrosylation In The Extrinsic Apoptotic Signalling Pathway In Cancer. *Redox Biol.* **2015**, *5*, 415. [[CrossRef](#)]
90. Romagny, S.; Bouaouiche, S.; Lucchi, G.; Ducoroy, P.; Bertoldo, J.B.; Terenzi, H.; Bettaieb, A.; Plenchette, S. S-Nitrosylation of cIAP1 Switches Cancer Cell Fate from TNF α /TNFR1-Mediated Cell Survival to Cell Death. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 1948–1957. [[CrossRef](#)]
91. Choudhari, S.K.; Chaudhary, M.; Bagde, S.; Gadbail, A.R.; Joshi, V. Nitric oxide and cancer: A review. *World J. Surg. Oncol.* **2013**, *11*, 118. [[CrossRef](#)]
92. Cheng, H.; Wang, L.; Mollica, M.; Re, A.T.; Wu, S.; Zuo, L. Nitric oxide in cancer metastasis. *Cancer Lett.* **2014**, *353*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Plenchette, S.; Romagny, S.; Laurens, V.; Bettaieb, A. S-Nitrosylation in TNF superfamily signaling pathway: Implication in cancer. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 507–515. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Leon-Bollotte, L.; Subramaniam, S.; Cauvard, O.; Plenchette-Colas, S.; Paul, C.; Godard, C.; Martinez-Ruiz, A.; Legembre, P.; Jeannin, J.F.; Bettaieb, A. S-nitrosylation of the death receptor fas promotes fas ligand-mediated apoptosis in cancer cells. *Gastroenterology* **2011**, *140*, 2009–2018. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Tang, Z.; Bauer, J.A.; Morrison, B.; Lindner, D.J. Nitrosylcobalamin promotes cell death via S nitrosylation of Apo2L/TRAIL receptor DR4. *Mol. Cell Biol.* **2006**, *26*, 5588–5594. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Rodríguez-Hernández, A.; Navarro-Villarán, E.; González, R.; Pereira, S.; Soriano-De Castro, L.B.; Sarrias-Giménez, A.; Barrera-Pulido, L.; Álamo-Martínez, J.M.; Serrablo-Requejo, A.; Blanco-Fernández, G.; et al. Regulation of cell death receptor S-nitrosylation and apoptotic signaling by Sorafenib in hepatoblastoma cells. *Redox Biol.* **2015**, *6*, 174–182. [[CrossRef](#)]
97. Hongo, F.; Garban, H.; Huerta-Yepez, S.; Vega, M.; Jazirehi, A.R.; Mizutani, Y.; Miki, T.; Bonavida, B. Inhibition of the transcription factor Yin Yang 1 activity by S-nitrosation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *336*, 692–701. [[CrossRef](#)]
98. Garbán, H.J.; Bonavida, B. Nitric oxide inhibits the transcription repressor Yin-Yang 1 binding activity at the silencer region of the Fas promoter: A pivotal role for nitric oxide in the up-regulation of Fas gene expression in human tumor cells. *J. Immunol.* **2001**, *167*, 75–81. [[CrossRef](#)]
99. Huerta-Yepez, S.; Vega, M.; Escoto-Chavez, S.E.; Murdock, B.; Sakai, T.; Baritaki, S.; Bonavida, B. Nitric oxide sensitizes tumor cells to TRAIL-induced apoptosis via inhibition of the DR5 transcription repressor Yin Yang 1. *Nitric Oxide* **2009**, *20*, 39–52. [[CrossRef](#)]
100. Braumüller, H.; Wieder, T.; Brenner, E.; Aßmann, S.; Hahn, M.; Alkhaled, M.; Schilbach, K.; Essmann, F.; Kneilling, M.; Griessinger, C.; et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature* **2013**, *494*, 361–365. [[CrossRef](#)]

101. Raats, D.A.; Frenkel, N.; van Schelven, S.J.; Rinkes, I.H.; Laoukili, J.; Kranenburg, O. CD95 ligand induces senescence in mismatch repair-deficient human colon cancer via chronic caspase-mediated induction of DNA damage. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2669. [[CrossRef](#)]
102. Burton, D.G.A.; Stolzing, A. Cellular senescence: Immunosurveillance and future immunotherapy. *Ageing Res. Rev.* **2018**, *43*, 17–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Peñarando, J.; Aranda, E.; Rodríguez-Ariza, A. Immunomodulatory roles of nitric oxide in cancer: Tumor microenvironment says “NO” to antitumor immune response. *Transl Res.* **2019**, *210*, 99–108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Heinecke, J.L.; Ridnour, L.A.; Cheng, R.Y.; Switzer, C.H.; Lizardo, M.M.; Khanna, C.; Glynn, S.A.; Hussain, S.P.; Young, H.A.; Ambis, S.; et al. Tumor microenvironment-based feed-forward regulation of NOS2 in breast cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 6323–6328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. De Santo, C.; Serafini, P.; Marigo, I.; Dolcetti, L.; Bolla, M.; Del Soldato, P.; Melani, C.; Guiducci, C.; Colombo, M.P.; Iezzi, M.; et al. Nitroaspirin corrects immune dysfunction in tumor-bearing hosts and promotes tumor eradication by cancer vaccination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 4185–4190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Molon, B.; Ugel, S.; Del Pozzo, F.; Soldani, C.; Zilio, S.; Avella, D.; De Palma, A.; Mauri, P.; Monegal, A.; Rescigno, M.; et al. Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells. *J. Exp. Med.* **2011**, *208*, 1949–1962. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
107. Bronte, V.; Kasic, T.; Gri, G.; Gallana, K.; Borsellino, G.; Marigo, I.; Battistini, L.; Iafrate, M.; Prayer-Galetti, T.; Pagano, F.; et al. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J. Exp. Med.* **2005**, *201*, 1257–1268. [[CrossRef](#)]
108. Lu, G.; Zhang, R.; Geng, S.; Peng, L.; Jayaraman, P.; Chen, C.; Xu, F.; Yang, J.; Li, Q.; Zheng, H.; et al. Myeloid cell-derived inducible nitric oxide synthase suppresses M1 macrophage polarization. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6676. [[CrossRef](#)]
109. Thompson, S.; Martínez-Burgo, B.; Sepuru, K.M.; Rajarathnam, K.; Kirby, J.A.; Sheerin, N.S.; Ali, S. Regulation of Chemokine Function: The Roles of GAG-Binding and Post-Translational Nitration. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, 1692. [[CrossRef](#)]
110. Janssens, R.; Mortier, A.; Boff, D.; Vanheule, V.; Gouwy, M.; Franck, C.; Larsen, O.; Rosenkilde, M.M.; Van Damme, J.; Amaral, F.A.; et al. Natural nitration of CXCL12 reduces its signaling capacity and chemotactic activity in vitro and abrogates intra-articular lymphocyte recruitment in vivo. *Oncotarget* **2016**, *7*, 62439–62459. [[CrossRef](#)]
111. Sato, K.; Ozaki, K.; Oh, I.; Meguro, A.; Hatanaka, K.; Nagai, T.; Muroi, K.; Ozawa, K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* **2007**, *109*, 228–234. [[CrossRef](#)]
112. Tun, X.; Yasukawa, K.; Yamada, K.I. Nitric Oxide Is Involved in Activation of Toll-Like Receptor 4 Signaling through Tyrosine Nitration of Src Homology Protein Tyrosine Phosphatase 2 in Murine Dextran Sulfate-Induced Colitis. *Biol. Pharm. Bull.* **2018**, *41*, 1843–1852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Hays, E.; Bonavida, B. Nitric Oxide-Mediated Enhancement and Reversal of Resistance of Anticancer Therapies. *Antioxidants* **2019**, *8*, 407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Feng, S.; Cheng, X.; Zhang, L.; Lu, X.; Chaudhary, S.; Teng, R.; Frederickson, C.; Champion, M.M.; Zhao, R.; Cheng, L.; et al. Myeloid-derived suppressor cells inhibit T cell activation through nitrating LCK in mouse cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 10094–10099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Gubin, M.M.; Esaulova, E.; Ward, J.P.; Malkova, O.N.; Runci, D.; Wong, P.; Noguchi, T.; Arthur, C.D.; Meng, W.; Alspach, E.; et al. High-Dimensional Analysis Delineates Myeloid and Lymphoid Compartment Remodeling during Successful Immune-Checkpoint Cancer Therapy. *Cell* **2018**, *175*, 1014–1030.e1019. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Liu, X.; Mo, W.; Ye, J.; Li, L.; Zhang, Y.; Hsueh, E.C.; Hoft, D.F.; Peng, G. Regulatory T cells trigger effector T cell DNA damage and senescence caused by metabolic competition. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 249. [[CrossRef](#)]
117. Isambert, N.; Fumoleau, P.; Paul, C.; Ferrand, C.; Zanetta, S.; Bauer, J.; Ragot, K.; Lizard, G.; Jeannin, J.F.; Bardou, M. Phase I study of OM-174, a lipid A analogue, with assessment of immunological response, in patients with refractory solid tumors. *BMC Cancer* **2013**, *13*, 172. [[CrossRef](#)]

118. Galluzzi, L.; Vacchelli, E.; Eggermont, A.; Fridman, W.H.; Galon, J.; Sautès-Fridman, C.; Tartour, E.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Trial Watch: Experimental Toll-like receptor agonists for cancer therapy. *Oncoimmunology* **2012**, *1*, 699–716. [[CrossRef](#)]
119. Kang, C. Senolytics and Senostatics: A Two-Pronged Approach to Target Cellular Senescence for Delaying Aging and Age-Related Diseases. *Mol. Cells* **2019**, *42*, 821–827. [[CrossRef](#)]
120. Short, S.; Fielder, E.; Miwa, S.; von Zglinicki, T. Senolytics and senostatics as adjuvant tumour therapy. *EBioMedicine* **2019**, *41*, 683–692. [[CrossRef](#)]
121. Kannaiyan, R.; Mahadevan, D. A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev. Anticancer. Ther.* **2018**, *18*, 1249–1270. [[CrossRef](#)]
122. Ghione, S.; Mabrouk, N.; Paul, C.; Bettaieb, A.; Plenchette, S. Protein kinase inhibitor-based cancer therapies: Considering the potential of nitric oxide (NO) to improve cancer treatment. *Biochem. Pharmacol.* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Shafabakhsh, R.; Asemi, Z. Quercetin: A natural compound for ovarian cancer treatment. *J. Ovarian Res.* **2019**, *12*, 55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Baumgart, B.; Guha, M.; Hennan, J.; Li, J.; Woicke, J.; Simic, D.; Graziano, M.; Wallis, N.; Sanderson, T.; Bunch, R.T. In vitro and in vivo evaluation of dasatinib and imatinib on physiological parameters of pulmonary arterial hypertension. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2017**, *79*, 711–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Hu, X.; Wang, H.; Han, C.; Cao, X. Src promotes anti-inflammatory (M2) macrophage generation via the IL-4/STAT6 pathway. *Cytokine* **2018**, *111*, 209–215. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Cruz, F.F.; Horta, L.F.; Maia, L.e.A.; Lopes-Pacheco, M.; da Silva, A.B.; Morales, M.M.; Gonçalves-de-Albuquerque, C.F.; Takiya, C.M.; de Castro-Faria-Neto, H.C.; Rocco, P.R. Dasatinib Reduces Lung Inflammation and Fibrosis in Acute Experimental Silicosis. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0147005. [[CrossRef](#)]
127. Singh, S.P.; Konwar, B.K. Molecular docking studies of quercetin and its analogues against human inducible nitric oxide synthase. *Springerplus* **2012**, *1*, 69. [[CrossRef](#)]
128. García-Mediavilla, V.; Crespo, I.; Collado, P.S.; Esteller, A.; Sánchez-Campos, S.; Tuñón, M.J.; González-Gallego, J. The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *557*, 221–229. [[CrossRef](#)]
129. Ma, J.Q.; Li, Z.; Xie, W.R.; Liu, C.M.; Liu, S.S. Quercetin protects mouse liver against CCl₄-induced inflammation by the TLR2/4 and MAPK/NF-κB pathway. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *28*, 531–539. [[CrossRef](#)]
130. Martínez-Flórez, S.; Gutiérrez-Fernández, B.; Sánchez-Campos, S.; González-Gallego, J.; Tuñón, M.J. Quercetin attenuates nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide production in interleukin-1beta-activated rat hepatocytes. *J. Nutr.* **2005**, *135*, 1359–1365. [[CrossRef](#)]
131. Shen, S.C.; Lee, W.R.; Lin, H.Y.; Huang, H.C.; Ko, C.H.; Yang, L.L.; Chen, Y.C. In vitro and in vivo inhibitory activities of rutin, wogonin, and quercetin on lipopolysaccharide-induced nitric oxide and prostaglandin E(2) production. *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *446*, 187–194. [[CrossRef](#)]
132. Morales, A.I.; Vicente-Sánchez, C.; Jerkic, M.; Santiago, J.M.; Sánchez-González, P.D.; Pérez-Barriocanal, F.; López-Novoa, J.M. Effect of quercetin on metallothionein, nitric oxide synthases and cyclooxygenase-2 expression on experimental chronic cadmium nephrotoxicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2006**, *210*, 128–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Banerjee, T.; Van der Vliet, A.; Ziboh, V.A. Downregulation of COX-2 and iNOS by amentoflavone and quercetin in A549 human lung adenocarcinoma cell line. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **2002**, *66*, 485–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Takahashi, S.; Mendelsohn, M.E. Synergistic activation of endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) by HSP90 and Akt: Calcium-independent eNOS activation involves formation of an HSP90-Akt-CaM-bound eNOS complex. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 30821–30827. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Murtagh, J.; Lu, H.; Schwartz, E.L. Taxotere-induced inhibition of human endothelial cell migration is a result of heat shock protein 90 degradation. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 8192–8199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Hassan, M.; Watari, H.; AbuAlmaaty, A.; Ohba, Y.; Sakuragi, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. *Biomed. Res. Int.* **2014**, *2014*, 150845. [[CrossRef](#)]
137. Wright, C.; Iyer, A.K.; Kulkarni, Y.; Azad, N. S-Nitrosylation of Bcl-2 Negatively Affects Autophagy in Lung Epithelial Cells. *J. Cell Biochem.* **2016**, *117*, 521–532. [[CrossRef](#)]

138. Scroggins, B.T.; Neckers, L. Just say NO: Nitric oxide regulation of Hsp90. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1093–1094. [[CrossRef](#)]
139. Pillai, R.N.; Ramalingam, S.S. Heat shock protein 90 inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **2014**, *26*, 159–164. [[CrossRef](#)]
140. García-Cardena, G.; Fan, R.; Shah, V.; Sorrentino, R.; Cirino, G.; Papapetropoulos, A.; Sessa, W.C. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* **1998**, *392*, 821–824. [[CrossRef](#)]
141. Natarajan, M.; Konopinski, R.; Krishnan, M.; Roman, L.; Bera, A.; Hongying, Z.; Habib, S.L.; Mohan, S. Inhibitor- κ B kinase attenuates Hsp90-dependent endothelial nitric oxide synthase function in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2015**, *308*, C673–C683. [[CrossRef](#)]
142. Martínez-Ruiz, A.; Lamas, S. Detection and identification of S-nitrosylated proteins in endothelial cells. *Methods Enzymol.* **2005**, *396*, 131–139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Retzlaff, M.; Stahl, M.; Eberl, H.C.; Lagleder, S.; Beck, J.; Kessler, H.; Buchner, J. Hsp90 is regulated by a switch point in the C-terminal domain. *EMBO Rep.* **2009**, *10*, 1147–1153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Xue, W.; Zender, L.; Miething, C.; Dickins, R.A.; Hernando, E.; Krizhanovsky, V.; Cordon-Cardo, C.; Lowe, S.W. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature* **2007**, *445*, 656–660. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Kang, T.W.; Yeves, T.; Woller, N.; Hoenicke, L.; Wuestefeld, T.; Dauch, D.; Hohmeyer, A.; Gereke, M.; Rudalska, R.; Potapova, A.; et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature* **2011**, *479*, 547–551. [[CrossRef](#)]
146. Seignez, C.; Martin, A.; Rollet, C.E.; Racoer, C.; Scagliarini, A.; Jeannin, J.F.; Bettaieb, A.; Paul, C. Senescence of tumor cells induced by oxaliplatin increases the efficiency of a lipid A immunotherapy via the recruitment of neutrophils. *Oncotarget* **2014**, *5*, 11442–11451. [[CrossRef](#)]
147. Onier, N.; Hilpert, S.; Reveneau, S.; Arnould, L.; Saint-Giorgio, V.; Exbrayat, J.M.; Jeannin, J.F. Expression of inducible nitric oxide synthase in tumors in relation with their regression induced by lipid A in rats. *Int. J. Cancer* **1999**, *81*, 755–760. [[CrossRef](#)]
148. Gautier, T.; Paul, C.; Deckert, V.; Desrumaux, C.; Klein, A.; Labbé, J.; Le Guern, N.; Athias, A.; Monier, S.; Hammann, A.; et al. Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression. *FASEB J.* **2010**, *24*, 3544–3554. [[CrossRef](#)]
149. Lamrani, M.; Sassi, N.; Paul, C.; Yousfi, N.; Boucher, J.L.; Gauthier, N.; Labbé, J.; Seignez, C.; Racoer, C.; Athias, A.; et al. TLR4/IFN γ pathways induce tumor regression via NOS II-dependent NO and ROS production in murine breast cancer models. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1123369. [[CrossRef](#)]
150. Martin, A.; Seignez, C.; Racoer, C.; Isambert, N.; Mabrouk, N.; Scagliarini, A.; Reveneau, S.; Arnould, L.; Bettaieb, A.; Jeannin, J.F.; et al. Tumor-derived granzyme B-expressing neutrophils acquire antitumor potential after lipid A treatment. *Oncotarget* **2018**, *9*, 28364–28378. [[CrossRef](#)]
151. Eggert, T.; Wolter, K.; Ji, J.; Ma, C.; Yeves, T.; Klotz, S.; Medina-Echeverez, J.; Longerich, T.; Forgues, M.; Reisinger, F.; et al. Distinct Functions of Senescence-Associated Immune Responses in Liver Tumor Surveillance and Tumor Progression. *Cancer Cell* **2016**, *30*, 533–547. [[CrossRef](#)]

