

**UNIVERSITÉ BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ**  
**Laboratoire INSERM U1231 – Lipides, Nutrition, Cancer**

École doctorale n°554  
« Environnement – Santé »

Pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Bourgogne-Franche-Comté  
Spécialité : Cancérologie et Immunologie

Par

**Ledys Fanny**

**Évaluation préclinique des effets immunologiques de l'association éribuline/cisplatine : rationnel d'association à l'immunothérapie par anti-PD-L1 et au ciblage du TGF- $\beta$  dans le CSTN**

Présentée et soutenue à Dijon, le 2 février 2022

Composition du Jury :

M. Ghiringhelli François	PU-PH – Centre G-F Leclerc, Dijon	Président
Mme Penault-Llorca Frédérique	PU-PH – Centre Jean Perrin, Clermont Ferrand	Rapporteur
M. Bachelot Thomas	PH – Centre Léon Bérard, Lyon	Rapporteur
Mme Bendriss-Vermare Nathalie	CR – Centre Léon Bérard, Lyon	Examinatrice
M. Ladoire Sylvain	PU-PH – Centre G-F Leclerc, Dijon	Directeur de thèse
M. Limagne Emeric	Chercheur CLCC – Centre G-F Leclerc, Dijon	Coencadrant de thèse



**Titre :** Évaluation préclinique des effets immunologiques de l'association éribuline/cisplatine : rationnel d'association à l'immunothérapie par anti-PD-L1 et au ciblage du TGF- $\beta$  dans le CSTN

**Mots clés :** mort cellulaire immunogène, cancer du sein triple négatif, éribuline, cisplatine, immunothérapie, TGF- $\beta$

**Résumé :** Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est le sous-type de cancer du sein le plus agressif et le plus difficile à traiter car l'arsenal thérapeutique est limité et l'efficacité réelle de l'immunothérapie (notamment par anti PD-1/anti PD-L1) reste controversée.

Dans le but de restaurer l'efficacité anti-tumorale de l'immunothérapie dans cette pathologie, nous avons étudié les effets immunologiques de deux molécules de chimiothérapie fréquemment utilisées dans le CSTN (l'éribuline et le cisplatine). En effet, leurs effets immunogènes, autrement dit leur capacité à stimuler une réponse immunitaire spécifique à la tumeur, ne sont pas ou peu décrits à l'heure actuelle. Nous les avons ainsi combinés car leur association, potentiellement faisable chez l'homme, pourrait permettre d'augmenter l'efficacité anti-tumorale.

Dans notre modèle murin de CSTN (4T1), le cisplatine semble être une drogue immunogène (ICD), au contraire de l'éribuline qui induit peu de signaux permettant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. *In vitro* et *in vivo*, la combinaison de ces chimiothérapies n'induit pas plus de signaux de danger que le cisplatine seul, mais permet d'augmenter l'infiltration tumorale en cellules cytotoxiques (lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> et Natural Killer).

Malheureusement, l'induction en parallèle de l'expression de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta 1), une cytokine pro-oncogénique dans un contexte tumoral, semble induire un environnement tumoral immunosuppresseur et pro-fibrotique potentiellement médié par les fibroblastes associés au cancer (CAF) rendant la tumeur résistante à l'association d'un anti-PD-L1 avec les chimiothérapies. Ces deux phénomènes sont donc susceptibles de s'opposer et de contrebalancer les effets, en théorie favorables, de l'augmentation du recrutement intra-tumoral de cellules immunitaires.

Afin de remédier à ces phénomènes de résistance, nous avons ensuite évalué l'efficacité de l'association éribuline-cisplatine en combinaison à une immunothérapie par anti-PD-L1 et un traitement ciblant le TGF- $\beta$ . L'ajout de cet inhibiteur a permis d'augmenter l'immuno-stimulation par les traitements et de restaurer l'effet anti-tumoral de l'immunothérapie auparavant inefficace dans notre modèle murin.

**Title :** Preclinical evaluation of the immunological effects of eribulin/cisplatin: rationale combination with anti-PD-L1 immunotherapy and TGF- $\beta$  targeting in TNBC

**Keywords :** immunogenic cell death, triple-negative breast cancer, eribulin, cisplatin, immunotherapy, TGF- $\beta$

**Abstract :** Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive and difficult subtype of breast cancer to treat as the therapeutic arsenal is limited and the actual efficacy of immunotherapy (especially anti PD-1/anti PD-L1) remains controversial.

In order to restore the anti-tumor efficacy of immunotherapy regarding this disease, we studied the immunological effects of two chemotherapy molecules frequently used in TNBC (eribulin and cisplatin). At this time, their immunogenic effects, in other words their capacity to stimulate a tumor-specific immune response, are not or rarely described. We decided to associate them since their combination is potentially feasible in human, and thereby could increase anti-tumor efficacy. In our mouse model of TNBC (4T1), cisplatin appears to be an immunogenic drug (ICD) in contrast with eribulin, which induces few signals allowing the recruitment and activation of immune cells. *In vitro* and *in vivo*, the combination of these chemotherapies does not induce more danger signals than cisplatin alone but increases tumor infiltration of cytotoxic cells (T-CD8+ and natural killer lymphocytes).

Unfortunately, the parallel induction of TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta 1) expression, a pro-oncogenic cytokine in a tumor setting, appears to induce an immunosuppressive and pro-fibrotic tumor environment potentially mediated by cancer associated fibroblasts (CAF) causing the tumor to be resistant to the combination of anti-PD-L1 with chemotherapies. These two phenomena are thus likely to oppose themselves and counterbalance the theoretically favourable effects of increased intra-tumor recruitment of immune cells.

To address these resistance phenomena, we then evaluated the efficacy of eribulin-cisplatin in combination with anti-PD-L1 immunotherapy and TGF- $\beta$  targeting therapy. The addition of this inhibitor has increased the immunostimulation through the treatments and restored the anti-tumor effect of the previously ineffective immunotherapy observed in our mouse model.



## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie le professeur Frédérique Penault-Llorca et le docteur Thomas Bachelot d'avoir accepté d'examiner mon travail en tant que rapporteur. Un remerciement particulier à Mme Nathalie Bendriss-Vermare pour son implication lors de mon comité de suivi de thèse.

Je tiens ensuite à remercier le Professeur François Ghiringhelli pour m'avoir accordé sa confiance et permise d'intégrer le CGFL et plus particulièrement la PTBC afin d'y effectuer tout mon internat. Merci de m'avoir permise de publier deux articles durant mon année de master 2, et surtout, merci pour votre implication quotidienne dans la recherche contre le cancer. Enfin, merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je remercie aussi le professeur Sylvain Ladoire pour avoir accepté la direction de ma thèse d'exercice mais aussi de ma thèse de Sciences. Merci pour votre confiance, vos conseils et votre soutien.

Des remerciements particuliers pour Emeric, mon co-directeur de thèse sans qui ces années à la PTBC n'auraient pas été les mêmes. Merci d'avoir été présent pour moi, mais aussi pour tous les stagiaires, étudiants, internes, etc, qui, par tes conseils, ton savoir-faire mais aussi ton humour et ta bienveillance sont ressortis plus grands. Je pense que tu es un « chef » en or et que chaque étudiant aura énormément de chance de t'avoir croisé sur sa route. Pour ma part, tu m'as apporté beaucoup de confiance en moi, tu as voulu et réussi à cerner la personne que je suis pour que je me sente bien et pour travailler au mieux ensemble. Merci pour ton soutien, tes encouragements, tes blagues, tes jeux de mots, ta présence et ta gentillesse. La PTBC a beaucoup de chance de te compter permis ses chercheurs ! J'espère que tu n'oublieras jamais ta 1<sup>ère</sup> thésarde et que tu feras perdurer la « Team boobs » encore longtemps même après mon départ !

Merci à Valentin pour sa gentillesse inébranlable, son humour à toute épreuve et d'avoir été présent particulièrement durant mes premières années d'internat. Des années dans la « Team colon » que je n'oublierai pas !

Merci à Marion pour ses précieux conseils et son investissement quotidien dans la vie de la PTBC. Merci à Caroline pour sa gentillesse et son soutien quotidien durant ces années d'internat. Des remerciements à JD, mon co-interne de master 2, merci pour ces fous-rires qui resteront encore longtemps dans ma mémoire. Merci aussi à Cédric, Elise, Julie, Hugo, l'équipe des Radios, d'anapath et de la biomol et tous les étudiants et internes que j'ai croisé durant ces années pour m'avoir aidé de n'importe quelle façon qu'il soit.. Merci à Alis et à David pour leur gentillesse et leur aide pour les différents marquages.

Merci à toutes mes jeunes collègues : Lisa, Laura, Anaïs, Léa, Marjorie, Susy, Solène et Charlène. Merci d'avoir été une si chouette équipe de collègues et amies, mes années à la PTBC auraient été bien différentes et moins agréables sans vous toutes !

Des remerciements particuliers pour Samia et Laura qui, chacune à leur tour, m'ont aidé et soutenu durant leur venue dans la « Team boobs ». Merci pour votre bienveillance et votre implication dans l'avancement de ce bel article qui sortira bientôt j'espère ! Laura, j'espère que tes années de thèse se dérouleront au mieux et surtout un grand merci pour avoir élargi mon univers musical !

Merci à Lisa et Dimitri (mais aussi à Shoushou et Meiko) d'avoir été présents dans ma vie dijonnaise, même à l'extérieur du boulot. Merci pour ces aprem/soirées jeux et ces sorties m'ayant permise de profiter au mieux de mes weekends bourguignons.

Merci aux internes IPR : Claire, Simon, Pauline, Clémence, Alexandre et Hugo pour votre soutien et vos conseils bien appréciés durant nos repas IPR.

Je remercie aussi mes plus proches amies : Coralie, Florence, AudreyC, AudreyF, Charlotte, Tiffany, d'avoir été présentes et de m'avoir soutenues jusqu'au bout de ces longues années d'études.

Une énorme merci à toute ma famille et en particulier à ma nièce Bilie et mon neveu Zadig, mon frère, ma sœur, ma mère et mon père. Merci à vous tous pour votre bienveillance et votre soutien. Ces années ont été longues mais ça y est c'est presque la fin. Je vais pouvoir revenir sur Lyon retrouver toutes ces personnes qui me sont chères et voir grandir ma grande petite nièce et mon tout petit neveu. Un remerciement particulier à loulou pour avoir pris le temps de corriger une partie de ma thèse. A mes parents, merci de m'avoir soutenue dans chacun de mes projets de vie, d'avoir été présents et de m'avoir accompagnée à chaque étape durant ces années d'étude. Vous avez toujours su croire en moi et c'est évidemment grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Je vous aime.

Enfin, un remerciement tout particulier à Bérenger, merci pour ton amour, ta patience, ta générosité, ta tendresse. Merci d'être resté dans ma vie, de prêt ou de loin, durant 15 ans et d'avoir osé bouleverser ton quotidien pour vivre une vie avec moi. Merci d'avoir accepté les sacrifices d'une relation Lyon-Dijon, merci de m'avoir soutenue jusqu'au bout, merci d'être là, toujours, malgré un travail extrêmement prenant. Je t'admire, tu le sais, pour ta force de caractère et ta grande générosité envers chaque personne qui t'entoure. J'ai hâte de pouvoir réaliser tous nos projets.

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	5
TABLE DES MATIERES	7
LISTE DES ANNEXES	10
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES ABREVIATIONS	12
INTRODUCTION	14
I.    Immunologie générale du cancer	14
a.    Phase d'élimination	15
b.    Phase d'équilibre	20
c.    Phase d'échappement	21
Immunosélection	21
Immunosubversion	23
Immuno-exclusion	26
II.   Immunologie du cancer du sein : le cas du CSTN	28
a.    Le cancer du sein	28
Epidémiologie	28
Sous-types de cancer du sein	28
Le cancer du sein triple négatif	29
Traitements du CSTN métastatique	29
Sous-types de CSTN	31
b.    Aspects prédictifs/pronostiques de réponse anti-tumorale	32
TMB et charge mutationnelle	32
Evaluation des lymphocytes infiltrant la tumeur	32
Evaluation du statut PD-1/PD-L1	33
III.  Utilisation de l'immunothérapie dans le CSTN	34
a.    Immunothérapie d'hier à aujourd'hui	34
b.    Mécanismes de résistance à l'immunothérapie	36
Tumeurs immuno-désertiques	37
Tumeurs immuno-exclues	37
Tumeurs immuno-inflammées	39
c.    Immunothérapie dans le CSTN	41
IV.  Effets immunologiques des thérapeutiques anti-cancéreuses	44
a.    Antigénicité tumorale	45
b.    Immunogénicité tumorale	46

c.	Impact sur l'immunosuppression	50
V.	Sensibilisation à l'immunothérapie par les chimiothérapies du CSTN	52
	OBJECTIFS	57
	MATERIELS ET METHODES	59
	Culture cellulaire <i>in vitro</i>	59
	Expériences <i>in vivo</i>	59
	Traitements	60
	Test de viabilité cellulaire	60
	Expériences de mort cellulaire immunogène	61
	Western Blot	62
	RT-qPCR	62
	Analyse par NanoString	63
	Cytométrie en flux <i>in vivo</i>	63
	Isolation des populations intra-tumorales	64
	Marquage immunohistochimique et coloration	65
	Quantification des cellules CD8 <sup>+</sup> en IHC	66
	Analyse statistique	66
	RESULTATS	67
I.	Evaluation de l'effet thérapeutique et immunologique des chimiothérapies <i>in vivo</i>	67
a.	Evaluation de l'efficacité thérapeutique des chimiothérapies	67
b.	Exploration des signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits	68
c.	Caractérisation des populations immunitaires intra-tumorales	71
II.	Caractérisation de la mort cellulaire immunogène <i>in vitro</i>	73
a.	Evaluation de la mortalité cellulaire chimio-induite	73
b.	Evaluation du stress du RE et de l'exposition membranaire de la calréticuline	75
c.	Exploration des autres signaux de la mort immunogène	77
d.	Etude des voies de signalisation inflammatoires associées à la chimiokine CXCL10	79
e.	Analyse de l'antigénicité des cellules tumorales	81
f.	Evaluation de l'immunostimulation par les cellules tumorales	82
III.	Association chimiothérapies et immunothérapie	84
a.	Evaluation de l'efficacité thérapeutique T-dépendante des chimiothérapies	84
b.	Association à une immunothérapie par anticorps anti-PD-L1	86
IV.	Evaluation des phénomènes d'immuno-résistance chimio-induits	88
a.	Evaluation des différentes populations immunosuppressives intra-tumorales	88
b.	Analyse de la modulation structurelle du microenvironnement tumoral	89
V.	Exploration de la voie du TGF- $\beta$	92



a.	Evaluation de l'expression du TGF- $\beta$ chimio-induite	92
b.	Evaluation de l'efficacité thérapeutique d'une association avec un traitement ciblant le TGF- $\beta$	95
VI.	Evaluation du microenvironnement immunitaire induit par la combinaison de chimiothérapies et la double immunothérapie <i>in vivo</i>	98
a.	Evaluation des signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits	98
b.	Caractérisation des populations immunitaires intra-tumorales	99
	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	103
I.	Exploration de l'immunité chimio-induite	103
II.	Exploration de la voie du TGF- $\beta$	105
III.	Evaluation de la faisabilité clinique	108
	ANNEXES	111
	BIBLIOGRAPHIE	147

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Présentation des anticorps primaires utilisés pour le western blot. p111

Annexe 2 : Séquences des amorces murines utilisées pour amplifier les ARNm par RT-qPCR. p112

Annexe 3 : Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux. p113

Annexe 4 : Panel des gènes utilisés pour l'analyse transcriptomique. p114

Annexe 5 : Stratégie d'analyse du panel lymphoïde. p115

Annexe 6 : Stratégie d'analyse du panel cytokines. P116

Annexe 7 : Stratégie d'analyse du panel myéloïde. p117

Annexe 8 : Stratégie d'analyse du panel CAF. p118

Annexe 9 : Schéma récapitulatif des différentes étapes d'isolation des populations intra-tumorales. p119

Annexe 10 : Courbes de croissances tumorales 4T1. p120

Annexe 11 : Revue acceptée dans « Cancers », novembre 2021 :

“Clinical challenges and medical perspectives of therapeutic associations with anti PD-1/PD-L1 in breast cancer”. p121

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> La phase d'élimination de l'immunoédition.....	20
<b>Figure 2:</b> La théorie de l'immunoédition. D'après Schreiber et al, 2011. ....	27
<b>Figure 3:</b> Les différents immunophénotypes tumoraux.....	40
<b>Figure 4:</b> La mort cellulaire immunogène. D'après Galluzzi et al, 2016.....	50
<b>Figure 5:</b> Evaluation de l'efficacité thérapeutique des chimiothérapies..	67
<b>Figure 6:</b> Exploration des signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits.....	70
<b>Figure 7:</b> Exploration de l'infiltration des populations lymphocytaires intra-tumorales.....	71
<b>Figure 8:</b> Exploration de la fonctionnalité des cellules lymphocytaires.....	72
<b>Figure 9:</b> Evaluation de la mortalité cellulaire chimio-induite.....	75
<b>Figure 10:</b> Evaluation du stress du RE et de la translocation à la membrane de la calréticuline. ....	77
<b>Figure 11:</b> Exploration des autres signaux de mort immunogène. ....	78
<b>Figure 12:</b> Etude des voies de signalisation inflammatoires associées à la chimiokine CXCL10.....	80
<b>Figure 13:</b> Analyse de l'antigénicité des cellules tumorales.....	81
<b>Figure 14:</b> Evaluation de l'immunostimulation par les cellules tumorales.....	82
<b>Figure 15:</b> Résumé des différents signaux immunogènes exprimés par les cellules cancéreuses 4T1 et EMT6 et induits après 24h ou 48h de traitement par éribuline, cisplatine ou par la combinaison des chimiothérapies.....	83
<b>Figure 16:</b> Evaluation de l'efficacité thérapeutique T-dépendante des chimiothérapies. ....	84
<b>Figure 17:</b> Evaluation de l'expression de PD-L1 et de son gène Cd274 dans les cellules tumorales in vitro et in vivo.....	86
<b>Figure 18:</b> Evaluation de l'efficacité anti-tumorale de l'immunothérapie anti-PD-L1.....	87
<b>Figure 19:</b> Evaluation des différentes populations immunosuppressives CD11b <sup>+</sup> intra-tumorales. ....	89
<b>Figure 20:</b> Analyse de la modulation du microenvironnement tumoral et de la localisation des cellules T-CD8 <sup>+</sup> .....	90
<b>Figure 21:</b> Evaluation de l'expression et de la sécrétion du TGF-β.....	93
<b>Figure 22:</b> Evaluation de l'expression de gènes associés à la voie du TGF-β dans différentes populations intra-tumorales. ....	94
<b>Figure 23:</b> Evaluation de l'efficacité thérapeutique d'une association avec un anti-TGF-β dans différents modèles murins de cancer du sein. ....	97
<b>Figure 24:</b> Exploration des signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits.....	99
<b>Figure 25:</b> Exploration de l'infiltration des populations lymphocytaires intra-tumorales.....	101

## LISTE DES ABREVIATIONS

5-FU : 5-Fluoro-Uracile	FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence
ADCC : Cytotoxicité Dépendante des Anticorps	FLT3 : <i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	HER2 : <i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>
AKT : Protéine Kinase B	HIF1- $\alpha$ : <i>Hypoxia Inductible Factor 1 alpha</i>
ARN : Acide Ribonucléique	HLA : <i>Human Leucocyte Antigen</i>
ATF4 : <i>Activating Transcription Factor 4</i>	HMGB1 : <i>high mobility group box 1</i>
ATP : Adénosine TriPhosphate	IC50 : Concentration inhibitrice moyenne
BL : <i>Basal-Like</i>	IFN : Interféron
BSA : <i>Bovine Serum Albumin</i>	Ig : Immunoglobuline
CAFs : <i>Cancer Associated Fibroblastes</i>	IHC : ImmunoHistoChimie
CCL: <i>chemokine CC motif ligand</i>	IM : ImmunoModulateur
CHOP : <i>C/EBP Homologous Protein</i>	IRF : <i>Interferon Regulatory Factor</i>
CMF : Cytométrie en Flux	<i>ISR : integrated stress response</i>
CMH : Complexe d'Histocompatibilité	LAR : Luminal à Récepteur Androgène
CPA : cellule présentatrice d'antigènes	LMP : <i>low molecular weight polypeptide</i>
CSTN : Cancer du Sein Triple Négatif	LPS : Lipopolysaccharydes
CTLA-4 : <i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>	M : Méenchymateux
CXCL10 : <i>CXC motif chemoxine 10</i>	MAPK : <i>MAP Kinase Pathway</i>
CXCR : <i>CXC-chemokine receptor</i>	MDSCs : <i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
DAMPs : <i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>	MICA/B : <i>major histocompatibility complex class I-related chain A/B</i>
DI: double immunothérapie (anti-PD-L1+anti-TGF- $\beta$ )	MSL : Méenchymateux Stem Like
DXR : Doxorubicine	MTT : (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
EGFR : <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	NF- $\kappa$ B : <i>nuclear factor-kappa B</i>
eIF2 $\alpha$ : <i>eukaryotic initiation factor 2<math>\alpha</math></i>	NK : <i>Natural Killer</i>
FDA : <i>Food and Drug Administration</i>	

*NLR : Nucleotide Oligomerization domain receptors*

*ORR : overall response rates*

*PBS : Phosphate- buffered saline*

*PD-1: programmed cell death 1*

*PD-L1: programmed death ligand 1*

*PERK : protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*

*PFS : Progression Free Survival*

*PI(3)K : Phosphoinositide 3-kinase*

*PTEN : Phosphatase and TENsin homolog*

*RE : Réticulum Endoplasmique*

*RO : Récepteur aux Œstrogènes*

*ROS : espèces réactives de l'oxygène*

*RP : Récepteur à la Progestérone*

*RPMI : Roswell Park Memorial Institute*

*RT-qPCR : Reverse transcription – réaction en chaine par polymérase en temps réel*

*TAM : Tumor Associated Macrophage*

*TAP1 : transport associated with antigen Processing*

*TBK1 : TANK-binding kinase 1*

*TGF-β : transforming growth factor β*

*TILs : lymphocytes infiltrant la tumeur*

*TLR : Toll Like Receptor*

*TNFα : Tumor Necrosis Factor α*

*T-reg : Lymphocytes T régulateurs*

*TSA : Antigène Spécifique de Tumeur*

*UNC : Instable / non classifié*

*VEGF : vascular endothelium growth factor*

*XCL1 : X-C Motif Chemokine Ligand 1*

*NLRP3 : Nod-like receptor family, pyrin domain containing 3*

*SVF : Sérum de Veau Foetal*

*STAT1 : Signal Transducer And Activator Of Transcription 1*

*STING : Stimulator of interferon genes*

*TAA : Antigène Associé aux Tumeur*

## INTRODUCTION

Le cancer est l'une des principales causes de décès dans le monde avec 10 millions de décès en 2020 (1). Malgré les progrès considérables de la médecine durant le siècle dernier, cette maladie continue de progresser et l'on estime à 30,2 millions de nouveaux cas de cancer dans le monde en 2040. Cependant, cette évolution est à deux vitesses en fonction du niveau socio-économique du pays concerné et l'accès au diagnostic ou au traitement sera dépendant de la qualité de son système de santé. En effet, un système de santé solide permet aujourd'hui d'augmenter la survie des patients en améliorant le nombre et la précocité des dépistages mais aussi en permettant l'accès à des traitements anti-cancéreux de qualité.

Dans la population générale, le cancer du sein féminin est aujourd'hui le plus diagnostiqué avec une incidence de 11,7 % suivi par le cancer du poumon 11,4% et le cancer colorectal 10%. Le plus mortel est le cancer du poumon avec 18% de mortalité suivi par le cancer colorectal 9,4%, du foie 8,3%, de l'estomac 7,7% et du sein 6,9% (1).

Malgré une meilleure connaissance de la maladie, on estime à plus de 40% de cas de cancer évitables. Effectivement de nombreux facteurs de risques sont impliqués dans le développement de ces maladies tels que le tabac, l'alcool, le surpoids, les rayonnements UV, ou encore la pollution aux particules fines. Le tabac est le premier facteur de risque « externe » et serait impliqué dans environ 20% des cancers, suivi par la consommation d'alcool (8%), une alimentation déséquilibrée et le surpoids ou obésité (5.4%).

Durant le siècle dernier, de nombreuses recherches ont été réalisées et ont permis de mieux comprendre cette maladie. En 2011, Hanahan et Weinberg ont alors décrit les différentes caractéristiques du cancer mettant ainsi en lumière la complexité de cette maladie (2). La compréhension de la biologie tumorale est devenue aujourd'hui une étape indispensable dans la lutte contre le cancer et permettant ainsi de proposer une stratégie de traitement personnalisée, plus efficace et moins toxique.

### I. Immunologie générale du cancer

L'oncogenèse est la transformation d'une cellule saine en une cellule tumorale. Cette modification peut être due à une altération du génome des cellules normales suite à une infection virale ou à l'exposition à des agents carcinogènes, mais aussi suite à une ou des mutations constitutionnelles dans le patrimoine génétique de l'hôte. Durant le début des années 1900, Ilya I. Mechnikov et Paul Ehrlich ont réalisé de nombreux travaux en matière d'immunologie et ont été les précurseurs dans la compréhension de l'immunité en tant que

protection de l'organisme. Plusieurs dizaines d'années après, Burnet et Thomas ont établi l'hypothèse de « l'immunosurveillance des cancers ». Cette hypothèse établit que notre système immunitaire aurait la capacité de détecter toute cellule suspecte présente dans l'organisme puis de l'éliminer. Cette surveillance implique la reconnaissance des antigènes tumoraux par différents acteurs du système immunitaire inné, tels que les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules *Natural Killer* (NK) et du système immunitaire adaptatif, tels que les lymphocytes B, T-CD4 et T-CD8. Ces différents acteurs auront pour but de reconnaître et de détruire les cellules dysplasiques ou cancéreuses avant le développement de la tumeur.

Néanmoins, ce concept possède ses propres limites avec l'apparition de cancers malgré un système immunitaire fonctionnel. En effet, des phénomènes d'immunosélection et/ou d'immunosubversion peuvent être mis en place par les cellules tumorales afin d'échapper à cette surveillance (3). La théorie de l'immunoédition est alors apparue afin de compléter le concept de l'immunosurveillance (4). Ce nouveau concept est défini par la promotion de cellules tumorales faiblement immunogènes apparues à la suite d'une pression de sélection du système immunitaire. Suite à l'interaction entre les cellules tumorales et immunitaires, 3 étapes successives sont alors mises en place : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (5,6).

#### a. Phase d'élimination

Comme son nom l'indique, cette phase a pour but d'éliminer les cellules pré-néoplasiques et tumorales par le système immunitaire inné avant même qu'elles deviennent cliniquement observables. En effet, à la suite d'une transformation cellulaire, différents signaux vont être envoyés afin de recruter des acteurs de l'immunité innée tels que les cellules dendritiques, les lymphocytes NK ou les macrophages.

L'instabilité génomique pouvant entraîner le développement tumoral, des voies de réparation des dommages génétiques de la cellule transformée vont pouvoir corriger les lésions de l'ADN et restaurer l'intégrité cellulaire (7). Dans le cas contraire, différents mécanismes peuvent se mettre en place comme l'induction d'un phénomène inflammatoire pouvant aboutir à mort cellulaire programmée ou apoptose. Les régulateurs ATM/ATR sont impliqués dans cette réponse aux dommages à l'ADN et vont pouvoir alerter le système immunitaire par l'induction des voies de signalisation des IRFs et de NF- $\kappa$ B (8). Les facteurs de transcription IRF, comme IRF3 et 7, induisent l'expression des interférons de classe I (IFN  $\alpha$  et  $\beta$ ) (9). La voie de signalisation de NF- $\kappa$ B est quant à elle connue pour médier la réponse pro-inflammatoire. D'autres capteurs de dommages à l'ADN peuvent être activés comme les TLR (*Toll Like Receptors*), étant des récepteurs spécialisés de la réponse immunitaire innée. Ces TLR sont localisés à différents endroits et reconnaissent différents types de signaux (10). En effet, les TLR 1,2,4,5 et 6 sont retrouvés à la surface cellulaire et reconnaissent les lipides, lipoprotéines et protéines tandis que les TLR 3,7,8,9,11,12 et 13 localisés dans les endosomes reconnaissent les acides nucléiques (ARN double et simple brin ou îlots CpG non méthylés de

l'ADN). La transduction du signal implique ensuite l'activation de la voie de signalisation de NFkB *via* la protéine MyD88 et/ou de la voie de IRF3 induisant la production d'IFN I (11,12). L'ADN intracellulaire peut aussi être reconnu par des senseurs présents dans le cytoplasme cellulaire. cGAS, par exemple, va reconnaître l'ADN double brin et induire l'activation de cGAMP puis de STING. Celui-ci va à son tour induire IRF3 puis l'interféron  $\beta$ 1 (13). Une réaction pro-inflammatoire avec la production d'interférons de type III peut aussi être induite à la suite de la reconnaissance d'ADN double brin par les molécules AIM2 ou NLRP3 et qui vont former, avec ASC et la caspase 1, l'inflammasome. Cet inflammasome actif va cliver la pro-IL-1 $\beta$  et pro-IL-18 en leur forme mature et permettre leur sécrétion (14). NLRP3 fait partie de la famille des NLR (*Nucleotide Oligomerization domain receptors*), une autre famille de senseurs intracellulaires (15). Ces différents signaux inflammatoires vont alors avoir pour but de créer un contexte pour l'activation de la réponse immunitaire innée via le recrutement et l'activation de populations immunitaires.

Le second signal induit par l'altération du génome est l'expression membranaire de ligands activateurs des récepteurs NKG2D exprimés par les cellules NK. MICA/B vont être retrouvés chez l'homme tandis que Rae-1 et Mult-1 seront exprimés chez la souris. La liaison entre les ligands et leur récepteur va activer les cellules NK induisant la libération du contenu de leurs granules cytotoxiques contenant la perforine, les granzymes A et B ainsi que des cytokines pro-apoptotiques l'IFN $\gamma$  ou le TNF $\alpha$  (16). Ces molécules relarguées vont ainsi provoquer l'apoptose de la cellule pré-néoplasique. L'IFN $\gamma$  est une cytokine activatrice des macrophages impliqués dans le déclenchement de l'inflammation. L'activation de ces cellules de l'immunité innée va aussi permettre de recruter et d'activer les cellules dendritiques *via* notamment les chimiokines CCL4, CCL5, XCL1 (17) ou les interférons de type I, ainsi que de maintenir leur survie par la sécrétion du facteur FLT3 par exemple (18).

Les cellules pré-néoplasiques ou tumorales peuvent aussi exprimer à leur surface des antigènes tumoraux permettant leur reconnaissance par les cellules dendritiques. En effet, les protéasomes de ces cellules peuvent dégrader des protéines du soi en peptides, à la suite d'une mutation, d'une hyper-expression ou encore d'une modification post-traductionnelle de ces protéines. La cellule va alors pouvoir présenter cet antigène tumoral *via* le CMH de classe I ou II (19).

- Les antigènes spécifiques des tumeurs (TSA) correspondent à des antigènes uniquement retrouvés dans les cellules tumorales et pas dans les cellules saines. L'exposition à un agent cancérigène induisant des mutations génétiques sur des gènes particuliers peut provoquer l'apparition de néoantigènes, c'est-à-dire une protéine de séquence nouvelle. En plus de leur singularité, ces néoantigènes auraient la capacité d'induire une réaction immunitaire avec l'augmentation de gènes tels que *Prf1* ou *Gzma* (20). La mise en évidence de ces antigènes spécifiques de tumeurs est donc un enjeu majeur dans le traitement personnalisé du cancer car cela permet de cibler spécifiquement les cellules tumorales. Par exemple, chez une patiente atteinte de cancer du sein ER+/HER2- métastatique et réfractaire à la chimiothérapie, le



traitement par des TILs réactifs à 4 néoantigènes associé à de l'IL-2 et au pembrolizumab a montré une régression complète et durable (21).

- Les antigènes associés aux tumeurs (TAA) peuvent au contraire être retrouvés dans les cellules saines mais à un niveau bien inférieur à celui dans les cellules tumorales (18). Par exemple, HER2 est un antigène cellulaire constitutionnellement retrouvé dans les cellules épithéliales du sein. Cependant, dans ¼ des cancers du sein, le gène HER2 sera amplifié et le nombre de récepteurs HER2 à la surface des cellules tumorales sera augmenté. Cette protéine est intéressante car elle possède un domaine extracellulaire la rendant immunogène et pouvant être ciblée par les lymphocytes B. En effet, les anticorps produits peuvent bloquer la fonctionnalité de ce récepteur mais aussi induire une cytotoxicité dépendant des anticorps (ADCC) (22). Cet antigène peut donc être utilisé dans des stratégies vaccinales prophylactiques ou thérapeutiques en vue de provoquer une réponse immunitaire spécifique contre ces cellules tumorales (23).

Dans des conditions de stress ou de mort cellulaire induite notamment par les NK, la cellule tumorale ou transformée peut libérer des signaux endogènes appelés DAMPS (*Damage-Associated Molecular Patterns*). Ils représentent un large panel de molécules comprenant l'ATP, l'HMGB1 et la calréticuline (24). Ces trois signaux sont caractérisés comme immunogènes et permettront d'activer les cellules dendritiques. Ces différents signaux seront détaillés plus précisément dans la suite de ce travail.

Tous ces signaux de danger ainsi que les débris cellulaires retrouvés après l'action des cellules cytotoxiques vont pouvoir induire l'activation d'autres cellules immunitaires. En effet, bien que les acteurs de l'immunité innée puissent rapidement agir contre les cellules malignes, il est aussi nécessaire de recruter les cellules de l'immunité adaptatives ayant la capacité de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales et de les éliminer. Pour cela, les petites molécules libérées vont tout d'abord être phagocytées par les macrophages et les cellules dendritiques afin de présenter ces peptides tumoraux aux lymphocytes T *via* le CMH de classe I et/ou II. Cette phagocytose et/ou endocytose dépendant des récepteurs TLR (*Toll-like receptors*) va aboutir à la sécrétion de cytokines inflammatoires (TNF $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ). Ces différents éléments vont entraîner l'expression du récepteur à chimiokines CCR7 et va provoquer la migration des cellules dendritiques. En effet, afin de pouvoir activer à leur tour les cellules de l'immunité adaptative, les cellules dendritiques vont devoir migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires. Le premier signal d'activation des lymphocytes est la reconnaissance des peptides antigéniques présentés par le CMH de classe I ou II des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) par le TCR. Le TCR d'un lymphocyte T est spécifique d'un peptide antigénique. Simultanément, la molécule du CMH va se lier avec le corécepteur CD4 ou CD8 présent sur le lymphocyte. L'engagement du TCR ne peut cependant pas activer seul les lymphocytes T et un second signal de costimulation est nécessaire. Les protéines CD80 et CD86 sont présentes sur les cellules dendritiques et reconnaissent le récepteur CD28 retrouvé sur

la plupart des lymphocytes T. Cette costimulation est indispensable et va permettre l'activation des cellules T naïves. La liaison du ligand CD40 et de son récepteur est un autre signal de costimulation renforçant l'activité stimulatrice des cellules dendritiques par l'induction de l'expression des protéines CD80 et CD86 ainsi que la sécrétion de l'interleukine 12 impliquée dans la différenciation des lymphocytes T.

Après la reconnaissance de l'antigène peptidique tumoral dans les ganglions lymphatiques *via* le CMH, les lymphocytes T naïfs vont répondre en sécrétant des cytokines comme l'IL-2 et en exprimant des récepteurs pour ces cytokines. Ceci va alors conduire à l'expansion clonale de lymphocytes spécifiques de l'antigène. Ces lymphocytes activés vont se différencier en populations effectrices ou mémoires ayant des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles particulières (25). Les lymphocytes T mémoires ayant une longue durée de vie, vont circuler dans les vaisseaux sanguins et seront prêts à répondre rapidement suite à un second contact avec l'antigène. Les cellules T effectrices activées telles que les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> et NKT vont pouvoir répondre spécifiquement à l'antigène reconnu et induire une réponse cytotoxique anti-tumorale *via* la sécrétion de perforine et de granzyme. Les lymphocytes auxiliaires T-CD4<sup>+</sup> vont eux sécréter des cytokines permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires.

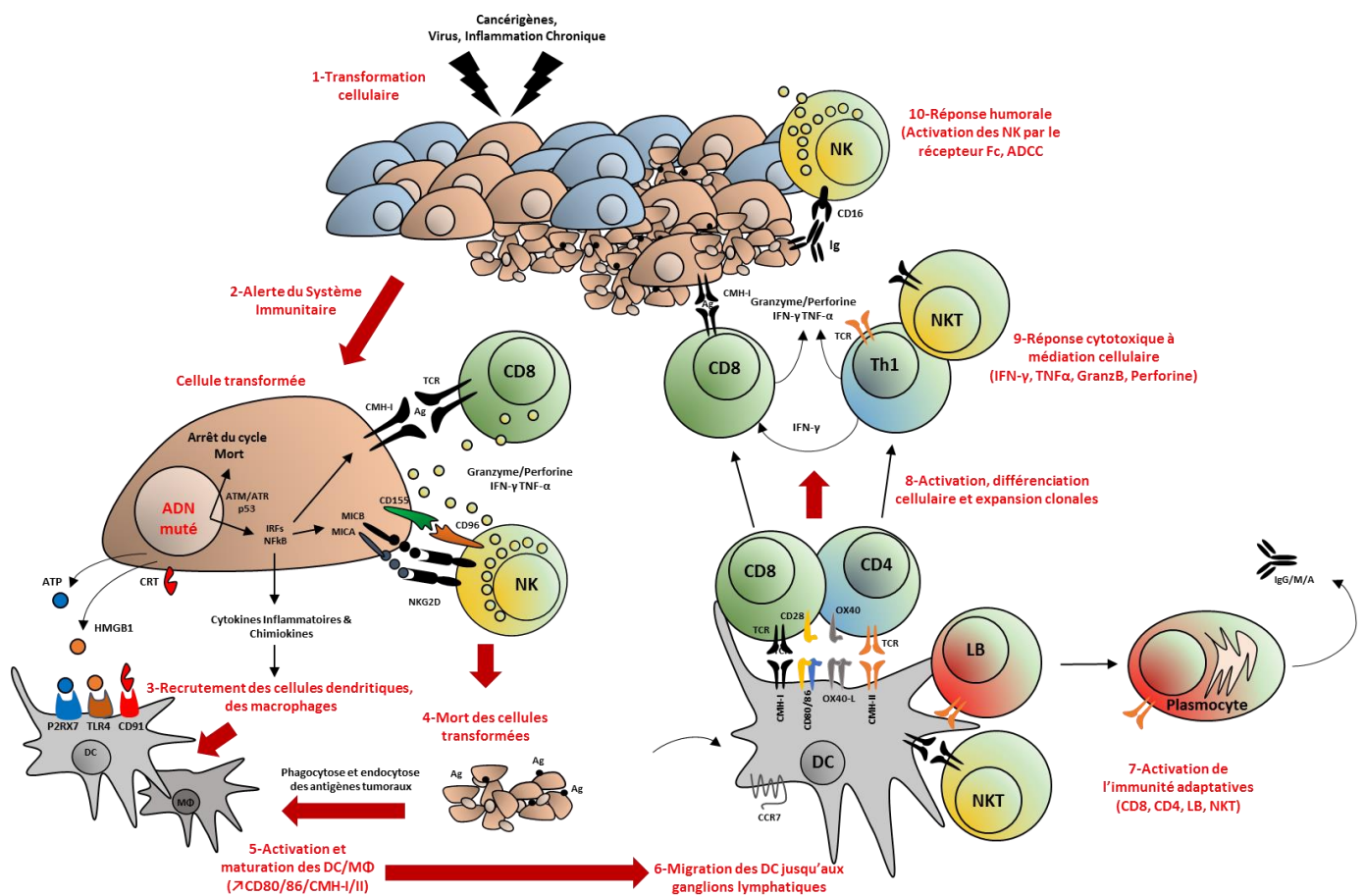
Les lymphocytes auxiliaires T-CD4<sup>+</sup> peuvent se différencier en plusieurs sous-populations ayant des fonctionnalités différentes comme par exemple :

- Les cellules Th1 vont sécréter de l'IFN $\gamma$  et de l'IL-2. Par l'intermédiaire du ligand CD40, de l'IL-12 et de l'IFN $\gamma$ , ces lymphocytes vont soutenir les fonctions de phagocytose et d'exposition des antigènes tumoraux par les cellules dendritiques ainsi que par les macrophages, c'est ce que l'on appelle : l'activation classique des macrophages (phénotype M1) (26). De plus, ces cellules peuvent aider au maintien des fonctions cytotoxiques des cellules T-CD8<sup>+</sup> et NK.
- Les cellules Th2 vont sécréter de l'IL-4 et de l'IL-13. Ces cytokines vont, à l'inverse des Th1, stimuler la voie alternative des macrophages caractérisés par le phénotype M2 (27). Dans un modèle murin de cancer du sein spontané et métastatique, les cellules T-CD4<sup>+</sup> Th2 ont stimulé la progression du cancer du sein et des métastases en apprenant aux macrophages associés à la tumeur à produire des facteurs pro-angiogéniques et pro-métastatiques (28). De plus, ces cytokines vont promouvoir l'activité de synthèse de collagène par les fibroblastes, induisant un processus fibrotique (29).

Après leur activation, les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> vont être capables de synthétiser les molécules cytotoxiques et vont pouvoir reconnaître les peptides associés aux CMH de classe I sur les cellules tumorales. Une fois l'antigène tumoral reconnu, ces cellules vont se lier à la cellule cible *via* le TCR et le CD8 et vont former une synapse immunologique permettant le relargage de molécules cytotoxiques afin d'éliminer la cellule tumorale.

Tout comme l'immunité cellulaire avec les lymphocytes T, l'immunité humorale fait aussi partie de l'immunité adaptative mais est médiée par les lymphocytes B et les anticorps. Les lymphocytes B naïfs vont rencontrer les lymphocytes T auxiliaires et les cellules dendritiques présentant l'antigène tumoral dans les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules B vont alors se différencier en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes pouvant sécréter des anticorps. Son rôle anti-tumoral est moins bien connu que pour l'immunité cellulaire mais il a été bien établi l'existence d'anticorps ciblant des protéines tumorales modifiées. L'outil protéomique a permis de mettre en évidence de nombreux antigènes associés aux tumeurs ainsi que leur anticorps respectif (30). Par exemple, l'antigène hMena a été retrouvé surexprimé dans le cancer du sein et est capable d'induire une réponse humorale en plus d'être reconnu par les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> (31). De plus, des auto-anticorps ont été identifiés dans le sérum de patientes atteintes de cancer du sein précoce ou évolué contre des antigènes associés aux tumeurs (p53, c-myc, HER2, BRCA1,2, etc) et pourraient être utilisés comme une aide au diagnostic du cancer du sein précoce (32). La présence d'anticorps contre des antigènes tumoraux peut aussi induire la cytotoxicité d'autres cellules immunitaires. En effet, les cellules NK expriment le récepteur CD16 (FcγRIII) qui va reconnaître le fragment Fc des anticorps IgG recouvrant la cellule tumorale et va pouvoir provoquer la décharge de ses granules lytiques (33). Ce mécanisme est appelé la cytotoxicité cellulaire dépendant des anticorps (ADCC).

Cette collaboration entre immunité innée et immunité adaptative va donc permettre l'élimination des cellules tumorales. Cependant, certaines cellules peuvent arriver à échapper aux attaques du système immunitaire et entreront dans une phase d'équilibre.



**Figure 1:** La phase d'élimination de l'immunoédition. L'induction d'un stress génotoxique dans la cellule transformée va induire l'expression de molécules de stress telles que le CMH I ou les ligands NKG2D. Les cellules NK de l'immunité innée vont reconnaître ces ligands et induire la mort de la cellule transformée par la libération de molécules cytotoxiques. Les antigènes tumoraux libérés lors de la lyse cellulaire mais aussi l'expression de signaux de danger, de chimiokines et de cytokines inflammatoires vont permettre le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Après l'endocytose des antigènes tumoraux qui va permettre la maturation des CPA, les cellules dendritiques vont migrer jusqu'aux organes lymphoïdes secondaires afin de déclencher la réponse immunitaire adaptative. Ces cellules vont présenter les antigènes tumoraux aux cellules T-CD4<sup>+</sup>, T-CD8<sup>+</sup>, NKT et LB. Les lymphocytes B vont être activés suite à la reconnaissance du peptide antigénique et par la collaboration avec les lymphocytes T auxiliaires afin de se différencier, notamment, en plasmocytes sécréteurs d'anticorps médiateurs de la réponse humorale. Après avoir reconnu le peptide antigénique présenté par le CMH, les lymphocytes vont pouvoir s'activer, se différencier et se multiplier afin d'induire une réponse cytotoxique à médiation cellulaire contre les cellules tumorales présentant l'antigène.

## b. Phase d'équilibre

Cette phase d'équilibre est caractérisée par la balance entre la dormance tumorale et la pression de sélection des cellules immunitaires du système adaptatif. En effet, les cellules tumorales vont acquérir des capacités d'échappement vis-à-vis des cellules immunitaires et vont pouvoir entrer dans un état d'équilibre avec l'hôte. C'est ce que l'on retrouve dans le cas de cancer en rémission récidivant en métastases plusieurs années après le traitement initial. En 2007, une étude réalisée dans des modèles murins traités par un carcinogène a montré l'effet des cellules T-CD4<sup>+</sup> et T-CD8<sup>+</sup> mais aussi de l'IFN $\gamma$  dans le contrôle de la tumeur (34). En effet, le système immunitaire adaptatif a permis de stabiliser les masses tumorales mais dès lors que ces populations ont été bloquées par des anticorps monoclonaux, les tumeurs ont

progressé. Cependant, le ciblage des cellules NK, de leur récepteur et de leur fonction effectrice n'a pas provoqué d'augmentation de la taille tumorale prouvant l'action exclusive du système adaptatif dans le contrôle tumoral durant cette phase. Le système immunitaire adaptatif va donc exercer une pression de sélection sur les cellules tumorales et promouvoir la génération de variants tumoraux capables de survivre à l'attaque des cellules immunitaires. Cette sélection Darwinienne, par notamment les lymphocytes T et l'IFN $\gamma$ , va engendrer la formation de clones tumoraux faiblement immunogènes (immunosélection). De plus, des cellules immunosuppressives peuvent infiltrer la tumeur (immunosubversion) tandis que les cellules effectrices auront du mal à éliminer les cellules tumorales. C'est en effet ce qu'a montré l'équipe de R.Zhang en 2013 par l'étude du microenvironnement tumoral dans le même modèle de cancer de sarcome induit (35). L'étude des différentes populations immunitaires présentes dans des tumeurs stables ou en progression prouve l'existence d'une balance entre les populations anti-tumorales telles que les lymphocytes T cytotoxiques, NK, T $\gamma\delta$ , et les cellules immunosuppressives comme les Mo-MDSCs. Ces différents ratios de populations immunitaires vont permettre de maintenir l'état d'équilibre. Cependant, cet état d'équilibre est fragile et peut être dépassé suite à la pression de sélection du système immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales, c'est ce que l'on appelle l'échappement tumoral.

### c. Phase d'échappement

Cette dernière phase fait suite à la sélection de cellules tumorales transformées et ayant résisté aux attaques du système immunitaire de différentes façons : par immunosélection et/ou par immunosubversion ainsi que par immuno-exclusion (3). Ces cellules agressives vont pouvoir se développer et proliférer jusqu'à devenir cliniquement observables.

#### *Immunosélection*

L'échappement par immunosélection est la capacité progressive des cellules tumorales à échapper à leur reconnaissance et à leur élimination par les cellules immunitaires. Autrement dit, cette stratégie d'échappement fait appel à la modification des propriétés intrinsèques des cellules tumorales.

Tout d'abord, l'expression des molécules du CMH de classe I situées sur ces cellules tumorales peut être diminuée, permettant ainsi aux cellules tumorales de devenir moins visibles pour les lymphocytes T. En effet, si les cellules tumorales perdent leur capacité de présentation des antigènes, les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> ne pourront plus reconnaître les cellules tumorales et celles-ci ne seront plus éliminées. Cette diminution d'expression du HLA I sur les cellules tumorales a été par exemple retrouvée dans le cancer du poumon contribuant ainsi vraisemblablement à l'échappement tumoral (36). D'autres molécules impliquées dans le processus de présentation antigénique telles que TAP1, LMP2,7 ou la tapasine peuvent être progressivement perdues comme le montre une étude dans le cancer colorectal (37). Les

cellules tumorales peuvent aussi jouer sur la reconnaissance par les cellules NK. En effet, les cellules tumorales peuvent libérer une forme soluble du ligand activateur de NKG2D, MICA, qui va s'accumuler et provoquer l'internalisation de NKG2D à la surface des lymphocytes (38).

Il a aussi été démontré que les cellules tumorales pouvaient développer la capacité de résister à la mort cellulaire par apoptose induite par l'action des cellules immunitaires. Par exemple, les cellules tumorales peuvent surexprimer des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Mcl1 ou Bcl-xL (39). De plus, les tumeurs peuvent développer des mécanismes permettant d'échapper à la machinerie cytolytique des cellules effectrices. En effet, par l'induction de l'expression de l'inhibiteur de sérine protéase PI-9/SPI-6, les cellules tumorales peuvent inactiver le système apoptotique dépendant du granzyme B et de la perforine (40).

Des altérations génétiques peuvent aussi donner lieu à l'activation constitutive de voies de survie et de prolifération telles que la voie de HER2, PI3K/AKT ou la voie des MAPK. La voie des MAPK comprenant la cascade de protéines Ras/Raf/MEK/ERK régule l'activité de nombreuses protéines impliquées dans la survie cellulaire. Une mutation sur l'une de ces protéines va engendrer l'activation de l'expression de gènes impliqués dans la prolifération ou dans la prévention de l'apoptose et provoquer l'échappement tumoral à la mort induite par les cellules cytotoxiques de l'immunité (41). Par exemple, dans le cancer colorectal, 30-45% des tumeurs expriment une mutation sur le gène KRAS engendrant ainsi l'activation constitutive du récepteur EGFR, indépendamment de son ligand l'EGF, et la stimulation continue de processus cellulaires tels que la prolifération, la résistance à l'apoptose et l'angiogenèse (42). A l'inverse, des mutations génétiques peuvent rendre la cellule tumorale insensible aux facteurs antiprolifératifs et provoquer leur prolifération de manière incontrôlée. Un des plus importants signaux antiprolifératifs est celui du TGF- $\beta$ . En effet, ce facteur de croissance est connu pour être impliqué dans le développement épithélial mammaire et réguler la prolifération et l'apoptose (43). Les cellules tumorales peuvent désactiver des composants de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , comme par exemple : la mutation ou perte des récepteurs TGF- $\beta$ R1/2 ou encore la mutation du facteur de transcription SMAD4 (3).

Les cellules tumorales en prolifération nécessitent des besoins accrus en énergie afin de se développer. La cellule va donc modifier son métabolisme par notamment l'activation d'oncogènes tels que PI(3)K/AKT dans le but de répondre à ce besoin énergétique élevé : c'est ce que l'on appelle la reprogrammation métabolique. Ce changement métabolique décrit par Warburg utilise la glycolyse aérobie favorisant la production de lactate à partir du glucose. La cellule tumorale va alors consommer de grandes quantités de glucose et produire beaucoup de lactate afin d'obtenir rapidement de l'ATP. Une augmentation de l'expression des transporteurs du glucose est fréquemment retrouvée dans les cancers solides et se révèle être de mauvais pronostics (44). Par la présence de lactate acidifiant le microenvironnement tumoral, cette reprogrammation métabolique va aussi jouer sur les cellules immunitaires (45). Par exemple, il a été montré que la diminution du pH intracellulaire provoquerait une apoptose des cellules NK (46) ainsi qu'une inhibition des cellules NKT (47). De plus, la présence

d'un fort taux d'acide lactique dans l'environnement peut perturber le métabolisme des cellules T et provoquer une diminution de leur prolifération et de leur activité cytotoxique (48). L'acide lactique induirait aussi l'expression de VEGF et de l'arginase 1 *via* HIF1- $\alpha$  favorisant ainsi la polarisation des macrophages vers le phénotype 2 ainsi que la croissance tumorale (49).

Les altérations génétiques peuvent aussi conduire à une perte d'immunogénicité c'est-à-dire l'induction de défauts dans l'émission ou la perception des signaux de danger. Par exemple, une mutation de TLR4 peut induire la réduction de l'affinité d'HMGB1 pour son récepteur et cette perte de fonction allélique par les cellules tumorales va accélérer la rechute après certaines chimiothérapies (50). Le déséquilibre en signaux pro et anti-phagocytaire peut aussi jouer dans l'évasion immunitaire. Le CD47 est une immunoglobuline pouvant être surexprimée à la surface des cellules cancéreuses. Par la formation d'un complexe avec la protéine SIRP $\alpha$ , le CD47 va permettre aux cellules cancéreuses d'échapper à la phagocytose médiée par les macrophages (51,52). Des mutations dans des voies de signalisation impliquant des cytokines immunorégulatrices telles que les IFN de type I peuvent aussi être retrouvées. En effet, une perte d'expression de gènes associés au facteur de régulation IRF7 a été retrouvée entre des cellules tumorales primaires et métastatiques, diminuant l'immunosurveillance et promouvant l'invasion métastatique osseuse (53). La perte du facteur IRF5 retrouvé dans des tumeurs mammaires humaines peut aussi être impliquée dans la promotion de la capacité métastatique tandis que sa sur-expression induite *in vitro* permet de sensibiliser les cellules tumorales aux chimiothérapies en augmentant leur apoptose (54). Une diminution des signaux chemo-attractants peut aussi être signe de résistance. Par exemple, la chimiokine pro-inflammatoire CXCL10 peut être tronquée par DPP4 et donner lieu à une diminution du recrutement des lymphocytes vers les cellules tumorales. L'expression de DPP4, également connu sous le nom de CD26, peut être induite dans plusieurs contextes de transformation maligne comme dans le carcinome hépatocellulaire ou encore le lymphome non Hodgkinien (55,56). Dans un modèle murin de mélanome, le blocage de DPP4 a permis d'augmenter l'immunité anti-tumorale médiée par les lymphocytes T ainsi que l'efficacité de l'immunothérapie (57).

### *Immunosubversion*

L'immunosubversion est la capacité des cellules tumorales à générer au sein des tumeurs, un microenvironnement immunitaire défavorable à la réponse contre les cellules cancéreuses, et au contraire, favorable à l'échappement face à la réponse immunitaire anti tumorale.

Les cellules tumorales peuvent en effet exprimer des ligands inhibiteurs des cellules T tels que PD-L1/PD-L2, les galectines, ou CTLA-4 c'est ce que l'on appelle des points de contrôle du système immunitaire. Dans des conditions physiologiques, le récepteur PD-1 est retrouvé sur les cellules T après leur activation, et sa liaison avec son ligand PD-L1/PD-L2 permet d'éviter l'emballement de la réponse immune ou inflammatoire. Les cellules tumorales

peuvent exprimer le ligand PD-L1 à leur surface et ainsi inhiber la capacité de prolifération et d'activation des lymphocytes. L'expression de PD-L1 peut être secondaire à une réponse immunitaire notamment *via* l'induction par l'IFN $\gamma$  mais peut être aussi surexprimée en cas de mutation dans la voie PTEN/PI(3)K (58). Au même titre que PD-1/PD-L1, la liaison de la galectine 9 à son ligand Tim-3 induit une inhibition des effecteurs de la réponse de type 1 (59). La molécule CTLA-4 agit différemment des deux autres points de contrôle. En effet, CTLA-4 est un récepteur protéique exprimé par les cellules T pouvant se lier aux récepteurs CD80/86 avec une plus forte affinité que le CD28. Cette liaison va bloquer le signal de costimulation des cellules dendritiques avec les lymphocytes T lorsque la densité membranaire de CD28 sera faible. Cette liaison va donc prévenir l'activation des cellules T au niveau des organes lymphoïdes secondaires, en particulier dans les ganglions drainant la tumeur.

Les cellules tumorales vont aussi pouvoir créer un environnement immunosuppresseur à l'aide d'enzymes et de cytokines. L'adénosine est un nucléoside fortement immunosuppresseur. Sa production par les cellules tumorales peut être due à un environnement hypoxique ou par l'hyper-expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 à la surface cellulaire. Ces deux ectonucléotidases vont jouer un rôle dans la balance ATP/adénosine. En effet, celles-ci vont permettre la conversion de l'ATP en AMP puis en adénosine. L'augmentation de la consommation d'ATP dans le milieu extracellulaire va donc diminuer le signal immunogénique au profit d'un signal immunosuppresseur. Cette augmentation de l'adénosine va induire une hyper régulation des lymphocytes T-reg et des MDSCs et va aussi limiter la migration des cellules dendritiques (60). La production de cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-10 par les cellules tumorales peut inhiber le développement des cellules dendritiques permettant l'échappement de la reconnaissance immunitaire (61,62). Le TGF- $\beta$  est un autre facteur immunosuppresseur sécrété par de nombreuses cellules, notamment les cellules tumorales, pouvant induire une diminution de l'activité cytotoxique des cellules T. En effet, il a été démontré que cette cytokine peut inhiber spécifiquement l'expression de la perforine, des granzymes A et B et de l'IFN $\gamma$  (63). Le TGF- $\beta$  peut aussi agir sur l'augmentation des populations immunosuppressives comme les lymphocytes T-reg, les Th17 ou encore les macrophages de type M2 (64).

Ces enzymes et cytokines vont aussi permettre le recrutement de nouvelles populations ayant pour rôle de diminuer la réponse anti-tumorale du système immunitaire, c'est ce que l'on appelle : les cellules immunosuppressives (65).

- Les MDSCs sont une population hétérogène regroupant des cellules myéloïdes immatures pouvant supprimer l'activation des lymphocytes T. Cette population cellulaire est retrouvée en très faibles proportions dans le sang périphérique de patients sains mais cette proportion est augmentée chez les patients atteints de cancer. Effectivement, les cellules tumorales peuvent sécréter des facteurs solubles mais aussi produire des exosomes induisant l'expansion, *via* la voie Erk et NF-kB, ainsi que l'activation des MDSCs dépendant de STAT3 (66). Leurs fonctions immunosuppressives sont alors basées sur



plusieurs mécanismes. Tout d'abord, ces cellules vont produire des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote induisant une réduction de l'expression du TCR et une anergie du lymphocyte T *via* la cyclo-oxygénase 2 ou le facteur HIF-1 $\alpha$  (67). Elles vont aussi dégrader la L-arginine, un acide aminé essentiel pour les lymphocytes T et affectant leurs fonctions (68). Les MSDC peuvent aussi attirer d'autres populations immunosuppressives comme les lymphocytes T-reg par la sécrétion de chimiokines telles que CCL3, CCL4 et CCL5 *via* leur récepteur CCR5 (69) mais aussi par l'induction de TGF- $\beta$  et d'IL-10 (70).

- Les lymphocytes T-reg font partie des lymphocytes T-CD4<sup>+</sup> exprimant le marqueur Foxp3 et sont des cellules immunosuppressives pouvant être retrouvées dans le microenvironnement tumoral (71). Ces cellules ont pour but de maintenir l'homéostasie immunitaire et vont migrer essentiellement vers les sites inflammatoires, comme les tumeurs, afin de réguler la réponse anti-inflammatoire et/ou anti-tumorale. Dans le but de réguler les cellules cytotoxiques, les T-reg vont exprimer fortement le CD25, un récepteur à l'IL-2, et vont provoquer sa consommation rendant sa quantité limitée pour l'activation des cellules T (72). Ces cellules vont aussi sécréter des cytokines inhibitrices comme le TGF- $\beta$  ou l'IL-10, mais aussi des points de contrôle du système immunitaire tels que LAG-3 ou PD-1. De plus, par l'expression de CTLA-4, les T-reg vont pouvoir inhiber les cellules dendritiques en se liant au CD80/86 (73).

- Les macrophages de phénotype M1, font partie de l'immunité innée par leur fonction anti-microbienne et anti-tumorale. Cependant, lorsque le microenvironnement est modifié et concentré en IL-4 et IL-13, le phénotype des TAM va changer en un phénotype M2 immunosuppresseur. Dès lors, ces TAM2 vont sécréter du TGF- $\beta$  et de l'IL-10 réprimant les fonctions effectrices de cellules T et induisant les T-reg. En plus de ce rôle immunosuppresseur, les TAM2 vont jouer sur l'induction de fibrose créant ainsi un environnement hypoxique voire immuno-exclu. De plus, les ligands PD-L1, PD-L2 peuvent être hyper exprimés sur les TAM induisant leur fonction inhibitrice des cellules immunitaires (74).

La promotion de l'angiogenèse est un autre phénomène pouvant permettre la progression tumorale en dépit de l'attaque des cellules immunitaires. En effet, la formation de nouveaux vaisseaux intratumoraux va permettre aux cellules tumorales l'apport de nutriments et l'élimination des déchets produits au cours de leur prolifération. Le VEGF, une cytokine engagée dans l'angiogenèse et est l'une des plus étudiée. Ce facteur de croissance est connu pour être impliqué dans la maturation des cellules dendritiques. En effet, le traitement par du VEGF exogène a montré une diminution de la capacité de stimulation des cellules T par les cellules dendritiques, *via* le récepteur VEGF-R2 (75), ainsi qu'une diminution des molécules de costimulation dans un modèle de carcinome gastrique (76). De plus, ce facteur soluble active les fonctions immunosuppressives des MDSCs, des TAM2 et des T-reg (77). L'hypoxie induite par ce remodelage vasculaire peut promouvoir le changement de

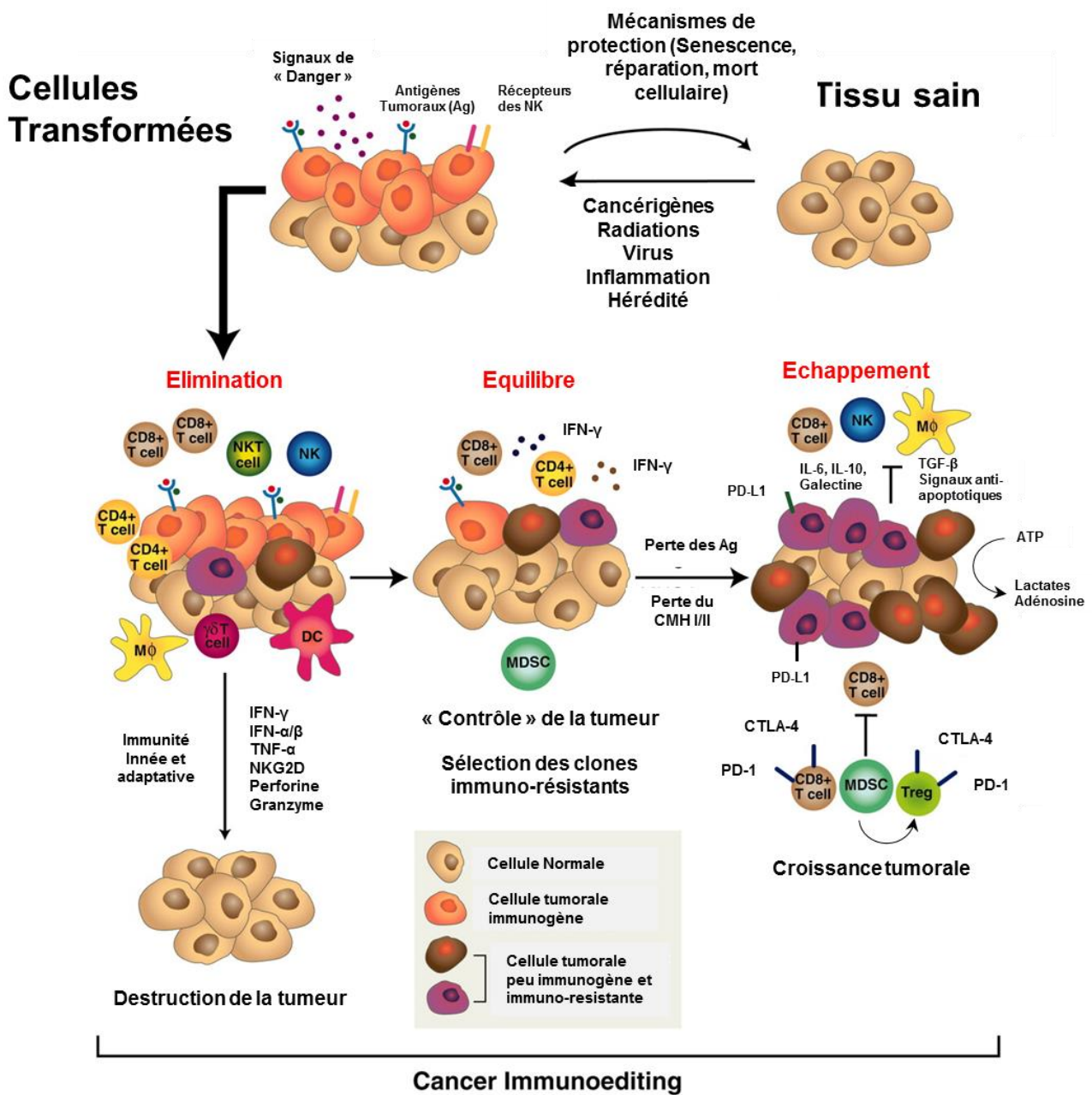
phénotype des cellules immunitaires comme par exemple la polarisation des macrophages de type 1 vers un phénotype M2 (78).

### *Immuno-exclusion*

D'autres mécanismes peuvent expliquer l'échappement des cellules tumorales vis-à-vis du système immunitaire. En effet, le développement de phénomènes physiques peut permettre de limiter l'infiltration en cellules cytotoxiques (79).

Une barrière mécanique peut effectivement bloquer le contact entre les cellules immunitaires et les cellules cancéreuses. Une étude dans le mélanome métastatique a montré que la diminution de l'expression génique de signatures immunitaires Th1 était inversement corrélée avec l'hyper-régulation de gènes associés à l'adhésion cellulaire et à la barrière mécanique comme les protéines desmosomales (80). Le TGF- $\beta$  est un composant essentiel du microenvironnement tumoral et est impliqué dans le remodelage de la matrice extracellulaire. En effet, le TGF- $\beta$  peut jouer sur différentes populations cellulaires comme les fibroblastes infiltrant la tumeur (CAFs) associés à la production de collagène et de tissus matriciels. La formation d'une capsule fibreuse péri-tumorale riche en collagène peut induire l'exclusion des cellules immunitaires de la tumeur. Une étude dans le cancer urothélial métastatique a mis en évidence cette immuno-exclusion des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> dans le stroma tumoral (81). Ce phénomène, associé à la présence d'une signature génique de la voie du TGF- $\beta$  dans les fibroblastes, cause une résistance vis-à-vis d'un traitement par anti-PD-L1. L'administration d'un anti-TGF- $\beta$  permet finalement de restaurer l'immunité anti-tumorale par l'infiltration en cellules T-CD8<sup>+</sup>. De plus, le TGF- $\beta$  peut aussi jouer sur le recrutement des T-CD8<sup>+</sup> *via* les cytokines chimioattractantes. Dans un modèle préclinique de cancer colorectal, les résultats démontrent que le TGF- $\beta$  inhibe le CXCR3 dans les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> limitant l'attraction tumorale de cette population cytotoxique. Par ailleurs, chez des souris déficientes pour le gène du récepteur I du TGF- $\beta$ , l'expression du CXCR3 est augmentée permettant une meilleure migration des cellules T-CD8<sup>+</sup> et améliorant aussi leur fonction effectrice (82).

L'oncogenèse est un processus complexe mettant en jeu de multiples acteurs ayant des rôles bien définis dans la promotion ou la lutte face au développement tumoral. En effet, les cellules transformées vont induire l'expression de nombreux signaux permettant l'activation et le recrutement des cellules de l'immunité innée puis adaptative. La mise en place de cette immunité va permettre la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales. Cependant, malgré la collaboration entre les systèmes inné/adaptatif dans la lutte contre les cellules tumorales, celles-ci peuvent échapper au contrôle du système immunitaire et permettre la progression de la maladie. L'utilisation de chimiothérapies dans le traitement des cancers est, depuis de nombreuses années, le protocole standard à utiliser. Cependant, de nouvelles fonctionnalités, notamment immunologiques, ont été découvertes, rendant ces thérapeutiques de plus en plus étudiées.



**Figure 2:** La théorie de l'immunoédition. Cette théorie se décompose en 3 phases successives : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Suite à la transformation cellulaire engendrée par des agents mutagènes, la cellule va émettre des signaux de danger mais aussi exprimer des protéines capables d'alerter le système immunitaire. Ces différents éléments vont permettre de recruter les acteurs de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques, NK). Ces cellules de l'immunité innée vont stimuler l'immunité adaptative (Lymphocytes T-CD4+, T-CD8+, LB et NKT) et permettre l'élimination des cellules tumorales. La seconde phase est caractérisée par l'équilibre entre l'élimination des cellules tumorales immunogènes et la sélection de clones non immunogènes. Cet état d'équilibre est obtenu par une balance entre cellules cytotoxiques et cellules immunosuppressives. Les clones immuno-résistants vont finalement réussir à échapper au contrôle de la tumeur via différents mécanismes (immunoédition/subversion et immuno-exclusion) et provoquer la croissance tumorale. D'après Schreiber et al, 2011.

## II. Immunologie du cancer du sein : le cas du CSTN

### a. Le cancer du sein

#### *Epidémiologie*

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, en France, mais aussi dans le monde avec une incidence de 11,7%. Il est aussi l'un des plus meurtriers avec 6,9% de décès, tout sexe confondus, dans le monde, en 2020 (1). Toutefois, sa mortalité diminue depuis les années 1990. En effet, l'amélioration de la prise en charge thérapeutique ainsi que du dépistage par mammographie, pour les femmes âgées de 50 à 74 ans, permet aujourd'hui de diagnostiquer les cancers du sein à un stade précoce.

Plusieurs facteurs de risque sont connus pour être impliqués dans l'apparition de cette pathologie, que l'on peut différencier en 3 classes : les facteurs de risque non génétiques et non modifiables, les non génétiques mais modifiables et les facteurs de risque génétiques (83). Les facteurs de risque non génétiques et non modifiables sont l'âge, l'ethnie, l'histoire personnelle (menstruations précoces, ménopause tardive) ou encore les antécédents de pathologies mammaires. Les facteurs de risque non génétiques et modifiables sont l'exposition au tabac, à des radiations, la prise d'alcool ou de certains médicaments ainsi que le manque d'activité physique ou une mauvaise nutrition (84,85). 5 à 10% des cancers du sein sont héréditaires, en effet, des mutations sur des gènes connus peuvent être transmises à la descendance et font partie des facteurs de risque génétiques. La mutation la plus fréquente se situe sur un gène impliqué dans la réparation de l'ADN : le gène *BRCA1* ou *2*, et est impliquée dans environ 6% des cancers du sein. D'autres gènes mutés peuvent être impliqués tels que *Cdh1*, *Pten*, *Tp53*, *Chek2*, *Atm*, ou *Brip1* représentant 5-6% de ces cancers (86,87).

#### *Sous-types de cancer du sein*

Basé sur différentes caractéristiques moléculaires définies par des techniques d'histologie, les cancers du sein peuvent être classés en plusieurs sous-types. En effet, la présence de récepteurs aux œstrogènes (RO), à la progestérone (RP) et de HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), permettent de différencier les sous-types de cancer du sein au pronostic intrinsèque et à l'histoire clinique différente. En outre, ces différences moléculaires impliquent l'utilisation de thérapies différentes (hormonothérapie ou thérapies ciblées anti HER2).

Les tumeurs lumineuses A et B sont les formes les plus fréquentes. Elles présentent toutes deux les récepteurs hormonaux à la progestérone et aux œstrogènes mais se différencient par leur signature moléculaire ainsi que par la capacité de prolifération des cellules tumorales. En effet, les lumineuses A seront des carcinomes avec un index de prolifération faible (caractérisés par exemple par une faible expression Ki-67), tandis que les lumineuses B auront un index de prolifération élevé. De plus, la mutation p53 est d'environ 15%

chez les luminaux A contre 65% chez les luminaux B. L'évaluation de la présence et de la quantité de récepteurs hormonaux se fait par immunohistochimie (IHC) et détermine l'utilisation ou non d'une hormonothérapie.

Les tumeurs HER2 sont caractérisées par la surexpression du récepteur HER2 associée ou non à l'expression des récepteurs hormonaux. Cette surexpression, analysée par IHC ou par hybridation *in situ* en fluorescence (FISH), favorise la croissance tumorale mais peut être ciblée par des traitements particuliers. Deux classes thérapeutiques font partie de ces thérapies ciblées : les anticorps monoclonaux (Trasuzumab, Pertuzumab par exemple) ou les inhibiteurs de la tyrosine kinase (Lapatinib, Tucatinib).

Les tumeurs « basal-like » expriment très faiblement les récepteurs hormonaux et HER2. Il s'agit souvent de cancer triples négatifs représentant 10-15% des cancers du sein invasifs (88). En effet, comme leur nom l'indique, ces tumeurs n'expriment pas les récepteurs précédents et ne peuvent donc pas être traitées par une thérapie ciblée.

### *Le cancer du sein triple négatif*

Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est le sous-type de cancer du sein le plus agressif. Environ 34% des patientes développeront une récurrence à distance contre 20% chez des patientes atteintes d'autres sous-types de cancers du sein et celle-ci sera d'apparition plus rapide (89). Le risque de développer des métastases viscérales est aussi augmenté par rapport aux autres cancers du sein (90). Le CSTN a aussi le pronostic le plus sombre avec une probabilité de décès plus importante que les autres sous-types de cancers du sein dans les 5 ans suivant le diagnostic (89). Il est aussi le plus difficile à cibler car n'exprimant ni les récepteurs hormonaux ni HER-2, son traitement sera moins spécifique. La chimiothérapie est alors le traitement standard à utiliser pour cette pathologie. Les anthracyclines et les taxanes sont les molécules les plus indiquées dans le traitement du CSTN et sont à utiliser en première intention (91). En effet, Le traitement néoadjuvant standard dans le CSTN de stade précoce est un régime séquentiel d'anthracyclines + cyclophosphamide et de taxanes induisant une réponse complète dans environ 40% des cas (92,93). Cependant, le choix de la stratégie thérapeutique à adopter dépend de plusieurs facteurs comme la charge tumorale et ses marqueurs, l'avancement de la maladie et sa progression, la localité et le nombre d'organes atteints ainsi que des critères de vulnérabilité de la patiente.

### *Traitements du CSTN métastatique*

Compte tenu de l'agressivité tumorale de ce sous-type, et du faible nombre d'options thérapeutiques en dehors des chimiothérapies cytotoxiques usuellement utilisées dans les cancers du sein, le pronostic des CSTN métastatiques est particulièrement mauvais et constitue, en 2021, un enjeu majeur d'amélioration thérapeutique pour les patientes atteintes. La maladie triple négative est, ou devient, rapidement chimiorésistante, et la médiane de survie globale des patientes est d'environ 14 mois. Différentes familles de chimiothérapies peuvent être envisagées pour le traitement des CSTN. Il n'existe aucune

recommandation pour une utilisation spécifique dans un ordre donné des principales familles de molécules usuellement utilisées dans le cancer du sein en général.

Dans la famille des taxanes, le paclitaxel est une chimiothérapie de référence dans le cancer du sein. Il appartient à la famille des poisons du fuseau et bloque la division cellulaire par inhibition de la dépolarisation des microtubules. Il est le plus souvent utilisé en monothérapie, et en première ligne, au regard de son excellent rapport efficacité/toxicité.

La capécitabine est un anti-métabolique se comportant comme un précurseur oral du 5-fluoro-uracile (5-FU) et est fréquemment utilisée dans le traitement de tous les sous-types de cancers du sein métastatiques y compris les CSTN. Cette molécule va être activée par une enzyme présente en très forte quantité dans les tissus tumoraux : la thymidine phosphorylase. Le 5-FU ainsi produit va alors contribuer à inhiber la synthèse de l'ADN en bloquant la thymidilate synthase, principale enzyme impliquée dans la production des pyrimidines (thymine).

La combinaison d'anthracyclines associées aux taxanes peut aussi être une option si la patiente n'a pas reçu d'anthracyclines ultérieurement du fait de leur cardiotoxicité à doses cumulées. Par exemple, la doxorubicine et l'épirubicine sont des molécules indiquées dans cette pathologie. Cette famille de chimiothérapies va agir en s'intercalant dans l'ADN *via* une liaison avec la topoisomérase II, empêchant la progression de l'ADN polymérase et perturbant ainsi la division cellulaire et entraînant la mort de la cellule cancéreuse.

Le cyclophosphamide est un agent alkylant appartenant à la famille des moutardes azotées et est le plus souvent utilisé en association avec les anthracyclines. Cette molécule électrophile va former des liaisons covalentes avec l'ADN inhibant ainsi la réplication et la transcription de l'ADN mais aussi en formant des radicaux libres entraînant des cassures des brins d'ADN.

Depuis quelques années, les sels de platine sont entrés dans l'arsenal thérapeutique utilisé face au CSTN et peuvent être utilisés en combinaison avec d'autres chimiothérapies de référence. Les sels de platine font partie de la famille des alkylants et provoquent des cassures de l'ADN par la formation d'adduits. Les tumeurs triples négatives présentent souvent des mutations dans les gènes BRCA ce qui en fait des candidates adéquates à l'utilisation de traitements capables de générer des cassures doubles brins de l'ADN. En effet, ces cassures doubles brins ne peuvent être réparées compte tenu d'une recombinaison homologue déficiente en rapport avec les anomalies de BRCA. Dans le CSTN métastatique, l'essai TNT (NCT00532727) en première ligne a montré la supériorité du carboplatine en monothérapie par rapport au docetaxel pour les patientes avec une mutation germinale de BRCA1/2 (94). Malgré l'absence de bénéfice pour les autres sous-groupes de patientes, en pratique clinique quotidienne, les sels de platine sont fréquemment utilisés chez les patientes atteintes de CSTN, le plus souvent après échec des taxanes et/ou des anthracyclines. De plus, le cisplatine

semblerait être la molécule la plus efficace des sels de platine car donnant lieu à des meilleures PFS et ORR (95).

L'éribuline est un agent anti-néoplasique se distinguant des taxanes par son action inhibitrice de la polymérisation des microtubules sans altérer la phase de raccourcissement. Cette chimiothérapie est indiquée dans le cancer du sein localement avancé ou métastatique ayant progressé après au moins deux lignes de chimiothérapies contenant des anthracyclines ou des taxanes. L'essai clinique de phase III EMBRACE (NCT00337103) a montré une amélioration significative de la survie globale (OS) après ce traitement utilisé en monothérapie comparé à d'autres chimiothérapies choisies par les cliniciens (96). La deuxième grande étude de phase III, l'étude 301 (NCT00337103), a quant à elle démontré une tendance favorable mais non significative à l'amélioration de la survie globale chez les patientes ayant reçu de l'éribuline comparée à celles traitées avec la capécitabine (97).

Ces différents cytotoxiques vont donc pouvoir être utilisés successivement en fonction de la progression de la maladie mais aussi de la toxicité chez les patientes. La monothérapie séquentielle peut être indiquée chez des patientes âgées ou fragiles ne tolérant pas les effets secondaires d'une polychimiothérapie ou ayant une maladie d'évolution lente et peu symptomatique. Dans les autres cas, la polychimiothérapie doit être réservée en 1<sup>ère</sup> ligne des CSTN métastatiques.

### *Sous-types de CSTN*

En 2011, l'équipe de Lehmann a analysé le profil transcriptomique de 587 tumeurs triples négatives et a identifié 7 sous-types. Les sous-types *basal-like* 1 et 2 (BL1 et BL2), immunomodulateur (IM), mésenchymateux (M), mésenchymateux *stem like* (MSL), luminal à récepteur androgène (LAR) et instable/non classifié (UNC) (98). Les sous-types *basal-like* seront caractérisés par une instabilité génomique ou la présence de mutation BRCA ou EGFR. Les sous-types M et MSL seront eux enrichis en voies de signalisation associées à la différenciation et la motilité cellulaire avec notamment la voie du TGF- $\beta$ . Le sous-type LAR exprime les récepteurs aux androgènes et est enrichi en voies régulées par les hormones. Le sous-type immunomodulateur est le plus intéressant en matière d'immunologie car il est caractérisé par l'enrichissement en gènes impliqués dans l'immunité comme les voies de signalisation des cellules immunitaires et la présentation antigénique (98).

C'est ainsi que, bien qu'historiquement le cancer du sein ait longtemps été considéré comme une maladie peu immunogène, le CSTN a été le principal sous-type de cancer du sein étudié sous un angle immunologique.

## b. Aspects prédictifs/pronostiques de réponse anti-tumorale

Le CSTN est le sous-type de cancer du sein le plus étudié pour son immunobiologie depuis l'arrivée des nouvelles immunothérapies. En effet, en raison de son profil biologique en apparence assez favorable à ces traitements, mais aussi compte tenu d'un besoin médical pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques, en particulier en phase métastatique, le CSTN fait l'objet de recherches précliniques et cliniques intenses.

### *TMB et charge mutationnelle*

La charge mutationnelle tumorale ou TMB définit le nombre de mutations somatiques retrouvées dans la tumeur et est mesurée par technique de séquençage de l'exome. Le TMB est le reflet indirect de l'immunogénicité tumorale car il met en évidence le taux de néoantigènes pouvant être présentés *via* le CMH. Un TMB élevé est donc généralement corrélé à un taux important de lymphocytes infiltrant la tumeur. Dans le cancer du sein, le TMB médian est de 2,63 mutations par mégabase contre plus de 7 pour le cancer du poumon et de 13 pour le mélanome (99,100). Un TMB supérieur à 10 mutations par mégabase peut être considéré comme élevé et est retrouvé dans environ 5% des cancers du sein (99). Le CSTN est le sous-type de cancer du sein présentant le plus fort taux de mutations notamment au niveau de TP53 ou BRCA1/2 et cette instabilité génomique peut laisser supposer de l'utilisation appropriée de l'immunothérapie.

### *Evaluation des lymphocytes infiltrant la tumeur*

Une conséquence simple de l'immunosurveillance tumorale est la présence caractéristique de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs). Les TILs sont des cellules immunitaires mononucléées infiltrant la tumeur et comprenant les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup>, T-CD4<sup>+</sup>, B-CD19<sup>+</sup> et NK (101). L'évaluation des TILs se fait par l'analyse morphologique *in situ* sur coupe de tissu tumoral inclus en paraffine et coloré par l'hématoxyline-éosine-safran (HES). Ces populations peuvent être localisées dans le stroma tumoral, souvent associé à de la fibrose, ou au cœur tumoral, c'est-à-dire en contact direct avec les cellules malignes (102). Ces cellules immunitaires peuvent être considérées comme un stigmate de réponse anti-tumorale et se sont révélées être un marqueur pronostique et prédictif de réponse.

Il est logique de constater que, en particulier dans les CSTN localisés, leur présence en nombre important est associée à un meilleur pronostic (moins de rechute). En 2009, une étude sur une large cohorte de patientes traitées uniquement par chirurgie a validé le concept du rôle pronostique favorable de l'infiltration en TILs dans le cancer du sein (103). Depuis, plusieurs études dans le CSTN ont confirmé ce concept dans ce sous-type de cancer du sein et cela quel que soit la méthode d'évaluation des TILs utilisée. Effectivement, l'exploration des données d'expression génique de tumeurs CSTN ont aussi prouvé une association entre une expression élevée des gènes CD8 (*Cd8a,b*) et une meilleure survie (104). Récemment, une méta-analyse regroupant 37 études rétrospectives dans le CSTN a montré qu'un fort taux de



TILs est associé à une meilleure survie globale et sans rechute par rapport aux tumeurs exprimant un faible taux de TILs (105). Plus particulièrement, l'amélioration de la survie sans rechute était associée aux TILs CD8<sup>+</sup> et CD4<sup>+</sup> mais étonnement, un taux élevé de TILs Foxp3<sup>+</sup> a aussi montré un impact favorable. Ce phénotype considéré comme immunosuppresseur avait auparavant été associé à un mauvais pronostic contrairement aux lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> cytotoxiques (106,107). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par le fait que les tumeurs fortement infiltrées en cellules T-CD8<sup>+</sup> seraient aussi infiltrées en lymphocytes T régulateurs (108).

A côté de ce rôle pronostique, de nombreuses études cliniques révèlent par ailleurs un rôle prédictif des TILs en terme de réponse à la chimiothérapie. En 2017, une méta-analyse regroupant 3771 tumeurs issues de 6 études a été réalisée en vue d'évaluer l'aspect prédictif de réponse des TILs à une chimiothérapie néo-adjuvante. Les résultats ont indiqué qu'une augmentation des TILs était associée à une augmentation du taux de réponse complète dans les 3 sous-types de cancers du sein (CSTN, HER2+ et HR+/HER2-). De plus, une analyse de régression logistique univariée a montré qu'une augmentation de 10% des TILs stromaux permettait d'augmenter la probabilité d'obtenir un taux de réponse complète pathologique de 16% dans le CSTN (109). Les traitements à base de platine font partie de ces chimiothérapies associées à l'aspect prédictif de réponse des TILs dans le CSTN (110) ainsi que les anthracyclines et les taxanes (111). Du fait de leur rôle pronostique dans le CSTN bien décrit dans la littérature, les recommandations internationales sont en faveur de l'évaluation de TILs mais de ne pas se servir de ces données pour guider le choix du traitement néo-adjuvant (112). Des résultats récents d'une analyse exploratoire de l'étude NeoTRIPaPDL1 et présentés au congrès de l'ESMO 2021 ont mis en évidence l'effet prédictif de l'expression élevée des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> chez les patientes atteintes de CSTNm et traitées par chimiothérapie +/- immunothérapie. En effet, cette expression élevée était associée à un taux de réponse complète pathologique de 58,6% et de 61,7% dans les groupes atezolizumab+chimiothérapie et chimiothérapie seule respectivement (113).

### *Evaluation du statut PD-1/PD-L1*

PD-1 est une protéine retrouvée à la surface des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup>, T-CD4<sup>+</sup>, B, NK ainsi que sur les cellules dendritiques et les monocytes. PD-1 est exprimé lors de l'activation lymphocytaire *via* différents signaux comme le TCR (ou BCR pour les cellules B), des facteurs de transcription comme NF-κB ou encore des cytokines telles que l'IFNγ. Cette protéine est naturellement induite sur les lymphocytes activés et va permettre de désamorcer l'emballement du système immunitaire. Ses ligands : PD-L1 et PD-L2 peuvent être exprimés, entre autres, par les cellules tumorales en vue de résister à l'assaut des cellules immunitaires. Deux mécanismes de régulation de PD-L1 par les cellules tumorales peuvent exister : une résistance innée et/ou adaptative (114). La résistance innée est due à l'expression constitutive de voie de signalisation oncogénique. Par exemple, dans des modèles de cancer du sein et de la prostate, il a été montré que la perte de PTEN ou une mutation dans

une sous unité catalytique de la PI(3)Kinase activait la PI(3)Kinase et induisait l'immunoséance médiée par la protéine PD-L1 (58,115). La résistance adaptative est liée à un tout autre mécanisme et est secondaire à l'activation de la réponse T. En effet, la tumeur va utiliser une voie physiologique naturelle d'induction de PD-L1 comme par exemple *via* l'IFN $\gamma$  (116).

Le taux de lymphocytes T et la présence de ce point de contrôle immunitaire sont donc liés, en effet, les tumeurs CSTN PD-L1 positives présenteraient un taux d'infiltration en lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> plus élevé que les tumeurs PD-L1 négatives. D'après l'analyse de séquençage de l'ARN du TCGA (*Cancer Genome Atlas*), le CSTN est le sous-type de cancer du sein présentant un plus fort taux d'expression du gène *Cd274* (58). De nombreuses études ont cherché à étudier le rôle pronostique de l'expression de PD-L1/PD-1 dans plusieurs cancers mais les résultats sont controversés (117). En effet, PD-L1 peut être un marqueur d'agressivité notamment dans le cancer urothélial (118). Dans le cancer du sein, l'expression de PD-L1 serait un facteur de mauvais pronostic car elle serait associée à une durée de vie plus faible pour les patientes des sous-types luminaux A, B, HER2+ et basal-like (119). Une étude dans le CSTN a montré aussi qu'une expression de PD-L1 dans les TILs, mais pas dans les cellules tumorales, était un facteur de mauvais pronostic (120). Cependant plusieurs rapports indiquent aussi un manque de corrélation voire même une amélioration de la survie associée à l'augmentation de PD-L1 (121,122). En effet, l'induction de l'expression de PD-L1 étant associée à une augmentation de la réponse immunitaire T, cette hyper-régulation peut donner lieu à une meilleure réponse à la chimiothérapie et donc augmenter la survie des patientes (123). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, l'hyperexpression de PD-L1 peut aussi être constitutive par addiction oncogénique et caractériser une tumeur plus agressive donc de mauvais pronostic.

Ces résultats divergeants concernant la valeur pronostique de PD-L1 peuvent être liés à l'absence de standardisation de la méthode de détermination du statut PD-L1. Effectivement, la méthode couramment utilisée est l'analyse immunohistochimique (IHC) réalisée à partir d'échantillons frais ou archivés. De nombreux anticorps spécifiques de PD-L1 sont aujourd'hui disponibles et leurs spécificité et reproductibilité sont variables au même titre que le seuil de positivité défini et la subjectivité interprétative (123).

### III. Utilisation de l'immunothérapie dans le CSTN

#### a. Immunothérapie d'hier à aujourd'hui

Depuis le 19<sup>ème</sup> siècle, l'utilisation du système immunitaire dans la lutte contre les cellules tumorales est apparue comme une nouvelle piste dans la thérapie anti-cancéreuse. En effet, les travaux de William B. Coley entre 1890 et 1940 sur l'utilisation d'un cocktail de

bactéries tuées par la chaleur chez des patients atteints de cancer en fait le précurseur de l'immunothérapie (124). Cependant, malgré l'incompréhension persistante du mécanisme reliant le système immunitaire au cancer, c'est seulement quelques années plus tard que Paul Ehrlich postulera l'hypothèse d'une reconnaissance et d'une élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. Au cours du siècle suivant, de nombreux travaux vont permettre d'approfondir ces nouvelles connaissances en matière d'immunologie du cancer par, notamment, la caractérisation de l'immunosurveillance puis de l'immuno-editing du cancer. Le développement de modèles murins génétiquement modifiés et immunodéficients permettra la mise en évidence du rôle primordial des lymphocytes T et des chimiokines telles que l'interféron gamma dans le contrôle des tumeurs spontanées ou induites (125).

A partir de ces nouvelles découvertes, les chercheurs ont donc finalement essayé de développer des traitements basés sur ce principe d'immunothérapie et quatre grandes stratégies ont ainsi vu le jour :

- L'immunothérapie non spécifique utilise les cytokines stimulant directement les cellules immunitaires telles que les interférons, les interleukines ou le facteur de stimulation des colonies granulocytes-macrophages (GM-CSF). L'IFN $\alpha$  et l'IL-2 ont été les premières cytokines recombinantes à être développées et approuvées par la FDA pour le traitement de la leucémie à tricholeucocytes, du cancer rénal métastatique et du mélanome métastatique respectivement (53).
- L'immunothérapie active correspond aux vaccins anticancéreux développés à partir d'un ou plusieurs antigènes tumoraux associés à un adjuvant afin d'amplifier la réponse immunitaire. Comme vu précédemment, les antigènes tumoraux peuvent être exprimés par les cellules tumorales et les cellules saines tandis que certains peuvent être uniques aux tumeurs. L'antigène tumoral humain MAGE-1 a été le premier à être découvert en 1991 et depuis, plus de 75 antigènes ont été identifiés dans le but de développer des vaccins contre le cancer (54). Le T-VEC a été le premier virus oncolytique à être approuvé par le FDA en 2015 dans le traitement du mélanome métastatique et depuis, de nombreux essais cliniques sont en cours afin de développer la virothérapie oncolytique dans d'autres types de cancers (126).
- L'immunothérapie adoptive utilise le transfert autologue de cellules immunitaires activées et amplifiées de patients afin de stimuler la réponse immunitaire. C'est dans les années 1980 que l'équipe de Rosenberg a montré les premiers résultats suite à la réinjection de TILs infiltrant des mélanomes malins chez des patients (127). Depuis, l'utilisation de différents types de cellules immunitaires a été étudiée comme les lymphocytes activés en association avec de l'IL-2, des TILs spécifiques de tumeurs, les monocytes ou macrophages activés ou encore les cellules dendritiques (128). La thérapie par l'utilisation de cellules CAR-T a été une avancée majeure des dernières années. En effet, les lymphocytes T issus de patients malades vont être modifiés génétiquement afin d'exprimer un récepteur chimérique différent selon la maladie ciblée. Cette thérapie

personnalisée est aujourd'hui prometteuse avec l'approbation par la FDA en 2017 dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique à cellules B récidivante puis dans le lymphome et enfin dans le myélome multiple en mars 2021.

- Enfin, l'immunothérapie passive est la plus couramment étudiée et est basée sur la modulation du système immunitaire par l'utilisation d'anticorps. Certains anticorps vont permettre la stimulation de cellules effectrices comme les cellules T par le ciblage du récepteur CD28 ou du TNF comme OX40 et 4-1BB (129). D'autres vont avoir pour but de bloquer l'immunosuppression ou l'inhibition des populations cytotoxiques. En effet, les inhibiteurs de point de contrôle immunitaire appartiennent à la classe d'immunothérapie la plus ancienne et la plus couramment étudiée. Elle a été développée sur le principe de la sérothérapie et utilise aujourd'hui le génie génétique pour produire de grandes quantités d'anticorps monoclonaux spécifiques de cellules ou de molécules cibles. En 1987, CTLA-4 devient le premier récepteur inhibiteur à être découvert et sera le premier à être approuvé par la FDA en 2011 dans le traitement du mélanome métastatique. Quelques années après la découverte de CTLA-4, le récepteur PD-1 est mis en évidence comme régulateur négatif de la réponse immunitaire des lymphocytes T et c'est une dizaine d'années plus tard que son ligand PD-L1 sera identifié B7-H1 (130,131). S'ensuit alors le développement de ces immunothérapies et c'est en 2014 que la FDA approuvera le pembrolizumab et le nivolumab dans le traitement du mélanome puis de l'atezolizumab dans le cancer urothélial en 2016 (132). La découverte de ces nouveaux traitements permettant de lever l'inactivation des lymphocytes T et démontrant une très grande efficacité anti-cancéreuse va finalement être récompensée par la remise du prix Nobel de physiologie et de médecine en 2018 à l'américain James P. Allison et au Japonais Tasuku Honjo.

Tous ces différents travaux associés à la recherche constante d'une amélioration des techniques en matière d'isolation, de production et de sécurité des biomédicaments permettent aujourd'hui de proposer un large panel de traitements aux patients atteints de cancer. Malgré des réponses thérapeutiques prometteuses chez certains patients, d'autres ne répondront pas ou acquerront des résistances. L'étude de la biologie tumorale associée à son microenvironnement peut parfois nous donner des indications face aux différentes réponses cliniques des patients.

## **b. Mécanismes de résistance à l'immunothérapie**

L'immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1 permet d'induire des réponses thérapeutiques spectaculaires mais ceci est malheureusement limité qu'à un certain nombre restreint de patients. Pour fonctionner, ces traitements nécessitent l'expression de leur cible PD-L1 dans la tumeur mais aussi la présence de lymphocytes T cytotoxiques infiltrants (133). Cependant, par l'analyse des tumeurs, notamment par immunohistochimie, il a été possible de différencier 3 immunophénotypes caractérisés par une distribution spatiale distincte des

cellules immunitaires. Ces 3 phénotypes sont appelés immuno-désertiques, immuno-exclus (ou tumeurs « froides ») et immuno-inflammés (ou tumeurs « chaudes ») (figure 3).

### *Tumeurs immuno-désertiques*

Les tumeurs « froides » immunologiquement sont caractérisées par l'absence de cellules T dans la tumeur et son microenvironnement. Plusieurs mécanismes peuvent en être la cause comme une altération dans la machinerie de la présentation antigénique, une faible immunogénicité ou l'augmentation de l'angiogenèse et de l'hypoxie.

Les tumeurs présentant une charge mutationnelle tumorale élevée c'est-à-dire un nombre de mutation important sont caractérisées par une forte charge en néoantigènes. Les tumeurs exprimant beaucoup de néoantigènes seront alors plus à même d'activer les cellules cytotoxiques au sein de la tumeur. Le TMB semble d'ailleurs pouvoir être un biomarqueur prédisant l'efficacité de l'immunothérapie dans plusieurs types de cancers (134,135). A l'inverse, une charge mutationnelle peu élevée pourrait finalement être corrélée avec un faible taux d'antigène rendant la tumeur dénudée en lymphocytes. Un défaut dans la machinerie de présentation des antigènes tumoraux peut aussi expliquer l'absence d'activation et de fonctionnalité des lymphocytes T. Par exemple, une mutation de B2M, la chaîne invariante du CMH, entraîne une perte du CMH et de ce fait, une résistance face à la cytotoxicité des cellules T-CD8<sup>+</sup> mais aussi au blocage de PD-1 (136). Les tumeurs « froides » immunologiquement peuvent aussi exprimer des protéines minimisant l'émission de signaux de danger et diminuant la phagocytose par les cellules présentatrices d'antigènes. Par exemple, la stanniocalcine 1 (STC1), un point de contrôle intracellulaire exprimé par les cellules tumorales, peut piéger la calréticuline et diminuer le signal « mange moi » initié par ce signal immunogène. La perte d'un signal phagocytaire pour les CPA va alors diminuer leur capacité de présentation antigénique ainsi que l'activation d'une réponse T et contribuer à l'évasion tumorale et à la résistance à l'immunothérapie (137).

L'absence d'immunogénicité tumorale peut aussi être une caractéristique de ces tumeurs « froides ». En effet, une faible expression de DAMPs durant le processus de mort immunogène tels que la calréticuline, l'ATP ou l'HMGB1 ne permettra pas le recrutement et l'activation des cellules présentatrices d'antigènes. Une régulation épigénétique des tumeurs comme modification de la méthylation de l'ADN, ou une diminution des cellules dendritiques telles que les CD Batf3, peut influencer sur l'expression de chimiokines engendrant un appauvrissement en cellules T cytotoxiques (138). Effectivement, les tumeurs immuno-désertiques peuvent être caractérisées par le manque de lymphocytes T dû à un déficit en cytokines chimioattractantes comme CXCL10-9 ou CCL4-5 (139).

### *Tumeurs immuno-exclues*

Les tumeurs immuno-exclues sont caractérisées par la présence de nombreux lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> en périphérie tumorale mais en faible nombre dans le cœur tumoral. Ce phénotype tumoral appartient aux tumeurs « froides » immunologiquement et répondent

rarement à l'immunothérapie. Plusieurs mécanismes peuvent en être la cause comme l'expression de facteurs solubles tel que le TGF- $\beta$  associé au remodelage de la matrice extracellulaire *via* les CAF ou les TAM2.

Le TGF- $\beta$  est la cytokine immunosuppressive la plus couramment impliquée dans l'immuno-exclusion des cellules immunitaires et est corrélée à un manque d'efficacité à l'immunothérapie par un anti-PD-L1 (140). Cette protéine va être synthétisée sous forme immature car liée à un peptide appelé LAP. L'exocytose dans l'environnement extracellulaire va permettre notamment, l'incorporation de ce complexe dans la matrice extracellulaire (MEC) par la réticulation à la fibrilline et la fibronectine. Le clivage de ce complexe lié à la MEC aura lieu grâce à l'élastase ou au BMP-1 tandis que dans un contexte hors MEC, les MMP-2 libéreront le TGF- $\beta$  mature (141). Ce TGF- $\beta$  biologiquement actif va alors pouvoir se lier aux récepteurs TGF $\beta$ RII et RI induisant l'activation de la voie de signalisation des SMAD. Le complexe trimérique comprenant SMAD2, SMAD3 et SMAD4 va être transloqué dans le noyau afin de réguler la transcription de gènes cibles tel que celui de la *Serpine1*. Le TGF- $\beta$  peut aussi réguler d'autres voies de signalisation impliquant des kinases telles que ERK1/2, p38 ou AKT. Ces voies de signalisation sont indépendantes des SMAD et sont appelées « voies de signalisation non canoniques » et peuvent être impliquées dans la différenciation fibreuse médiée par le TGF- $\beta$  (142). Le TGF- $\beta$  peut être sécrété par les cellules environnantes comme les fibroblastes associés au cancer (CAF) ou par les cellules tumorales elles-mêmes. Ces fibroblastes vont remodeler la matrice extracellulaire par l'induction de fibres de collagènes denses et désorganisées. Le mouvement des lymphocytes dans le stroma tumoral sera ralenti et ces cellules ne pourront pas entrer en contact avec les cellules tumorales afin d'effectuer leur rôle cytotoxique (143). Les CAF peuvent aussi sécréter la cytokine CXCL12 diminuant l'infiltration en cellules T cytotoxiques rendant inefficace l'utilisation d'un anti-PD-L1 (144). Le TGF- $\beta$  pourrait aussi supprimer la transcription de CXCR3 dans les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> limitant ainsi l'attraction tumorale de cette population cytotoxique (82).

L'IL-6, le TGF- $\beta$  mais aussi le collagène et l'environnement fibrotique peuvent orienter les macrophages vers un phénotype M2 immunosuppresseur (145). Dans ce contexte, les TAM2 peuvent à leur tour jouer sur l'immuno-exclusion des lymphocytes T par l'expression de TGF- $\beta$ 1 et de métalloprotéinases matricielles (146)

Après l'activation par les CPA et l'attraction grâce aux chimiokines, les lymphocytes T vont devoir migrer jusqu'à la tumeur en utilisant le système vasculaire. Les tumeurs « froides » peuvent avoir comme caractéristique la surexpression génique de *Vegf* pouvant provoquer une altération de la vascularisation empêchant les cellules T d'arriver jusqu'aux cellules tumorales (147). Le VEGF, sécrété par notamment les cellules tumorales et stromales, peut stimuler la prolifération des cellules endothéliales et induire la formation de néovaisseaux anormaux. De plus, ce facteur peut provoquer la diminution de molécules d'adhésion tel que VCAM-1 et empêcher la migration des cellules T à travers la paroi des vaisseaux (148). Cette altération de la structure vasculaire ainsi que la consommation importante d'oxygène par les cellules tumorales peut aussi induire une hypoxie. Cette diminution de l'apport en oxygène

peut provoquer l'attraction de cellules immunosuppressives ainsi que l'expression d'ectonucléotidases (CD39 et CD73) provoquant l'inhibition de la production d'IL-2 et de la prolifération des cellules T (138).

L'activation de voies oncogéniques peut être une autre caractéristique des tumeurs « froides ». Par exemple, la perte de PTEN, retrouvée dans de nombreux cancers, notamment le CSTN, active la voie de survie et de prolifération PI3K/AKT et peut favoriser la résistance à l'immunothérapie. La perte de PTEN dans les tumeurs est corrélée à une faible infiltration tumorale en lymphocytes T-CD8<sup>+</sup>, une altération de la fonction des TILs ainsi qu'une augmentation du VEGF (149).

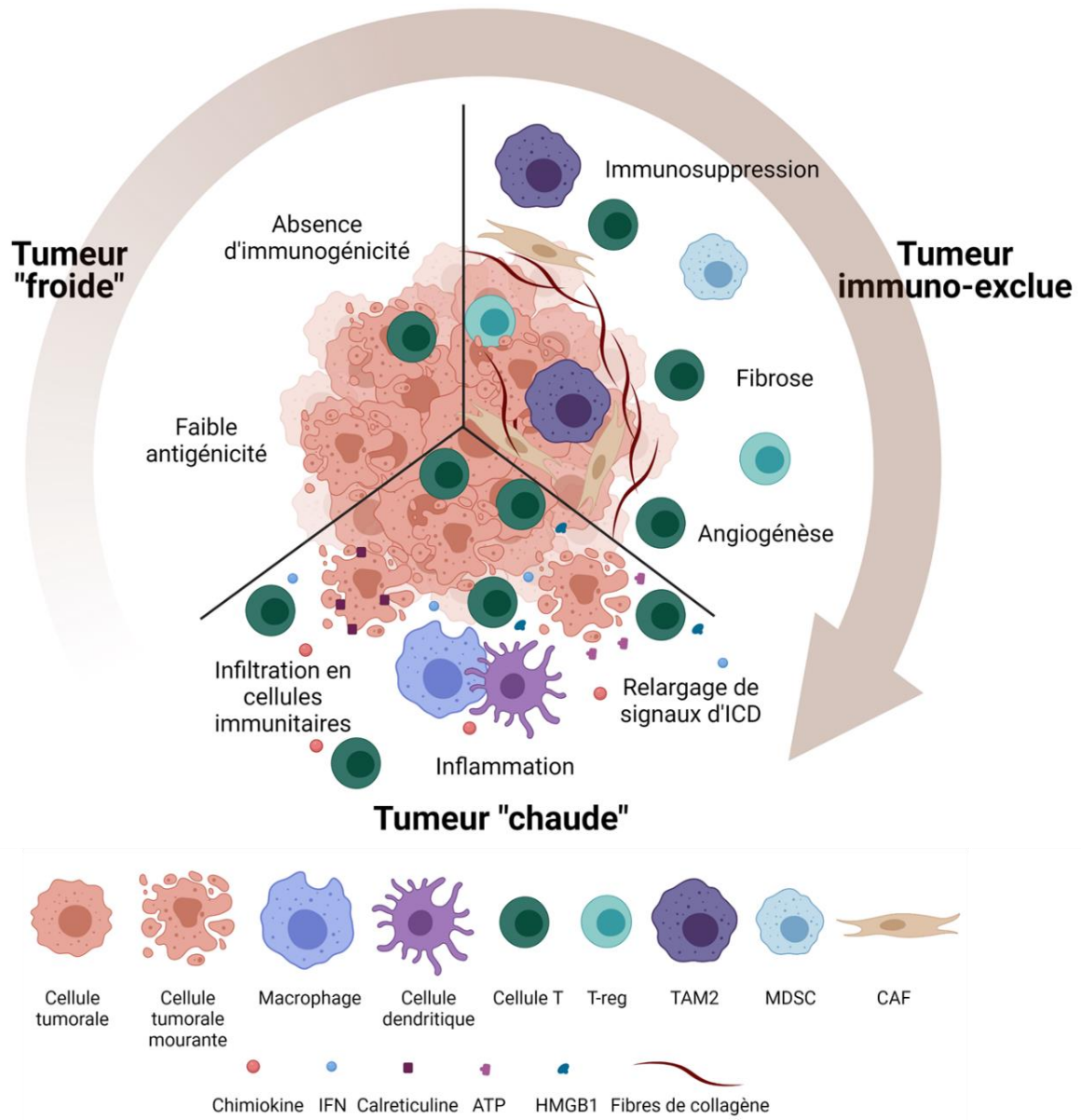
### *Tumeurs immuno-inflammées*

Les tumeurs « chaudes » immunologiquement sont caractérisées par la présence de nombreux lymphocytes infiltrant la tumeur. En effet, comme expliqué précédemment, les cellules tumorales, en mourant, vont émettre des signaux de danger et libérer des antigènes. Ces antigènes vont alors être captés par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Ces CPA vont pouvoir présenter ces antigènes tumoraux aux cellules T-CD8<sup>+</sup> permettant l'activation de leur fonction cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. Afin de pouvoir effectuer leur rôle anti-tumoral, ces lymphocytes vont devoir migrer jusqu'aux cellules tumorales afin de les reconnaître *via* le CMH de classe I. De plus, de nombreuses cytokines pro-inflammatoires peuvent être retrouvées dans le microenvironnement tumoral des tumeurs « chaudes » tels que les interférons de type I et II mais aussi certaines interleukines comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-2, l'IL-12 ou l'IL-23 (150). Ces tumeurs inflammées vont aussi présenter une signature IFN $\gamma$  corrélée avec l'expression de PD-L1. Cependant, en parallèle de cette inflammation anti-tumorale, des cellules immunosuppressives peuvent être attirées au sein du microenvironnement tumoral comme les lymphocytes T-régulateurs, les MDSCs ou les TAM2. Ces cellules immunosuppressives vont alors jouer leur rôle dans la régulation de l'immunité par, notamment, l'expression de PD-1 ou PD-L1. De plus, l'inflammation chronique due au cancer peut provoquer l'épuisement des cellules T-CD8<sup>+</sup>. Ce phénotype d'épuisement est caractérisé par la présence de points de contrôle immunitaires comme PD-1 (151).

Ces tumeurs inflammées vont donc avoir la capacité de lutter contre les cellules tumorales *via* les cellules immunitaires présentes au sein du microenvironnement tumoral. Cependant, la chronicité de cette pathologie va aussi entraîner en parallèle un phénomène de tolérance ayant pour finalité de restreindre l'immunité induite et pourra provoquer à terme la progression tumorale. Dans ce contexte, l'utilisation de l'immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1 prend alors tout son sens et c'est pour cela que de meilleures réponses cliniques à l'immunothérapie sont observées dans ce type de tumeur (152).

Comme vu précédemment, le CSTN est le sous-type de cancer du sein le plus infiltré en lymphocytes liée en partie par une charge mutationnelle élevée. Cependant, les cellules

tumorales peuvent induire un phénotype et un microenvironnement fortement immunosuppresseur avec la présence de CAF, TAM2 et lymphocytes T-reg associée à l'expression de cytokines immunosuppressives tel que le TGF- $\beta$  (153). Le CSTN est donc classifié de tumeur « froide » immunologiquement rendant l'utilisation de l'immunothérapie plus complexe.



**Figure 3:** Les différents immunophénotypes tumoraux. Les tumeurs « froides » ou immuno-désertiques sont caractérisées par une faible antigénicité et l'absence d'immunogénicité. Les tumeurs immuno-exclues seront marquées par un microenvironnement immunosuppresseur, une fibrose péri et/ou intra-tumorale et une angiogenèse accrue. Les tumeurs « chaudes » ou immuno-inflammées seront les plus à même de répondre à l'immunothérapie car elles auront la capacité de permettre l'infiltration en populations anti-tumorales via la libération de signaux de mort cellulaire immunogène et de cytokines inflammatoires.



### c. Immunothérapie dans le CSTN

Le cancer du sein n'étant pas considéré comme une tumeur immunogène, les premières études cliniques ont donné des résultats décevants mais ont révélé le CSTN comme étant le sous-type de cancer du sein le plus ciblable par les inhibiteurs de PD-1/PD-L1 (154). Les résultats des études cliniques utilisant un inhibiteur de l'axe PD-1/PD-L1 en monothérapie ont montré des réponses thérapeutiques durables mais seulement chez moins de 10% des patientes atteintes de maladies métastatiques. Pourtant, le cancer du sein triple négatif semble être aujourd'hui une cible prioritaire du fait d'un besoin thérapeutique important et d'une biologie tumorale semblant prédictive de l'efficacité de l'immunothérapie (infiltration en TILs, expression de PD-L1 et une charge mutationnelle élevée). Il a donc été nécessaire de trouver des solutions pour améliorer l'efficacité de l'immunothérapie.

Premièrement, en cherchant à identifier le sous-groupe de malades potentiellement répondeurs à cette immunothérapie (155).

- Les tumeurs de CSTN exprimant particulièrement PD-L1, contrairement aux autres sous-types de cancer du sein, l'utilisation de l'immunothérapie dans ce contexte semble alors adéquate. Effectivement, ces biomarqueurs ont prouvé leur intérêt et semblent bien être prédictifs de la réponse aux inhibiteurs de points de contrôles du système immunitaire (152,156). Par exemple, les résultats de l'essai clinique IMpassion 130 ont montré l'aspect prédictif du statut de PD-L1 sur les cellules immunitaires sur le bénéfice en survie globale et en survie sans progression avec l'immunothérapie dans le CSTN métastatique (157). En effet, La survie globale des patientes traitées par l'immunothérapie était de 25 mois dans le groupe PD-L1>1% et de 18,9 mois dans le groupe PD-L1 négatif. Il en est de même pour la survie sans progression avec une PFS de 7,5 mois *versus* 5,6 mois (157). Dans cette étude, l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales n'a pas donné d'information supplémentaire. Afin d'évaluer les différences de capacités prédictives des tests de détection de PD-L1, une sous-étude de l'étude IMpassion 130 a été réalisée et a mis en évidence une plus grande capacité prédictive de l'expression de PD-L1 évaluée en IHC à l'aide de l'anticorps SP142 (158). A la suite de ces résultats, en mars 2019, la FDA a alors approuvé l'anticorps SP142 de VENTANA comme test de diagnostic compagnon pour la sélection de patients atteints de CSTN et éligibles à l'atezolizumab (159).
- L'infiltration en cellules lymphocytaires pourrait aussi être un biomarqueur prédictif de réponse à l'immunothérapie dans le CSTN comme suggéré dans l'étude KEYNOTE-119 où un taux de TILs élevé semble associé à de meilleurs résultats cliniques avec le pembrolizumab qu'avec une chimiothérapie (160). Cette immuno-inflammation associée à l'expression de PD-L1 sur les cellules immunitaires a aussi été associée à une amélioration de la survie des patientes traitées par de l'atézolizumab (161).
- De plus, certains sous-types de CSTN pourraient donner des informations sur la réponse à l'immunothérapie. Par exemple, d'après certains résultats de l'étude

IMpassion130 présentés récemment, les tumeurs de type basal, présentant notamment une signature transcriptomique caractérisée par des gènes de la prolifération et de la réparation des lésions de l'ADN, seraient associées à une amélioration de la survie de patientes traitées par l'atézolizumab (161).

- Dans le CSTN métastatique, plusieurs études laissent supposer qu'un TMB élevé serait prédictif d'une réponse à l'immunothérapie. Par exemple, dans l'essai KEYNOTE-119 comparant l'efficacité du pembrolizumab à une chimiothérapie dans le CSTN métastatique, un TMB élevé est associé à une meilleure réponse clinique chez les patientes traitées par l'immunothérapie. De plus, les résultats de survie globale tendent à montrer le bénéfice d'un TMB élevé associé à l'utilisation du pembrolizumab (162). L'essai clinique de phase 2 TAPUR évaluant l'activité anti-tumorale du pembrolizumab dans le cancer du sein métastatique a lui aussi mis en évidence l'efficacité anti-tumorale de l'immunothérapie dans les cas de TMB élevés (163). De plus, une étude rétrospective dans le CSTN métastatique a montré qu'un fort TMB était associé à l'augmentation de la survie chez les patientes traitées par des thérapies anti-PD-(L)1 (164). En juin 2020, la FDA a approuvé l'utilisation du pembrolizumab chez les patients atteints de tumeurs solides et présentant une charge mutationnelle tumorale supérieure ou égale à 10. Cependant, dans le cancer du sein, les résultats restent toujours controversés comme le montre une analyse réalisée dans plusieurs types tumoraux et semble nécessiter de nouvelles études (165).
- La mise en évidence du déficit dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR), est le second biomarqueur validé et cliniquement disponible afin de prédire l'efficacité de l'immunothérapie dans les tumeurs solides. Cependant, cela concerne moins de 2% des cancers du sein et nécessite de plus amples investigations avant de l'envisager comme biomarqueur prédictif de réponse à l'immunothérapie (155,166).

Deuxièmement, l'association à un traitement permettant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires ou supprimant les signaux immunosuppresseurs permettrait de surmonter la résistance acquise à l'immunothérapie.

Les résultats de cette association sont aujourd'hui plutôt controversés. En effet, d'après les deux études cliniques NeoTRIPaPDL1 (NCT02620280) (167) et GeparNuevo (NCT02685059) (168), l'ajout d'inhibiteurs de PD-L1 à une chimiothérapie n'a pas donné d'amélioration de la réponse pathologique complète (pCR) chez les patientes présentant un cancer CSTN de phase précoce. Néanmoins, les résultats à long terme de l'essai GeparNuevo montrent un bénéfice en survie sans rechute et en survie globale pour les patientes ayant reçu du durvalumab, et ce malgré l'absence de bénéfice en pCR, et l'absence de phase adjuvante comprenant du durvalumab en post opératoire (169). Les résultats de deux nouveaux essais cliniques redonnent aujourd'hui de l'espoir dans la prise en charge du CSTN de phase précoce. L'essai clinique de phase III KEYNOTE-522 (NCT03036488) a montré l'efficacité du pembrolizumab en traitement néo-adjuvant et associé à la chimiothérapie. En effet, 64,8%

des patientes ont présenté une réponse pathologique complète sous immunothérapie face à 51,2% sous placebo (170). Les premiers résultats de l'essai clinique IMpassion031 (NCT03197935) ont été présentés au congrès de l'ESMO 2020 et concordent avec les données de l'essai précédant. Dans cet essai clinique de phase III, l'efficacité de l'atezolizumab a été évaluée dans le CSTN de phase précoce, en néoadjuvant et associé à un protocole de chimiothérapie contenant le nab-paclitaxel suivi de la doxorubicine (DXR) et du cyclophosphamide. Les résultats indiquent un taux de réponse pathologique complète de 57,6% comparé à 41,1% avec le placebo. Cependant, lorsque l'on sépare les patientes en sous-groupes de tumeurs PD-L1+ ou PD-L1-, ces résultats restent inchangés quel que soit le statut de PD-L1. Les résultats sur la sécurité et la toxicité de cette combinaison sont satisfaisants car il n'a pas été retrouvé d'effets indésirables supérieurs (171). Basé sur ces différents résultats d'essais cliniques, la FDA a récemment approuvé l'utilisation du pembrolizumab dans le traitement en néoadjuvant pour les patientes atteintes d'un CSTN de stade précoce à haut risque, en association avec une chimiothérapie puis en monothérapie après la chirurgie. L'évaluation de l'efficacité de l'immunothérapie en adjuvant est désormais nécessaire. L'étude ALEXANDRA/IMpassion030 (NCT03498716) est une étude de phase III actuellement ouverte évaluant l'efficacité, l'innocuité et le profil pharmacocinétique de l'atezolizumab associé à une chimiothérapie standard par rapport à la chimiothérapie seule, en adjuvant, dans le CSTN de stade précoce (172). Ces derniers résultats sont donc prometteurs et permettent d'envisager le traitement précoce de ces tumeurs empêchant donc l'arrivée au stade métastatique encore plus complexe à traiter.

Effectivement, les données concernant l'efficacité de l'immunothérapie dans le CSTN métastatique sont complexes. En 2018, l'étude de phase III IMpassion130 (NCT02425891) évaluant l'efficacité de l'atezolizumab plus nab-paclitaxel comparativement au nab-paclitaxel seul a donné ses premiers résultats. L'immunothérapie permettrait l'augmentation de la PFS de 5 à 7,5 mois dans le sous-groupe de patientes présentant un nombre de cellules immunitaires PD-L1+ supérieur à 1% (173). A la suite de ces résultats, la FDA (*US Food and Drug Administration*) et la Commission Européenne ont approuvé l'utilisation de l'atezolizumab plus nab-paclitaxel dans le traitement en première ligne du CSTN non résécable localement avancé ou métastatique exprimant plus de 1% de cellules immunitaires PD-L1 positives. La seconde analyse intermédiaire parue en 2020 a confirmé le bénéfice de l'association de l'atezolizumab au nab-paclitaxel uniquement chez les patientes présentant une tumeur PD-L1 positive (174). L'autorisation temporaire d'utilisation dont bénéficiait l'atezolizumab dans le traitement du CSTN métastatique a été remise en question suite aux résultats de l'essai clinique IMpassion131 (NCT03125902). En effet, cet essai clinique ayant le même design que l'étude IMpassion130 mais évaluant le paclitaxel, n'a pas montré de résultats significatifs en matière de PFS sur la population globale ou PD-L1+. Cette différence pourrait s'expliquer par une immunomodulation supérieure du nab-paclitaxel par rapport au paclitaxel mais aussi du fait de l'ajout de corticoïdes en prémédication du paclitaxel. La suspension d'ATU associée à l'avis défavorable rendu par la Haute Autorité de Santé en 2020

pour le remboursement de ce traitement, ne donne désormais plus accès à l'immunothérapie pour les patientes françaises atteintes de CSTN métastatique. Fin 2020, l'essai clinique de phase III KEYNOTE-355 (NCT02819518) évaluant l'efficacité de l'association d'une chimiothérapie avec le pembrolizumab *versus* placebo dans le CSTN métastatique, avait présenté des résultats préliminaires satisfaisants en termes de survie sans progression. En effet, chez les patientes présentant un score positif combiné (CPS) supérieur ou égale à 10 (PD-L1+), la médiane de survie sans progression était de 9,7 mois avec l'association chimio-immunothérapie contre 5,6 mois pour le groupe placebo-chimiothérapie (175). Ces résultats ont alors permis l'autorisation par la FDA du pembrolizumab en association avec une chimiothérapie pour le traitement du CSTN localement avancé non résecable ou métastatique dont les tumeurs expriment PD-L1. En juillet 2021, le laboratoire Merck/MSD a publié un communiqué de presse annonçant les résultats positifs de survie globale de cet essai clinique. L'association du pembrolizumab avec une chimiothérapie (paclitaxel, nab-paclitaxel ou gemcitabine/carboplatine) aurait démontré « une amélioration statistiquement et cliniquement significative de la survie globale par rapport à la chimiothérapie seule chez les patientes atteintes de CSTN métastatique et dont les tumeurs expriment PD-L1 (CPS supérieur ou égal à 10) » (176). Effectivement, lors du congrès de l'ESMO 2021, les résultats finaux de cette étude ont été exposés. La survie globale médiane des patientes atteintes de CSTNm avec un CPS>10 a été de 23 mois pour le groupe traité par immunothérapie+chimiothérapie contre 16,1 mois dans le groupe placebo+chimiothérapie. Cette combinaison avec le pembrolizumab a réduit le risque de décès de 27% et a permis un gain de survie sans progression de 4 mois (177). Ces derniers résultats donnent finalement de l'espoir pour ces patientes mais soulève l'obligation d'une meilleure sélection des patientes ainsi qu'une harmonisation des tests d'analyse de PD-L1. Aujourd'hui, il est donc désormais possible de prescrire le pembrolizumab, hors AMM, et après justification de son utilisation.

Les conclusions cliniques de ces essais montrent donc que l'efficacité de l'immunothérapie sous forme d'anti PD-1/PD-L1 dans le CSTN est d'autant plus importante qu'elle est utilisée précocement et en association avec la chimiothérapie. Dans le CSTN métastatique ou le pronostic est particulièrement sombre, il est donc crucial de déterminer les molécules de chimiothérapie les plus à même d'entrer en synergie avec les approches anti PD-1/PD-L1.

#### IV. Effets immunologiques des thérapeutiques anti-cancéreuses

Depuis l'arrivée de l'immunothérapie dans le traitement anti-tumoral et l'évaluation de son inefficacité dans certains types de cancers, l'objectif a été de trouver des solutions pour sensibiliser les tumeurs résistantes à cette thérapeutique. Comme vu précédemment, les

cellules tumorales sont instables du point de vue génétique avec une charge mutationnelle variable au sein de leur génome, ayant pour conséquence, notamment, une prolifération excessive et une survie favorisée. Néanmoins, c'est justement cette capacité de multiplication que les agents de chimiothérapies vont pouvoir venir cibler. De nombreuses chimiothérapies appartenant à différentes classes thérapeutiques et ayant un mécanisme d'action distinct ont été développées. Dans un contexte particulier, d'autres traitements, appelés thérapies ciblées, peuvent aussi être utilisés afin de cibler des protéines impliquées dans la transduction du signal pro-oncogénique. En plus de l'effet cytotoxique pur, ces thérapeutiques anti-cancéreuses peuvent aussi avoir des effets sur la modulation du système immunitaire. En effet, par leur action sur les cellules tumorales *via* l'induction de l'antigénicité et/ou de l'immunogénicité mais aussi sur les cellules immunitaires par la diminution de l'immunosuppression, ces traitements peuvent arriver à sensibiliser les tumeurs à une immunothérapie (178,179).

#### a. Antigénicité tumorale

L'antigénicité est la capacité d'une cellule à induire une réponse T par présentation d'un antigène du « non soi ». Ce phénomène implique la capacité de présentation antigénique des cellules tumorales mais aussi celle de reconnaissance des cellules immunitaires. En effet, l'antigénicité peut être induite notamment par l'augmentation de l'expression du CMH permettant l'amélioration de la capacité de présentation antigénique des cellules tumorales (180).

L'augmentation de l'expression du CMH de classe I peut faire suite à l'induction de la voie de signalisation STING *via* les IFN de type I. En effet, l'instabilité génomique induite par certaines thérapies ciblées peut générer des fragments d'ADN doubles brins (ADNdb) capables d'activer la voie des interférons. Par exemple, les inhibiteurs de PARP utilisés dans le traitement du cancer du sein métastatique présentant des mutations germinales BRCA1/2 peuvent induire un nombre élevé de cassures de l'ADN. Il a été montré que l'olaparib, dans des tumeurs murines ovariennes ainsi que des tumeurs humaines de CSTN mutées BRCA1, pouvait induire une stimulation de la voie de IFN de type I dépendamment de STING/TBK1/IRF3 dans les cellules présentatrices d'antigènes suite à la détection d'ADN tumoral ainsi qu'une augmentation de la maturation et une capacité de présentation antigénique de ces cellules (181,182). De plus, les inhibiteurs de PARP pourraient réguler à la hausse l'expression de PD-L1 dans différents modèles précliniques de cancer du sein et par conséquent, la combinaison du blocage de PD-L1 et de PARP induirait une efficacité additive contre la croissance tumorale (183). Les inhibiteurs de la voie oncogénique des MAP Kinase semblent aussi capables de jouer sur l'expression du CMH et de PD-L1. Par exemple, les inhibiteurs de MEK auraient la capacité d'augmenter l'expression du CMH I, CMH II et de PD-L1 *via* l'IFN $\gamma$ , ainsi que de favoriser l'infiltration tumorale en T-CD8<sup>+</sup>, sensibilisant ainsi les tumeurs à l'immunothérapie par anti-PD-(L)1 (184). Il a récemment été observé qu'une combinaison d'anti-PD-(L)1 et du tramétinib permettait une augmentation de l'expression du

CMH de classe I de PD-L1 via STAT1, *in vitro* dans des cellules CSTN humaines et murines, ainsi qu'*in vivo* chez la souris (185). Les inhibiteurs de CDK4/6 utilisés dans le traitement du cancer du sein métastatique ont aussi montré un effet sur l'expression du CMH en plus de leurs effets antiprolifératifs. En effet, il a été démontré que les inhibiteurs de la CDK4/6 peuvent augmenter les niveaux d'ADNdb intracellulaire, notamment dans des modèles murins de carcinomes mammaires, stimulant la production d'IFN de type III améliorant ainsi la capacité de présentation antigénique. Cette augmentation d'antigénicité permet, entre autres, une synergie anti-tumorale avec l'immunothérapie par anti-PD-L1 (186).

Le mécanisme « antigen spreading » est idéal pour augmenter l'antigénicité car permet la diversification de la réponse des T contre des épitopes antigéniques différents de l'épitope cible (187). Effectivement, une augmentation de la clonalité du TCR associée à une infiltration en TILs ou un enrichissement en gènes de l'inflammation et de l'immunité a été retrouvée dans des lésions métastatiques après chimiothérapies et radiothérapie (188). Les taux de réponses thérapeutiques étant associés à ces différentes inductions, ces résultats donnent alors une preuve de l'amorçage des tumeurs pour la réponse à l'immunothérapie par les chimiothérapies.

## b. Immunogénicité tumorale

L'immunogénicité est la capacité d'une cellule tumorale à induire une réponse immunitaire spécifique d'un ou plusieurs antigènes. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, les cellules tumorales peuvent générer des signaux de danger permettant l'activation des cellules immunitaires. Le concept de « mort cellulaire immunogène » (ICD) induit par des chimiothérapies a été démontré pour la première fois en 2005 par l'équipe du Pr. Guido Kroemer. Les résultats dans un modèle murin de cancer colique ont montré que la doxorubicine (DXR) entraîne une mort cellulaire par apoptose dépendante des caspases, rendant certaines cellules tumorales mourantes immunogènes. La distinction entre nécrose et apoptose est intéressante pour les analyses de mort immunogène. En effet, l'apoptose, contrairement à la nécrose, est une mort cellulaire programmée permettant l'expression de molécules impliquées dans la phagocytose (calréticuline). Ces corps apoptotiques peuvent être reconnus par des cellules de l'immunité telles que les cellules dendritiques et induire leur maturation et migration jusqu'aux ganglions lymphatiques. Les cellules nécrotiques vont quant à elles jouer un rôle dans l'inflammation avec la libération de facteurs nécrotiques contenus dans les cellules tumorales mourantes permettant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires (ATP, HMGB1). La présence de ces signaux de stress mis en jeu lors des étapes initiales de la mort immunogène permet ensuite aux cellules dendritiques de phagocyter les cellules tuées par la DXR et de les présenter aux cellules cytotoxiques. De plus, un phénomène de mémoire immunitaire a été mis en évidence par le rechallenge de souris syngéniques précédemment injectées par des cellules tumorales exposées à la DXR ne développant pas de nouvelle tumeur après une seconde injection (189). L'induction d'une mort immunogène fait appel à une cascade d'événements moléculaires ayant pour

conséquence la stimulation d'une réponse immunitaire anti-tumorale, et l'induction d'une réponse mémoire.

Le premier signal généré est l'exposition membranaire de la calréticuline (CRT) (190). En effet, les espèces oxygénées réactives produites par certaines chimiothérapies vont induire un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les cellules tumorales. Ce stress du RE va permettre la phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic initiation factor 2 $\alpha$* ) par la protéine kinase PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*). A la suite de cette phosphorylation, le facteur de transcription ATF4 va être traduit et induire l'expression des gènes cibles ISR (*integrated stress response*). L'induction de l'expression de ces gènes tels que *Ddit3* codant pour la protéine CHOP mais aussi l'activation de caspases vont provoquer l'activation du processus apoptotique. Tous ces événements moléculaires vont finalement conduire au transport vésiculaire de la calréticuline de la membrane du RE vers la membrane cytoplasmique de la cellule tumorale. La calréticuline va pouvoir se lier au récepteur CD91 des CPA et favoriser leur maturation ainsi que la présentation antigénique des débris cellulaires tumoraux aux cellules T. Une autre protéine endoplasmique associée à la CRT, appelée ERp57, peut être transloquée à la surface de la cellule et apparaît comme un autre signal d'engloutissement pour les cellules dendritiques. Il a été montré que ces deux protéines apparaissaient à la surface des cellules tumorales pré-apoptotiques suite à l'exposition à des chimiothérapies. Le blocage ou la perte de ces deux signaux va alors induire une perte d'immunogénicité pouvant aller jusqu'à l'induction d'une résistance à la mort cellulaire immuno-induite par les traitements (190,191). En effet, toute cette voie immunogène, partant de l'induction d'espèces oxygénées réactives jouant sur le stress du RE, l'activation de caspases jusqu'à l'exocytose de la CRT et de ERp57 sont impliquées dans l'efficacité anti-tumorale de certaines chimiothérapies et de leur immuno-modulation (192). La radiothérapie, induisant des dommages létaux à l'ADN des cellules tumorales, a aussi montré l'induction d'une mort cellulaire immunogène par notamment l'expression de la calréticuline à la membrane cytoplasmique associée à l'augmentation de composants impliqués dans la machinerie de traitement de l'antigène (193).

Le second événement est le relargage extracellulaire d'ATP *via* un processus autophagique (194). L'ATP est redistribué des lysosomes aux autolysosomes et sécrété par un mécanisme dépendant des caspases. L'ATP peut ensuite être relargué dans le cytosol *via* la protéine LAMP1 ou à l'extérieur de la cellule *via* la pannexine-1 (195). L'ATP va ainsi pouvoir se fixer sur son récepteur P2RX7 situé sur les cellules dendritiques et induire la formation de l'inflammasome NLRP3. NLRP3 va ensuite permettre l'activation de la caspase-1 et provoquer le clivage et la sécrétion d'IL-1 $\beta$  et d'IL-18. Ces deux cytokines sont connues pour avoir d'importantes propriétés inflammatoires ainsi qu'un rôle dans le renforcement de l'immunité médié par les cellules Th1 (196,197). De plus, l'ATP peut stimuler la motilité des cellules dendritiques. En effet, par une boucle de signalisation autocrine, l'ATP, par sa fixation à son récepteur et associé aux canaux de pannexine 1, va augmenter la vitesse de migration des cellules dendritiques (198). *In vitro*, il a été montré que la mort cellulaire induite par plusieurs

chimiothérapies a été accompagnée de la libération d'ATP extracellulaire (199). NLRP3 et l'IL-1 $\beta$  semblent essentiels pour l'immunogénicité de la mort cellulaire déclenchée par les chimiothérapies contribuant ainsi à une réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T-CD8 sécréteurs d'IFN $\gamma$  (200).

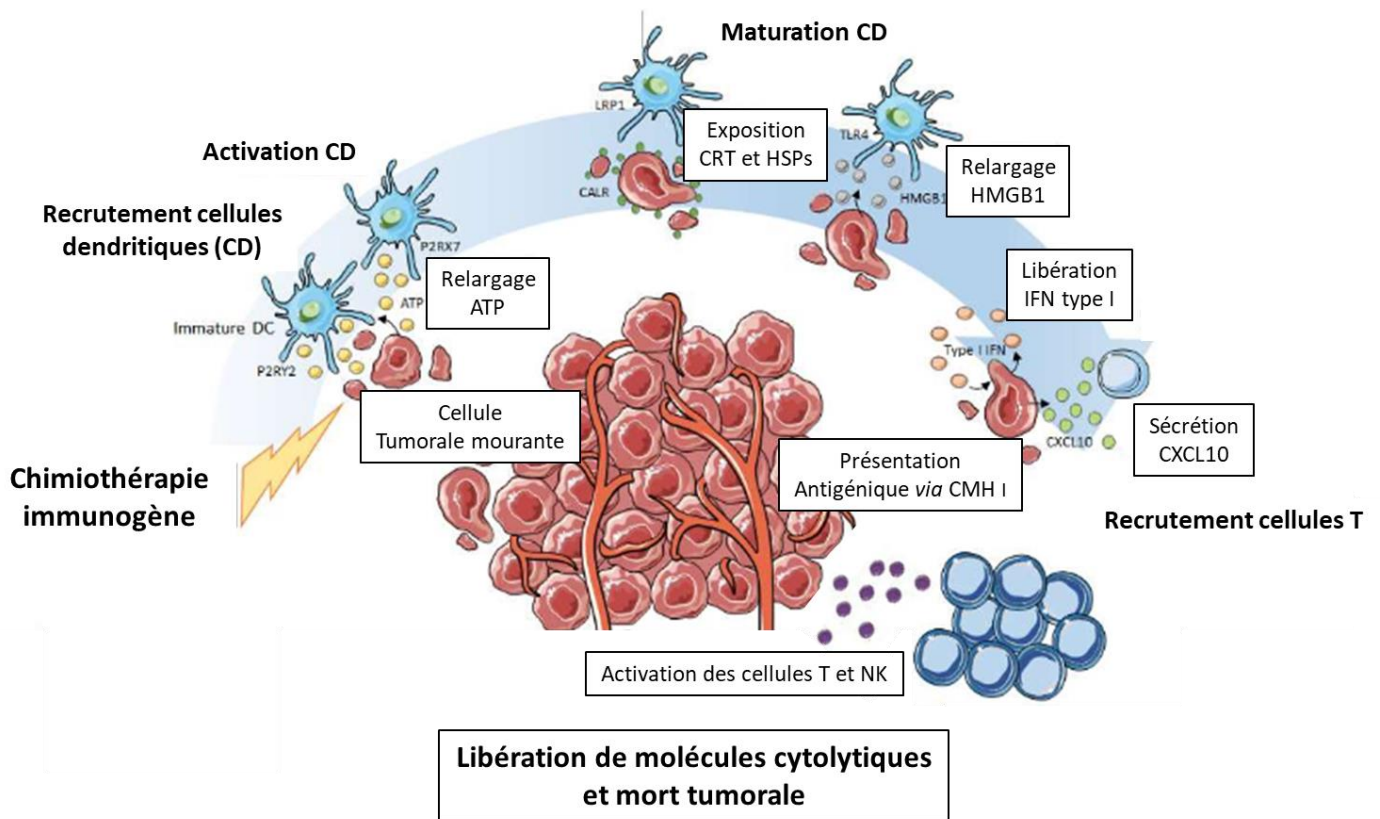
Le troisième signal est le relargage de la protéine nucléaire HMGB1. HMGB1 est une protéine nucléaire contenue dans de nombreux types cellulaires. Ce relargage peut faire suite à plusieurs mécanismes comme l'apoptose ou la nécrose mais être aussi impliqué dans l'autophagie (201). HMGB1 peut être relargué de manière active ou passive. La sécrétion active par des cellules inflammatoires fait suite à différents stimuli exogènes ou endogènes tels que les CpG-ADN, le TNF- $\alpha$ , les interférons ou la production de radicaux oxygénés. Cet environnement pro-inflammatoire va permettre la modification post-traductionnelle de l'HMGB1 qui va s'accumuler dans le cytoplasme des cellules puis être sécrété *via* des lysosomes. Cette sécrétion active est aussi caractérisée par l'interaction entre HMGB1 et CRM-1 (*Chromosome-Region Maintenance-1*) qui va permettre le passage du noyau au cytosol. La sécrétion passive tient compte du degré d'acétylation de l'HMGB1 et de sa liaison avec l'ADN double brin (202). En effet, en cas d'apoptose, l'HMGB1 sera hyper-acétylé et fortement fixé à l'ADN double brin limitant ainsi sa libération dans le milieu extracellulaire. A contrario, en cas de nécrose, l'hyper-acétylation de l'HMGB1 associée à sa faible liaison à l'ADN va faciliter sa sécrétion. C'est ainsi que l'HMGB1 est plutôt défini comme un marqueur cellulaire nécrotique (203). L'HMGB1 libéré dans le milieu extracellulaire va pouvoir être retrouvé sous trois formes redox différentes allant de la forme réduite, intermédiaire et oxydée. HMGB1 sous forme réduite lui procure ses capacités chemo-attractantes vis-à-vis des cellules inflammatoires *via* sa fixation du CXCR4 (204). L'HMGB1 sous forme disulfure induit la libération de cytokines pro-inflammatoires et agit comme une alarmine immunitaire (205). Il peut se lier aux TLR, notamment au récepteur TLR4 présent à la surface des cellules dendritiques. La liaison de l'HMGB1 au TLR4 va induire l'activation des cellules dendritiques et faciliter leur capacité à présenter des antigènes tumoraux aux cellules T (50). De plus, cette fixation peut ensuite activer une voie de signalisation dépendante de MyD88 améliorant le traitement des antigènes tumoraux et est essentielle dans l'immunogénicité tumorale (206). HMGB1 peut aussi stimuler la sécrétion de la chimiokine CXCL11 *via* l'activation de la voie NF- $\kappa$ B et va permettre d'augmenter le recrutement des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> (207). Dans un contexte apoptotique médié par la voie des caspases, le stress oxydatif est susceptible de diminuer l'activité immunitaire d'HMGB1, notamment par l'oxydation de cette protéine (201). De plus, cette protéine située dans le cytosol ou dans les mitochondries peut avoir un rôle dans la régulation de l'autophagie des cellules cancéreuses par la protection contre le clivage des protéines Beclin 1 et ATG5 contrôlant ainsi la balance entre apoptose et autophagie durant le processus inflammatoire (208,209). En effet, en se liant aux récepteurs RAGE ou TLR4, HMGB1 peut être impliqué dans la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 (210). L'effet immuno-adjuvant de chimiothérapies et de la radiothérapie reposant sur la libération d'HMGB1 a été mis en évidence dans différents modèles tumoraux. En effet,



l'efficacité de ces traitements serait due, notamment, à l'interaction entre l'HMGB1 sécrété par les cellules tumorales mourantes et le TLR4 sur les cellules dendritiques permettant l'absorption et le traitement de l'antigène tumoral (50).

Afin que les cellules immunitaires migrent avec succès vers les sites tumoraux il est nécessaire que les cellules tumorales aient des effets immunostimulants. Par exemple, il est important d'induire l'expression de cytokines attractantes pour les lymphocytes effecteurs telles que CCL2,3,4,5 CXCL9 et CXCL10 (211). Les chimiothérapies peuvent induire l'expression de ces chimiokines et de leur récepteur contrôlant ainsi la progression tumorale tout en étant associées à la survie des patients (212). Un des mécanismes mis en évidence dans l'induction de ces cytokines étant l'activation de la voie des interférons de types I. En effet, les agents cytotoxiques ciblant l'ADN/ARN peuvent stimuler l'expression de TLR3 (213). Suite à l'activation de TLR3, les cellules tumorales peuvent exprimer et sécréter l'IFN $\alpha$  et  $\beta$ . Les interférons vont alors induire à leur tour, l'expression et la sécrétion de la chimiokine CXCL10 *via* leur récepteur membranaire IFNARI (214). CXCL10 est une chimiokine particulièrement importante dans l'activation de la réponse immunitaire anti-tumorale car elle permet l'attraction des lymphocytes T effecteurs CXCR3<sup>+</sup> au niveau tumoral (215). Les chimiothérapies immunogènes peuvent aussi agir sur d'autres axes cytokiniques comme celui de l'axe CCL2/CCR2. L'augmentation de l'expression de cette cytokine conduit alors au recrutement des cellules dendritiques présentatrices d'antigènes fonctionnels directement au site tumoral permettant ainsi la prolifération des lymphocytes T (216).

Un autre marqueur d'immunogénicité est la libération des protéines chaperonnes de la famille des protéines de choc thermique : HSP70 et 90 par les cellules tumorales pré-apoptotiques. En effet, ces protéines peuvent aider à la présentation des antigènes tumoraux *via* le CMH I aux lymphocytes T-CD8<sup>+</sup>. De plus, ces protéines peuvent être relarguées par les cellules tumorales et se lier aux TLR2/4 sur les cellules présentatrices d'antigènes. Cette liaison va ensuite permettre la libération de cytokines pro-inflammatoires permettant de stimuler le système immunitaire inné notamment les cellules NK (217). C'est ainsi que plusieurs chimiothérapies ont montré leur impact sur l'intensité de l'expression des HSP et la corrélation avec le taux de phagocytose des cellules tumorales mourantes par les cellules dendritiques immatures (218).



**Figure 4:** La mort cellulaire immunogène. Certaines chimiothérapies dites immunogènes sont capables d'induire un stress du RE favorisant le processus apoptotique. Cet événement conduit au transport de la calréticuline de la membrane du RE vers la membrane des cellules tumorales mourantes ainsi que la libération des protéines HSPs vont agir comme un signal « mange-moi » pour les cellules présentatrices d'antigène. Il s'ensuit la libération d'ATP et d'HMGB1 dans l'espace extracellulaire et l'activation d'une réponse intrinsèque de type interféron de type I aboutissant à la production de chimiokines telle que CXCL10. Ce processus la mort cellulaire immunogène va finalement conduire au recrutement de cellules cytotoxiques ayant pour rôle de tuer les cellules tumorales persistantes. D'après Galluzzi et al, 2016.

### c. Impact sur l'immunosuppression

Dans le chapitre précédent nous avons parlé des différentes populations immunosuppressives pouvant être recrutées ou stimulées par le biais des cellules tumorales et pouvant induire une résistance vis-à-vis de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les chimiothérapies peuvent elles aussi impacter ces populations notamment vis-à-vis de leur prolifération ou de leur fonctionnalité. Prenons exemple du cyclophosphamide, plusieurs études ont caractérisé les interactions de cette chimiothérapie vis-à-vis des lymphocytes T régulateurs. Dans des modèles murins, le cyclophosphamide a en effet montré sa capacité à dépléter les T-reg dans les tumeurs coliques (219). Cette chimiothérapie a aussi permis de diminuer les T-reg circulant ainsi que de restaurer la fonction effectrice des cellules NK et des cellules T chez des patientes ayant un cancer avancé (220). De plus, la cytotoxicité de cette chimiothérapie peut agir sur la fonctionnalité des T-reg en diminuant leur activité immunosuppressive (221). Dans un modèle cellulaire de lymphome, le paclitaxel a permis lui

aussi de diminuer le taux de lymphocytes T-reg ainsi que l'expression de Foxp3 affectant leur fonction inhibitrice (222). L'utilisation de thérapies ciblées telles que les inhibiteurs de la voie PI3K-AKT ont montré, dans différents modèles tumoraux *in vitro* et *in vivo*, l'inhibition sélective du nombre mais aussi de l'activation des lymphocytes T régulateurs (223). La gemcitabine et le 5-fluorouracile (5FU) ont montré une cytotoxicité assez sélective envers les MDSCs dans un modèle de carcinome thymique sans montrer d'effet significatif sur les cellules anti-tumorales. Plus particulièrement, la sensibilité du 5-FU envers les MDSCs, permettant leur épuisement et la mort cellulaire, serait due à une faible expression de la thymidilate synthase par ces cellules. Cet effet induirait une mort cellulaire apoptotique des MDSCs ce qui permettrait d'augmenter la production d'IFN $\gamma$  par les T-CD8 $^+$  infiltrant la tumeur (224). En 2017, notre équipe a montré la modulation de différentes populations immunosuppressives par le schéma de traitement FOLFOX+bevacizumab dans le cancer colorectal métastatique. Un des résultats majeurs a été la mise en évidence d'une diminution des gMDSC exprimant des niveaux élevés de molécules immunosuppressives telles que PD-L1, CD39 et CD73 dans les tumeurs traitées. Cependant, ces traitements ont aussi induit la modulation de l'équilibre T-régulateurs/Th17 associant l'augmentation des Th17 à un mauvais pronostic (225).

Certaines molécules immunosuppressives peuvent aussi être la cible de thérapies anti-cancéreuses permettant ainsi de restaurer l'efficacité du système immunitaire médiée par l'immunothérapie. Par exemple, le ciblage des récepteurs de l'adénosine semble être synergique avec un anti-PD-1. En effet, dans un modèle préclinique de CSTN, l'efficacité de cette combinaison, dépendamment des cellules NK, de l'IFN $\gamma$  et des T-CD8 $^+$ , a permis de diminuer la charge tumorale métastatique et de prolonger la survie des souris (226). Le ciblage du TGF- $\beta$  peut aussi permettre de diminuer l'immunosuppression et de limiter la formation de fibrose intra et péri-tumorale. L'inhibition du récepteur de type II du TGF- $\beta$  dans différents modèles murins tumoraux, a permis l'induction d'une forte réponse cytotoxique T, diminuant ainsi la capacité métastatique des tumeurs (227). Dans le modèle murin de cancer du sein immuno-exclu EMT6, l'ajout d'un anticorps monoclonal bloquant le TGF- $\beta$  à un anti-PD-L1, restaure l'efficacité de l'immunothérapie par diminution de l'immuno-exclusion des cellules T-CD8 $^+$ . En effet, ce traitement va provoquer la reprogrammation des fibroblastes du stroma péri-tumoral et permettre l'attraction et l'activation des cellules cytotoxiques dans le cœur de la tumeur (81). Le M7824 ou bintrafusp alpha est une protéine de fusion bifonctionnelle ciblant le TGF- $\beta$  par mimétisme avec son récepteur le TGF- $\beta$ RII et PD-L1. Cette molécule permet d'augmenter le recrutement, l'activation et la fonctionnalité des cellules T cytotoxiques par rapport à la combinaison d'anticorps. En effet, cette molécule va inhiber les deux formes d'immunosuppression induites par PD-L1 et le TGF- $\beta$  mises en évidence, notamment, par une réduction de l'expression de l' $\alpha$ -SMA, un marqueur de CAF, et d'un remodelage des fibres de collagènes dans les tumeurs (228).

Malgré l'efficacité des chimiothérapies dans la lutte contre l'immunosuppression, certaines d'entre elles, dans certains contextes, peuvent produire l'effet inverse et participer au phénomène de résistance tumorale. Par exemple, il a été montré que la gemcitabine et le

5-FU entraînaient l'activation de l'inflammasome dans les MDSC, induisant à son tour l'activation de l'IL-1 et conduisant à la production d'IL-1 $\beta$ . L'IL-1 $\beta$  produite par les MDSC induisait alors la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes T-CD4 limitant ainsi l'efficacité anti-tumorale de ces agents thérapeutiques (229). De plus, l'exposition chronique à certaines chimiothérapies comme le cisplatine ou le paclitaxel peut engendrer une modification du phénotype des cellules cancéreuses pulmonaires. Ces cellules devenues fusiformes ont alors exprimé différents marqueurs de l'EMT et ces marqueurs mésenchymateux ont été associés à une diminution de survie chez les patients traités par ces chimiothérapies (230). Ces chimiothérapies peuvent aussi induire une résistance tumorale par augmentation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ . En effet, dans le CSTN, après une réponse initiale à la chimiothérapie certaines patientes peuvent récidiver et développer une maladie métastatique résistante aux traitements. Les cellules tumorales résistantes ont été apparentées à des cellules souches cancéreuses agressives, capables d'auto-renouvellement et associées à une signature génique du TGF- $\beta$  (231). En effet, l'évaluation de biopsies de patientes atteintes de CSTN avant et après traitement, montrent une augmentation des marqueurs de la voie du TGF- $\beta$  tels que les gènes *Tgfbr2*, *Tgfbr3* et *Smad4*. De plus, *in vitro*, le traitement au paclitaxel a augmenté la phosphorylation de SMAD2 mais aussi l'expression de l'IL-8 dépendamment de SMAD4 (231).

Ces différents moyens permettant de moduler le système immunitaire semblent donc aujourd'hui indispensables pour une utilisation efficace de l'immunothérapie. Dans le CSTN, notamment métastatique, l'évaluation des effets immunologiques des chimiothérapies utilisées est donc nécessaire afin de déterminer une combinaison chimio-immunothérapie adéquate.

## V. [Sensibilisation à l'immunothérapie par les chimiothérapies du CSTN](#)

L'impact sur le système immunitaire des traitements habituellement utilisés dans le CSTN tels que les anthracyclines et les taxanes est particulièrement bien décrit dans la littérature. Grâce aux résultats prometteurs, leur association à l'immunothérapie a donc été développée avec succès en phase précoce (néoadjuvant). Cependant, les effets sur le système immunitaire d'autres traitements utilisés couramment dans le CSTN en phase métastatique (comme les sels de platine ou l'éribuline) sont assez peu étudiés et pourraient avoir un intérêt en particulier chez les patientes ayant rechutées malgré l'utilisation en phase précoce des taxanes et des anthracyclines.

Les anthracyclines sont une famille de chimiothérapies largement utilisée dans le traitement du cancer du sein du fait de leur faible toxicité et de leur fort pouvoir anti-tumoral *via* l'inhibition des topoisomérases de type II et les cassures doubles brins d'ADN ainsi

généérées. Depuis les années 2000, les anthracyclines sont connues pour avoir un effet immunomodulateur (232,233). Depuis cette date, de nombreuses études ont mis en lumière le rôle du système immunitaire dans l'efficacité de ces traitements. Dans un modèle humain de cancer colorectal il a été montré que le paclitaxel et la doxorubicine, à de faibles doses, augmentent l'expression intracellulaire de protéines impliquées dans le processus de traitement des antigènes présentés par le CMH de classe I. De plus, les cellules tumorales prétraitées par ces chimiothérapies génèrent des antigènes plus susceptibles d'induire des cellules T très cytotoxiques (234). En effet, la doxorubicine provoquerait l'activation des ROS en plus des dommages sur l'ADN. Ces phénomènes induiraient l'activation de la voie des ISR comme les protéines ATF4, ATF3 et CHOP. Une augmentation de l'HMGB1 dans le surnageant cellulaire et de l'expression de la calréticuline a aussi été retrouvées *in vitro* dans des lignées humaines de CSTN (235). L'efficacité des anthracyclines implique aussi la libération d'ATP permettant de stimuler des précurseurs granulocytaires et impliqués dans la présentation antigénique (236). De plus, par les dommages à l'ADN induits par cette chimiothérapie, TLR3 peut induire l'expression des interférons de type I. Ces IFN I vont pouvoir se lier à leur récepteur IFNARI et induire l'expression de CXCL10 permettant l'induction de la réponse immunitaire anti-tumorale (214). Les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> et l'IFN $\gamma$  joueraient un rôle clé dans l'effet anti-tumoral de la doxorubicine. Ces résultats ont été démontrés dans des modèles de tumeurs murines mammaires mais aussi sur 2 cohortes de femmes traitées pour un cancer du sein (237). L'essai clinique TONIC confirme l'impact de la doxorubicine chez les patientes présentant un CSTN métastatique en montrant l'induction tumorale de gènes impliqués dans l'axe PD-1/PD-L1 et dans la cytotoxicité des cellules T mais aussi par l'activation des voies de l'inflammation, JAK-STAT et du TNF $\alpha$  (188). Dans un modèle de cancer du sein HER2+ résistant au trastuzumab, un conjugué anti-HER2 portant un dérivé d'anthracycline a permis d'induire ce phénomène de mort immunogène des cellules tumorales. Son association à un aPD-1 a amélioré la régression tumorale après traitement (238). Par sa capacité de stimulation du système immunitaire, la doxorubicine semble donc être une molécule de chimiothérapie idéale pour l'association à l'immunothérapie. Effectivement, nous pouvons retrouver de meilleurs résultats en phase précoce (néoadjuvant) dans les essais où ces molécules sont présentes dans le protocole de traitement (IMpassion), par rapport aux essais réalisés sans anthracyclines (NeoTRIPaPDL1).

Les taxanes, par leur action anti-mitotique interfèrent avec la dynamique des microtubules induisant l'arrêt de la division cellulaire en phase G2 ou M. En plus de leur effet anti-néoplasique, les taxanes peuvent moduler la réponse immunitaire. Les dommages cellulaires causés par le paclitaxel peuvent en effet augmenter l'expression du CMH de classe I et du ligand Fas, décrit comme un inducteur d'apoptose, dans des cellules tumorales ovariennes (180). Une augmentation d'HMGB1 dans le surnageant cellulaire et de l'expression de la calréticuline a été retrouvée *in vitro* dans des lignées humaines de CSTN après l'incubation avec le paclitaxel (235). De manière similaire aux LPS, *via* le TLR4, le paclitaxel induirait la reprogrammation macrophagique du phénotype M2 en M1. Il permettrait ainsi

l'activation des macrophages et leur sécrétion de cytokines comme le TNF $\alpha$  et l'IL-12 (239). Ces cytokines produites vont pouvoir activer les cellules NK mais aussi les cellules dendritiques et les lymphocytes T cytotoxiques afin d'éliminer les cellules tumorales (240). En effet, dans un modèle cellulaire humain de carcinome mammaire, le paclitaxel augmenterait l'expression et la production de perforine par les cellules NK et activerait la voie inflammatoire de NF-kappa B (241). Une augmentation d'autres cytokines telles que l'IFN $\gamma$ , l'IL-2 ou l'IL-6 impliquées dans les réponses Th1 ou Th2 a été mise en évidence dans des sérums de patientes atteintes de cancer du sein avancé et traitées par du paclitaxel ou du docétaxel (242). De plus, le docétaxel agirait sur l'immunosuppression par la diminution des MDSCs et l'augmentation de l'activité des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> (243). Ces données permettent donc de bien comprendre l'intérêt d'utiliser ces molécules dans le traitement du CSTN et l'efficacité du paclitaxel et du nab-paclitaxel associés à l'atezolizumab est en cours d'évaluation (essais Impassion131-130).

L'éribuline est un inhibiteur de la polymérisation des microtubules induisant un blocage du fuseau mitotique prolongé et irréversible donnant lieu à une mort cellulaire par apoptose (244). En phase préclinique, des résultats indiquent que l'éribuline conserverait son activité sur des lignées cellulaires tumorales ovariennes présentant des mutations de la bêta tubuline et résistantes au paclitaxel (245). Tout comme les traitements ciblant la tubuline, l'éribuline semble avoir également un effet anti-vasculaire. En effet, par l'évaluation immunohistochimique du marqueur endothélial CD31, dans des lignées tumorales mammaires humaines injectées dans des souris immunodéficientes, l'éribuline montre une modulation morphologique de la vascularisation tumorale par l'augmentation de la micro-vascularisation. Cet effet est associé à une induction de la perfusion tumorale suivant l'injection de cette drogue (246). Une étude clinique comparant la réoxygénation des tumeurs après éribuline et bevacizumab, un anti-VEGF, montre une meilleure oxygénation tumorale avec l'éribuline (247). De plus, environ une semaine après traitement, l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse diminue (246) ainsi que les concentrations plasmatiques de VEGF et de TGF- $\beta$ 1 (247). Une autre fonction particulièrement intéressante est envisagée dans cette étude. L'éribuline, par l'augmentation de la micro-vascularisation et de la micro-perfusion tumorale permettrait une meilleure délivrance d'un autre traitement administré par la suite (248). En revanche, dans la littérature, peu de données existent sur l'impact de cette molécule sur les cellules immunitaires dans le cancer du sein. Cependant, par la modulation du microenvironnement vasculaire tumoral, son association avec une immunothérapie pourrait permettre d'augmenter l'efficacité anti-tumorale, en favorisant par exemple la migration des cellules T. Les résultats de l'essai clinique de phase Ib/II ENHANCE1 (NCT02513472) sont encourageants notamment vis-à-vis de l'activité anti-cancéreuse de l'association éribuline / pembrolizumab (anti PD-1) dans le CSTN métastatique en 1<sup>ère</sup> et 2<sup>nd</sup> ligne de traitement (249). Effectivement, les premiers critères d'évaluation étaient la sécurité de cette association ainsi que le taux de réponse objectif évalué par les critères RECIST. Aucune dose limite de toxicité n'a été observée dans cette étude et l'ORR évalué est de 23,4%. De plus, comparativement aux études évaluant le pembrolizumab ou l'éribuline en

monothérapie, l'association de ces deux molécules semble être prometteuse. Dans le groupe de patientes n'ayant pas reçu d'autres lignes de traitement, l'ORR est de 26% alors qu'il était de 21% après pembrolizumab (250) ou de 10% après traitement par éribuline seul (251). Après plusieurs lignes de traitement, nous retrouvons ce bénéfice avec un ORR de 22% pour l'association contre 5-12% avec le pembrolizumab en monothérapie (252,253). Au niveau de l'évaluation de la survie, chez les patientes présentant un statut PD-L1<sup>+</sup>, la SSP est de 4,2 mois avec l'association contre 1,9 mois pour l'immunothérapie seule et l'OS de 16,2 mois contre 11,2 mois (254). Ces différents résultats suggèrent donc une association prometteuse en terme de sécurité et d'efficacité.

Le cisplatine a été le premier de la famille des sels de platine à être approuvé par la FDA en 1978 et a montré un intérêt majeur dans le traitement de nombreux cancers tels que les cancers du testicule, de l'ovaire, de la sphère ORL, de l'œsophage, etc. Cette petite molécule contient seulement un atome de platine relié à 2 amides et 2 chlorures et va venir se lier aux bases puriques de l'ADN après hydrolyse afin de former des adduits. Ces adduits vont empêcher la transcription et la synthèse d'ADN (255). L'activation de la voie des caspases induit alors l'apoptose de la cellule endommagée en cas de système de réparation de l'ADN défectueux ou surpassé. Le cisplatine induit également les espèces oxygénées réactives aboutissant aussi à l'élimination de la cellule cancéreuse (256). Dans un modèle cellulaire de cancer mammaire le cisplatine a permis l'induction de la sécrétion d'IFN $\beta$  dans le surnageant cellulaire mesuré par ELISA. De plus, cette molécule permet d'augmenter l'expression du CMH de classe I (257). Peu de données dans le cancer du sein permettent donc de prédire l'efficacité de cette chimiothérapie *via* l'activation du système immunitaire. Cependant, un essai clinique de phase III (NCT01287624) envisage le cisplatine comme une alternative au paclitaxel, en association à la gemcitabine, en première ligne dans le CSTN métastatique. En effet, cette association ne montre pas d'effet inférieur ou supérieur sur la PFS par rapport au paclitaxel/gemcitabine (258). En 2019, l'essai clinique TONIC (NCT02499367) apporte de nouveaux éléments sur l'impact du cisplatine sur l'immunomodulation du microenvironnement tumoral dans le CSTN métastatique (188). Cette étude de phase II évalue l'efficacité de l'association du nivolumab avec différents traitements tels que la radiothérapie, le cyclophosphamide, la doxorubicine ou le cisplatine. Le cisplatine a donné l'un des meilleurs taux de réponse objectif évalué grâce aux critères RECIST avec un ORR de 23%. L'évaluation des biopsies avant et après traitement par cisplatine indique une augmentation de l'infiltration en cellules T ainsi qu'un enrichissement en gènes associés à l'immunité. En effet, nous retrouvons une hyper régulation de gènes associés à la cytotoxicité cellulaire T, à l'inflammation ou encore de gènes impliqués dans l'axe PD-1/PD-L1. Le cisplatine permettrait donc de préparer les tumeurs à la réponse à l'inhibiteur de PD-1, c'est pourquoi, à la suite de ces résultats, l'essai clinique TONIC-2 (NCT04159818) a été ouvert et est aujourd'hui en cours de recrutement. Cet essai clinique de phase II aura pour but d'évaluer la réponse immune liée au cisplatine en association avec le nivolumab dans le CSTN métastatique.

Fort de ces données précliniques et cliniques issues de la littérature, en particulier :

- 1) L'important besoin médical pour les patientes atteintes de CSTN métastatique résistant aux taxanes/anthracyclines du fait de rechutes après traitement à visée curative.
- 2) Les résultats pour le moment compliqués à évaluer des anti-PD-L1 en association aux taxanes en première ligne du CSTN métastatique.
- 3) L'importance du choix du partenaire de chimiothérapie pour synergiser au mieux avec l'immunothérapie anti PD-1/PD-L1 dans le CSTN.

Il nous est donc apparu intéressant d'étudier les effets immunologiques potentiels de chimiothérapies majeures du CSTN, et dont les interactions avec la réponse immunitaire anti tumorale sont encore peu décrites à l'heure actuelle : le cisplatine et l'éribuline. Nous avons souhaité combiner ces deux chimiothérapies car l'association semble être potentiellement faisable chez l'homme et permettrait d'augmenter l'efficacité anti-tumorale. A partir de ces résultats précliniques, nous avons voulu étudier la façon la plus rationnelle d'administrer ces traitements en association avec l'immunothérapie de façon à synergiser de la manière la plus optimale avec ce traitement. Ici seront présentés les résultats obtenus au cours de ma thèse et pour lesquels un article est actuellement en cours d'écriture.

De plus, nous avons effectué une revue de la littérature afin de répertorier les traitements ayant un impact sur le micro-environnement immunitaire des tumeurs mammaires et pouvant potentiellement permettre d'améliorer la réponse à une immunothérapie par anti-PD(L)1. Cette revue, intitulée « *Therapeutic associations comprising anti-PD-1/PD-L1 in breast cancer: clinical challenges and perspectives* », a été acceptée et est en cours de publication dans le journal « *Cancers* ». Cette revue est présentée en annexe 11 du manuscrit.



## OBJECTIFS

Comme nous l'avons vu précédemment, le CSTN est fréquemment résistant à un traitement par immunothérapie anti PD-(L)1 utilisé en monothérapie, c'est pourquoi l'utilisation de chimiothérapies « immunogènes » pourrait avoir un intérêt synergique afin de sensibiliser les tumeurs aux inhibiteurs de points contrôle immunitaire.

L'objectif principal de ce travail est la caractérisation des effets immunologiques, en particulier sur la réponse immunitaire anti-tumorale, de deux chimiothérapies fréquemment utilisées en clinique dans le CSTN métastatique : l'éribuline et le cisplatine, dont nous avons évalué les effets en monothérapie et/ou en combinaison. En effet, les effets immunologiques de l'éribuline ayant été peu évalués dans la littérature, et le cisplatine, identifié comme une nouvelle chimiothérapie immunostimulante par l'essai TONIC, semblent être des chimiothérapies adéquates. De plus, leur association, potentiellement faisable chez l'homme, pourrait permettre d'augmenter l'efficacité anti-tumorale. Nous avons utilisé le modèle murin de cancer du sein caractéristique de nombreuses tumeurs de CSTN métastatique : le modèle « froid » immunologiquement et résistant à l'immunothérapie 4T1. Afin de valider ces résultats sur un autre modèle de cancer du sein ayant un phénotype différent des tumeurs 4T1, nous avons utilisé le modèle immuno-exclu EMT6.

- a) Premièrement, nous avons souhaité étudier les effets thérapeutiques et immunologiques de cette combinaison de chimiothérapies *in vivo* dans les modèles 4T1 et EMT6. Pour cela, nous avons mis en évidence leur impact sur les différentes populations immunitaires présentes au niveau intra-tumoral par des analyses transcriptomiques, de cytométrie en flux et d'immunohistochimie.
- b) Deuxièmement, afin d'expliquer les effets immunologiques précédemment retrouvés *in vivo*, il a été nécessaire d'évaluer l'effet des chimiothérapies sur les lignées cancéreuses murines 4T1 et EMT6 *in vitro*. Tout d'abord, nous avons caractérisé l'efficacité *in vitro* des chimiothérapies, afin d'établir un profil de dose à utiliser pour les futures expériences et permettant de caractériser autant de cellules vivantes que mourantes. Grâce à ces données de viabilité cellulaire, nous avons réalisé plusieurs expériences *in vitro* dans nos deux modèles murins permettant d'évaluer l'effet des chimiothérapies sur les différents marqueurs de mort immunogène tels que la translocation de la calréticuline à la membrane cytoplasmique, la sécrétion d'ATP et d'HMGB1. De plus, nous avons étudié les voies inflammatoires/CXCL10 ainsi que l'antigénicité des cellules tumorales (expression des molécules de classe 1 et des protéines associées à la présentation antigénique).
- c) A la suite de ces résultats, nous avons pu proposer une combinaison rationnelle d'association de ces chimiothérapies avec une immunothérapie, pouvant servir de base de réflexion à une telle association en clinique humaine chez les patientes atteintes de CSTN métastatique.

- d) Cependant, malgré l'utilisation de cette association prometteuse, certains mécanismes d'immuno-résistance semblent se mettre en place après l'utilisation de ces traitements. Nous avons donc ensuite mis en évidence certains de ces phénomènes par cytométrie en flux et par coloration histochimique.
- e) Après avoir fait ressortir le TGF- $\beta$  comme cible potentiel pour lutter contre cette immuno-résistance, nous avons souhaité valider notre hypothèse et évaluer son expression par RTqPCR dans différentes populations cellulaires intra-tumorales précédemment isolées.
- f) Enfin, après avoir validé l'efficacité de l'association éribuline/cisplatine et des immunothérapies ciblant PD-L1 et le TGF- $\beta$ , nous avons analysé leur impact sur les différents signaux d'antigénicité et d'immunogénicité ainsi que sur les populations immunitaires anti-tumorales et immunosuppressives présentes dans les tumeurs 4T1.

## MATERIELS ET METHODES

### Culture cellulaire *in vitro*

Nous avons utilisé les lignées cellulaires murines de cancer du sein 4T1, EMT6 et TS/A provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les lignées cellulaires 4T1 et EMT6 sont cultivées dans du milieu *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640 de chez D.Dutscher) et supplémentée avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF de PAN Biotech) plus 1% d'un cocktail d'antibiotiques (Pénicilline, Streptomycine et amphotéricine B de chez D.Dutscher) et la lignée TS/A dans du milieu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM de chez D.Dutscher) 10% SVF et 1% PSA. Ces lignées sont cultivées dans une étuve à 37°C contenant 5% de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. L'ensemencement s'effectue après trypsination des cellules puis comptage au microscope dans une covaslide afin d'avoir un nombre identique de cellules par puits. La concentration cellulaire utilisée a été trouvée à la suite d'expériences de prolifération au MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Thermo Fisher Scientific) et correspond à un nombre de cellules par puits en phase de croissance après 48 heures de culture.

### Expériences *in vivo*

Les expériences de croissance tumorale et d'immunomonitoring ont été effectuées dans un modèle de souris femelles immunocompétentes Balb/cByJ et/ou immunodéficientes Nude NMRI âgées de 6 semaines et fournies par l'élevage Charles River. Les souris MMTV-PyMT ont été fournies par « The Jackson Laboratory ». Les souris MMTV-PyMT ont été génotypées par le personnel du centre de zootechnie de l'université de Bourgogne afin d'isoler les souris porteuses du transgène MMTV-PyVmt. Les animaux sont logés dans une zone EOPS dont les conditions environnementales et alimentaires sont rigoureusement contrôlées.

Les cellules 4T1, EMT6 et TS/A ont été injectées à la concentration de 100 000 cellules/100 µL de NaCl 0,9% en orthotopique, au niveau de la glande mammaire abdominale droite. Le volume tumoral est calculé à partir de mesures 2 à 3 fois par semaine au pied à coulisse et grâce à la formule suivante : volume tumoral (mm<sup>3</sup>) = (largeur<sup>2</sup> \* longueur) / 2. La randomisation a été réalisée en moyenne 7 à 10 jours après l'injection des cellules tumorales, lorsque la tumeur atteint 40 mm<sup>3</sup>. Le poids des animaux est mesuré quotidiennement afin de contrôler une trop forte toxicité des traitements, caractérisée par une perte de poids supérieure à 20%. Cette perte de poids correspond à un point éthique limite qui nécessite le sacrifice de l'animal.

## Traitements

### Traitements *in vitro*:

Les concentrations thérapeutiques utilisées *in vitro* ont été choisies à la suite d'expériences de croissance cellulaire au MTT après un effet dose de chimiothérapies. Les résultats des courbes de viabilité cellulaire nous ont permis de mettre en évidence la concentration inhibitrice permettant d'atteindre 50% de cytotoxicité cellulaire (IC50) à 48h (figure 4B). La doxorubicine a été ajoutée en tant que contrôle positif induisant l'expression des différents marqueurs de mort immunogène. L'interféron  $\beta$ 1 (10nM) et le TGF- $\beta$ 1 (2nM) ont été utilisés comme contrôles positifs d'activation de leur voie de signalisation.

Le galunisertib (LY215729, Selleckchem) a été repris dans du DMSO (10 mM) puis a été utilisé aux concentrations de 10 nM, 100 nM et 1  $\mu$ M.

### Traitements *in vivo* :

L'éribuline a été injectée par voie intraveineuse dans la veine de la queue à la concentration de 1 mg/kg, diluée dans du NaCl 0.9%. Deux injections d'éribuline ont été réalisées dans un intervalle de 4 jours. Le cisplatine a été injecté une seule fois en intrapéritonéale à la concentration de 6 mg/kg, dilué dans du NaCl 0.9%. L'anticorps anti-PD-L1 (BioXcell® BE0101 B7-H1), l'anticorps anti-TGF- $\beta$ 1 (BioXcell® BE0057 1D11.16.8) et la solution d'isotype contrôle IgG2 $\alpha$  (BE0089 BioXcell® IgG2 $\alpha$  isotype control anti-trinitrophenol) ont été administrés en intrapéritonéale, à la dose de 10 mg/kg et dilués dans du NaCl 0.9%. Ces traitements ont été injectés une fois par semaine pendant 4 semaines. L'anticorps anti-CD8 $\alpha$  (BioXcell® BE0061 2.43) a été injecté en intrapéritonéale, à la dose de 10 mg/kg et dilués dans du NaCl 0.9%, un jour avant l'injection des cellules tumorales, 24 heures après l'injection tumorales puis deux fois par semaine pendant 3 semaines.

## Test de viabilité cellulaire

### Détermination de la viabilité cellulaire par activité enzymatique :

Après 24h ou 48h de traitement, les cellules vivantes sont mises en contact avec 110  $\mu$ L d'une solution contenant le sel de tétrazolium (MTT) pendant 4 heures à l'étuve. Cette solution est obtenue par la dilution de 5 mg de sel de tétrazolium dans 1 mL de PBS 1X puis dans 10 mL de milieu sans rouge de phénol. L'enzyme mitochondriale déshydrogénase présente dans les cellules vivantes et témoin de l'activité métabolique cellulaire va permettre la réduction du sel de tétrazolium et former un produit coloré : le formazan. Après solubilisation dans 100  $\mu$ L d'une solution de HCl 0.01M pendant une nuit à l'étuve, l'absorbance est lue à 570 nm.

### Caractérisation du type de mort cellulaire par cytométrie en flux (CMF) :

Après 24 ou 48h de traitement, le surnageant et les cellules sont récupérées après trypsination. Après le lavage des cellules dans du tampon contenant du Ca<sup>2+</sup> (Annexin V binding Buffer - Miltenyi Biotec), les cellules sont marquées par 2  $\mu$ L d'annexine V couplée

au fluorochrome FITC (Miltenyi Biotech) pendant 15 minutes à 4°C et dans le noir afin de mettre en évidence les cellules mourantes (apoptotiques). L'ajout de 1 µL/puits de DAPI (4'6-diamino-2-phénylindole - Miltenyi Biotech), un intercalant de l'ADN, va ensuite permettre la caractérisation des cellules apoptotiques ou nécrotiques. Les cellules sont enfin analysées dans un cytomètre en flux CytoFlex® (Beckman Coulter).

## Expériences de mort cellulaire immunogène

### Marquage membranaire de la calréticuline par CMF :

Après 24 ou 48h de traitement, le surnageant et les cellules sont récupérées dans du tampon FSB après trypsination. Les cellules sont ensuite marquées par une solution d'anticorps primaire anti-calréticuline (clone FMC 75, 1 µL/ puits, abcam) et incubées pendant 30 minutes à 4°C dans le noir. Après avoir lavé les cellules dans du tampon FSB, l'anticorps secondaire anti-calréticuline couplé à un fluorochrome Alexa Fluor 647 (Thermo Fisher Scientific) dilué à 1/1000<sup>ème</sup> est ajouté et incubé pendant 15 minutes à température ambiante. Un lavage dans du tampon FSB est ensuite réalisé. Afin d'éliminer les cellules mortes à l'analyse, une solution contenant 1 µL/puits de DAPI est ajoutée et les cellules sont passées au cytomètre en flux pour être analysées.

### Marquage membranaire de H2Kd, H2Dd et PD-L1 par CMF :

Après 24 ou 48h de traitement, le surnageant et les cellules sont récupérées dans du tampon FSB après trypsination. Les cellules sont ensuite marquées par une solution d'anticorps anti-H2Kd/H2Dd couplé au FITC (clone 34-1-2S, 2 µL/ puits, Biolegend) et anti-PD-L1 couplé au PE (clone B7-H1, 2 µL/ puits, Biolegend) et incubées pendant 15 minutes à température ambiante dans le noir. Afin d'éliminer les cellules mortes à l'analyse, une solution contenant 1 µL/puits de DAPI est ajoutée et les cellules sont passées au cytomètre en flux pour être analysées.

### Libération d'ATP par dosage colorimétrique :

Après 24 ou 48h de traitement, le surnageant des cellules 4T1 est récupéré et le kit CellTiter-Glo® (Luminescent Cell Viability Assay – Promega) est utilisé selon les recommandations du fournisseur. La luminescence a été mesurée au luminomètre et la concentration d'ATP présente dans le surnageant cellulaire a été déterminée grâce à une gamme d'étalonnage.

### Relargage d'HMGB1 par dosage immuno-enzymatique ELISA:

Après 24 ou 48h de traitement, le surnageant des cellules 4T1 est récupéré et le kit de détection HMGB1 (Chondrex) est utilisé selon les recommandations du fournisseur. L'absorbance a été lue à 450nm par spectrophotométrie et la concentration d'HMGB1 présente dans le surnageant cellulaire a été déterminée grâce à une gamme d'étalonnage.

## Western Blot

Après 24 ou 48h de traitement, les cellules du surnageant et les cellules adhérentes sont récupérées par grattage dans du PBS 1X. Les cellules récupérées sont ensuite lysées dans du tampon RIPA (Sigma), contenant des inhibiteurs de protéases, de phosphatases et d'ATPases, afin d'extraire les protéines totales. Après centrifugation à 20 000g pendant 20 minutes à 4°C, le surnageant est récupéré. Les protéines sont dosées selon la méthode de Lowry grâce au kit *Protein Assay Reagent* (BIO-RAD) avec lecture de l'absorbance à 690nm. La concentration est ensuite calculée grâce à une gamme d'étalonnage d'albumine sérique bovine. Les protéines sont ensuite dénaturées dans un tampon de charge 4X contenant 37% de sodium dodécyl sulfate (SDS, Sigma), 29.5% de glycérol (Sigma), 18,5% de Tris-HCl 1M pH 6.8 (Euromedex), 14.8% de  $\beta$ -mercaptoéthanol (Sigma) et quelques cristaux de bleu de Bromophénol (Sigma), puis chauffées à 95°C pendant 5 minutes. 14  $\mu$ g de protéines dénaturées sont déposés par puits et vont pouvoir migrer sur un gel d'acrylamide à 10% par électrophorèse. Le transfert sur une membrane de nitrocellulose a été réalisé avec un ampérage de 0.40 A pendant 1h30. Les membranes sont ensuite saturées pendant 1 heure dans une solution de lait 5% tris-buffered saline Tween 0,1% (T-TBS) avant l'ajout d'anticorps primaire. Les membranes sont incubées avec les différentes solutions d'anticorps primaires (annexe 1) pendant toute la nuit à 4°C. La détection immunologique des protéines d'intérêt est effectuée grâce à l'incubation des membranes avec un anticorps secondaire couplé à une peroxydase (anti-IgG *goat anti-rabbit*, anti-IgG *goat anti-mouse*, Jackson Immuno Research®). L'activité de la peroxydase est révélée par une réaction de chimioluminescence observée en temps réel par un automate (ChemoDoc TM XRS imaging system - Bio-rad).

## RT-qPCR

*In vitro*, les cellules tumorales ont été lysées dans 250  $\mu$ L de Trizol® (Fischer Scientific). Le matériel tumoral *in vivo* a été dissocié par 1 mL de Trizol® contenu dans des tubes à billes (Precellys Lysing Kit – Bertin instrument) et par minilyse 5\*20 secondes. Du chloroforme est ajouté et permet d'acidifier la phase aqueuse afin de séparer les protéines, l'ADN et l'ARN. Les échantillons sont ensuite vortexés puis centrifugés à 12 000g pendant 15 minutes. La phase chloroformique supérieure contenant les ARN est récupérée. Les ARN sont ensuite précipités grâce à une solution d'isopropanol (100%). Après 15 minutes de précipitation à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 12 000g pendant 15 minutes à 4°C. Les culots d'ARN sont ensuite lavés deux fois par de l'éthanol (75%). Une fois l'éthanol vidé, les culots sont séchés puis repris et réhydratés dans de l'eau ultra pure.

Une analyse quantitative des ARN de chaque échantillon est effectuée par mesure de la densité optique à 260nm au spectrophotomètre Nanodrop2000 et permet de régulariser les quantités d'ARN afin d'avoir une concentration identique à 100 ng/mL. Une première étape de transcription inverse est réalisée (kit M-MLV Reverse Transcriptase - Invitrogen®) afin de synthétiser une chaîne d'acide désoxyribonucléique monocaténaire complémentaire (ADNc) à partir d'une chaîne monocaténaire d'ARN. La réaction de polymérisation en chaîne quantitative en temps réel (RT-qPCR) est ensuite réalisée (kit Power SYBER Green PCR Master

Mix – Applied Biosystem) afin de synthétiser le brin complémentaire d'ADNc mais aussi de l'amplifier de façon exponentielle. Les amorces murines spécifiques des gènes d'intérêt sont résumées en annexe 2. La réaction de qPCR est réalisée sur un appareil Quant Studio™ 5 real-time PCR system (Applied Biosystem). Les valeurs d'ARNm obtenus sont normalisées par rapport à un gène de référence, l'actine-β puis l'expression relative est calculée grâce à la formule  $2^{(-X)} * 100\ 000$  et rapportée aux cellules non traitées.

## Analyse par NanoString

L'ARN purifié provenant des tumeurs murines et utilisé pour l'analyse transcriptomique a été extrait par le protocole précédemment décrit. 100 ng d'ARN sont ajoutés à la solution d'hybridation contenant 8 µL de *Reporter CodeSet* dilué dans 70 µL d'*hybridation buffer* et 2 µL de *Capture ProbSet*. Cette solution est ensuite placée dans un thermocycleur afin d'effectuer l'hybridation pendant 16 heures à 65°C. Après l'hybridation, les échantillons sont ajoutés dans une cartouche puis celle-ci est chargée dans l'appareil *NanoString nCounter Analyser*. Le panel de gènes analysés a été établi en amont par notre équipe et est retrouvé en annexe 4.

## Cytométrie en flux *in vivo*

Les tumeurs murines sont récupérées et digérées grâce à un mix enzymatique (*tumor dissociation kit mouse* - Miltenyi) dans un automate Gentle Macs (Miltenyi). Les échantillons sont ensuite centrifugés 7 minutes à 300g puis repris dans 20 mL de RPMI. Après avoir passé chaque tumeur dissociée sur un filtre de 70 µm, les échantillons sont de nouveau centrifugés 5 minutes à 300g. Les tumeurs sont alors reprises dans 1 mL de RPMI puis 10 µL sont ajoutées à une solution contenant 89 µL de FSB + 1 µL de DAPI. Les cellules sont ensuite analysées par CMF afin de dénombrer les cellules vivantes présentes dans nos échantillons tumoraux. Après centrifugation 5 minutes à 300g, les cellules sont reprises dans un volume de RPMI calculé afin d'avoir un nombre équivalent de  $1.10^6$  cellules par puits pour les futurs marquages. 50 µL de chaque solution cellulaire sont alors répartis dans les puits de différentes plaques 96 puits à fonds V.

Afin d'analyser l'activation lymphocytaire, les cellules du panel « cytokines » sont tout d'abord restimulées par 100 µL de milieu RPMI complet contenant de la PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; 20 ng/ml; Sigma-Aldrich), ionomycine (1 µg/ml; Sigma-Aldrich) et brefeldine A (2 µl/ml; eBioscience) pendant 3 heures à 37°C.

Les cellules des différents panels sont ensuite incubées dans une solution de 100 µL de FSB contenant les différents anticorps souhaités pendant 15 minutes à température ambiante (Annexe 3). De plus, une sonde de viabilité est ajoutée dans chaque mix d'anticorps afin de pouvoir analyser les cellules vivantes. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300G pendant 5 minutes puis lavées par du FSB et re-centrifugées à 300G pendant 5 minutes.

Les cellules marquées par les anticorps du panel lymphoïde et cytokines sont ensuite fixées et perméabilisées grâce au kit *Foxp3 staining buffer set* (Miltenyi Biotech) selon les recommandations du fournisseur. Les cellules sont ensuite centrifugées à 300G pendant 5 minutes puis lavées par le tampon *Foxp3 staining buffer* et re-centrifugées à 300G pendant 5 minutes. Les marquages intracellulaires des anticorps du panel lymphoïde et cytokines sont ensuite réalisés et les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 4°C. Les cellules sont centrifugées à 300G pendant 5 minutes puis lavées par le tampon *Foxp3 staining buffer* et re-centrifugées à 300G pendant 5 minutes. Les cellules marquées par les différents panels d'anticorps sont finalement reprises dans le FSB et analysées par cytométrie en flux.

Les stratégies d'analyses des panels lymphoïde, cytokines, myéloïde et CAF sont présentées en annexes 5, 6, 7 et 8.

## Isolation des populations intra-tumorales

Les étapes de dissociation des tumeurs sont identiques à celles décrites précédemment.

Les culots cellulaires ont été repris afin d'obtenir une suspension cellulaire à  $20 \times 10^6$  cellules / mL. Le schéma récapitulatif des différentes étapes d'isolation des populations intra-tumorales est retrouvé en annexe 9.

La suspension est ensuite passée sur un filtre de 30  $\mu$ M (Miltenyi) puis 1/3 de la suspension tumorale est utilisée pour la purification des cellules tumorales et 2/3 pour celle des CD45<sup>+</sup> et des CAFs.

### Isolation des cellules CD45<sup>+</sup> :

Après une centrifugation à 300G pendant 5 minutes, le culot est repris dans 90  $\mu$ L de tampon (*MACS<sup>®</sup> BSA Stock Solution* diluée au 1/20 dans du PBS) et 10  $\mu$ L de *CD45 (TIL) Microbeads mouse* (Miltenyi) sont ajoutés. Les puits sont incubés pendant 15 minutes dans le noir à 4°C. 400  $\mu$ L de tampon sont ensuite rajoutés.

La séparation des cellules est réalisée grâce à un automate *MultiMACS Cell24 Separator plus* et à l'utilisation de plaque *Multi-24 Column Block* (Miltenyi). Après avoir équilibré les colonnes avec 2 mL de tampon, les cellules sont passées à travers les colonnes et sont récupérées (fraction A). Les colonnes sont ensuite lavées par du tampon et cette fraction sortante est associée à la fraction A. La fraction positive est alors éluée par du tampon et sera composée des cellules CD45<sup>+</sup>.

Les cellules CD45<sup>+</sup> isolées sont ensuite triées dans un trieur FACS ARIA III puis récupérées dans du formol pour la future analyse transcriptomique.

### Isolation des CAFs :

Les cellules contenues dans la fraction A sont centrifugées à 300G pendant 10 minutes puis resuspendues dans 80  $\mu$ L de tampon associé à 20  $\mu$ L du cocktail de déplétion (*Non Tumor*



*Associated Fibroblast Depletion Cocktail, mouse, Miltenyi*) puis incubées pendant 15 minutes au noir à 4°C. 400 µL de tampon sont ensuite rajoutés.

Après avoir équilibré les colonnes avec 2 mL de tampon, les cellules sont passées à travers les colonnes et sont récupérées car contenant les cellules non marquées et donc pré-enrichie en CAF. Les colonnes sont ensuite lavées par du tampon et cette fraction sortante est associée à la fraction pré-enrichie.

Cette fraction est ensuite centrifugée 300G pendant 10 minutes puis le culot est resuspendu dans 80 µL de tampon associé à 20 µL de billes marquées CD90.2 (*Kit Tumor Associated Fibroblast, MicroBeads, mouse, Miltenyi*). Les cellules sont incubées 15 minutes au noir à 4°C. 400 µL de tampon sont ensuite rajoutés.

Après avoir équilibré les colonnes avec 2 mL de tampon, les cellules sont passées à travers les colonnes. La fraction positive est alors éluée par du tampon et sera composée des CAFs.

#### Isolation des cellules tumorales :

Les 1/3 de la suspension tumorale sont centrifugés à 300G pendant 10 minutes puis resuspendus dans 80 µL de tampon associé à 20 µL du cocktail de déplétion (*Non-Tumor Cell Depletion Cocktail, mouse, Miltenyi*). Les cellules sont incubées 15 minutes au noir à 4°C.

Après avoir équilibré les colonnes avec 2 mL de tampon, les cellules sont passées à travers les colonnes et sont récupérées (fraction C). Les colonnes sont ensuite lavées par du tampon et cette fraction sortante est associée à la fraction composée des cellules tumorales.

#### Elimination des cellules mortes :

Les cellules tumorales contenues dans la fraction C sont centrifugées à 300G pendant 10 minutes. Le culot est resuspendu dans 100 µL de *Dead Cell Removal MicroBeads mouse* (Miltenyi) puis incubé pendant 15 minutes à température ambiante.

Après avoir équilibré les colonnes avec 2 mL de tampon, les cellules sont passées à travers les colonnes et sont récupérées (fraction D). Les colonnes sont ensuite lavées par du tampon et cette fraction sortante est associée à la fraction composée des cellules tumorales sans cellules mortes.

## Marquage immunohistochimique et coloration

Les tumeurs ont été récupérées 8 jours après la randomisation, fixées dans du PFA (formol) et incluses dans de la paraffine. Des coupes de 4 µm ont été réalisées grâce à un microtome rotatif Leica (RM2145) et déposées sur lames silanées.

#### Marquage CD8 :

Pour commencer les lames sont déparaffinées dans un automate PT link (Agilent) par un tampon pH9 pendant 50 minutes à 95°C, puis les lames sont lavées dans du tampon (Agilent) deux fois pendant 5 minutes. Le marquage est ensuite réalisé dans un Autostainer

48 (Agilent). Le blocage de la peroxydase est réalisé grâce à une solution S2023 (Agilent) pendant 5 minutes. La saturation est ensuite effectuée par du sérum de chèvre normal (kit MP-7451-50 Vector Laboratories) pendant 20 minutes. Les lames sont incubées avec l'anticorps anti-CD8 spécifique de souris (1/100 polyclonal HS-361 00, Sysy Ab) pendant 30 minutes à température ambiante. Après deux étapes de lavage des lames, le polymère Immpress HRP de chèvre (MP-7451-50 kit Vector Laboratories) a été ajouté pendant 15 minutes. Les lames sont ensuite incubées pendant 2 minutes avec la DAB (SM803), et après deux nouveaux lavages, l'hématoxyline (Enzo) est ajoutée pendant 20 minutes. Les lames sont finalement montées à l'aide d'une colleuse de lamelles automatisé Leica.

#### Coloration trichrome :

La coloration des lames de coupe tumorale *via* l'utilisation du Kit Trichrome de Goldner (DIAPATH) fait suite au déparaffinage et au marquage CD8 préalablement décrit.

Les lames sont tout d'abord recouvertes d'acide picrique solution alcoolique saturée pendant 5 minutes. Un lavage est effectué à l'eau distillée pendant 30 secondes. De la fuchine Ponceau selon Masson est ensuite ajoutée pendant 10 minutes. Après avoir été égouttées, les lames sont recouvertes d'acide phosphomolybdique selon Masson pendant 4 minutes. Enfin, après avoir été une nouvelle fois égouttées, une solution de vert lumière selon Goldner est ajoutée sur les lames pendant 2 minutes. Les lames sont finalement montées à l'aide d'une colleuse de lamelles automatisée Leica.

#### Quantification des cellules CD8<sup>+</sup> en IHC

La quantification des cellules CD8<sup>+</sup> a été réalisée par le logiciel QuPath. A l'aide d'un script préalablement établi, le logiciel est d'abord capable de reconnaître l'ensemble des noyaux colorés par l'hématoxyline puis dans un second temps, le marquage CD8 par l'intensité du DAB dans les cellules préalablement détectées. Après avoir défini 5 zones de tailles équivalentes et représentatives de la lame entière, le logiciel génère un fichier TXT contenant le nombre de cellules CD8<sup>+</sup> par mm<sup>2</sup>.

#### Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism (n.s,  $p > 0.05$  ; \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ). La distribution des variables a été exprimée en fonction de la médiane et des écarts interquartiles. Les comparaisons intergroupes ont fait appel à un test de Mann-Whitney bilatéral non paramétrique. Les données de survie ont été analysées par la méthode de Kaplan-Meier et le test log-rank.

## RESULTATS

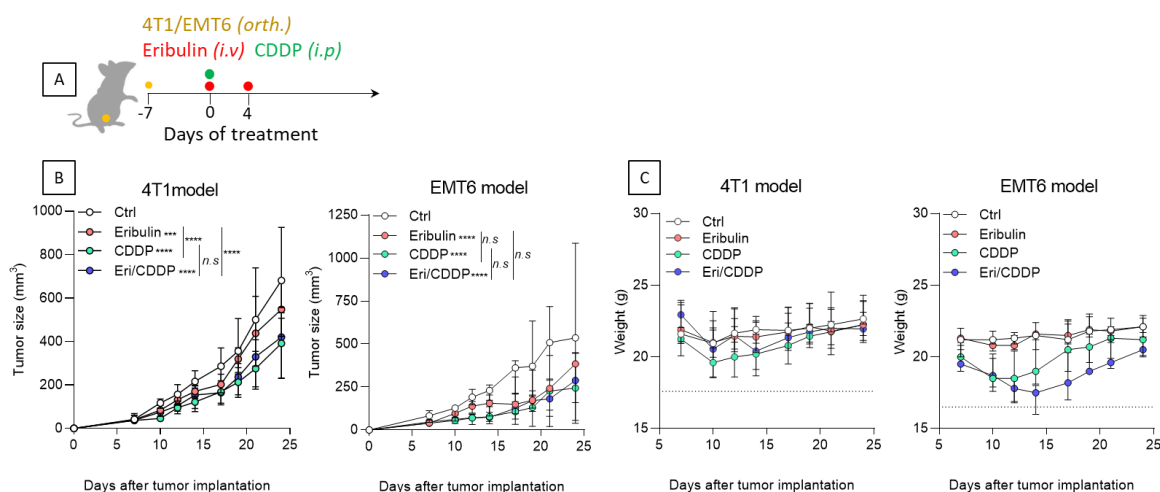
### I. Evaluation de l'effet thérapeutique et immunologique des chimiothérapies *in vivo*

L'objectif de cette première partie a été tout d'abord d'évaluer l'efficacité thérapeutique puis immunologique des chimiothérapies en monothérapie et en association dans nos deux modèles de cancer du sein représentatifs du large spectre phénotypique retrouvé dans les cancers du sein humains.

#### a. Evaluation de l'efficacité thérapeutique des chimiothérapies

Une fois les cellules tumorales injectées en orthotopique dans des souris immunocompétentes et après l'injection d'éribuline, de cisplatine ou de la combinaison des deux chimiothérapies (figure 5A), nous avons réalisé un suivi de croissance tumorale ainsi qu'une mesure de poids régulière afin de mettre en évidence une potentielle toxicité des chimiothérapies (figure 5).

Nous remarquons tout d'abord l'efficacité anti-tumorale des deux monothérapies dans les deux modèles murins (figure 5B). Cependant, le cisplatine semble avoir un effet anti-tumoral supérieur à l'éribuline, notamment dans le modèle 4T1. Etonnamment, la combinaison de ces deux traitements n'apporte pas d'efficacité anti-tumorale supplémentaire



**Figure 5:** Evaluation de l'efficacité thérapeutique des chimiothérapies. Schéma représentatif des expériences réalisées *in vivo* (A). Les cellules 4T1 et EMT6 ont été injectées en orthotopique dans des souris Balb/c. La randomisation a été effectuée 7 jours après l'injection des cellules tumorales. Les souris ont été traitées le jour de la randomisation par éribuline en intraveineuse, cisplatine en intrapéritonéale, les deux chimiothérapies ou par du NaCl 0.9%. 4 jours après la randomisation, les souris ont reçu une seconde injection d'éribuline ou de NaCl 0.9% (A). La croissance tumorale des cellules 4T1 et EMT6 (B) ainsi que le poids des souris Balb/c traitées par les différentes chimiothérapies (C) ont été suivis. Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles (n.s.,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

par rapport aux monothérapies et quel que soit le modèle tumorale utilisé. De plus, la toxicité de la combinaison de chimiothérapies est acceptable avec une diminution modérée du poids des souris (figure 5C). Cependant, cette toxicité semble être due uniquement au cisplatine et n'est pas supérieure à celle de la monothérapie.

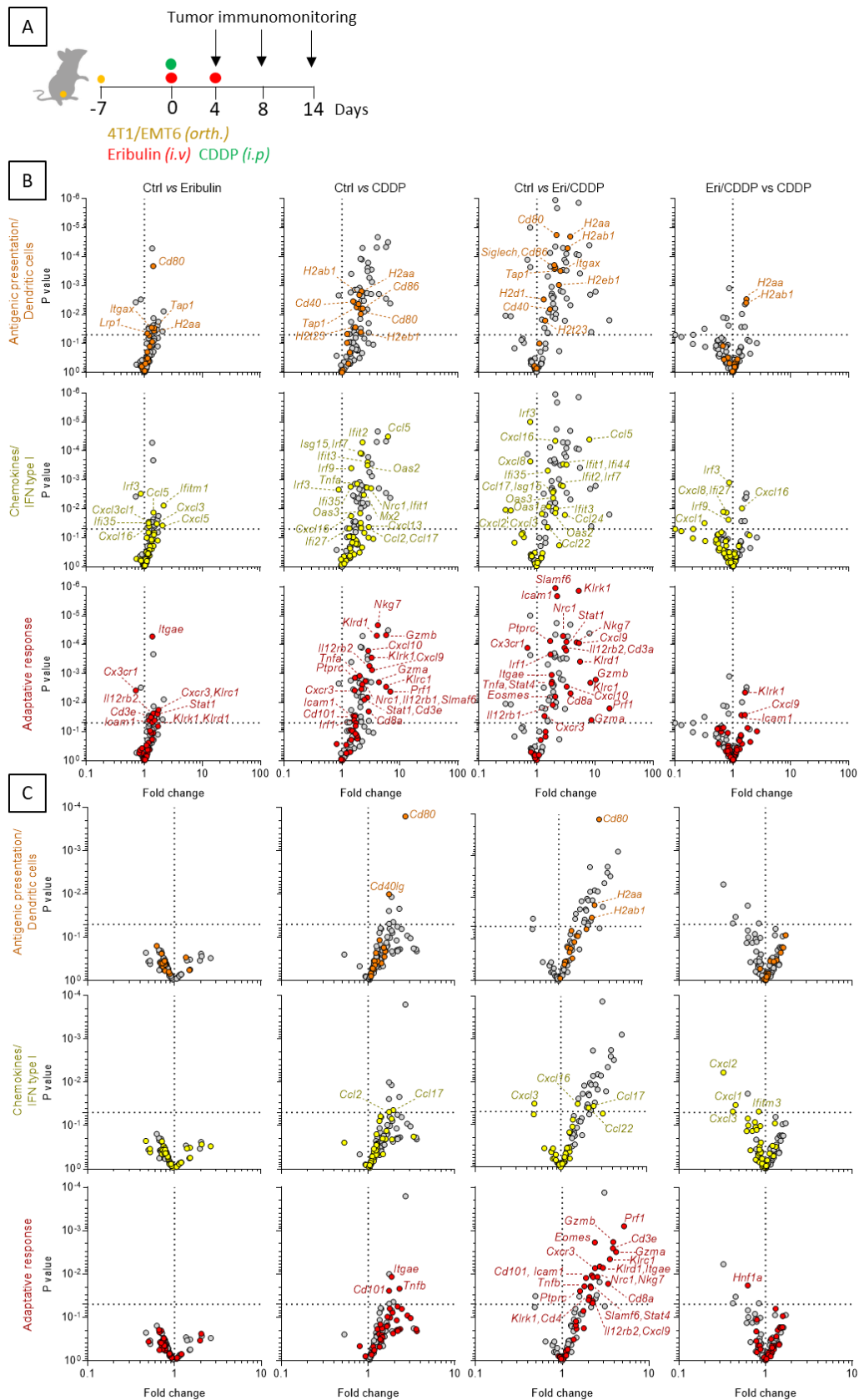
Afin d'évaluer les effets immunologiques des chimiothérapies, nous avons prélevé les tumeurs aux différents temps de traitement et réalisé des analyses transcriptomiques par NanoString, d'immunomonitoring par cytométrie en flux (CMF) et d'immunohistochimie (IHC) (figure 6A).

## b. Exploration des signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits

Les ARN extrait à partir des tumeurs récupérées après 8 jours de traitement ont été analysés par la technologie NanoString (figure 6). Cette analyse permet de mettre en évidence des signaux d'antigénicité, par l'expression de gènes impliqués dans les voies de la présentation antigénique et des cellules dendritiques, ainsi que des signaux d'immunogénicité par l'expression de gènes liés aux chimiokines, aux interférons de type I et aux lymphocytes NK, T-CD8<sup>+</sup> et T-CD4<sup>+</sup>.

Nous pouvons tout d'abord remarquer une très faible induction de signaux d'antigénicité et d'immunogénicité avec l'éribuline dans les tumeurs 4T1 (figure 6B). Dans les tumeurs EMT6, la plupart des signaux semblent au contraire réprimés par rapport aux tumeurs contrôles mais de manière non significative (figure 6C). A la différence de l'éribuline, le cisplatine induit l'expression génique de multiples marqueurs d'une immunostimulation dans les tumeurs 4T1 auparavant « froides » immunologiquement. Par exemple, le cisplatine permet l'induction de gènes associés au CMH de classe II tels que *H2ab1* et *H2aa*, ainsi que de gènes associés aux molécules de co-stimulation comme *Cd40*, *Cd80* et *Cd86*. Le cisplatine va aussi permettre l'induction de gènes retrouvés en aval (*Irf*) et en amont (*Ifit*) de la voie des interférons de type I. De plus, le cisplatine va induire l'expression génique des cytokines chimioattractantes *Cxcl9*, *Cxcl10* et *Ccl5*. Ces cytokines vont permettre le recrutement de cellules immunitaires anti-tumorales telles que les NK caractérisés ici par l'expression génique de *Nkg7*, ainsi que des récepteurs inhibiteurs et activateurs (*Klrd1/Klrc1* et *Klrk1*) ou les T-CD8<sup>+</sup> par l'expression de *Cd8a* et *Cd3e*. L'augmentation significative des gènes *Gzmb*, *Gzma*, *Prf1* et *Tnfa* sont les preuves d'une forte cytotoxicité de ces cellules immunitaires anti-tumorales (figure 6B). Dans le modèle EMT6, le cisplatine induit non significativement la plupart des signaux excepté l'expression génique du *Cd80*, *Cd40lg*, *Itgae*, *Cd101* et *Tnfb* (figure 6C). Ces résultats sont en accord avec les résultats de croissance tumorale. Le traitement par cisplatine en monothérapie a une efficacité anti-tumorale supérieure à l'éribuline, surtout dans le modèle 4T1, ce qui peut être expliqué, en partie, par l'activation de l'immunité anti-tumorale. Dans les deux modèles murins, la combinaison de chimiothérapies augmente la significativité des inductions associées au cisplatine par rapport aux tumeurs contrôles. Cependant, nous pouvons tout de même remarquer l'augmentation de l'expression génique d'autres

chimiokines telles que *Ccl24*, *Ccl17*, *Cxcl2*, *Cxcl3* et *Cxcl16* dans les tumeurs 4T1 marquant la forte inflammation (figure 6B). Les expressions géniques des marqueurs des T-CD8<sup>+</sup> ainsi que des molécules cytotoxiques vont être encore plus fortement et significativement induits. De plus, l'induction fortement significative de nouveaux gènes comme *Icam1*, associé à l'adhésion des cellules T, et *Slamf6*, associé à l'épuisement des cellules, sont d'autres preuves du recrutement et de l'activation de ces populations immunitaires anti-tumorales (figure 6B,C). Lorsque l'on compare les tumeurs traitées par le cisplatine seul ou associé à l'éribuline, les expressions des différents gènes étudiés sont peu voir pas augmentées (figure 6B,C). Ceci correspond à ce que nous avons remarqué précédemment *in vivo*. En effet, les tumeurs traitées par cette association de traitements ne montrent pas d'efficacité supérieure sur la croissance tumorale par rapport à la monothérapie de cisplatine et ceci pourrait s'expliquer par une expression de signaux d'antigénicité et d'immunogénicité comparable.



**Figure 6:** Exploration des signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits. Schéma représentatif des expériences d'immunomonitoring. 4, 8 et 14 jours après la randomisation, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs 4T1 et EMT6 ont été récupérées afin de réaliser des analyses d'IHC, de CMF ou d'expressions géniques (A). Les analyses transcriptomiques ont été réalisées via la technologie NanoString à partir d'ARN tumoraux récupérés dans les tumeurs murines 4T1 (n=6) (B) et EMT6 (n=6) (C) après 8 jours de traitement.

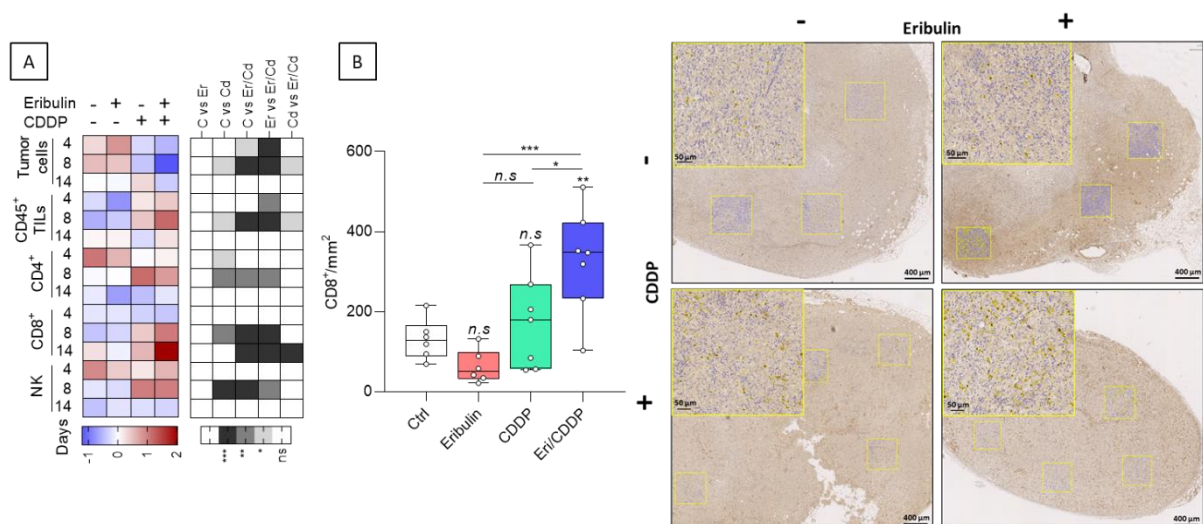
### c. Caractérisation des populations immunitaires intra-tumorales

Nous avons ensuite évalué l'infiltration tumorale en cellules immunitaires telles que les populations lymphocytaires cytotoxiques (T-CD8<sup>+</sup> et NK) et les cellules T-CD4<sup>+</sup>. Après avoir analysé cet infiltrat nous avons caractérisé ces populations par la mise en évidence de cytokines impliquées dans la réponse anti-tumorale (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  et le granzyme B) ainsi que dans l'épuisement lymphocytaire (PD-1, Tim3). Ces analyses ont été réalisées par des expériences de cytométrie en flux et d'immunohistochimie.

Tout d'abord, nous pouvons valider l'efficacité cytotoxique des monothérapies mais aussi de la combinaison éribuline-cisplatine par la diminution du nombre de cellules tumorales dans les tumeurs murines (figure 7A).

Parallèlement à la diminution du nombre de cellules tumorales, nous pouvons remarquer une augmentation des leucocytes CD45<sup>+</sup> infiltrants la tumeur (TILs) à J4 et J8. Le cisplatine permet en effet de recruter ces cellules immunitaires par rapport aux tumeurs contrôles et aux tumeurs traitées par éribuline. Après 8 jours de traitement, la combinaison éribuline-cisplatine est associée à une augmentation significative de l'infiltration en TILs par rapport aux monothérapies. Parmi les TILs analysés, nous retrouvons les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup>, T-CD4<sup>+</sup> et NK.

Le recrutement des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> va être influencé par les traitements au cisplatine. En effet, l'analyse par CMF indique que la mono et la bithérapie induisent le recrutement des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> après 8 jours de traitement (figure 7A). Les résultats d'IHC semblent aussi en accord avec ces résultats puisque nous retrouvons cette



**Figure 7:** Exploration de l'infiltration des populations lymphocytaires intra-tumorales. Les tumeurs 4T1 ont été récupérées après 4 (n=6), 8 (n=9) ou 14 jours de traitement (n=11) puis les cellules ont été marquées par un panel d'anticorps et analysées par CMF (A). Le nombre de cellules T-CD8<sup>+</sup> a été évalué par IHC dans les tumeurs 4T1 après 8 jours de traitements (B). Les photos représentent différentes tumeurs traitées et la mise en évidence des cellules T-CD8<sup>+</sup> par le logiciel d'analyse (B). Le « heat map » de gauche représente le z-score calculé à partir des résultats de CMF. Le « heat map » de droite représente les résultats statistiques (n.s, p > 0.05 ; \*, p < 0.05 ; \*\*, p < 0.01 ; \*\*\*, p < 0.001).

augmentation à J8 par le cisplatine. Cependant, c'est avec la combinaison d'éribuline et de cisplatine que l'on dénombre le plus de cellules T-CD8<sup>+</sup> par mm<sup>2</sup> dans les tumeurs murines (figure 7B). Fait intéressant, après 14 jours de traitement, seule la combinaison permet le maintien de cette population immunitaire cytotoxique (figure 7A).

Les infiltrations intra-tumorales des 2 autres populations lymphocytaires (T-CD4<sup>+</sup> et NK) sont elles aussi augmentées. L'analyse par CMF nous indique qu'après 8 jours de traitement, le cisplatine en monothérapie et en combinaison permet l'infiltration intra-tumorale en cellules NK ainsi qu'en lymphocytes T-CD4<sup>+</sup> (figure 7A).

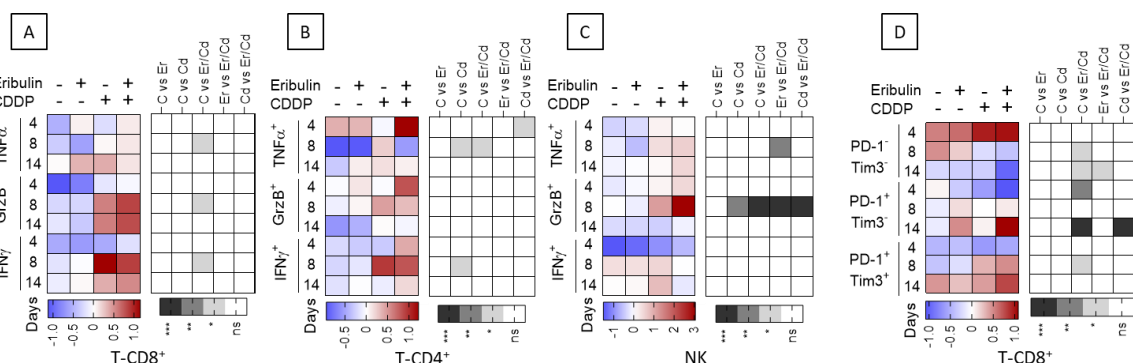
Après avoir analysé cet infiltrat nous avons caractérisé ces populations par la mise en évidence de cytokines impliquées dans la réponse anti-tumorale (TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  et le granzyme B) (figure 8).

Dans les cellules T-CD8<sup>+</sup>, à J8, nous retrouvons une augmentation significative de TNF $\alpha$ , associé à l'inflammation, de granzyme B, témoin de l'activité cytotoxiques, et d'IFN $\gamma$ . L'IFN $\gamma$  exprimé dans ces cellules joue un rôle important dans l'augmentation de la capacité de présentation des antigènes tumoraux et est la preuve de leur activation (figure 8A). Les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> semblent donc bien activés par ces chimiothérapies permettant de jouer leur rôle anti-tumoral.

Dans les cellules T-CD4<sup>+</sup>, le cisplatine va aussi induire l'expression de TNF $\alpha$  ainsi que d'IFN $\gamma$  témoin de leur différenciation en Th1 après 8 jours de traitement (figure 8B).

Dans les cellules NK, le cisplatine, mais surtout la combinaison de chimiothérapies, vont permettre l'induction d'une forte cytotoxicité *via* le granzyme B après 8 jours de traitement (figure 8C).

L'analyse de l'expression des molécules PD-1 et Tim3 présentes sur les cellules T-CD8<sup>+</sup> permet d'établir un profil phénotypique de cette population (figure 8D). En effet, l'expression



**Figure 8:** Exploration de la fonctionnalité des cellules lymphocytaires. Les tumeurs 4T1 ont été récupérées après 4 (n=6), 8 (n=9) ou 14 jours de traitement (n=11) puis les cellules ont été marquées par un panel d'anticorps et analysées par CMF. Expression des cytokines TNF $\alpha$ , granzyme B et IFN $\gamma$  dans les cellules T-CD8<sup>+</sup> (A), T-CD4<sup>+</sup> (B), NK (C). Expression des marqueurs PD-1 et Tim3 dans les cellules T-CD8<sup>+</sup> (D). Les « heat map » de gauche représentent le z-score calculé à partir des résultats de CMF. Les « heat map » de droite représentent les résultats statistiques (n.s, p > 0.05 ; \* , p < 0.05 ; \*\* , p < 0.01 ; \*\*\* , p < 0.001 et \*\*\*\* , p < 0.0001).



conjointe de ces deux marqueurs reflète un état d'épuisement de cette population caractérisé par la diminution de leur prolifération et de leur production de cytokines telles que l'IL2, le TNF $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$ . Dans notre modèle, nous pouvons voir l'acquisition de ces deux molécules au cours du temps et quel que soit le traitement reçu. Cependant, les tumeurs traitées avec du cisplatine ou la combinaison de chimiothérapies acquerront plus rapidement un phénotype PD-1<sup>+</sup> Tim3<sup>+</sup>, comprenant des lymphocytes T épuisés mais caractéristique de leur forte activation. Après 14 jours de traitement par la combinaison de chimiothérapies, ces tumeurs seront majoritairement composés de lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup> Tim3<sup>-</sup>, comprenant des lymphocytes effecteurs et épuisés, tandis que dans les autres tumeurs ces lymphocytes seront majoritairement épuisés (figure 8D).

Comme retrouvé en clinique, l'éribuline et le cisplatine ont une efficacité anti-tumorale concrète mais plutôt limitée au cours du temps. Étonnamment, leur association ne semble pas synergique d'un point de vue anti-tumorale et quel que soit le modèle utilisé. Cependant, grâce aux différentes analyses, nous remarquons que cette association est intéressante d'un point de vue immunologique. En effet, elle permet l'induction de signatures inflammatoires ainsi que de chimiokines. Elle est aussi impliquée dans l'augmentation du recrutement des populations lymphocytaires anti-tumorales associée à leur activation et à l'induction de leur fonctionnalité. Ces effets synergiques immunologiques de la combinaison de chimiothérapies pourraient alors s'expliquer par l'induction d'une mort cellulaire immunogène.

## II. Caractérisation de la mort cellulaire immunogène *in vitro*

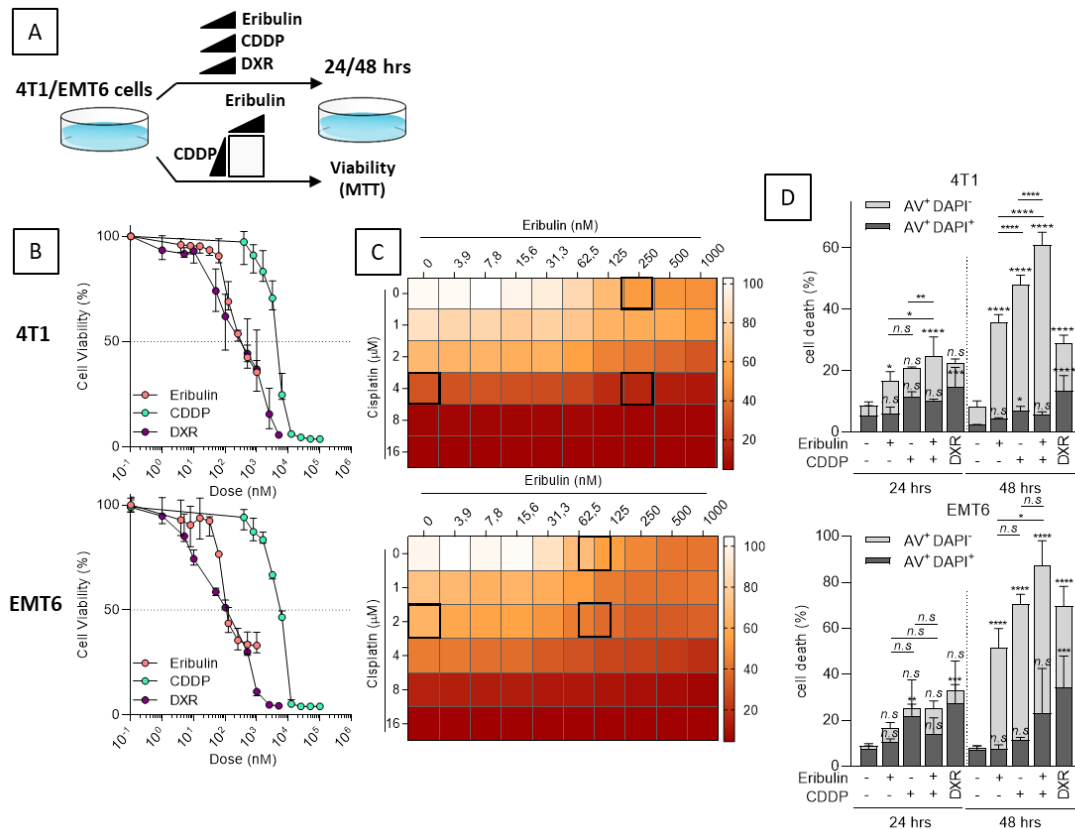
L'objectif de cette deuxième partie a été d'évaluer l'effet immunogène *in vitro* de l'éribuline et du cisplatine dans les lignées cellulaires murines 4T1 et EMT6. Nous avons tout d'abord déterminé les concentrations à utiliser *in vitro* puis, à l'aide de ces résultats, nous avons réalisé des expériences afin de mettre en évidence différents marqueurs de mort immunogène.

### a. Evaluation de la mortalité cellulaire chimio-induite

Une analyse de la mort cellulaire a été effectuée afin de trouver une concentration en chimiothérapie permettant les futures analyses des marqueurs de la mort immunogène et de l'antigénicité *in vitro* (figure 9). Les concentrations induisant une mortalité cellulaire de 50% après 48 heures de traitement ont été choisies (IC50) afin d'avoir une toxicité moyenne permettant d'avoir un nombre équivalent de cellules vivantes et mourantes (figure 9A). Le choix de l'IC50 permettra de caractériser les effets immunogènes des chimiothérapies en plus de leur toxicité cellulaire. Différentes analyses ont été réalisées telles que des effets dose *via* des tests au MTT et des analyses par cytométrie en flux (CMF). Cette dernière permet de mettre en évidence le type de mort induite par les chimiothérapies grâce à l'annexine V et au DAPI. A partir de l'analyse de l'effet dose réalisé par le test au MTT, l'IC50 de l'éribuline, du

cisplatine et de la doxorubicine établies sont de 300 nM, 4  $\mu$ M et 500 nM respectivement, pour les cellules 4T1 et de 90 nM, 2  $\mu$ M et 400 nM et pour les cellules EMT6 (figure 9B). Un effet dose combiné de l'éribuline et du cisplatine permet ensuite de mettre en évidence le taux de mortalité associé à la combinaison de nos deux chimiothérapies d'intérêt (figure 9C). Après avoir choisi les IC50 des chimiothérapies, nous avons effectué des analyses de mort cellulaire (figure 9D). L'analyse par cytométrie en flux permet de différencier deux types de mort : l'apoptose et la nécrose des cellules tumorales. En effet, l'annexine V marquée par un fluorophore FITC permet de mettre en évidence la phosphatidylsérine contenue dans la membrane cytoplasmique. Durant le processus apoptotique, la phosphatidylsérine, initialement retrouvée du côté intracellulaire, va être transloquée et se retrouver du côté extracellulaire de la membrane cytoplasmique. L'anticorps va donc pouvoir se fixer à sa cible et marquer les cellules mourantes. Le DAPI est un second marqueur de viabilité ayant comme fonction de permettre la distinction entre une mort cellulaire nécrotique ou apoptotique. Celui-ci va pouvoir colorer l'ADN des cellules lorsqu'elles seront perméabilisées, c'est-à-dire pendant la nécrose. Des cellules doublement positives seront donc en état de mort cellulaire par nécrose alors que les simples positives à l'annexine V seront catégorisées en état d'apoptose. Ces deux types de mort cellulaire vont être caractérisés par l'expression de signaux de mort cellulaire immunogène tel que le relargage d'HMGB1 ou d'ATP lors d'un processus nécrotique et d'expression de la calréticuline en cas d'apoptose. Les résultats de cytométrie montrent une augmentation significative de la mortalité par apoptose des cellules 4T1 induite avec les chimiothérapies notamment après 48h de traitement. Il en est de même pour les cellules EMT6, les chimiothérapies induisent fortement l'apoptose des cellules tumorales après 48h de traitement. Les chimiothérapies vont aussi induire de la nécrose mais cette augmentation sera moins importante que l'induction d'un état apoptotique (figure 9D).

Une fois l'IC50 des chimiothérapies établie, nous avons caractérisé les effets immunogènes des chimiothérapies (figure 10A).



**Figure 9:** Evaluation de la mortalité cellulaire chimio-induite. Les cellules 4T1 et EMT6 ont été traitées par un effet dose d'éribuline, de cisplatine, de la combinaison des deux ou de doxorubicine. Les cellules ont été récupérées après 24h ou 48h de traitement pour être analysées (A). Les courbes effet-dose représentent le pourcentage de cellules viables analysées par MTT après 48h de traitement par éribuline, cisplatine et doxorubicine (B). Les « Heat map » représentent le pourcentage de cellules vivantes analysé par MTT et traitées par un effet-dose combiné d'éribuline et de cisplatine après 48h de traitement. L'IC50 choisie est entourée en noir (C). Le pourcentage de mortalité cellulaire analysée par CMF est défini par les marqueurs annexine V+DAPI- ou annexine V+DAPI+ après 48h de traitement (D). Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles de 2 expériences réalisées en triplicat (n.s,  $p > 0.05$  ; \*,  $p < 0.05$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

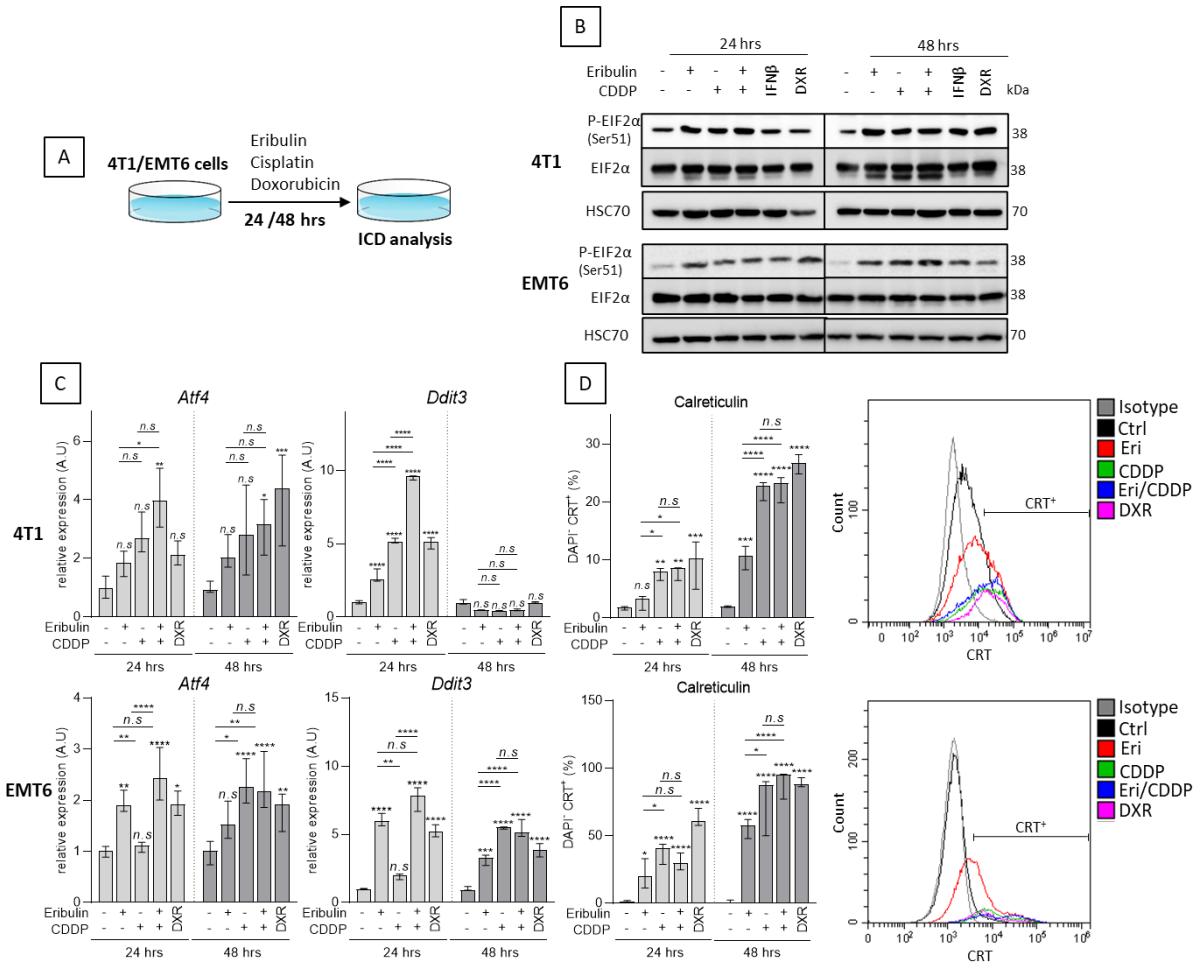
## b. Evaluation du stress du RE et de l'exposition membranaire de la calréticuline

Les chimiothérapies peuvent induire un stress du réticulum endoplasmique (RE) dans les cellules tumorales et provoquer une cascade d'évènements moléculaires induisant tout d'abord la translocation de la calréticuline à la membrane cytoplasmique. C'est ce que nous avons étudié dans cette partie (figure 10).

Après 24h de traitement, nous observons que l'éribuline, le cisplatine et la combinaison des deux molécules ont déjà activé les voies du stress du réticulum endoplasmique dans les deux modèles tumoraux. En effet, nous pouvons remarquer une augmentation de la phosphorylation de la sérine 51 d'EIF2 $\alpha$  mise en évidence par western blot. À 48h, cette phosphorylation est maintenue avec toutes les chimiothérapies dans les cellules 4T1 et EMT6 (figure 10B). Associé à cela, dans les cellules 4T1, les gènes *Atf4* et *Ddit3* vont voir leur expression génique augmenter à 24h avec les monothérapies et de manière plus

importante avec la combinaison. A 48h de traitement, seul l'expression du gène *Atf4* est influencée par les chimiothérapies. Par les RT-qPCR nous mettons en évidence l'ARNm d'ATF4 et non la protéine en elle-même. Cependant, c'est bien la protéine ATF4 qui va induire l'expression génique de *Ddit3*. Un laps de temps est donc nécessaire entre la phosphorylation de la sérine 51 d'EIF2 $\alpha$ , l'augmentation de l'expression génique d'*Atf4*, sa synthèse protéique puis l'induction de l'expression génique de *Ddit3*. C'est donc peut-être pour cette raison que nous ne retrouvons pas d'induction à 48h de l'expression du gène *Ddit3*. Dans les cellules EMT6 nous retrouvons un maintien de l'induction de l'expression de ces deux gènes avec l'éribuline en mono et bithérapie après 24 et 48h de traitement. Le cisplatine induit plus tardivement l'expression d'*Atf4* et *Ddit3* dans ces cellules. Après 24h de traitement par la combinaison de chimiothérapies, l'expression de ces deux gènes est augmentée de manière équivalente à celle induite par l'éribuline. Au bout de 48h de traitement, cette induction semble plus influencée par le cisplatine et ne semble pas supérieure aux monothérapies (figure 10C).

Ces différents événements vont conduire au transport antérograde de la calréticuline (CRT) du RE à la membrane cytoplasmique des cellules mourantes (figure 10D). Dans les cellules 4T1, après 24h de traitement, le cisplatine en mono et bithérapie augmente significativement le pourcentage de cellules DAPI<sup>-</sup> CRT<sup>+</sup>, c'est-à-dire les cellules vivantes et apoptotiques exprimant la CRT à la membrane cytoplasmique. L'éribuline induit l'expression de la CRT plus tardivement et de manière moins importante que le cisplatine. Dans les cellules EMT6, les deux chimiothérapies induisent l'expression de la CRT à la membrane plasmique mais de manière moins importante avec l'éribuline. Après 48h de traitement, dans les deux lignées cellulaires, toutes les chimiothérapies vont permettre l'exposition de la calréticuline à la membrane cytoplasmique sans avoir d'effet supérieur avec la combinaison de chimiothérapies (figure 10D).



**Figure 10:** Evaluation du stress du RE et de la translocation à la membrane de la calréticuline. Schéma représentatif des expériences in vitro : les cellules 4T1 et EMT6 ont été traitées par l'IC50 d'éribuline, de cisplatine, de la combinaison des deux ou de doxorubicine. Les cellules ont été récupérées après 24h ou 48h de traitement pour être analysées (A). Le western blot représente les protéines P-EIF2α (Ser51), EIF2α et HSC70 dans les cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement (B). Les expressions géniques d'Atf4 et de Ddit3 relatives aux cellules non traitées ont été analysées par RT-qPCR après 24h et 48h de traitement (C). Le pourcentage de cellules DAPI négatives exprimant la calréticuline membranaire a été analysé par CMF après 24h et 48h de traitement. Les histogrammes représentent les données de MFI après 48h de traitement (D). Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles de 2 expériences réalisées en triplicat (n.s.,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

### c. Exploration des autres signaux de la mort immunogène

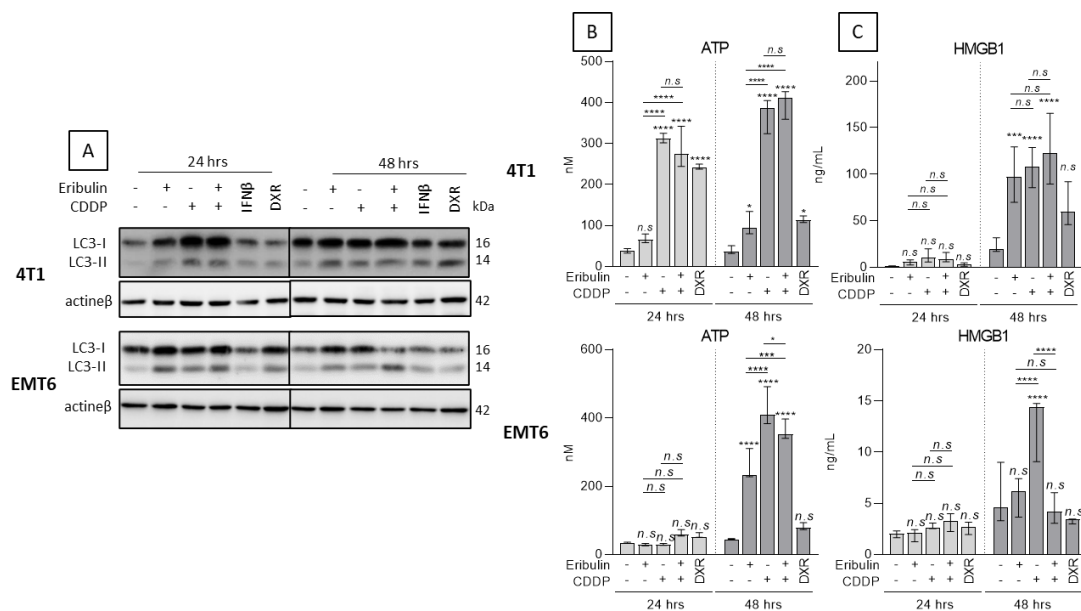
D'autres signaux peuvent être analysés comme la présence des différentes formes de la protéine LC3, la sécrétion d'ATP et d'HMGB1 (figure 11).

La visualisation de la forme non lipidée et lipidée de la protéine LC3 (LC3-I et II) est réalisée par western blot, permettant la mise en évidence d'un phénomène autophagique (figure 11A). Dans la lignée 4T1, nous pouvons remarquer une augmentation de LC3-II, caractéristique de son association aux autophagosomes, à 24h, avec toutes les chimiothérapies mais plus intensément avec le cisplatine en mono ou bithérapie. À 48h, cette induction est maintenue quel que soit le traitement utilisé. Dans les cellules EMT6, l'inverse

se produit avec une augmentation plus important avec l'éribuline en mono et bithérapie (figure 11A).

L'étude du relargage d'ATP qui peut suivre le processus autophagique ou après rupture de l'intégrité membranaire, est un second évènement moléculaire témoignant d'une induction de mort immunogène (figure 11B). Dans les cellules 4T1, le dosage de l'ATP permet de visualiser une différence entre nos chimiothérapies d'intérêt. En effet, c'est seulement après 48h de traitement que l'éribuline induira significativement et faiblement le relargage d'ATP. Le cisplatine, lui, va permettre une très nette augmentation d'ATP plus précocement et se maintiendra après 48h de traitement. Contrairement au cisplatine, la doxorubicine induira fortement la sécrétion à 24h mais diminuera après 48h de traitement. Dans les cellules EMT6, l'effet des chimiothérapies est plus tardif avec une induction après 48h de traitement par l'éribuline, le cisplatine et leur combinaison. Dans ce modèle tumoral, et à ce deux temps de traitement, la doxorubicine ne semble pas induire de relargage d'ATP (figure 11B).

Le relargage extracellulaire d'HMGB1 est un troisième signal mis en place plus tardivement car nécessitant la perméabilisation nucléaire et cytoplasmique (figure 11C). En effet, d'après les résultats de dosage dans le surnageant cellulaire des cellules 4T1, nous pouvons remarquer une augmentation significative de la concentration, à 48h, avec l'éribuline, le cisplatine et la combinaison mais non significativement avec la doxorubicine. Dans le modèle EMT6, seul le cisplatine en monothérapie induit le relargage de ce signal de danger après 48h de traitement (figure 11C).



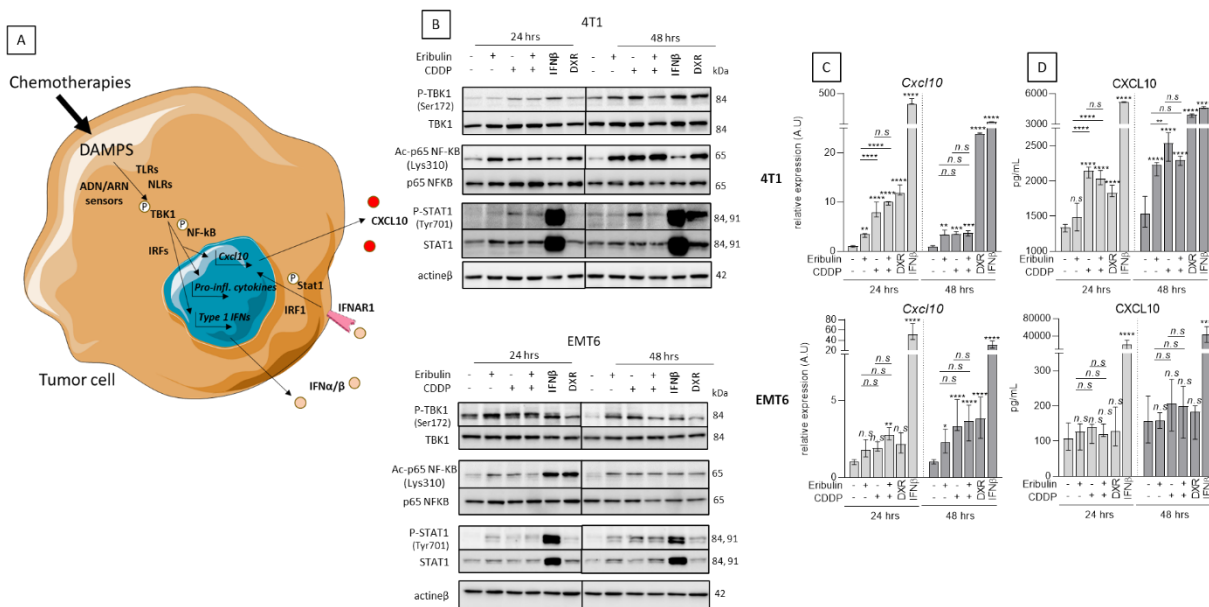
**Figure 11:** Exploration des autres signaux de mort immunogène. Le western blot représentent les protéines LC3-I, II et l'actineβ dans les cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement (A). La concentration d'ATP extracellulaire a été dosée par colorimétrie dans le surnageant des cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement (B). La concentration d'HMGB1 extracellulaire a été dosée par ELISA dans le surnageant des cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement (C). Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles de 2 expériences réalisées en triplicat (n.s, p > 0.05 ; \* , p < 0.05 ; \*\* , p < 0.01 ; \*\*\* , p < 0.001 et \*\*\*\* , p < 0.0001).

#### d. Etude des voies de signalisation inflammatoires associées à la chimiokine CXCL10

Après induction du stress génotoxique, les signaux de danger vont induire l'activation des voies de signalisation inflammatoires telles que la voie des interférons de type I médiée par STAT1 et la voie de NF- $\kappa$ B (figure 12A).

Par western blot, nous avons pu mettre en évidence l'activation de ces voies de signalisation *via* la phosphorylation de certaines protéines (figure 12B). Tout d'abord, nous avons analysé la phosphorylation de TBK1, une protéine au carrefour de la signalisation cellulaire induite après l'activation des TLRs, NLRs et/ou des senseurs à l'ADN et à l'ARN (cGAS/STING). Dans les cellules 4T1, à 24h, seuls les traitements par le cisplatine, la combinaison et la doxorubicine augmentent la phosphorylation de TBK1, mais à 48h, toutes les chimiothérapies l'induisent. Dans les cellules EMT6, la phosphorylation de TBK1 semble plus intense précocement avec toutes les chimiothérapies et diminue légèrement après 48h de traitement. Deux voies vont pouvoir ensuite être induites : la voie des IRFs, permettant l'induction de l'expression des IFN de types I, ou la voie pro-inflammatoire NF- $\kappa$ B. Les chimiothérapies induisent, à 24 et 48h, l'acétylation sur la lysine 310 de la sous-unité p65 témoin de l'activation de cette voie de signalisation dans les deux lignées cellulaires. Cependant, l'activation de cette voie de signalisation semble plus importante avec la doxorubicine qu'avec les autres chimiothérapies après 24h de traitement. Les IFN de types I peuvent aussi induire une réponse immunitaire inflammatoire. L'évaluation de la phosphorylation de STAT1 dans les cellules 4T1, permet de mettre en évidence l'activation du récepteur IFNAR1 suite à sa liaison avec les IFN I. Seul le cisplatine à 24h ainsi que la doxorubicine à 48h induisent la phosphorylation de STAT1, ce qui est en accord avec l'induction des IFN I par les monothérapies mais pas par la combinaison de traitements. Dans les cellules EMT6, toutes les chimiothérapies induisent la phosphorylation de STAT1 à 24h et à 48h mais la doxorubicine ne semble pas avoir d'effet supérieur comme dans les cellules 4T1 (figure 12B).

À la suite de l'activation ces voies de signalisation, la chimiokine CXCL10 peut être exprimée puis libérée. Nous avons donc évalué l'expression génique de cette chimiokine dans les cellules tumorales par RT-qPCR (figure 12C). Dans les cellules 4T1, après 24h de traitement, toutes les chimiothérapies induisent significativement son expression mais à des taux différents. La doxorubicine et le cisplatine ont le plus d'impact sur l'expression du *Cxcl10* suivi par l'éribuline. La combinaison des deux chimiothérapies a un effet significativement supérieur par rapport aux monothérapies. Après 48h de traitement, l'éribuline, le cisplatine et la combinaison induisent significativement l'expression de *Cxcl10* à des taux équivalents. La doxorubicine, reconnue dans la littérature pour son effet immunostimulant, permet bien l'augmentation importante de cette chimiokine à 48h (figure 12C). La sécrétion de CXCL10 dans le surnageant cellulaire a été dosée par technique ELISA (figure 12D). Après 24h de traitement par le cisplatine, la combinaison et la doxorubicine, la quantité de chimiokine est significativement augmentée par rapport aux cellules non traitées. Après 48h, toutes les chimiothérapies induisent significativement la sécrétion de CXCL10. Contrairement à l'expression génique, la sécrétion de CXCL10 n'est pas supérieure après traitement par la combinaison des deux chimiothérapies (figure 12D). Dans le modèle EMT6, l'induction précoce de l'expression de *Cxcl10* aura lieu seulement avec la combinaison de chimiothérapies. Après 48h de traitement, toutes les chimiothérapies vont alors augmenter cette expression mais à un niveau inférieur avec l'éribuline. De plus, contrairement aux cellules 4T1, et en accord avec les résultats sur la phosphorylation de STAT1, la doxorubicine n'induit pas l'expression de cette chimiokine de façon majeure comme le contrôle IFN $\beta$  (figure



**Figure 12:** Etude des voies de signalisation inflammatoires associées à la chimiokine CXCL10. Schéma représentatif des voies de signalisation pouvant être induites par les chimiothérapies et impliquées dans l'inflammation et dans l'expression de CXCL10 par la cellule tumorale (A). Les westerns blot représentent les protéines P-TBK1 (Ser172), TBK1, Ac-NF-kB p65 (Lys310), NF-kB p65, P-STAT1 (Tyr701), STAT1 et actine $\beta$  dans les cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement (B). L'expression génique de *Cxcl10* relative aux cellules non traitées a été analysée par RT-qPCR dans les cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement (C). La concentration de CXCL10 extracellulaire a été dosée par ELISA dans le surnageant des cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement (D). Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles de 2 expériences réalisées en triplicat (n.s,  $p > 0.05$  ; \* ,  $p < 0.05$  ; \*\* ,  $p < 0.01$  ; \*\*\* ,  $p < 0.001$  et \*\*\*\* ,  $p < 0.0001$ ).

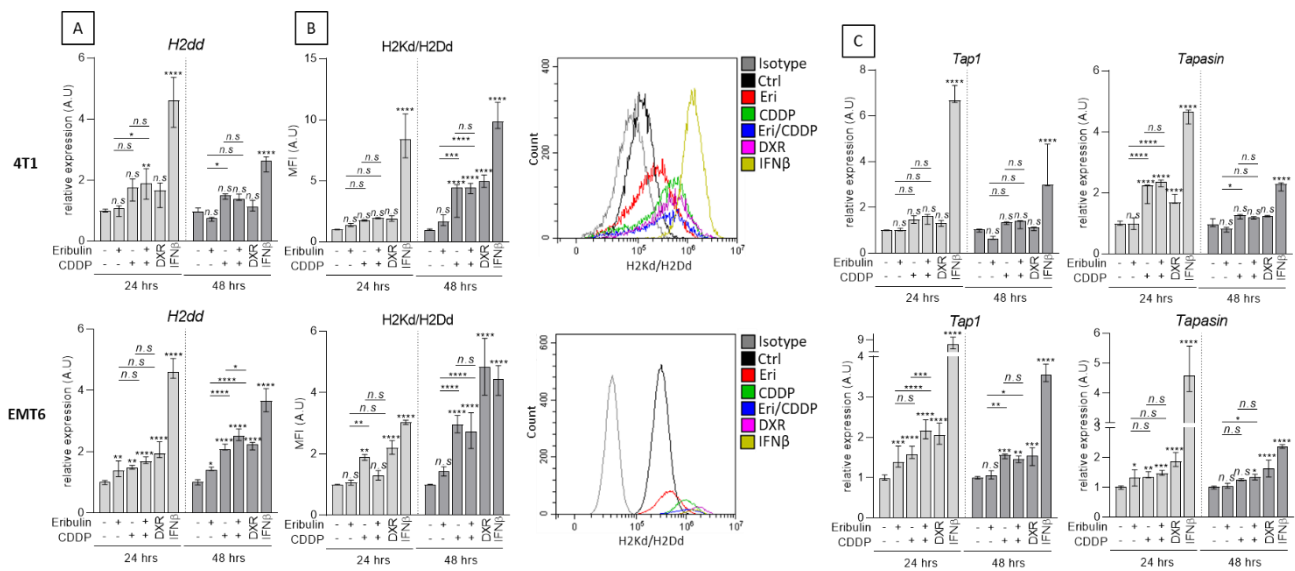


12C). La sécrétion de CXCL10 est plus complexe à évaluer dans cette lignée cellulaire car nous ne retrouvons pas d'augmentation significative avec le traitement par les chimiothérapies pouvant laisser supposer d'un délai d'induction par les chimiothérapies plus important que dans les cellules 4T1 (figure 12D).

### e. Analyse de l'antigénicité des cellules tumorales

Nous avons ensuite évalué la capacité de présentation antigénique des cellules tumorales suite au traitement par les chimiothérapies. Pour cela, nous avons étudié l'expression génique des allo-antigènes du CMH de classe I ainsi que des protéines impliquées dans cette présentation (figure 13).

Seule la combinaison de chimiothérapies permet une augmentation significative de l'expression de l'allo-antigène *H2dd* au temps 24h (figure 13A). Lorsque l'on met en évidence la présence des deux allo-antigènes H2Dd et H2Kd par cytométrie en flux, nous remarquons leur augmentation après 48h sous cisplatine et doxorubicine. L'éribuline n'induit pas d'augmentation quel que soit la durée de traitement et l'effet de la combinaison n'est pas supérieur au cisplatine seul (figure 13B). L'expression génique du transporteur *Tap1*, permettant le transport des peptides antigéniques à travers la membrane du RE, n'est pas influencée par les traitements quel que soit la durée de traitement (figure 13C). Après 24h de traitement par cisplatine et doxorubicine, l'expression génique de la glycoprotéine *Tapasine*, associée au transporteur TAP1, est augmentée par rapport aux cellules non traitées mais l'effet n'est plus visible à 48h (figure 13C). Dans le modèle EMT6, toutes les chimiothérapies induisent l'expression de l'allo-antigène *H2dd* à 24 et 48h de traitement mais la combinaison



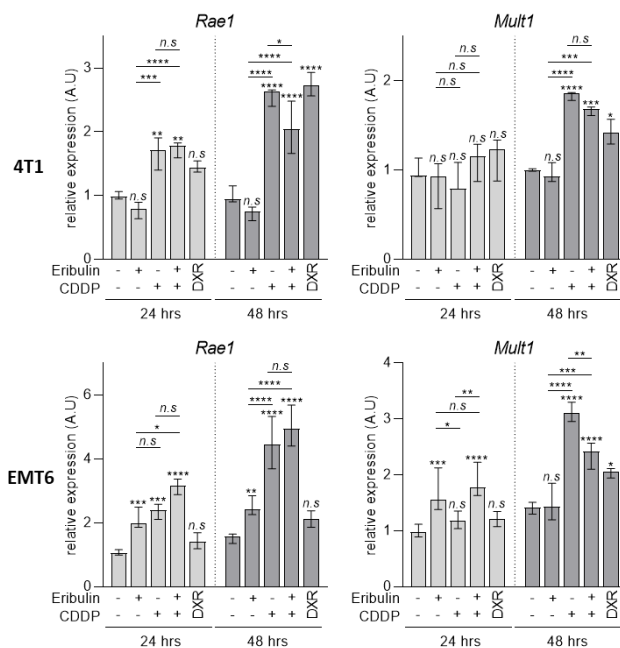
**Figure 13:** Analyse de l'antigénicité des cellules tumorales. Les expressions géniques de *H2dd* (A), *Tap1* et *Tapasine* (C) relatives aux cellules non traitées ont été analysées par RT-qPCR dans les cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement. L'intensité moyenne de fluorescence d'H2Dd et H2Kd relative aux cellules non traitées a été analysée par CMF dans les cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement. Les histogrammes représentent les données de CMF après 48h de traitement (B). Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles de 2 expériences réalisées en triplicat (n.s,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

de chimiothérapies permet d'augmenter l'expression par rapport aux monothérapies à 48h (figure 13A). Par cytométrie en flux, nous retrouvons une augmentation des allo-antigènes à 24 et à 48h de traitement par les chimiothérapies. Comme dans la lignée 4T1, cette induction est très nettement supérieure avec la doxorubicine (figure 13B). Cependant, dans le modèle EMT6, l'expression des molécules impliquées dans la présentation antigénique est augmentée avec les chimiothérapies après 24 et 48h de traitement (figure 13C).

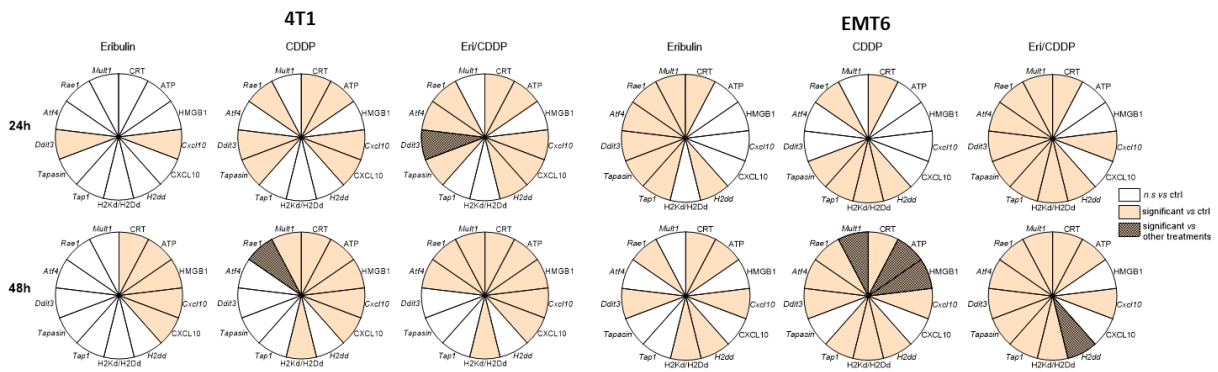
## f. Evaluation de l'immunostimulation par les cellules tumorales

Pour finir, nous avons étudié l'effet des chimiothérapies sur la capacité des cellules tumorales à présenter les ligands activateurs du récepteur NKG2D présent sur les cellules immunitaires T mais surtout sur les NK. Pour cela, nous avons analysé l'expression de deux ligands activateurs de NKG2D : *Rae-1* et *Mutl-1*. L'activation de ce récepteur va induire une cytotoxicité anti-tumorale (figure 14).

Dans le modèle 4T1, l'éribuline n'induit pas l'expression génique de *Rae-1* et de *Mutl-1* et quel que soit le temps d'incubation. Le cisplatine va permettre d'augmenter significativement leurs expressions géniques après 24h de traitement pour *Rae-1* et plus intensément après 48h pour les deux gènes. La combinaison de traitement ne semble pas augmenter ces inductions par rapport à la monothérapie de cisplatine. Dans le modèle EMT6, l'éribuline agit sur l'induction de l'expression génique du ligand *Rae-1*. Tout comme la lignée 4T1, le cisplatine va permettre d'augmenter l'expression génique des deux gènes notamment après 48h de traitement et la combinaison de chimiothérapies n'aura pas d'effet supérieur que les monothérapies (figure 14).



**Figure 14:** Evaluation de l'immunostimulation par les cellules tumorales. Les expressions géniques de *Rae-1* et *Mutl-1* relatives aux cellules non traitées ont été analysées par RT-qPCR dans les cellules 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement. Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles de 2 expériences réalisées en triplicat (n.s.,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).



**Figure 15:** Résumé des différents signaux immunogènes exprimés par les cellules cancéreuses 4T1 et EMT6 et induits après 24h ou 48h de traitement par éribuline, cisplatine ou par la combinaison des chimiothérapies.

Les différents résultats des expériences de mort immunogène réalisées sur les lignées 4T1 et EMT6 ont été résumées dans la figure 15. Dans la lignée 4T1, le cisplatine semble donc être une drogue plus immunogène que l'éribuline qui induit moins de signaux permettant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. En effet, les signaux de mort cellulaire immunogène tels que la sécrétion d'ATP et la translocation de la calréticuline à la membrane cytoplasmique sont augmentés avec le sel de platine. L'activation des voies de signalisation inflammatoires ainsi que l'augmentation de l'antigénicité des cellules tumorales sont d'autres preuves de cette immunostimulation. La combinaison de chimiothérapies permet l'induction de plus de signaux que le cisplatine après 24h de traitement, mais cet additivité immunologique semble transitoire dans la mesure où après 48h, la combinaison de chimiothérapies ne semble pas avoir d'effet remarquablement supérieur au cisplatine seul. Ces résultats concordent avec ceux retrouvés dans les tumeurs *in vivo*. En effet, l'éribuline induit peu de signaux contrairement au cisplatine et la combinaison de chimiothérapies ne permet pas d'augmenter significativement les signaux d'antigénicité et d'immunogénicité par rapport au cisplatine seul. Dans le modèle EMT6, l'éribuline semble avoir plus d'effets immunostimulants *in vitro* que dans le modèle 4T1 et de manière plutôt équivalente au cisplatine. Cependant, la combinaison de chimiothérapies permet d'augmenter significativement plus de signaux que les monothérapies mais, tout comme dans les cellules 4T1, cet effet semble transitoire. En effet, après 48h, le cisplatine en monothérapie est le traitement permettant d'induire le plus de signaux immunostimulants. *In vivo*, l'antigénicité et l'immunogénicité induite par les monothérapies étaient faibles contrairement à ce que nous retrouvons *in vitro*. Ces différences peuvent être dues aux populations étudiées : *in vivo*, la totalité des cellules du microenvironnement tumoral, sans distinction, sont étudiées contrairement à *in vitro* où seules les cellules tumorales EMT6 sont analysées. De plus, nous avons évalué les différentes expressions géniques dans les tumeurs murines récupérées après 8 jours de traitement, cependant le phénomène de mort cellulaire immunogène est un phénomène intervenant plutôt rapidement après l'injection de chimiothérapies. Il est donc possible que ces signaux d'antigénicité et d'immunogénicité soient retrouvés plus précocement.

La combinaison de chimiothérapies n'est donc pas synergique en termes de mort immunogène et l'efficacité immunologique constatée *in vivo* ne semble finalement pas liée à ce phénomène immunitaire. Cependant, l'association éribuline-cisplatine induit un meilleur recrutement de cellules immunitaires activées ainsi que leur maintien dans la tumeur qui pourraient être les causes de cette efficacité immunologique.

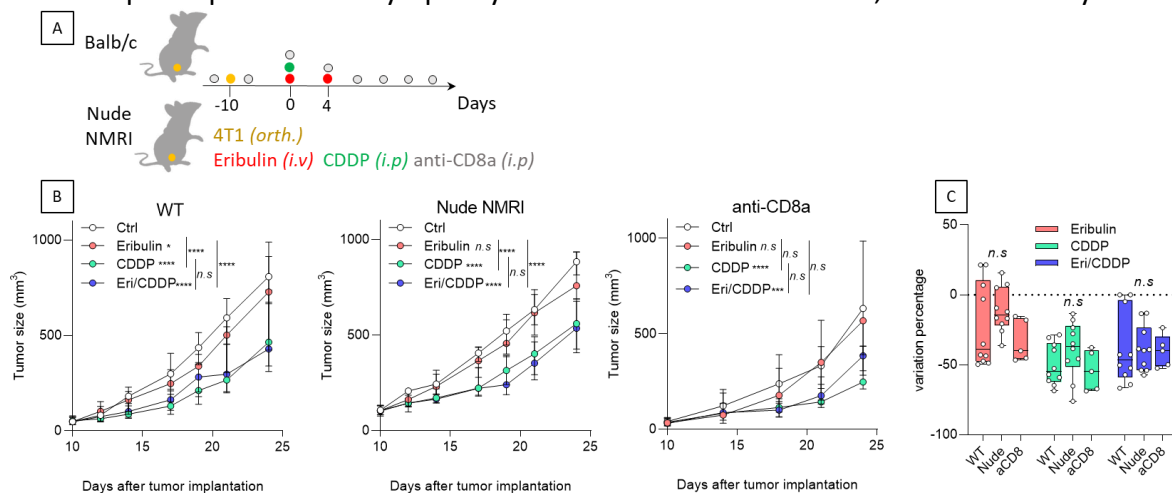
### III. Association chimiothérapies et immunothérapie

Par suite de ces résultats, nous pouvons penser que l'efficacité thérapeutique de la combinaison est due, en plus de l'effet cytotoxique pur, au recrutement et à l'activation de ces populations lymphocytaires, en particulier les cellules T-CD8<sup>+</sup> cytotoxiques.

#### a. Evaluation de l'efficacité thérapeutique T-dépendante des chimiothérapies

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé un suivi de croissance tumorale dans un modèle murin immunocompétent (WT), immunocompétent mais déplété en T-CD8<sup>+</sup> et immunodéficient (Nude NMRI) (figure 16A).

Après 25 jours de suivi de croissance tumorale nous ne retrouvons pas de différence significative entre les modèles immunocompétent et immunodéficients et cela quel que soit le traitement utilisé (figure 16B,C). Ces résultats indiquent que l'effet thérapeutique n'est pas influencé par la présence de lymphocytes T-CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>. En effet, du fait d'un thymus non



**Figure 16:** Evaluation de l'efficacité thérapeutique T-dépendante des chimiothérapies. Schéma représentatif des expériences *in vivo* réalisées dans un modèle murin immunocompétent (WT Balb/c) et immunodéficient (Nude NMRI) (A). 10 jours après avoir injecté les cellules 4T1 en orthotopique, les souris WT et Nude ont été randomisées et traitées par éribuline, cisplatine ou la combinaison des 2 chimiothérapies. Les injections d'anti-CD8a dans les souris Balb/c ont été effectuées 1 jour avant l'injection des cellules tumorales 4T1, 1 jour après, puis 2 fois par semaine pendant 3 semaines (A). Le suivi de croissance tumorale a été évalué pendant 4 semaines (B). Représentation du pourcentage d'inhibition de croissance d'une tumeur traitée par rapport à la taille tumorale médiane des souris contrôles (C). Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles (n.s,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

fonctionnel, le modèle Nude NMRI est déplété en lymphocytes T mais n'impacte pas les

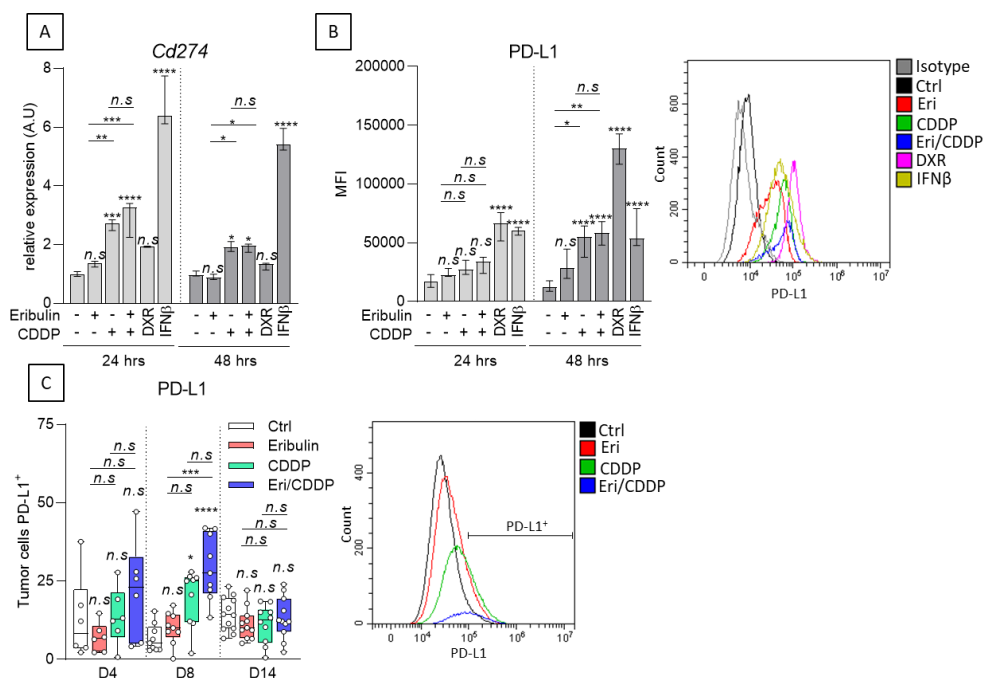
cellules NK. Ces résultats sont confirmés par les résultats après déplétion en lymphocytes T-CD8<sup>+</sup>. Effectivement, l'élimination de cette population ne permet pas non plus de perdre une partie de l'efficacité anti-tumorale des chimiothérapies (figure 16B,C).

Malgré l'infiltration lymphocytaire des tumeurs murines retrouvée dans les résultats précédents, un phénomène de résistance vis-à-vis de la réponse immunitaire doit donc finalement se mettre en place ne permettant pas aux cellules T de jouer leur rôle anti-tumoral.

En conclusion, malgré la capacité à « réchauffer » immunologiquement une tumeur « froide » immunologiquement comme 4T1, les effets anti tumoraux de la combinaison éribuline-cisplatine ne semblent pas influencés par la présence ou non d'un système immunitaire intègre, pouvant expliquer l'absence de synergie anti-tumorale observée dans nos modèles. Ces résultats laissent aussi entrevoir la possibilité de mécanismes de résistance à la réponse immunitaire induite et favorisée par cette association chez les animaux immunocompétents.

Nous avons ainsi cherché à savoir si de tels mécanismes d'immunoédition/immunosubversion pouvaient se mettre en place dans notre modèle consécutivement au traitement par chimiothérapie. Une des premières hypothèses que nous avons testées, est l'augmentation de l'expression de ligands inhibiteurs des cellules T, en particulier le marqueur PD-L1. En effet, nous avons précédemment remarqué une augmentation de PD-1 sur les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> au cours du temps et plus précocement avec la combinaison de chimiothérapies. L'association du ligand PD-L1 et de son récepteur PD-1 va induire l'inhibition de l'activité anti-tumorale des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> ce qui pourrait expliquer les résultats retrouvés chez les souris immunocompétentes/immunodéficientes.

Nous avons donc souhaité évaluer l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales 4T1 *in vitro* et *in vivo* après exposition par les différents traitements. Les résultats des RT-qPCR représentés sur la figure 17A indiquent une augmentation de l'expression génique de *Cd274*, codant pour la protéine PD-L1, avec le cisplatine et la combinaison de traitements à 24h et à 48h dans les cellules tumorales. Nous retrouvons l'expression induite de la protéine par cytométrie en flux, sur les cellules tumorales, après 48h de traitement par l'éribuline, le cisplatine et la combinaison (figure 17B). Cet effet du cisplatine et la combinaison se confirme dans les tumeurs murines. En effet, l'expression protéique de PD-L1 sur les cellules tumorales issues des tumeurs murines est significativement augmentée avec le cisplatine et d'autant plus avec la combinaison éribuline-cisplatine (figure 17C).



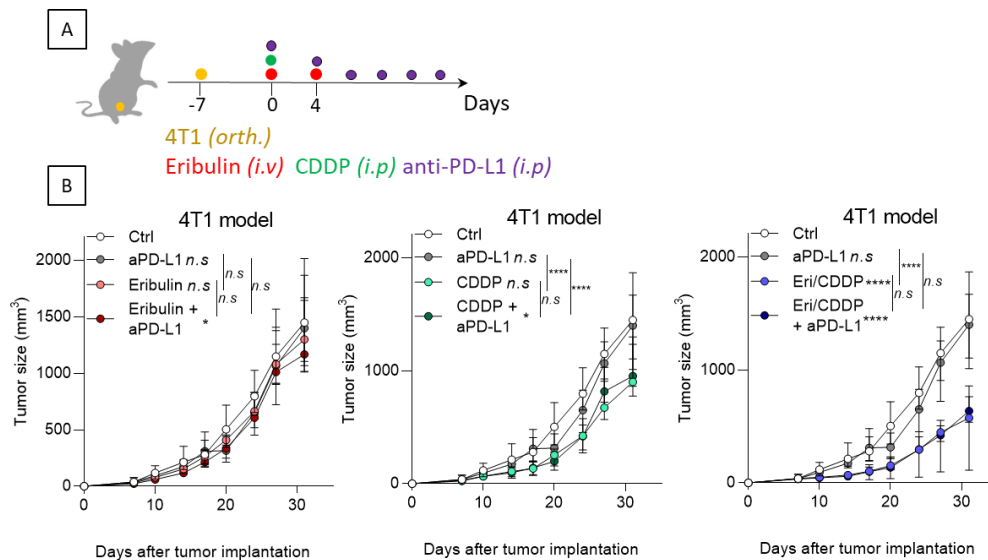
**Figure 17:** Evaluation de l'expression de PD-L1 et de son gène Cd274 dans les cellules tumorales in vitro et in vivo. L'expression génique de Cd274 relatives aux cellules non traitées a été analysée par RT-qPCR dans les cellules 4T1 in vitro après 24h et 48h de traitement (A). Les intensités moyennes de fluorescence de PD-L1 relatives aux cellules non traitées ont été analysées par CMF dans les cellules 4T1 in vitro après 24h et 48h de traitement. Les histogrammes représentent les données de CMF après 48h de traitement (B). Le pourcentage de cellules tumorales issues de tumeurs murines exprimant PD-L1 a été analysée par CMF après 4 (n=6), 8 (n=9) ou 14 jours de traitement (n=11). Les histogrammes représentent les données de CMF après 48h de traitement (C). Les expériences in vitro ont été réalisées 2 fois en triplicat. Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles (n.s, p > 0.05; \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001 et \*\*\*\*, p < 0.0001).

Comme nous avons pu le voir, les cellules T-CD8<sup>+</sup> recrutées et activées par l'effet immunogénique de la combinaison de chimiothérapies sont inhibées par un mécanisme de résistance chimio-induit. Effectivement, ces traitements induisent l'augmentation de l'expression génique et protéique de PD-L1 dans les cellules tumorales. Cette induction peut être due à un effet propre lié aux chimiothérapies mais aussi potentiellement à un effet médié par la réponse immunitaire. Effectivement, la combinaison éribuline-cisplatine permet l'activation d'une réponse immunitaire T qui va pouvoir induire l'augmentation de PD-L1 via l'IFN $\gamma$ . L'immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1 permettrait donc de lever l'inhibition de l'activité lymphocytaire et de potentiellement de restaurer l'efficacité des chimiothérapies.

## b. Association à une immunothérapie par anticorps anti-PD-L1

Nous avons réalisé un suivi de croissance tumorale dans le modèle 4T1 après traitement par éribuline, cisplatine ou la combinaison, en association, ou non, à une immunothérapie par anticorps anti-PD-L1 (figure 18A).

Dans le modèle 4T1, nous pouvons remarquer que cette association thérapeutique ne fonctionne pas quel que soit la chimiothérapie utilisée. En effet, le contrôle tumoral associé aux chimiothérapies n'est pas augmenté par l'ajout d'un anticorps ciblant PD-L1 (figure 18B). Le modèle 4T1 est donc bien semblable aux tumeurs généralement retrouvées chez les patientes. En effet, ce modèle est résistant à l'immunothérapie et le traitement par un anti-PD-L1 ne fonctionne pas.



**Figure 18:** Évaluation de l'efficacité anti-tumorale de l'immunothérapie anti-PD-L1. Schéma représentatif de l'expérience in vivo (A). 7 jours après avoir injecté les cellules 4T1 en orthotopique, les souris ont été randomisées et traitées par éribuline, cisplatine ou la combinaison des 2 chimiothérapies en association avec un anti-PD-L1 injecté 1 fois par semaine pendant 4 semaines (A). Le suivi de croissance tumorale a été réalisé après traitement par éribuline, cisplatine ou leur combinaison, en association avec une immunothérapie par aPD-L1 (B). Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles (n.s.,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ). Ctrl, aPD-L1:  $n=12$  / Eri, CDDP, Eri/CDDP :  $n=7$  / Eri+aPD-L1, CDDP+aPD-L1, Eri/CDDP+aPD-L1 :  $n=9$ .

Dans nos modèles de cancer du sein, la combinaison de chimiothérapies comprenant l'éribuline et le cisplatine paraît induire une mort cellulaire immunogène capable d'activer la réponse immunitaire anti-tumorale. Cependant, l'induction en parallèle de PD-L1 par les cellules tumorales provoque une résistance vis-à-vis de ces cellules immunitaires. Malgré l'utilisation d'un traitement immunogène, l'efficacité de l'immunothérapie par un anticorps anti-PD-L1 n'est pas restaurée, indiquant que des mécanismes d'immunosubversion complémentaires pourraient s'être mis en place par les cellules tumorales. Nous avons ainsi cherché à savoir si de tels mécanismes d'échappement, particulièrement les mécanismes d'immunosuppression et de modulation du stroma tumoral pouvaient exister dans notre modèle consécutivement au traitement par les chimiothérapies.

## IV. Evaluation des phénomènes d'immuno-résistance chimio-induits

Des mécanismes d'immunosélection/subversion et/ou d'immuno-exclusion médiés par les cellules tumorales se mettent probablement en place au niveau du microenvironnement tumoral afin d'échapper à la réponse immunitaire induite par la combinaison de chimiothérapies. Les hypothèses avancées dans ce travail sont tout d'abord l'induction d'une immunosuppression *via* certaines cellules de l'immunité telles que les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSCs), les macrophages et les lymphocytes T-reg. Ces cellules peuvent créer un microenvironnement tumoral immunosuppressif bloquant ainsi l'activité des cellules immunitaires anti-tumorales. Notre deuxième hypothèse est l'induction un phénomène mécanique par modulation du stroma tumoral/ péri-tumoral. Les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> recrutés et activés suite au traitement par l'association éribuline-cisplatine peuvent être séquestrés au front tumoral et ne pourront donc pas être au contact des cellules cancéreuses pour jouer leur rôle anti-tumoral. Cette hypothèse d'immuno-exclusion peut être liée à l'induction d'une fibrose péri-tumorale composée de fibres de collagènes pouvant bloquer la progression des lymphocytes.

### a. Evaluation des différentes populations immunosuppressives intra-tumorales

Les expériences d'immunomonitoring ont permis d'analyser les différentes populations cellulaires immunosuppressives présentes dans le microenvironnement tumoral (figure 19).

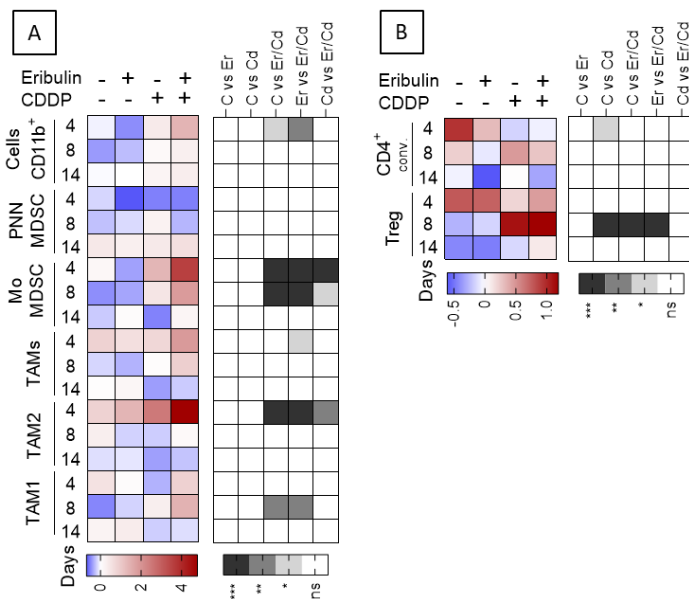
Tout d'abord, nous pouvons remarquer une augmentation des cellules CD11b<sup>+</sup>, représentant les cellules immunosuppressives totales, avec la combinaison éribuline-cisplatine au temps le plus précoce. A partir de cette population générale, nous pouvons différencier la population des MDSCs (monocytaires (Mo-MDSCs) et polymorphonucléaires/granulocytaires (PNN-MDSCs)), des macrophages (TAM1 et TAM2) (figure 19A).

D'après les résultats de cytométrie nous pouvons remarquer une augmentation significative des MDSCs monocytaires après 4 jours de traitement par la combinaison de chimiothérapie ainsi que leur persistance jusqu'à 8 jours de traitement. La deuxième population de cellules myéloïdes, les PNN-MDSCs, n'est pas impactée par les différents traitements. Ceci peut s'expliquer par l'environnement cytokinique plus à même de recruter les précurseurs monocytaires que granulocytaires mais aussi par l'effet direct des traitements exerçant une pression de sélection différente entre ces populations (figure 19A).

La population macrophagique immunosuppressive apparait aussi impactée par cette combinaison de chimiothérapies. En effet, au temps J4, nous pouvons aussi remarquer une augmentation des TAM2 avec la combinaison de traitements (figure 19A).



La troisième population immunosuppressive analysée est celles des lymphocytes T régulateurs (T-reg) (figure 19B). Dans les résultats précédents, nous avons pu remarquer une augmentation des cellules T-CD4<sup>+</sup> par la combinaison de traitement. Par le marquage de Foxp3, nous pouvons différencier 2 sous catégories de lymphocytes T-CD4<sup>+</sup>: les T-CD4<sup>+</sup> conventionnels (CD4<sup>+</sup>/Foxp3<sup>-</sup>) et les T-régulateurs (CD4<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup>). Ces deux types cellulaires vont avoir des effets différents sur le microenvironnement tumoral. Par CMF, nous pouvons voir que les T-CD4<sup>+</sup> conventionnels ne sont pas augmentés avec les traitements contrairement aux lymphocytes T-reg. Nous pouvons donc conclure que l'infiltration en T-CD4<sup>+</sup> est majoritairement composée de la population des lymphocytes T-régulateurs après 8 jours de traitement par la combinaison (figure 19B).



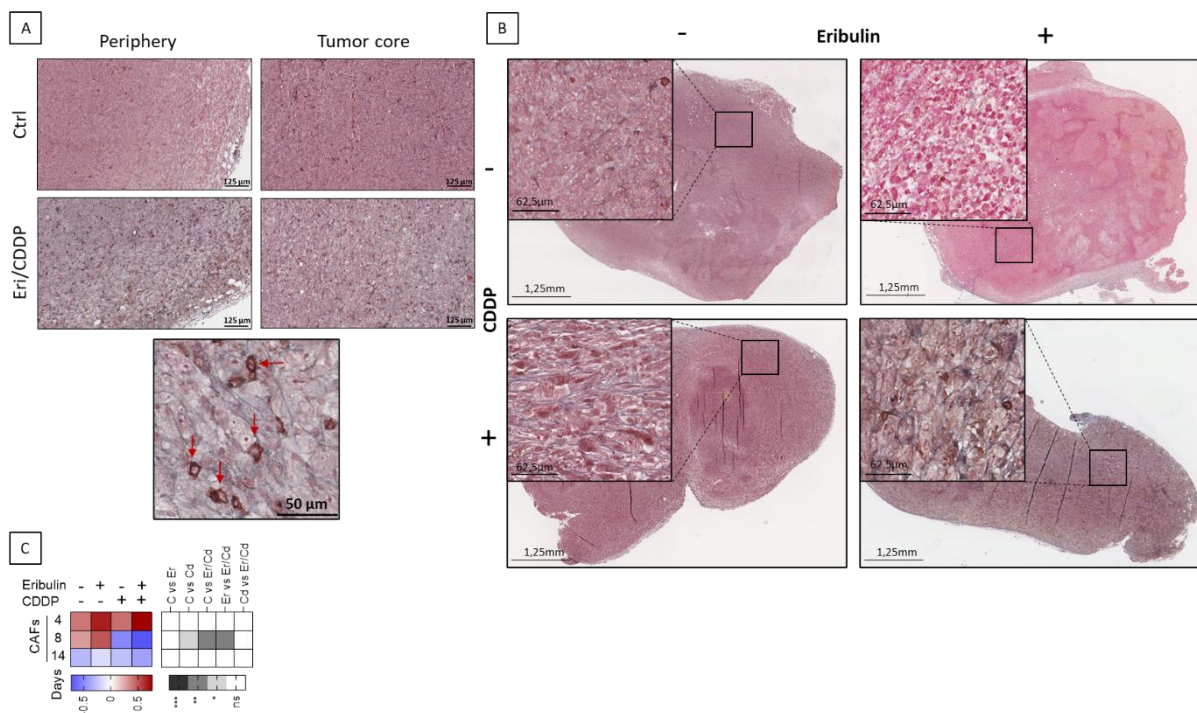
**Figure 19:** Evaluation des différentes populations immunosuppressives CD11b<sup>+</sup> intra-tumorales. Les tumeurs ont été récupérées après 4 (n=6), 8 (n=9) ou 14 jours de traitement (n=11) puis les cellules tumorales ont été marquées par un panel d'anticorps et analysées par CMF (A)(B). Les « heat map » de gauche/haut représentent le z-score calculé à partir des résultats de CMF. Les « heat map » de droite/bas représentent les résultats statistiques (n.s, p > 0.05 ; \*, p < 0.05 ; \*\*, p < 0.01 ; \*\*\*, p < 0.001 et \*\*\*\*, p < 0.0001).

Ces différents résultats s'accordent donc avec l'hypothèse d'une immunosubversion *via* le recrutement de cellules immunosuppressives dans le microenvironnement tumoral telles que les Mo-MDSCs, les TAM2 et les T-reg pouvant contrecarrer la réponse immunitaire cytotoxique induite.

## b. Analyse de la modulation structurelle du microenvironnement tumoral

Après avoir mis en évidence les populations immunosuppressives chimio-induites, nous avons évalué la modulation du microenvironnement tumoral pouvant aussi être à l'origine de cette résistance tumorale à la réponse immune chimio-induite (figure 20).

Nous avons tout d'abord cherché à évaluer la fibrose tumorale par une coloration des coupes tumorales au trichrome de Goldner. Cette analyse a permis de mettre en évidence, par une coloration en bleu/vert, les fibres de collagène présentes au sein de la tumeur mais aussi au pourtour de celle-ci. De plus, l'association de cette coloration au marquage enzymatique des T-CD8<sup>+</sup> nous informe sur la localisation de cette population. En effet, cette population immunitaire cytotoxique peut être séquestrée à la périphérie tumorale par la présence d'une capsule fibrotique empêchant donc le contact avec les cellules tumorales. L'évaluation visuelle des différentes conditions de traitement semble montrer que les T-CD8<sup>+</sup> sont assez bien dispersés dans la tumeur et ne sont donc pas séquestrés à la périphérie tumorale quel que soit le traitement utilisé (figure 20A). Néanmoins, il est intéressant de voir qu'une augmentation de la fibrose intra-tumorale survient après traitement par cisplatine. En effet, les fibres de collagènes semblent être plus nombreuses et plus épaisses que dans les tumeurs contrôles. La combinaison ne semble pas induire plus de fibrose que la monothérapie par cisplatine. Les tumeurs traitées par éribuline seule ne paraissent pas fibrotiques et les fibres de collagène sont restreintes au niveau la périphérie tumorale (capsule fibrotique) (figure 20B).



**Figure 20:** Analyse de la modulation du microenvironnement tumoral et de la localisation des cellules T-CD8<sup>+</sup>. Les coupes tumorales issues de tumeurs récupérées après 8 jours de traitement ont été marquées par un anticorps anti-CD8a puis colorées par un trichrome de Goldner. Les fibres de collagènes sont colorées en bleu/vert, les noyaux cellulaires en rouge et les cellules T-CD8<sup>+</sup> en marron. Les photos représentent les cellules CD8<sup>+</sup> marquées par l'anticorps anti-CD8, localisées à la périphérie ou dans le cœur tumoral, sur une lame de tumeur contrôlée et traitée par l'association éribuline-cisplatine. Echelle : 125 µm. Les flèches rouges indiquent les cellules T marquées par l'anticorps anti-CD8, échelle 50 µm (A). Les photos représentent les fibres de collagènes intra-tumorales marquées par le trichrome de Goldner. Echelles : 1.25 mm et 62.5 µm (B). Les tumeurs ont été récupérées après 4 (n=6), 8 (n=9) ou 14 jours de traitement (n=11) puis les cellules tumorales ont été marquées par un panel d'anticorps et analysées par CMF (C). Le « heat map » de gauche/haut représente le z-score calculé à partir des résultats de CMF. Le « heat map » de droite/bas représente les résultats statistiques (n.s, p > 0.05 ; \*, p < 0.05 ; \*\*, p < 0.01 ; \*\*\*, p < 0.001 et \*\*\*\*, p < 0.0001).

D'après ces résultats, le cisplatine semble bien induire l'augmentation des fibres de collagène intra-tumorales mais cette fibrose ne semble pas immuno-exclure notre population immunitaire T-CD8<sup>+</sup> chimio-induite.

Dans un contexte tumoral, les cellules principalement impliquées dans la production de collagène ou d'éléments de la matrice extracellulaire sont appelés fibroblastes associés au cancer (CAF). La présence de ces cellules ont été analysées par CMF dans les tumeurs 4T1 (figure 20C). Nous pouvons remarquer qu'après 8 jours de traitement, les CAF sont diminués dans les tumeurs traitées par le cisplatine et la combinaison de traitement. Ces résultats sont donc inversement corrélés avec la présence de collagène visualisée par la coloration au trichrome de Goldner. Cependant, nous pouvons supposer que les CAF résistants au traitement vont avoir une activité pro-tumorale et pro-fibrotique plus importante (figure 20C).

L'immunogénicité induite par l'association de l'éribuline et du cisplatine promeut le recrutement et l'activation des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> dans le microenvironnement tumoral. Cependant, l'efficacité thérapeutique de ces chimiothérapies ne semble pas être influencée par la présence de ces cellules immunitaires pouvant s'expliquer par la génération d'un mécanisme de résistance. Effectivement, l'expression du ligand inhibiteur des cellules immunitaires PD-L1 est induite suite au traitement par le cisplatine. Néanmoins, l'association d'un anticorps bloquant PD-L1 aux chimiothérapies, ne permet pas de diminuer la croissance tumorale dans notre modèle de CSTN. Un second mécanisme de résistance chimio-induit semble donc se mettre en place dans les tumeurs murines. Tout d'abord, nous avons remarqué l'induction de cellules immunitaires immunosuppressives telles que les MDSCs monocytaires, les TAM2 et les T-reg après traitement par la combinaison de chimiothérapies. Ces cellules vont avoir la capacité d'inhiber la fonction anti-tumorale des cellules T-CD8<sup>+</sup> précédemment recrutées. Ensuite, nous avons évalué la modulation du microenvironnement tumoral pouvant être associé au mécanisme de résistance. Le cisplatine semble induire l'augmentation de la fibrose tumorale sans pour autant immuno-exclure les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> du cœur tumoral. A l'inverse, cette chimiothérapie va permettre de diminuer la population des CAF laissant supposer une augmentation de l'activité intrinsèque des cellules résistantes au cisplatine.

Le point commun entre ces phénomènes de résistance (immunosuppression et fibrose intra-tumorale) peut être le TGF- $\beta$ . En effet, dans un contexte cancéreux, cette molécule aura un effet pro-tumoral en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), l'angiogenèse, le remodelage de la matrix extracellulaire ainsi que l'augmentation des capacités d'immunosuppression des cellules du microenvironnement tumoral (MDSCs, TAM2, T-reg, et CAF).

## V. Exploration de la voie du TGF- $\beta$

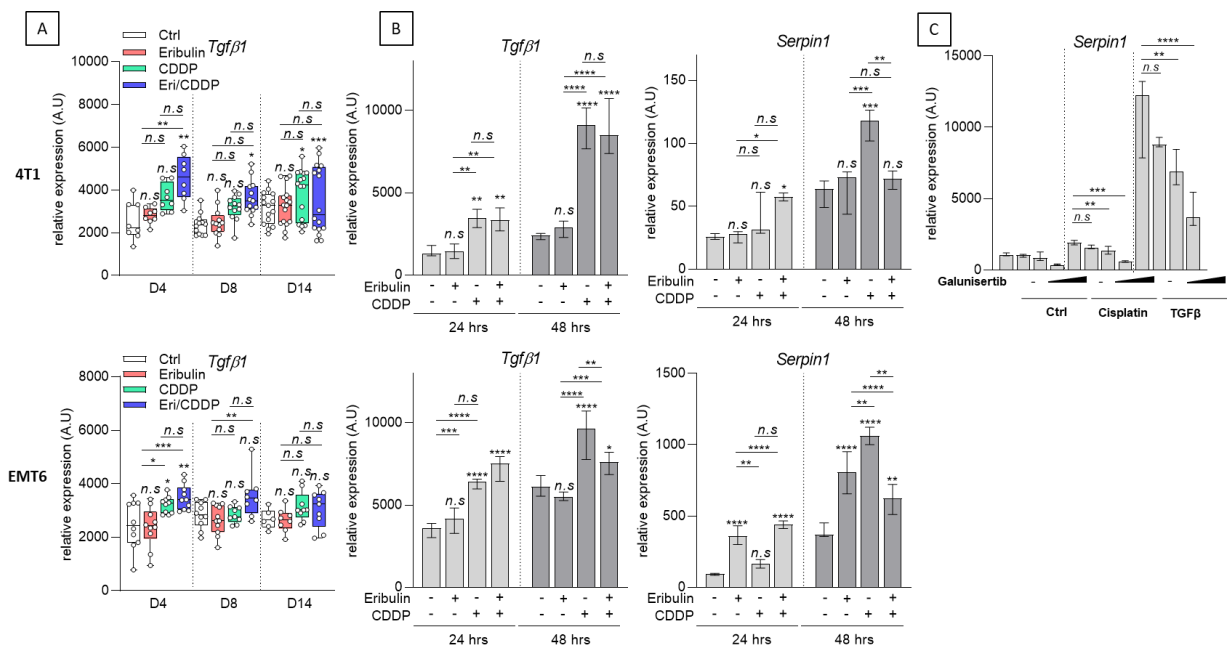
Afin de valider notre hypothèse sur le rôle du TGF- $\beta$  dans l'induction de la résistance à l'association des chimiothérapies et de l'anti-PD-L1, nous avons évalué son expression dans les tumeurs murines suite aux différents traitements de chimiothérapie (figure 21).

### a. Evaluation de l'expression du TGF- $\beta$ chimio-induite

D'après les résultats de la RT-qPCR sur les échantillons tumoraux, l'expression génique du *Tgf $\beta$ 1* est induite avec la combinaison de chimiothérapies au temps le plus précoce dans les deux modèles tumoraux par rapport aux tumeurs non traitées et aux monothérapies (figure 21A).

Le TGF- $\beta$  peut être produit par différentes populations cellulaires notamment les cellules tumorales et sous l'action des chimiothérapies. Nous avons donc évalué l'expression du *Tgf $\beta$ 1*, *in vitro*, dans les cellules tumorales. Le cisplatine et la combinaison de chimiothérapies induisent l'expression du *Tgf $\beta$ 1* par les cellules tumorales 4T1 et EMT6 après 24h et 48h de traitement (figure 21B).

Le TGF- $\beta$  est produit sous forme de TGF- $\beta$  latent, c'est-à-dire inactif. Celui-ci aura donc besoin d'être activé pour pouvoir être fonctionnel. Afin de vérifier l'état d'activation du TGF- $\beta$ 1 induit par la chimiothérapie, nous avons analysé l'expression génique de la *Serpine1*, un gène inductible par le TGF- $\beta$  actif (figure 21B). D'après les résultats de la figure 21B, le cisplatine induit aussi en parallèle du *Tgf $\beta$ 1*, l'augmentation de l'expression de la *Serpine1* dans les deux modèles tumoraux. Toujours dans le but de vérifier que le TGF- $\beta$  produit est biologiquement actif, nous avons bloqué, *in vitro*, le récepteur du TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ R-1) par un effet dose d'inhibiteur de tyrosine kinase : le galunistertib (figure 21C). Nous avons ensuite analysé l'expression génique de la *Serpine1* après 48h de traitement par le cisplatine ou après incubation avec du TGF- $\beta$  en tant que contrôle positif. Nous retrouvons l'induction de l'expression génique de la *Serpine1* avec le cisplatine par rapport aux cellules non traitées, ainsi que par l'ajout de TGF- $\beta$  actif dans le surnageant. L'expression génique de la *Serpine1*, induite par le cisplatine et le TGF- $\beta$ , est de plus en plus diminuée par des doses croissantes de galunisertib (figure 21C). Ces différentes expériences indiquent que le TGF- $\beta$  produit est bien fonctionnel et passe par la voie de signalisation en aval du TGF $\beta$ R-1.



**Figure 21:** Evaluation de l'expression et de la sécrétion du TGF-β. Les tumeurs murines 4T1 et EMT6 ont été récupérées après 4 (n=8), 8 (n=12) ou 14 jours de traitement (n=15) par éribuline, cisplatine ou la combinaison des chimiothérapies puis les cellules tumorales ont été lysées et l'ARN a été extrait. L'expression génique du *Tgfβ1* dans les tumeurs murines 4T1 et EMT6 après traitements a été analysée par RT-qPCR (A). Les cellules tumorales 4T1 et EMT6 ont été traitées par l'IC50 d'éribuline, de cisplatine, de la combinaison des deux ou de doxorubicine. Les cellules ont été récupérées après 24h ou 48h de traitement et l'expression génique du *Tgfβ1* et de la *Serpin1* ont été analysées par RT-qPCR (B). In vitro, les cellules 4T1 ont été traitées par un effet dose de Galunisertib (10 nM, 100 nM, 1 μM) seul ou en association avec le cisplatine ou le TGF-β pendant 48h puis l'expression génique de la *Serpin1* a été analysée par RT-qPCR (C). Les expériences in vitro ont été réalisées 2 fois en triplicat. Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles (n.s.,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

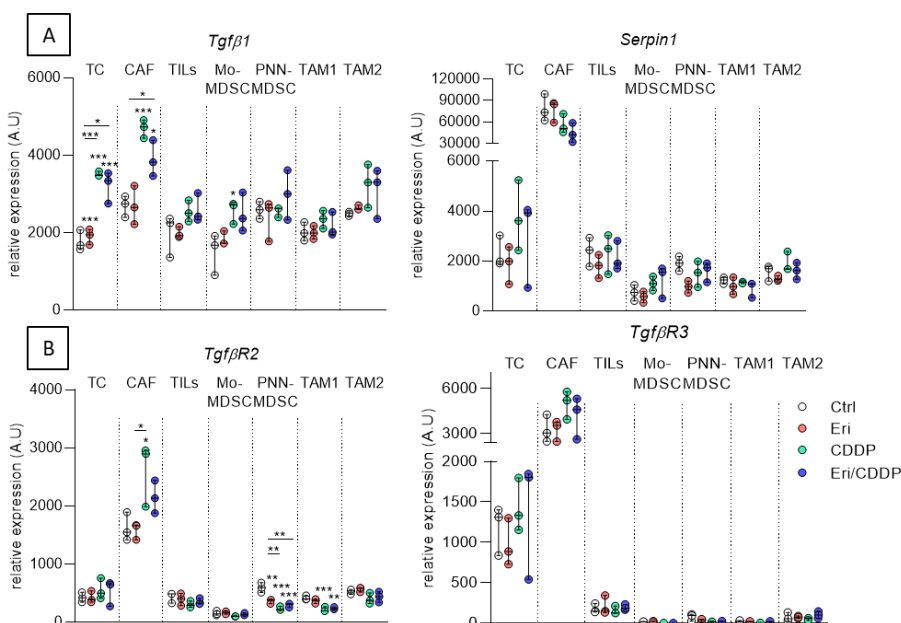
Ces résultats confirment donc bien les données *in vivo*. En effet, dans la combinaison de chimiothérapies, le cisplatine induit bien l'expression de TGF-β actif pouvant promouvoir la résistance tumorale à la réponse immune induite parallèlement. De plus, *in vitro*, nous mettons en évidence un TGF-β chimio-induit actif et produit par les cellules tumorales. Nous pouvons donc nous demander quelles cellules (en plus des cellules tumorales) sont susceptibles de produire le TGF-β chimio-induit *in vivo* dans les tumeurs, et quelles cellules seront susceptibles d'être réceptives à cette signalisation médiée par le TGF-β.

Afin d'évaluer les cellules pouvant être impliquées dans l'expression ou la reconnaissance du TGF-β, nous avons mis au point une expérience d'isolation de différentes populations (cellules tumorales, cellules immunitaires CD45<sup>+</sup>, et fibroblastes associés au cancer (CAF) retrouvées dans le microenvironnement tumoral, à partir de tumeurs murines 4T1 traitées par les monothérapies ou la combinaison éribuline-cisplatine (figure 22). Une fois les populations séparées, nous avons récupéré les cellules CD45<sup>+</sup> et réalisé une analyse quantitative de 4 populations par tri cellulaire : les Mo-MDCS, PNN-MDSC, TAM1 et TAM2. A partir des 7 populations isolées, nous avons réalisé des expériences de RT-qPCR afin de mettre en évidence l'expression de gènes tels que le *Tgfβ1*, la *Serpin1*, et les récepteurs au TGF-β (*TgfβR2*, *TgfβR3*) (figure 22).

Nous pouvons tout d'abord remarquer que les 7 populations isolées expriment naturellement le *Tgfb1* (figure 22A). Lorsque l'on traite les tumeurs avec le cisplatine ou la combinaison de chimiothérapies, cette expression est induite à différents taux en fonction de la population étudiée. En effet, nous pouvons remarquer que les cellules tumorales et les fibroblastes associés au cancer (CAF) sont les populations plus influencées par ces traitements car l'expression génique du *Tgfb1* est quasiment multipliée par deux par rapport aux souris contrôles. Cependant, la combinaison semble induire une expression plus faible du *Tgfb1* dans les CAF contrairement au cisplatine. A des taux relativement plus faibles, nous remarquons que le cisplatine et la combinaison éribuline-cisplatine induisent aussi l'expression génique de *Tgfb1* dans les populations immunosuppressives : Mo-MDSC, PNN-MDSC et les TAM2 (figure 22A).

Ensuite, nous pouvons remarquer que les cellules tumorales, CD45<sup>+</sup>, Mo-MDSC, PNN-MDSC, TAM1 et TAM2 expriment le gène de la *Serpine1* à des taux plus ou moins équivalents contrairement aux CAF qui l'expriment à des taux nettement supérieurs aux autres populations (figure 22A). Ces résultats semblent indiquer que le TGF- $\beta$  induit par les chimiothérapies va être capable d'induire à son tour l'expression d'autres gènes cibles pro-fibrotiques/pro-tumoraux de cette cytokine.

L'évaluation de l'expression du *TgfbR2*, le récepteur liant le TGF- $\beta$ , permet d'évaluer les populations capables de répondre à la stimulation par le TGF- $\beta$  actif (figure 22B). Les résultats de RTqPCR mettent en évidence l'expression de ce récepteur dans toutes les lignées évaluées mais à des taux particulièrement importants dans les CAF. De plus, nous pouvons remarquer l'induction de l'expression génique par le cisplatine et la combinaison de chimiothérapies dans ces cellules. Le TGF- $\beta$ 3 est un co-récepteur du TGF- $\beta$ 2 et nous confirme l'expression induite par le cisplatine et la combinaison de traitement dans les CAF mais aussi dans les cellules tumorales (figure 22B).



**Figure 22:** Evaluation de l'expression de gènes associés à la voie du TGF- $\beta$  dans différentes populations intra-tumorales. Les tumeurs murines 4T1 ont été récupérées après 4 jours de traitement par éribuline, cisplatine ou la combinaison des 2 chimiothérapies. Les CAFs, les cellules CD45<sup>+</sup> et les cellules tumorales ont été isolées puis les Mo-MDSC, PNN-MDSC, TAM1 et TAM2 ont été triées à partir des cellules CD45<sup>+</sup>. Les ARN des différentes populations cellulaires ont été extraits afin d'analyser l'expression génique du *Tgfb1*, de la *Serpine1* (A), du *TgfbR2* et *R3* (B) (n.s,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ).

La combinaison de traitements éribuline-cisplatine s'accompagne d'un recrutement de cellules immunosuppressives ainsi que d'une modulation du microenvironnement tumoral. Le point commun entre ces deux mécanismes pourrait être le TGF- $\beta$ , une cytokine impliquée dans la prolifération et la progression tumorale. Effectivement, *in vivo*, nous retrouvons l'augmentation de l'expression du gène *Tgf $\beta$ 1* sous l'action de la combinaison de chimiothérapies dans les deux modèles tumoraux. Par des expériences *in vitro*, nous avons mis en évidence une induction de l'expression du gène *Tgf $\beta$ 1* par les cellules tumorales 4T1 suite au traitement par cisplatine et la combinaison. De plus, l'analyse du gène de la *Serpine1* et du blocage du récepteur au TGF- $\beta$ 1 prouve l'activation de cette cytokine chimio-induite. Après isolation de plusieurs populations cellulaires, nous remarquons que les cellules tumorales et les CAF semblent être les populations les plus impliquées dans le processus d'immunorésistance induite par le cisplatine. D'après les résultats de CMF précédents nous avons remarqué la diminution des CAF par après traitement au cisplatine. Ces nouveaux résultats laissent entrevoir le fait que les CAF résistants à cette chimiothérapie pourraient être plus actifs et plus à même de sécréter du TGF- $\beta$ . De plus, pour la première fois, nous pouvons remarquer un effet moindre de la combinaison de chimiothérapies en terme d'induction l'expression du *Tgf $\beta$ 1* et de la *Serpine1* par rapport au cisplatine seul dans la population des CAF.

Afin d'explorer l'imputabilité du TGF- $\beta$  dans la résistance à la réponse immune induite par l'association éribuline-cisplatine, nous avons traité les animaux porteurs de tumeurs CSTN avec des associations chimiothérapies-immunothérapie-anti-TGF- $\beta$ .

## b. Evaluation de l'efficacité thérapeutique d'une association avec un traitement ciblant le TGF- $\beta$

Afin de vérifier l'efficacité de cette association d'immunothérapies par anti-PD-L1 et d'un traitement anti-TGF- $\beta$  (DI) à la combinaison de chimiothérapies, nous avons réalisé un nouveau suivi de croissance tumorale dans différents modèles murins : 4T1, EMT6, TS/A et PyMT-MMTV (figure 23A).

Dans le modèle 4T1, nous retrouvons tout d'abord l'efficacité anti-tumorale de la combinaison de chimiothérapies par rapport aux souris non traitées. La combinaison d'un anti-PD-L1 et d'anti-TGF $\beta$  permet d'induire deux types de réponses semblables aux données cliniques. En effet, dans le CSTN, l'immunothérapie par anti-PD-L1 ne fonctionne pas chez la majorité des patientes et peu d'entre elles sont répondeuses. Dans ce groupe de traitement, 3 souris sur 7 semblent répondre à l'immunothérapie tandis que les autres ont des courbes de croissance tumorale comparables à celles des souris contrôles (figure 23B). Comme attendu, d'après nos résultats précédant, associer la combinaison de chimiothérapies éribuline-cisplatine à une monothérapie d'anti-TGF- $\beta$  ou d'anti-PD-L1 ne donne pas de meilleurs résultats que la combinaison de chimiothérapies seule (annexe 9). Ceci est justifié

par l'induction de mécanismes de résistance vis-à-vis des cellules immunitaires. Tout d'abord par l'induction du ligand inhibiteur PD-L1 puis par l'augmentation de cellules immunosuppressives et la modulation du stroma tumoral *via* le TGF- $\beta$ . Cependant, lorsque nous associons l'éribuline, le cisplatine, un anti-TGF- $\beta$  et un anti-PD-L1, la croissance tumorale est significativement ralentie par rapport aux autres traitements et la survie des souris traitées est prolongée (figure 23A).

Afin de vérifier l'efficacité de cette association de chimiothérapie par rapport aux monothérapies, nous avons comparé les croissances tumorales de ces traitements avec l'association anti-PD-L1 / anti-TGF- $\beta$  (Annexe 9). Comme attendu, nous ne retrouvons pas d'intérêt à associer l'éribuline seule à cette association. Effectivement, l'éribuline ne permettant pas le recrutement de cellules immunitaires anti-tumorales, ni l'induction du PD-L1 ou du TGF- $\beta$ , n'a pas d'intérêt à être associée à un anti-PD-L1 / anti-TGF- $\beta$ . D'après les résultats *in vitro* et *in vivo*, l'association éribuline-cisplatine semble être une combinaison immunogène mais induisant en contrepartie PD-L1 et le TGF- $\beta$ . Ces informations expliquent donc pourquoi nous retrouvons une efficacité importante de cette combinaison de chimiothérapies associées à un traitement ciblant PD-L1 et le TGF- $\beta$  (figure 23B, Annexe 10).

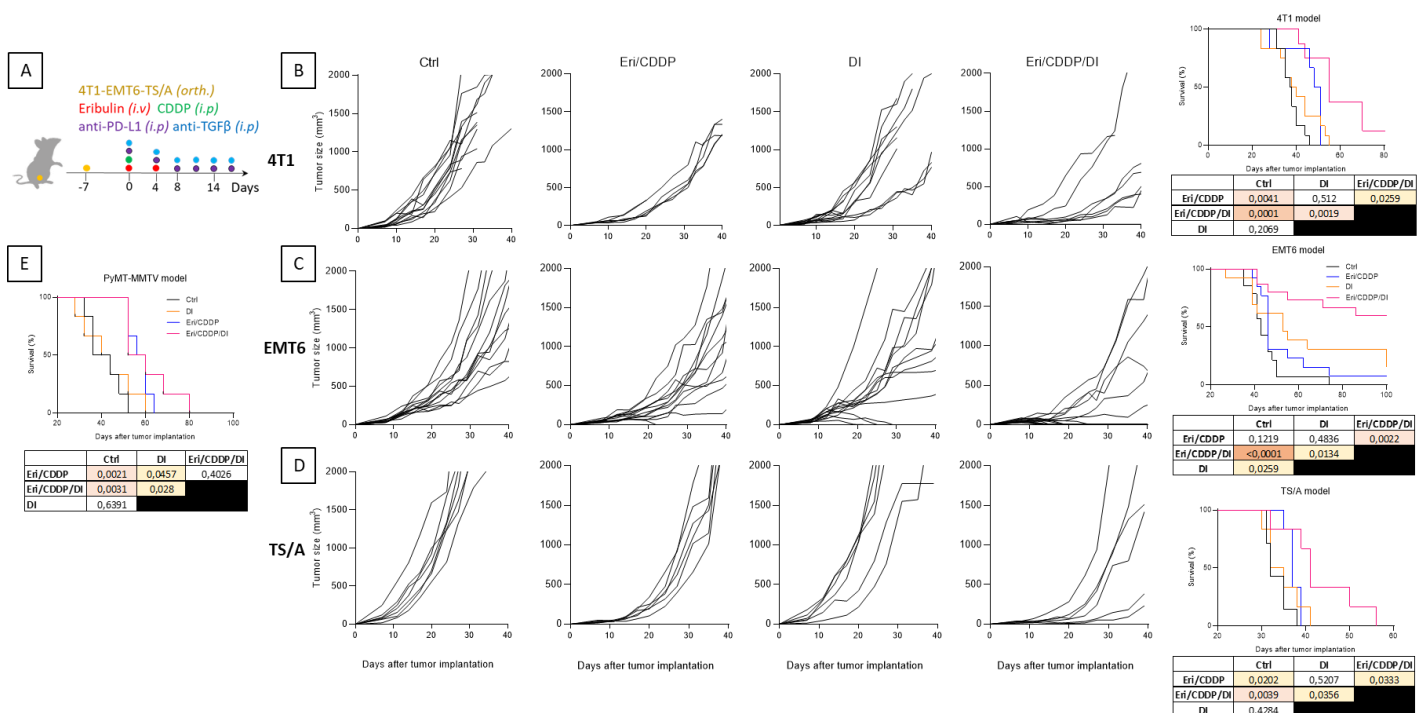
Comme nous l'avons vu précédemment, le modèle EMT6 est partiellement sensible à l'immunothérapie. En effet, nous retrouvons une prolongation de la survie chez les souris traitées par la double immunothérapie (anti-PD-L1 + anti-TGF- $\beta$ ) par rapport aux souris contrôles et traitées par la combinaison de chimiothérapies. Malgré la capacité de la chimiothérapie à permettre le recrutement des cellules cytotoxiques, la résistance *via* l'expression de points de contrôle immunitaires et de TGF- $\beta$  induite en retour ne permet pas une augmentation significative de la survie avec ces seuls traitements. Dans ce modèle, l'association de l'éribuline, du cisplatine, l'anti-PD-L1 et l'anti-TGF- $\beta$  permet une importante augmentation de la survie allant jusqu'à permettre la rémission de certaines souris, car, en association à l'effet immunogène de la combinaison de chimiothérapies, les stigmates de résistance sont levés notamment l'immuno-exclusion (figure 23C).

Le modèle TS/A est une autre lignée murine d'adénocarcinome mammaire ressemblant au modèle 4T1 par sa faible immunogénicité et sa forte capacité métastatique (259). Dans ce modèle, l'immunothérapie ne fonctionne pas comme l'on peut le remarquer dans la figure X. La double chimiothérapie ne permet pas non plus de prolonger la survie des souris traitées. Par contre, en associant les différents traitements, l'immunogénicité induite par les chimiothérapies combinées à la double immunothérapie permet d'augmenter la survie de ces souris (figure 23D).

Le modèle MMTV-PyMT est un modèle murin transgénique de cancer du sein. Ce modèle est semblable aux tumeurs humaines de sous-type luminal B et est généralement utilisé pour évaluer la progression et la capacité métastatique des tumeurs mammaires. Précocement ces tumeurs vont être plutôt « froides » immunologiquement et c'est après 10 à 14 semaines que l'infiltration en populations immunitaires sera la plus grande (260). D'après



la littérature, ces tumeurs répondraient faiblement à l'immunothérapie par anti-PD-L1. En effet, nous pouvons tout d'abord remarquer que l'immunothérapie n'est pas efficace dans ce modèle car les courbes de survie sont semblables à celles des souris contrôles. L'association de chimiothérapies permet de prolonger la survie des souris traitées par rapport aux souris contrôles. La quadrithérapie, par rapport aux chimiothérapies seules, prolonge plus faiblement la survie des souris traitées (figure 23E).



**Figure 23:** Evaluation de l'efficacité thérapeutique d'une association avec un anti-TGF- $\beta$  dans différents modèles murins de cancer du sein. Schéma représentatif de l'expérience in vivo (A). Un traitement par une immunothérapie anti-PD-L1 et anti-TGF- $\beta$  a été réalisé en combinaison, 1 fois par semaine pendant 4 semaines, avec l'éribuline, le cisplatine ou la combinaison des deux chimiothérapies. La randomisation a été réalisée environ 7 jours après l'inoculation en orthotopique des cellules tumorales (A). Un suivi de croissance tumorale 4T1 (B), EMT6 (C), TS/A (D) a été réalisé ainsi qu'une analyse de survie des souris dans les différents modèles tumoraux ainsi que dans le modèle PyMT-MMTV (E). Les résultats représentent la médiane et les écarts interquartiles (n.s,  $p > 0.05$ ; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  et \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ ). DI=Double immunothérapie: anti-PD-L1 + anti-TGF- $\beta$

Ces résultats préliminaires soulignent que le TGF- $\beta$ , induit en réponse à la chimiothérapie immunogène, participe à la résistance à la réponse immune spontanée créée par une chimiothérapie immunogène, ainsi qu'à l'immunothérapie par anti-PD-L1. La combinaison de chimiothérapies par éribuline et cisplatine induit parallèlement un phénomène immunitaire anti-tumoral ainsi que des mécanismes de résistances pro-tumoraux. L'association d'inhibiteurs de PD-L1 et du TGF- $\beta$  avec ces chimiothérapies permet finalement lever en partie ces résistances et d'induire une meilleure réponse thérapeutique dans les différents modèles de cancer du sein. L'étude du microenvironnement immunitaire après ces différents traitements pourrait expliquer cette efficacité thérapeutique.

## VI. Evaluation du microenvironnement immunitaire induit par la combinaison de chimiothérapies et la double immunothérapie *in vivo*

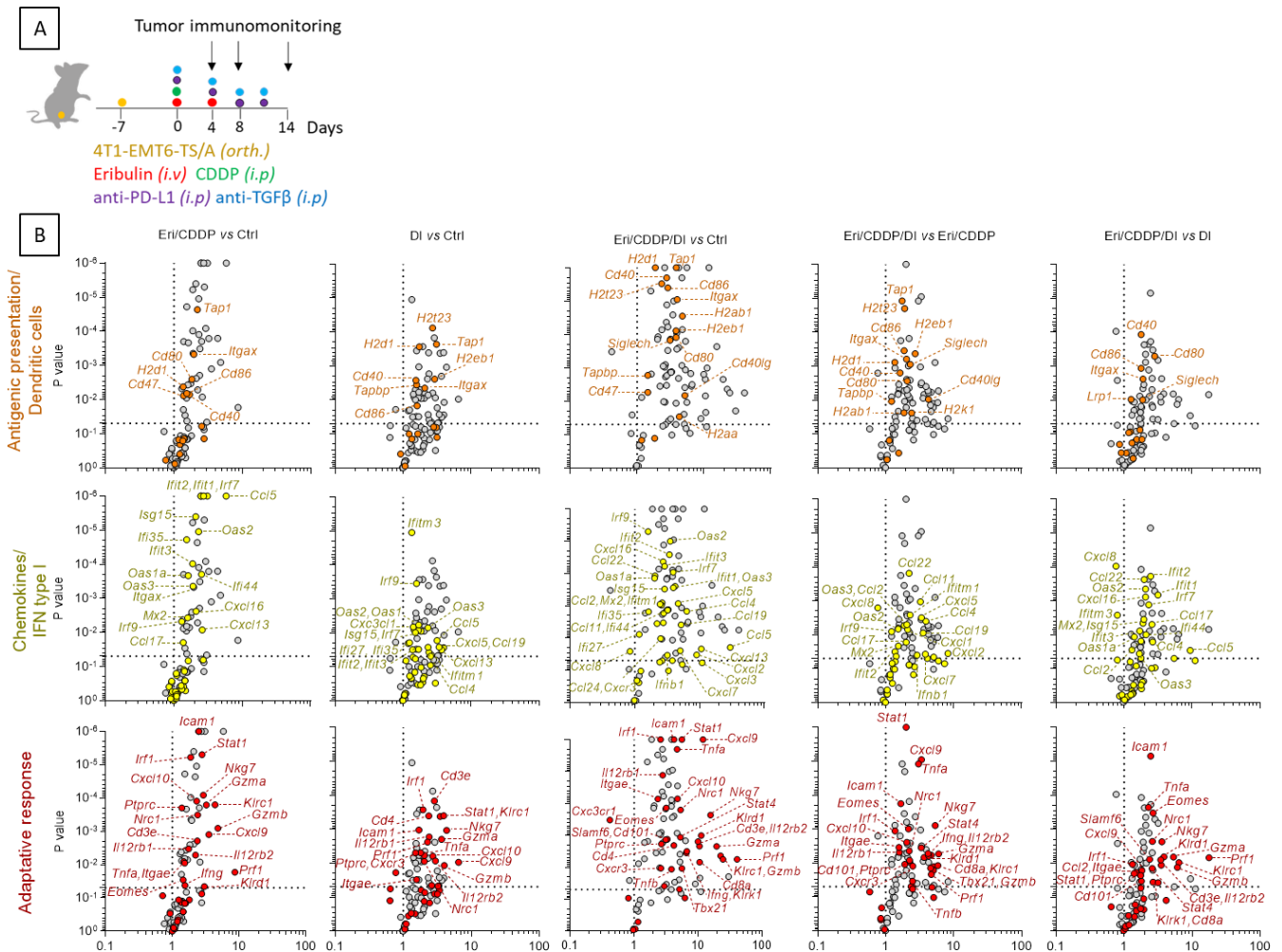
Afin de mieux comprendre les effets synergiques anti tumoraux de la combinaison de chimiothérapies avec l'immunothérapie anti-PD-L1 et le ciblage du TGF- $\beta$ , nous avons analysé le microenvironnement immunitaire des tumeurs traitées par cette association (figure 24A).

### a. Evaluation des signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits

A partir de tumeurs récupérées 8 jours après traitement par la double association chimiothérapies-immunothérapies, nous avons réalisé de nouvelles analyses d'expression génique à l'aide de la technologie NanoString afin de mettre en évidence les différents signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits (figure 24B).

Dans le modèle 4T1, nous retrouvons tout d'abord comme précédemment l'induction de nombreux gènes immunostimulants avec l'association éribuline-cisplatine (figure 24A). Par rapport aux tumeurs contrôles, nous pouvons remarquer l'induction des signaux d'antigénicité avec la combinaison d'immunothérapies avec l'augmentation de l'expression génique de *Cd40*, *Cd86*, *H2t23*, *H2d1*, *H2eb1* ou de *Tap1*. De plus, ces immunothérapies vont induire l'expression de certains gènes *Ifit*, *Irf* et *Stat1* impliqués dans la voie des interférons de type I et activés par l'ARN double brin (*Oas2,3*) mais aussi des chimiokines telles que *Ccl5*, *Ccl19*, *Cxcl5* ou *Cxcl13*. Cette association d'immunothérapies semble avoir effectivement un effet immunostimulant avec l'induction de l'expression géniques d'autres chimiokines comme *Cxcl9* et *Cxcl10* ainsi que des gènes associés aux T-CD4<sup>+</sup> et aux NK. De plus, l'augmentation des gènes associés à la cytotoxicité cellulaire prouvent l'induction de l'activation des cellules cytotoxiques. Tandis que la moitié des gènes étudiés ne ressortent pas significativement induits avec les bithérapies, nous pouvons remarquer que l'association de chimiothérapies et d'immunothérapies augmente intensément et significativement la plupart des gènes étudiés. En effet, de nombreux gènes associés aux CMH de classe I (*H2t23*, *H2d1*) et II (*H2ab1*, *h2eb1*, *H2aa*) et aux cellules dendritiques sont augmentés. De plus, cette association permet d'induire fortement l'activation de la voie des interférons de type I ainsi que de nombreuses chimiokines. De plus nous pouvons voir une forte augmentation des gènes associés au T-CD8<sup>+</sup> et NK ainsi qu'à leur cytotoxicité. Afin de visualiser l'intérêt de la double association d'immunothérapies et de chimiothérapies par rapport à la combinaison de chimiothérapies seule ou d'immunothérapies, nous avons comparé les expressions géniques de ces deux groupes de traitement. Cette analyse nous permet de mettre en évidence une l'induction de l'expression génique de la plupart des signaux par la quadrithérapie *versus* les bithérapies. En effet, les expressions géniques de molécules impliquées dans la présentation antigénique et dans la fonctionnalité des cellules dendritiques seront significativement induites. De plus,

nous pouvons remarquer l'amplification de l'expression génique de nombreuses chimiokines par rapport aux bithérapies. Ces différentes augmentations vont finalement être impliquées dans l'induction de gènes associées aux populations anti-tumorales telles que les T-CD8<sup>+</sup>, T-CD4<sup>+</sup> et NK mais aussi dans leur fonctionnalités avec des signaux cytotoxiques *Prf1*, *Gzma*, *Gzmb* et *Tnfa* (figure 24B). Ces résultats sont donc bien en accord avec l'efficacité anti-tumorale retrouvée dans les expériences précédentes : l'association de chimiothérapies et d'immunothérapies permet d'amplifier les signaux d'immunostimulation médiés par la combinaison éribuline-cisplatine.



**Figure 24:** Exploration des signaux d'antigénicité et d'immunogénicité chimio-induits. Schéma représentatif des expériences d'immunomonitoring. 4, 8 et 14 jours après la randomisation, les souris ont été sacrifiées et les tumeurs 4T1 ont été récupérées afin de réaliser des analyses d'IHC, de CMF ou d'expressions géniques (A). Les analyses transcriptomiques ont été réalisées via la technologie NanoString à partir d'ARN tumoraux récupérés dans les tumeurs murines 4T1 (n=6) (B).

## b. Caractérisation des populations immunitaires intra-tumorales

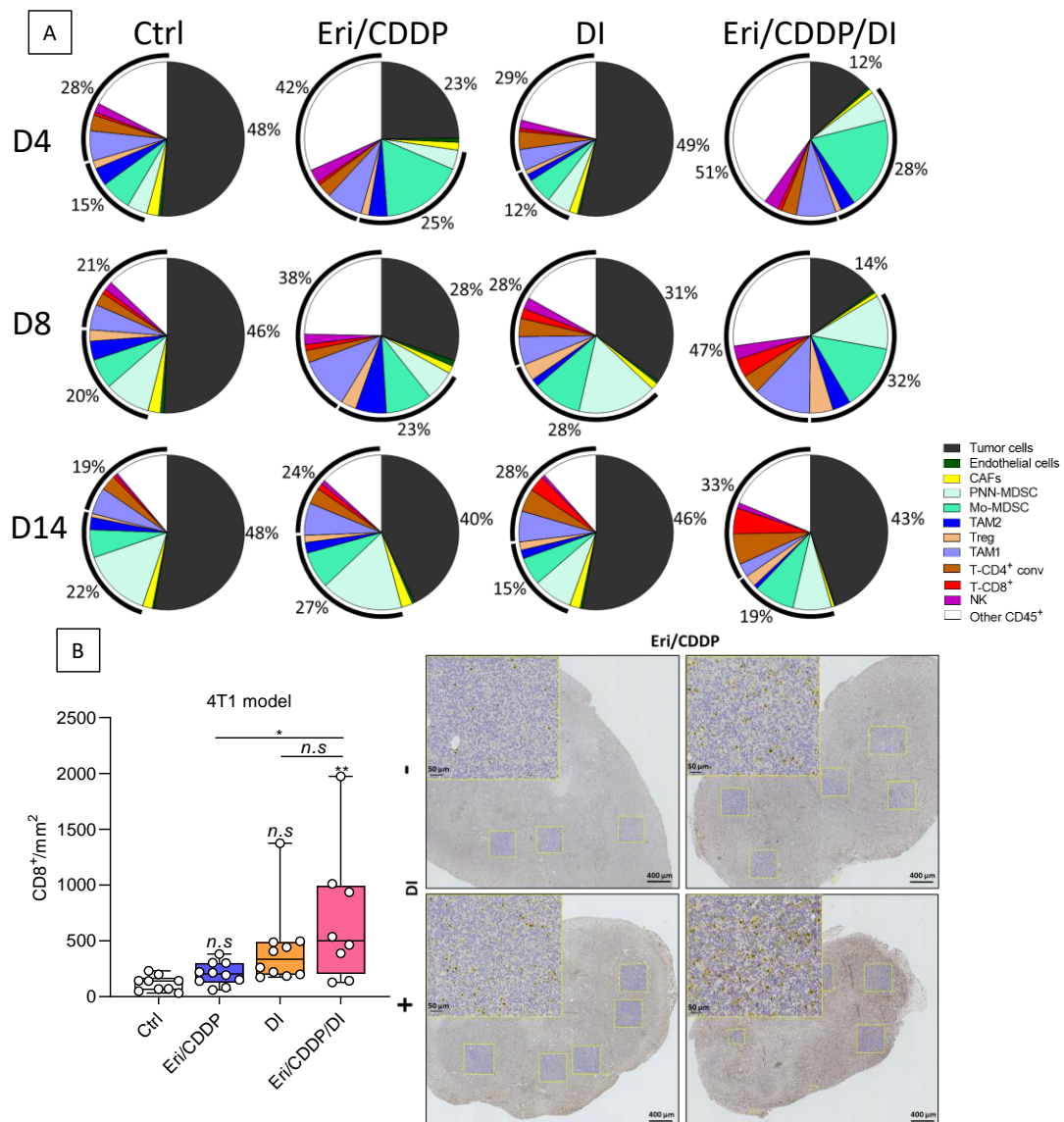
Afin de mettre en évidence les différentes populations présentes dans le microenvironnement tumoral nous avons réalisé des expériences de cytométrie en flux et

d'immunohistochimie à partir des tumeurs récupérées après 4, 8 et 14 jours de traitement (figure 25).

Dans le modèle « froid » immunologiquement 4T1, nous pouvons tout d'abord remarquer l'efficacité des chimiothérapies après 4 jours de traitement avec un pourcentage de cellules tumorales d'environ 50% dans les tumeurs contrôles et traitées par la double immunothérapie (figure 25A). En effet, 23% de cellules tumorales sont retrouvées dans les tumeurs traitées par la combinaison de chimiothérapies et seulement 12% dans les tumeurs traitées par la quadrithérapie. Cette efficacité se prolonge après 8 jours de traitement mais avec un taux nettement inférieur de cellules tumorales dans les tumeurs traitées par les immunothérapies. Cependant, tandis que les tumeurs traitées par les chimiothérapies voient leur nombre de cellules tumorales augmentées, la quadrithérapie permet de maintenir un taux toujours très faible de 14%. Après 14 jours de traitement la quadrithérapie ne permet plus d'avoir une efficacité anti-tumorale aussi nette que précédemment avec 40% de cellules tumorales *versus* 48% pour les tumeurs contrôles, 43% pour les tumeurs traitées par la combinaison éribuline-cisplatine et 46% pour la double immunothérapie (figure 25A).

En parallèle du taux de cellules tumorales, nous avons mis en évidence les populations immunitaires CD45<sup>+</sup> (figure 25A). Dans les cellules immunitaires CD45<sup>+</sup> totales nous retrouvons les cellules anti-tumorales et les cellules immunosuppressives CD11b<sup>+</sup>. Après 4 jours de traitement, les chimiothérapies permettent le recrutement de nombreuses cellules immunosuppressives et anti-tumorales dans les tumeurs. L'ajout de l'immunothérapie permet d'augmenter cette infiltration avec 28% de cellules immunosuppressives et 51% de cellules anti-tumorales pouvant expliquer le faible taux de cellules tumorales. Après 8 jours de traitement, l'immunothérapie va permettre le recrutement de plus de cellules immunosuppressives telles que les PNN-MDSC et anti-tumorales que dans les tumeurs contrôles et permettant ainsi la diminution du pourcentage de cellules tumorales. Les tumeurs traitées par les chimiothérapies seront toujours plus infiltrées en populations anti-tumorales que les tumeurs contrôles et traitées par la double immunothérapie seule, en particulier par les TAM1. La combinaison chimiothérapies-immunothérapies va permettre le maintien de cet infiltration avec en particulier les T-CD8<sup>+</sup> et les T-CD4<sup>+</sup> conventionnels. Ces résultats vont être confirmés par les marquages immunohistochimiques mettant en évidence les T-CD8<sup>+</sup> dans les tumeurs murines récupérées après 8 jours de traitement (figure 25B). Cependant, le pourcentage de cellules immunosuppressives sera lui aussi plus important que dans les autres traitements avec, en particulier, une augmentation du taux de Mo-MDSC. Après 14 jours de traitement, l'immunothérapie va maintenir un pourcentage important de cellules anti-tumorales avec en particulier les T-CD8<sup>+</sup>. Les chimiothérapies vont induire le recrutement de cellules immunosuppressives telles que les PNN-MDSC mais perdre des cellules anti-tumorales. La combinaison de chimiothérapies et d'immunothérapie va alors regrouper les 2 phénomènes : la diminution des populations immunosuppressives et le maintien des cellules anti-tumorales comme les T-CD8<sup>+</sup> ce qui expliquera l'efficacité de cette association de traitements (figure 25A).

Afin d'étudier la modulation du microenvironnement tumoral, deux autres populations cellulaires ont été analysées par CMF : les cellules endothéliales et les CAF (figure 25A). Nous pouvons tout d'abord remarquer que les différents traitements ne semblent pas avoir d'effet sur la vascularisation tumorale évaluée par le marqueur CD31. Cependant, précédemment nous avons remarqué l'impact des chimiothérapies sur les CAF après 8 jours de traitement. Dans cette nouvelle analyse, nous retrouvons la diminution de moitié de cette population avec la combinaison de chimiothérapies aux temps les plus précoces et une perte d'efficacité après 14 jours de traitement avec des taux semblables aux tumeurs contrôles. Néanmoins, la quadrithérapie permet d'éviter cette perte d'efficacité et de maintenir un taux



**Figure 25:** Exploration de l'infiltration des populations lymphocytaires intra-tumorales. Les tumeurs 4T1 ont été récupérées après 4 (n=5), 8 (n=10) ou 14 jours de traitement (n=4) puis les cellules tumorales ont été marquées par un panel d'anticorps et analysées par CMF. Représentation du pourcentage de cellules positives dans les tumeurs totales (A). Le nombre de cellules T-CD8<sup>+</sup> a été évalué par IHC dans les tumeurs 4T1 après 8 jours de traitements. Les photos représentent différentes tumeurs traitées et la mise en évidence des cellules T-CD8<sup>+</sup> par le logiciel d'analyse (B) (n.s, p > 0.05 ; \* , p < 0.05 ; \*\* , p < 0.01 ; \*\*\* , p < 0.001).

suffisamment bas de CAF dans les tumeurs pouvant alors jouer sur l'efficacité anti-tumorale des autres populations immunitaires (figure 25A).

L'analyse transcriptomique suivie de la mise en évidence des différentes populations cellulaires intra-tumorales semblent expliquer l'efficacité de cette combinaison de traitements. En effet, les différents signaux d'antigénicité et d'immunogénicité induits par la combinaison de chimiothérapies dans un modèle tumorale auparavant « froid » immunologiquement. Ces signaux vont alors permettre la stimulation du système immunitaire et induire le recrutement et l'infiltration en cellules cytotoxiques dans les tumeurs murines. Cependant, plusieurs phénomènes d'immuno-résistance chimio-induits vont alors se mettre en place et limiter l'efficacité anti-tumorale de la combinaison éribuline-cisplatine. Le ciblage du point de contrôle immunitaire PD-L1 permet de limiter le contrôle immunitaire et de restaurer l'efficacité cytotoxique des cellules anti-tumorales infiltrées. En parallèle, le ciblage du TGF- $\beta$  permettrait de contrecarrer plusieurs phénomènes de résistances chimio-induits notamment par la diminution des CAF ayant des capacités immunosuppressives et pro-fibrotiques. Ces différents traitements vont finalement permettre de restaurer et d'amplifier l'efficacité anti-tumorale de l'association de chimiothérapies éribuline-cisplatine.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans notre modèle préclinique de cancer du sein triple négatif, le cisplatine se révèle être une drogue fortement immunogène tandis que l'éribuline ne semble induire que peu de signaux de danger. Pourtant, la combinaison de ces deux molécules induit le recrutement et l'activation de cellules cytotoxiques telles que les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> et les NK. Les mécanismes de la synergie immunologique de ces deux chimiothérapies restent donc à établir. Cependant, au sein de cette association prometteuse du point de vue immunologique, nous avons montré que le cisplatine induit en contrepartie l'expression de TGF- $\beta$ . Par son action pro-tumorale sur l'immunosuppression et la modulation structurelle du microenvironnement tumoral, cette cytokine paraît être une bonne cible ; cependant des analyses supplémentaires sont nécessaires afin de comprendre quelles cellules sont impliquées dans ces processus.

### I. Exploration de l'immunité chimio-induite

Les tumeurs de CSTN pouvant être considérées comme immunologiquement inertes nécessitent l'utilisation de traitements immunogènes permettant de « réchauffer » immunologiquement des tumeurs. Dans ce travail, nous avons utilisé différents modèles précliniques permettant de représenter les différents phénotypes pouvant être à l'origine de la résistance à l'immunothérapie : le modèle 4T1 fortement immuno-ignoré et associé à une forte charge immunosuppressive, le modèle immuno-exclu EMT6, le modèle TS/A faiblement immunogène ainsi qu'un modèle de cancer du sein spontané. Dans chacun de ces modèles précliniques, cette combinaison de chimiothérapies a permis de restaurer l'efficacité anti-tumorale de l'immunothérapie et de prolonger la survie des souris traitées. Cependant, il semble aussi nécessaire de valider l'efficacité de cette combinaison de chimiothérapies et d'immunothérapies dans des lignées humaines de CSTN. Les effets de ces différents traitements vont prochainement être investigués sur les lignées MDA-MB-231 et MDA-MB-468. Par ailleurs, dans le but de confirmer ces résultats sur un jeu de données indépendant, nous analysons à l'heure actuelle des données transcriptomiques issues de lignées cellulaires de CSTN traitées ou non, *in vitro*, par cisplatine. Enfin, nous souhaitons analyser des données biologiques issues de CSTN traités par cisplatine chez des patientes ayant eu des biopsies tumorales avant et après administration de chimiothérapie. Ces données biologiques existent mais sont très rares. Des contacts ont été pris avec des équipes de recherche Européennes afin d'avoir accès à ces cohortes.

L'utilisation de chimiothérapies dans le but de « réchauffer » les tumeurs « froides » immunologiquement est depuis plusieurs années investiguée dans le but d'améliorer la

réponse à l'immunothérapie. Dans le CSTN, les deux principales familles de chimiothérapies utilisées : les taxanes et les anthracyclines, ont été largement étudiées. Leurs différents effets sur le système immunitaire ont été décrits dans la littérature et synthétisés dans l'introduction de ce manuscrit. Les anthracyclines sont considérées comme la chimiothérapie immunogène standard et c'est pourquoi nous l'avons utilisé en tant que contrôle dans nos expériences *in vitro*. Dans nos expériences *in vitro*, nous avons mis en évidence un effet immunogène du cisplatine au moins équivalent voire supérieur à celui de la doxorubicine. Ces résultats sont en accord avec ceux de l'essai clinique TONIC où il a été démontré que le cisplatine et les anthracyclines étaient capables d'induire des signes intra-tumoraux de réponse immunitaire, favorisant ainsi la réponse clinique observée après l'administration d'un anti PD-1 dans le CSTN métastatique (188).

Dans ce travail, le cisplatine se révèle être une drogue fortement immunogène tandis que l'éribuline ne semble induire que peu de signaux de danger. Pourtant, la combinaison de ces deux molécules induit le recrutement et l'activation de cellules cytotoxiques telles que les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> et les NK. Les mécanismes de la synergie immunologique de l'éribuline avec le cisplatine restent donc à établir. Dans les premières expériences d'immunomonitoring, nous avons pu remarquer une diminution significative du marqueur des cellules endothéliales CD31 par CMF dans les tumeurs murines traitées par cette chimiothérapie (données non montrées). Ce résultat est concordant avec la littérature car l'éribuline semble avoir un effet anti-angiogénique et permettrait de diminuer l'hypoxie tumorale (247,248). L'induction d'une fibrose tumorale engendrant un microenvironnement hypoxique et/ou la sécrétion de ROS par le cisplatine pourrait donc être contrecarrée par l'effet de l'éribuline. Cependant, ces résultats n'ont pas réussi à être reproduits et l'évaluation de marqueurs tels que la carbonique anhydrase ou le VEGF n'ont pas donné d'informations concordantes. De plus, d'après la littérature, son action sur les micro-vaisseaux permettrait d'assurer une meilleure délivrance d'une seconde chimiothérapie jusqu'au cœur tumoral (248). Dans notre étude, nous avons mesuré les niveaux de platine intra-tumoraux après les différents traitements par ICP-MS (spectrométrie à plasma à couplage inductif). Les données obtenues n'ont pas permis de démontrer que le co-traitement avec l'éribuline permettait une meilleure administration du cisplatine associé. De même, bien qu'il ait été suggéré qu'une partie de l'effet anti-tumoral de l'éribuline puisse être lié à l'inhibition de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT), peut-être *via* une régulation négative de la voie TGF- $\beta$ /Smad (261), nous n'avons révélé aucun effet modulateur de l'éribuline sur la voie du TGF- $\beta$  dans les modèles testés dans notre étude. L'induction du TGF- $\beta$  semble être uniquement liée au traitement par cisplatine. Aujourd'hui, le rôle de l'éribuline dans l'efficacité de cette combinaison n'est donc pas clairement identifié.

Nous avons vu qu'au sein de cette combinaison thérapeutique, le cisplatine induisait directement et indirectement l'expression intra-tumorale de PD-L1 et c'est pourquoi une immunothérapie ciblant ce ligand était proposée. De plus, les résultats des différents essais cliniques rapportant l'efficacité de l'immunothérapie contre PD-L1 dans le CSTN sont actuellement les plus complexes à interpréter et nécessitent de plus amples études. En effet,



les résultats des essais cliniques IMpassion130 et 131 sont discordants tandis que ceux de l'essai KEYNOTE-355 semblent révéler le bénéfice de l'immunothérapie ciblant PD-1. L'évaluation de l'efficacité de la combinaison de chimiothérapies éribuline-cisplatine, d'un inhibiteur du TGF- $\beta$  et d'une immunothérapie par anti-PD-1 pourrait cependant s'avérer être intéressante afin d'améliorer la prise en charge des patientes atteintes de CSTN métastatiques. D'autres points de contrôle pourraient aussi être ciblés, comme CTLA-4. En effet, cette protéine est présente sur les lymphocytes T-régulateurs et contribue à leur fonction inhibitrice (262). Dans notre modèle murin, la combinaison de chimiothérapies augmente l'expression et le nombre de cellules CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup>, c'est pourquoi utiliser cette immunothérapie pourrait s'avérer efficace. Dans un modèle de tumeurs spontanées CSTN BRCA muté, l'association du cisplatine à une immunothérapie par anti-PD-L1 et anti-CTLA-4 a montré une augmentation de l'immunité anti-tumorale et de la survie (263). L'étude clinique DART évaluant l'efficacité de la double combinaison anti-PD-1 anti-CTLA-4 dans un modèle de cancer du sein difficilement traitable semble montrer des réponses cliniques prometteuses et durables (264).

## II. [Exploration de la voie du TGF- \$\beta\$](#)

Dans ce travail, les résultats des expériences *in vitro* ont permis de mettre en évidence une expression induite de TGF- $\beta$  par les cellules tumorales. Cependant, l'évaluation de la voie d'induction de l'expression et de la sécrétion de cette cytokine dans le microenvironnement tumoral n'a pas encore été établie alors que plusieurs pistes peuvent être envisagées.

D'après nos résultats *in vitro*, nous avons remarqué l'induction de l'expression du TGF- $\beta$  par l'interféron  $\beta$ 1. D'après la littérature, l'efficacité des anthracyclines est liée à aux interférons de type I et à la chimiokine CXCL10. L'ARN libéré par les cellules mourantes après traitement active TLR3 qui induit l'expression et la sécrétion d'IFN I permettant la production de CXCL10. Ce mécanisme immunologique est indispensable à l'efficacité de cette famille de chimiothérapies (265). En bloquant le récepteur aux interférons de type I, IFN $\alpha$ 1, nous pourrions donc vérifier si le cisplatine induit le TGF- $\beta$  par la voie des IFN de type I. En effet, si l'expression du TGF- $\beta$  est diminuée après l'ajout d'un anti-IFN $\alpha$ 1, nous pourrions conclure à l'implication de cette voie de signalisation. De plus, il serait nécessaire d'étudier les voies en amont du récepteur aux interférons. Le cisplatine induit des dommages à l'ADN qui va être retrouvé dans le cytoplasme des cellules et être reconnu comme signal de danger par le senseur de l'ADN cytosolique cGAS (266). Ce senseur à l'ADN va ensuite activer la voie de signalisation STING/TBK1 qui aura pour finalité d'induire l'expression des gènes codant pour les interférons de types I ou des cytokines pro-inflammatoires *via* IRF3 ou NF- $\kappa$ B. Les TLRs sont un autre mécanisme de reconnaissance des acides nucléiques. Plus précisément, le TLR9, localisé dans les endosomes va reconnaître l'ADN et recruter le facteur de transcription IRF7

ou NF- $\kappa$ B (267). L'ARN extracellulaire retrouvé après la lyse de la cellule tumorale sera lui reconnu par le TLR3 (214). Comme pour la voie de signalisation STING/TBK1, ces deux facteurs vont induire la production d'IFN de type I ou des réponses cytokiniques pro-inflammatoires. Afin de mettre en évidence le senseur impliqué dans la reconnaissance de l'ADN détérioré par le cisplatine et permettant l'expression génique du TGF- $\beta$ , des inhibiteurs de la voie cGAS/STING et des TLR pourraient être utilisés. En effet, si le blocage d'une des voies associée au traitement par cisplatine diminue l'expression du TGF- $\beta$  nous pourrions valider l'implication de celle-ci. L'ajout d'inducteurs pourra aussi nous informer sur le type de ligand impliqué dans l'expression du TGF- $\beta$ . Dans des lignées murines de cancer de l'ovaire, il a été établi qu'un traitement par cisplatine activait et régulait la voie cGAS/STING lors de traitement répétés (268). D'autres ligands chimio-induits peuvent être reconnus et activer différents TLRs. Nous avons vu que le cisplatine augmentait la sécrétion d'HMGB1 dans notre modèle murin de cancer du sein triple négatif. HMGB1 est l'un de ces signaux de danger et va se lier à son récepteur TLR4 situé sur les cellules dendritiques. Cette protéine induirait la prolifération des fibroblastes dermiques en jouant sur les molécules pro-fibrogéniques telles que le collagène, l'élastine, la fibronectine mais aussi le TGF- $\beta$  et sa voie de signalisation (269).

La toxicité cellulaire du cisplatine peut aussi provenir de la dysfonction mitochondriale avec l'induction des ROS et des dommages à l'ADN mitochondrial. Les molécules de cisplatine peuvent aussi s'accumuler dans les mitochondries et former des adduits avec l'ADN mitochondrial. Par son action sur cet organite, cette chimiothérapie va induire fortement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (270). Les ROS mitochondriaux sont utiles pour produire de l'énergie par phosphorylation oxydative, cependant, lorsqu'ils sont produits en excès, ils peuvent provoquer des lésions et la mort cellulaire (271). Le TGF- $\beta$  est une cytokine impliquée dans le processus fibrotique et la littérature a mis en évidence un lien entre la dysfonction mitochondriale et l'activation de la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (272). Les ROS sont eux aussi directement impliqués dans l'activation du TGF- $\beta$  par le relargage de la forme active du TGF- $\beta$  après séparation au complexe latent contenant les polypeptides LAP et LTBP. C'est une boucle d'auto-activation qui est mis en place entre les ROS et le TGF- $\beta$  car cette cytokine peut à son tour induire l'expression des enzymes productrices de ROS ainsi que supprimer l'expression d'enzymes anti-oxydantes (273). L'ADN mitochondrial et les ROS peuvent ensuite activer la voie de l'inflammasome et de l'IL-1 $\beta$  impliquée dans l'inflammation. L'ADN mitochondrial oxydé cytosolique active l'inflammasome NLRP3 et va permettre l'activation et le clivage de la caspase 1 qui pourra à son tour activer l'IL-1 $\beta$ . Cette signalisation peut hyper-réguler les voies de signalisation telles que MAPK p38, JNK ou ERK1/2 donnant lieu à une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$  puis des gènes impliqués dans le processus fibrotique (274). L'étude de l'ADN mitochondrial, des ROS ou encore de l'inflammasome pourrait donc nous donner de plus amples informations sur la voie d'induction du TGF- $\beta$ .

Après avoir exploré les voies d'induction potentielles du TGF- $\beta$ , nous sommes actuellement en train d'explorer les aspects pronostiques de cette voie dans les CSTN, en

particulier par l'analyse des transcriptomes tumoraux de grosses séries publiques de cancers du sein (TCGA, METABRIC), dans le but de savoir si l'activation de la voie du TGF- $\beta$  existe de façon basale dans certains cancers du sein, savoir dans quels sous types de cancers du sein cette voie est la plus présente, et enfin déterminer si elle a un impact sur l'immunologie de ces tumeurs (relation avec les signatures immunes, ou les infiltrats en cellules immunitaires), et *in fine* un éventuel impact sur la survie des patientes.

Dans cette étude, nous avons mis en évidence l'effet du cisplatine sur l'induction de TGF- $\beta$ . Cependant, d'autres traitements utilisés dans le cancer du sein peuvent être associés à ce mécanisme d'immuno-résistance.

L'exemple le plus concret est la radiothérapie, qui peut être utilisée en association avec la chirurgie dans le traitement du cancer du sein. Dans ce type de traitement, le TGF- $\beta$  peut être impliqué dans le phénomène de résistance mais aussi dans l'induction d'une toxicité tissulaire radio-induite. En effet, l'exposition aux rayonnements ionisants peut donner lieu à une mort cellulaire de type apoptose ainsi que d'un processus de sénescence des cellules irradiées induisant la libération de TGF- $\beta$  dans le micro-environnement tumoral (275). Le TGF- $\beta$  va alors jouer son rôle de régulateur des cellules immunitaires anti-tumorales notamment en favorisant les populations immunosuppressives telles que les CAF, les T-reg ou les TAM2. Comme vu précédemment, ces différentes populations immunosuppressives vont alors limiter l'action des cellules anti-tumorales et provoquer une résistance aux traitements (275). Le ciblage du TGF- $\beta$  par le fresolizumab, un anticorps monoclonal anti-TGF- $\beta$ , à deux doses différentes et en association à la radiothérapie chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique, a montré l'induction d'une réponse immunitaire systémique favorable chez les patientes traitées par la plus haute dose (276). De plus, le TGF- $\beta$  semble jouer un rôle dans les mécanismes de réparation de l'ADN par l'induction de la phosphorylation d'enzymes telles que ATM et p53 provoquant ainsi l'adaptation des cellules tumorales à la mortalité radio-induite. En effet, il a été montré que le ciblage du TGF- $\beta$  permettait de limiter la réparation des dommages à l'ADN radio-induits et de sensibiliser les cellules de CSTN à la radiothérapie (277). Afin de limiter la résistance tumorale à la radiothérapie, une augmentation de dose peut s'avérer nécessaire. Cependant, une augmentation des rayonnements ionisants peut provoquer une toxicité tissulaire importante. De plus, cette toxicité peut aussi être due à l'atteinte des tissus sains et de certains organes plus radiosensibles que d'autres. La toxicité liée au TGF- $\beta$  et la plus communément retrouvée est l'induction d'une fibrose radio-induite. En effet, au niveau de la lésion, le TGF- $\beta$  peut induire la prolifération et l'activation des fibroblastes augmentant ainsi la production de tissus fibreux, inhiber la prolifération des cellules épithéliales ainsi que la dégradation de la matrice extracellulaire (278,279). L'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs I/II au TGF- $\beta$  a permis de limiter l'effet profibrotique, pro-inflammatoire et pro-angiogénique de la radiothérapie. En réduisant ainsi l'inflammation et la fibrose pulmonaire, la survie des souris traitées a été prolongée (280). La radiothérapie pouvant permettre l'induction d'une immunité anti-tumorale, l'association à

l'immunothérapie semble pouvoir être envisagée. Cependant, l'inhibition du TGF- $\beta$  en parallèle pourrait permettre d'éviter la résistance radio-induite. Dans les modèles murins peu immunogènes 4T1 et TS/A, il a été montré que les rayonnements associés au blocage du TGF- $\beta$  ont permis de générer des lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> efficaces et capables de provoquer une régression tumorale et métastatique. De plus, l'association à une immunothérapie anti-PD-1 a permis de prolonger la survie obtenue par cette combinaison de traitements (281).

D'après la littérature, le TGF- $\beta$  peut aussi être induit par d'autres chimiothérapies utilisées dans le traitement du cancer du sein et provoquer une résistance acquise. Par exemple, après l'analyse de biopsies avant et après traitement néoadjuvant contenant des anthracyclines et des taxanes, la chimiothérapie semble induire l'expression de gènes associés à la voie de signalisation du TGF- $\beta$  (231). Plus précisément, *in vitro*, sur des lignées murines de CSTN, le paclitaxel a montré son implication dans l'augmentation de la signalisation du TGF- $\beta$  associée à l'expansion des cellules souches cancéreuses résistantes à la chimiothérapie. De plus, l'utilisation du galunisertib, un inhibiteur du récepteur I au TGF- $\beta$ , en association au paclitaxel a permis de maintenir une inhibition de la croissance tumorale soutenant l'hypothèse de l'implication du TGF- $\beta$  dans la résistance chimio-induite par le paclitaxel dans le CSTN (231). Dans ce travail, nous avons étudié les effets du cisplatine, cependant, d'autres sels de platine peuvent être utilisés en fonction de l'état physiologique du malade. Le carboplatine fait partie de cette famille de chimiothérapies et semble induire lui aussi le TGF- $\beta$ . En effet, dans une étude sur le cancer du poumon non à petites cellules, l'oxalipatine a montré son implication dans l'induction de l'expression génique de *Tgfb* et de marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. De plus, l'expression de PD-L1 semblerait être régulée à la hausse par le TGF- $\beta$  laissant entrevoir l'intérêt d'associer l'immunothérapie avec cette chimiothérapie immuno-modulatrice (282).

### III. Evaluation de la faisabilité clinique

Nous pouvons désormais nous interroger sur la faisabilité clinique de cette association de chimiothérapies. En effet, ces deux chimiothérapies sont connues pour avoir des toxicités importantes chez certains patients. Le principal effet indésirable rapporté de l'éribuline est sa toxicité hématologique notamment au niveau des polynucléaires neutrophiles. Ces neutropénies de grade IV ou fébriles peuvent engendrer une modification de traitement voire même être un facteur de comorbidité contournable par l'utilisation de G-CSF. Le cisplatine présente une toxicité rénale pouvant provoquer une insuffisance rénale définitive. De plus, cette molécule est la plus neurotoxique des sels de platine engendrant des neuropathies sensorielles périphériques (283). Un essai clinique dans les tumeurs solides (NCT00415324) a eu pour but de déterminer la dose maximale tolérée d'éribuline et de cisplatine, ainsi que d'évaluer la toxicité, la sécurité de cette association. Les doses recommandées pour cette association sont de 1.2 mg/m<sup>2</sup> (jours 1 et 8 par cycle de 21 jours) et de 75 mg/m<sup>2</sup> (jour 1 par

cycle de 21 jours), respectivement pour l'éribuline et le cisplatine. Les effets indésirables les plus importants retrouvés sont : les neutropénies et les anémies dues à la toxicité des deux molécules sur la moelle osseuse. Il n'a pas été retrouvé d'augmentation de l'incidence des neuropathies mais cela peut être dû à la durée de traitement assez courte. Les autres effets indésirables retrouvés n'ont pas été supérieurs à ceux rapportés dans d'autres études cliniques. L'éribuline est éliminée essentiellement par le système hépatique (284) et pas par le système rénal ce qui pourrait être une preuve de la faisabilité de cette association. Néanmoins, une étude chez des patients atteints d'insuffisance rénale à différents stades a montré une diminution de la clairance de cette molécule ainsi qu'une augmentation de l'exposition. Cette étude recommande d'abaisser la dose à 1.1 mg/m<sup>2</sup> (habituellement 1.4 mg/m<sup>2</sup>) chez les patients atteints d'insuffisance rénale modérée ou sévère (285). L'étude dans les cancers solides n'a cependant pas établi de modifications particulières de la pharmacocinétique lors de la co-administration de ces deux molécules de chimiothérapie. D'après le profil toxicologique établi, cette combinaison de chimiothérapies semble donc être envisageable. Un essai clinique de phase II (NCT04517292) évalue actuellement l'efficacité d'une combinaison d'éribuline/cisplatine *versus* gemcitabine/cisplatine dans le CSTN.

Les modalités d'utilisation de la combinaison éribuline-cisplatine sont donc établies chez l'homme. Sous couvert des précautions habituelles, et en particulier concernant la prévention de la toxicité rénale et hématologique, l'association paraît tout à fait faisable chez des patientes atteintes de CSTN métastatiques.

Le ciblage du TGF- $\beta$  et de PD-L1 est aujourd'hui une nouvelle piste investie par de nombreuses études. Il est actuellement possible de cibler le TGF- $\beta$  par des anticorps monoclonaux ou des inhibiteurs des récepteurs du TGF- $\beta$ 1 et les résultats sont encourageants. De nombreux antagonistes de la voie du TGF- $\beta$  ont été ou sont actuellement en cours de d'évaluation clinique dans de nombreux types de cancers (286). Par exemple, le galunisertib est un inhibiteur de tyrosines kinases ciblant le TGF- $\beta$ 1. Cet inhibiteur a montré des effets anti-tumoraux dans différents modèles murins de cancer comme le cancer du sein, du colon et du poumon (287). De plus, il permettrait de prévenir la résistance des cellules tumorales *via* le TGF- $\beta$  induit par une chimiothérapie telle que le paclitaxel (231), et l'association avec l'immunothérapie restaurerait l'efficacité des cellules immunitaires. Les laboratoires MERCK et GSK ont récemment mis un point une protéine de fusion bi-spécifique permettant de cibler conjointement le TGF- $\beta$  et PD-L1 (M7824 ou Bintrafusp Alpha). Le M7824 permet de limiter la toxicité d'un anti-TGF- $\beta$  seul car il cible les tissus exprimant PD-L1, donc les sites inflammatoires évitant ainsi la toxicité due à l'inhibition du TGF- $\beta$ . De plus, l'efficacité anti-tumorale est supérieure à une double immunothérapie et les résultats de cette étude montrent une augmentation des TILs mais aussi de leur activation et prolifération avec ce traitement. Cette protéine de fusion potentialiserait aussi les effets de chimiothérapies immunogènes telles que l'oxaliplatine et le 5-fluorouracile par l'augmentation de la production d'IFN $\gamma$  par les lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> (228). Notre association de chimiothérapies

permettant d'augmenter l'infiltration en T-CD8<sup>+</sup> semble donc adéquate pour être combinée avec cet anticorps. L'association du M7824 et de l'éribuline est actuellement en essai clinique de phase Ib (NCT03579472) dans le cancer du sein triple négatif métastatique (288). Après des résultats encourageants dans le cancer des voies biliaires (289), un essai clinique de phase II/III (NCT04066491) est en cours de recrutement évaluant l'efficacité de l'association gemcitabine/cisplatine +/- le M7824. D'autres essais cliniques de phase I/II sont actuellement actifs ou en cours de recrutement dans le cancer du poumon non à petites cellules (NCT03840915) et dans le cancer du col de l'utérus (NCT04551950) évaluant l'efficacité de combinaison de chimiothérapies (dont le cisplatine) et de M7824.

Il apparaît donc possible que l'association de l'éribuline et du cisplatine soit utilisable en clinique pour traiter les patientes atteintes de CSTN. De plus, leur association en combinaison avec un traitement ciblant le TGF- $\beta$ , (comme le galunisertib ou le M7824) et permettant de rétablir l'efficacité de l'immunothérapie par anti-PD-L1, pourrait être envisagée en essai clinique. Nos données pré-cliniques sont encourageantes et pourraient inciter à proposer dans un essai de phase précoce, une association cisplatine-éribuline associée à un co-ciblage de l'axe PD-L1/PD-1 et du TGF- $\beta$  pour des CSTN en rechute post-anthracyclines-taxanes. Cet essai clinique serait bien sur associé à un volet de recherche translationnelle destiné à confirmer en clinique humaine les données biologiques observées dans nos modèles murins.

## ANNEXES

### Annexe 1: Présentation des anticorps primaires utilisés pour le western blot

Anticorps primaires	Clone	Poids moléculaire (kDa)	Espèce	Fournisseur	Dilution
Anti-Phospho-EIF2 $\alpha$ (Ser51)	D7D3	38	lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-EIF2 $\alpha$		38	lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-Phospho-TBK1 (Ser172)	D52C2	84	Lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-TBK1		84	lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-LC3 A/B	D3UAC	14, 16	lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-Phospho-Stat1 (Tyr701)	58D6	84, 91	lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-Stat1		84, 91	lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-Acétyle-NF-kB (Lys310)		65	lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-NF-kB		65	lapin	Cell Signaling	1 : 1000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-HSC70	B-6	70	souris	Sant Cruz Technology	1 : 5000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)
Anti-Actine $\beta$	AC-15	42	souris	Sigma Aldrich	1 : 5000 (TBS-T 0.1% BSA 0.5%)

Annexe 2: Séquences des amorces murines utilisées pour amplifier les ARNm par RT-qPCR

Gène	Amorce sens	Amorce anti-sens
<i>Actineβ</i>	5'-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3'	5'-TCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3'
<i>Atf4</i>	5'-CATGGGGCCTTTAGGACGAT-3'	5'-GCCCTAAACCCGCCCTTAT-3'
<i>Cd274</i>	5'-GCTTCTCAATGTGACCAGCA-3'	5'-GAGGAGGACCGTGGACACTA-3'
<i>Cxcl10</i>	5'-CCAAGTGCTGCCGTCATTTT-3'	5'-TTCATCGTGGCAATGATCTCAAC-3'
<i>Ddit3</i>	5'-GCAGCGACAGAGCCAGAATAA-3'	5'-CTGCTTTCAGGTGTGGTGGT-3'
<i>H2kd</i>	5'-TGAGAAGGAGAAACACAGGTGG-3'	5'-GTTTGGCTGAACCAGCAAGG-3'
<i>H2dd</i>	5'-AGTGGTGCTGCAGAGCATT-3'	5'-GTGCCTTTGGGGAATCTGTG-3'
<i>Mult1</i>	5'-AGCTCATGTTGCACTGGAAA-3'	5'-CATCCAAGAGAGGTGGTGGT-3'
<i>Rae1</i>	5'-CCCCAGTATCACCCAGCTTACAT-3'	5'-CCCTCCTCTGGCCTCTCCTT-3'
<i>Serpin1</i>	5'-GTTTCATCGCTGCACCCTTTG-3'	5'-CTGCTCTTGGTCGGAAAGACT-3'
<i>Tap1</i>	5'-CTGGGAAAAGTGCATCAGTCAC-3'	5'-AATGAGACAAGGTTGCCGCTG-3'
<i>Tapasin</i>	5'-AACCTGCCACACTGCTACTG-3'	5'-AGACTTCTGGCCCACTTCG-3'
<i>TgfβR2</i>	5'-ACGTTCCAAGTCGGATGTG-3'	5'-GTTTCAGTGGATGGATGGTCCT-3'
<i>TgfβR3</i>	5'-CTGCCAAGGGAGGTTACAT-3'	5'-AGAACCCTCCGAAACCAGGA-3'
<i>Tgfβ1</i>	5'-CCCAGTCTCCATACATTAACCC-3'	5'-CACCATCACCTTGAACCTCTGAC-3'



### Annexe 3: Anticorps utilisés pour la cytométrie en flux

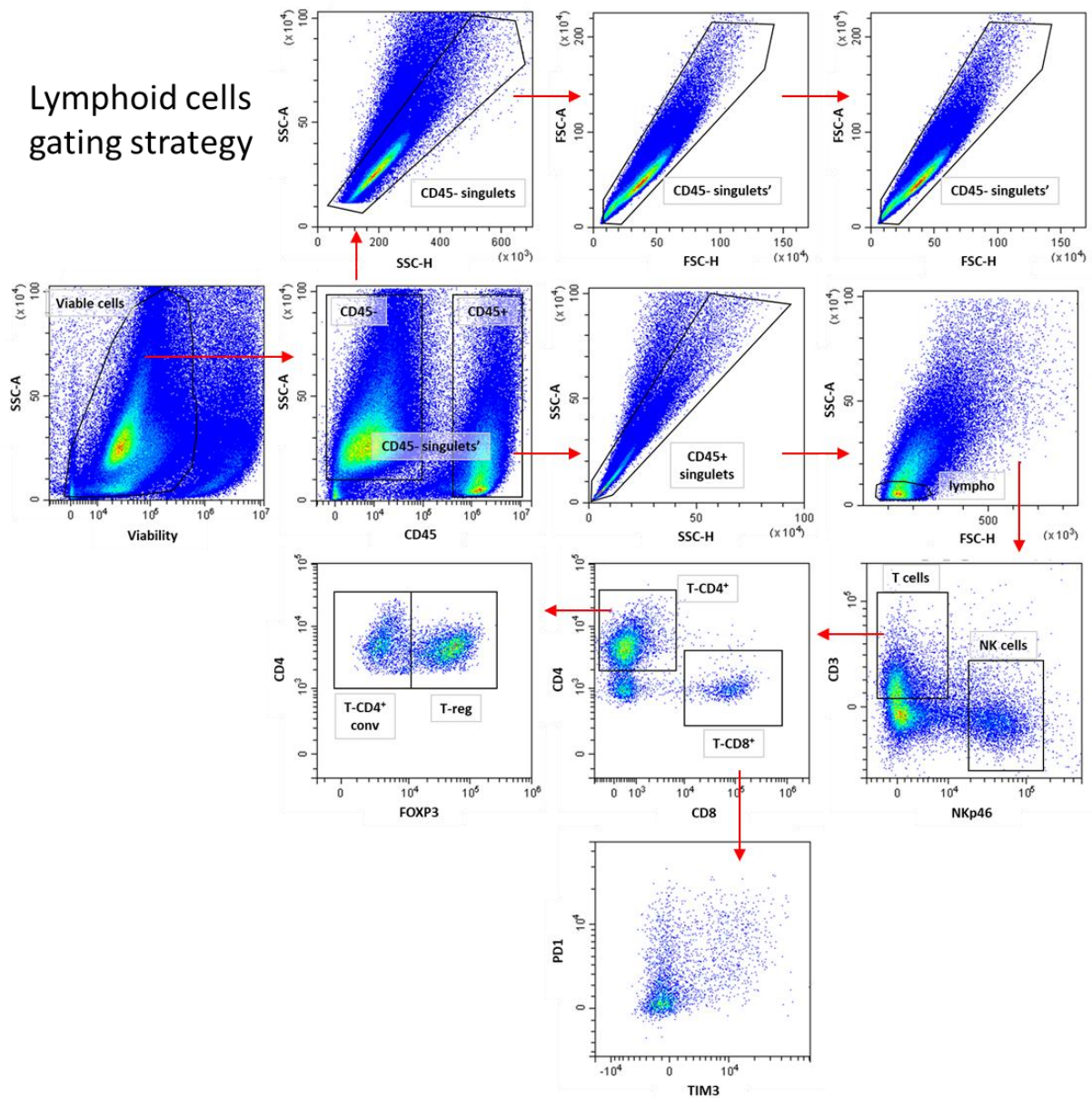
Anticorps	Clone	Fournisseur
Anti-mouse PD-1 VioBlue	HA2-7B1	Miltenyi
Anti-mouse Ly6C VioGreen	1G7.G10	Miltenyi
Anti-mouse F4/80 BV605	BM8	Biolegend
Anti-mouse Ly6G BV650	1A8	Biolegend
Anti-mouse CD11b BV785	M1/70	Biolegend
Anti-mouse HLA-DR Alexa fluor 488	M5/144.M5.2	Biolegend
Anti-mouse PD-L1 PE	10F.9G2	Biolegend
Anti-mouse CD45 APC	REA737	Miltenyi
Anti-mouse CD4 VioGreen	REA604	Miltenyi
Anti-mouse CD8 BV605	J3-6-7	Biolegend
Anti-mouse Tim3 BV785	RMT3-23	Biolegend
Anti-mouse Foxp3 PE VioBright 515	REA788	Miltenyi
Anti-mouse Ki67 PE	REA183	Miltenyi
Anti-mouse NKp46 PE-Vio770	REA815	Miltenyi
Anti-mouse CD3 Alexa Fluor 700	17A2	Biolegend
Anti-mouse TNFa BioBright 515	REA636	Miltenyi
Anti-mouse Granzyme B PE	REA226	Miltenyi
Anti-mouse IFNg PE-Cy7	XMG1.2	Biolegend
Anti-mouse CD45 VioBlue	REA737	Miltenyi
Anti-mouse CD140a BV605	REA637	Biolegend
Anti-mouse CD140b APC-Vio770	REA634	Miltenyi
Anti-mouse CD31 BV785	REA784	Biolegend
Anti-mouse FAPa	AF488	BiossAntibodies
Anti-mouse CD26 PE	REA1196	Miltenyi
Anti-mouse CD49f PE-Vio770	REA518	Miltenyi
Anti-mouse CD24 PE-Vio770	REA743	Miltenyi
Anti-mouse CD326 EPCAM PE-Vio770	REA977	Miltenyi
Anti-mouse Podoplanine APC-Vio770	8.1.1	Biolegend
Anti-mouse Viobility Fixable Dye V405/452		Biolegend

Annexe 4 : Panel des gènes utilisés pour l'analyse transcriptomique

<b>Antigenic presentation/Dendritic cells</b>	<b>Chemokines/IFN type I</b>	<b>Adaptative response</b>
H2-Aa	Ccl11	Icam1
H2-Ab1	Ccl17	Klrb1
H2-D1	Ccl19	Klrc1
H2-Eb1	Ccl2	Klrd1
H2-K1	Ccl20	Klrk1
H2-T23	Ccl22	Ncam1
Tap1	Ccl24	Ncr1
Tapbp	Ccl28	Nkg7
Cd40	Ccl4	Raet1c
Cd40lg	Ccl5	Ulbp1
Cd47	Cx3cl1	Cxcl10
Cd80	Cxcl1	Cxcl9
Cd86	Cxcl13	Cd101
Itgax	Cxcl16	Cd8a
Lrp1	Cxcl2	Cx3cr1
Siglech	Cxcl3	Eomes
	Cxcl5	Gzma
	Cxcl7	Gzmb
	Cxcl8	Hnf1a
	Ifi27	IL12rb2
	Ifi35	Ifng
	Ifi44	Il12p35
	Ifit1	Il12rb1
	Ifit2	Il21
	Ifit3	Irf1
	Ifitm1	Itgae
	Ifitm2	Prf1
	Ifitm3	Slamf6
	Ifna1/5/6/12/13/14/15/16/b	Stat1
	Ifna2	Stat4
	Ifna4	Tbx21
	Ifnb1	Tnfa
	Irf3	Tnfb
	Irf7	cxcr3
	Irf9	Cd3e
	Isg15	Cd4
	Mx2	Ptprc
	Oas1a	
	Oas2	
	Oas3	

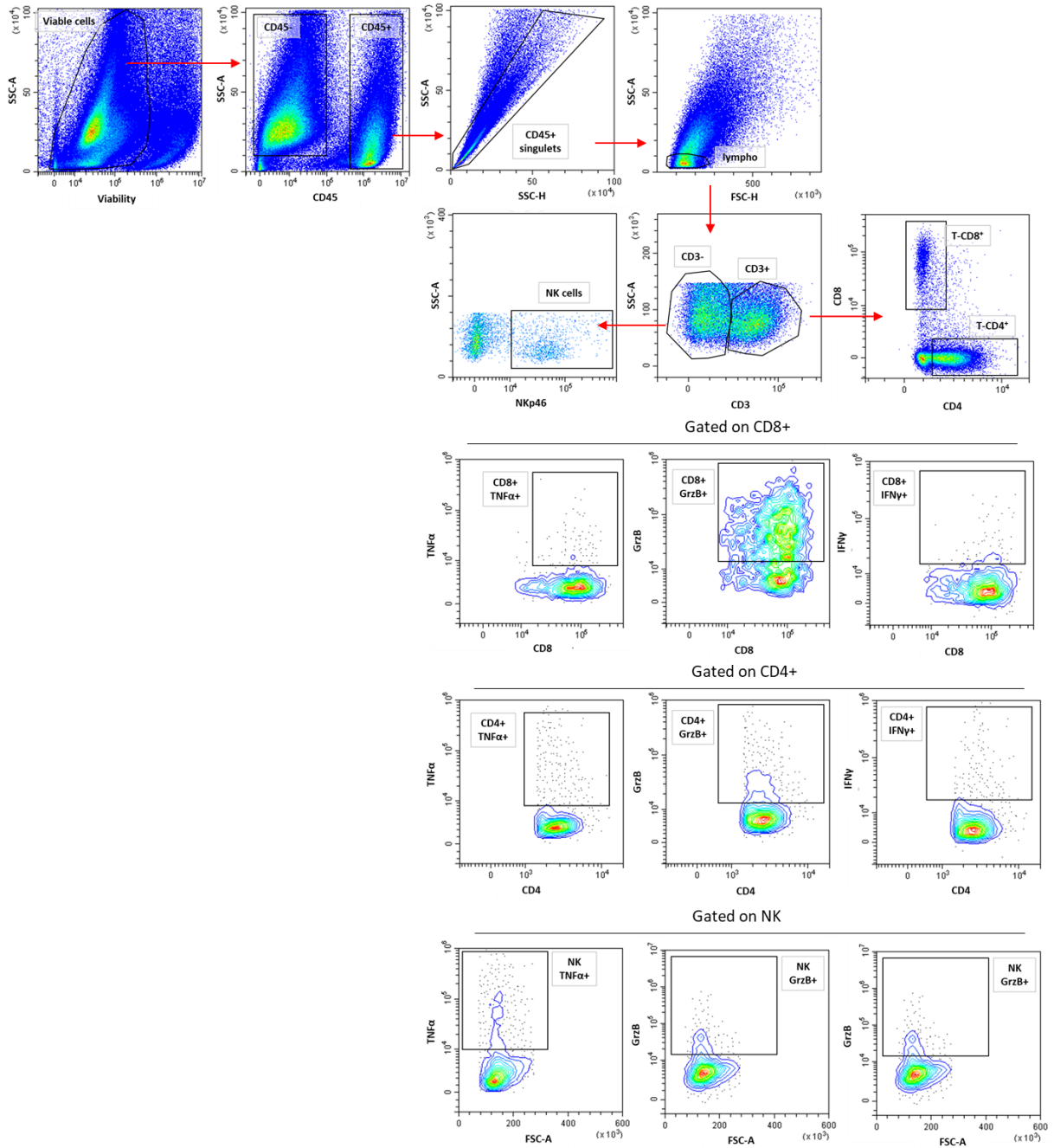
## Annexe 5 : Stratégie d'analyse du panel lymphoïde

Lymphoid cells gating strategy



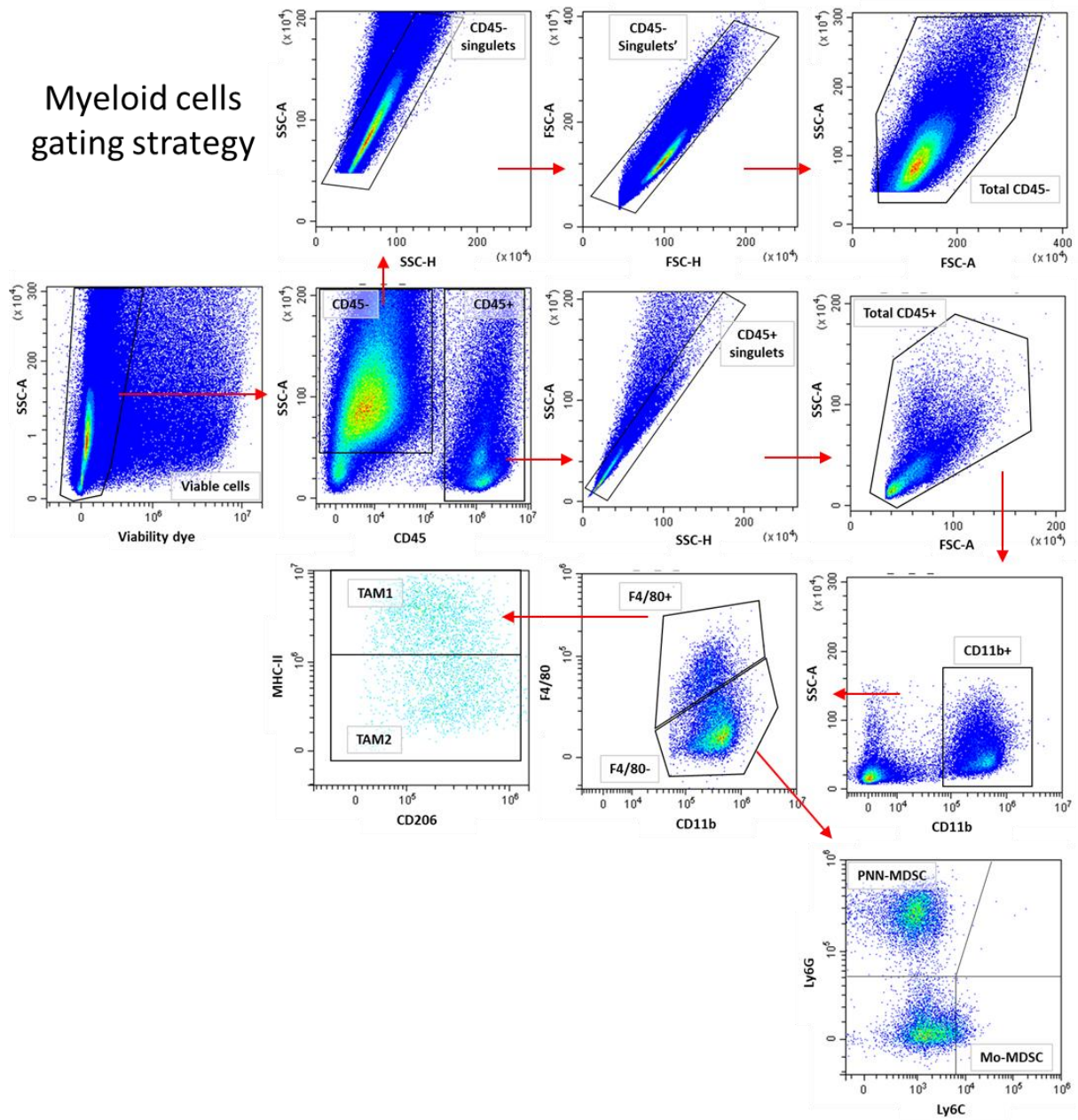
## Annexe 6 : Stratégie d'analyse du panel cytokines

### Lymphoid functionality analysis



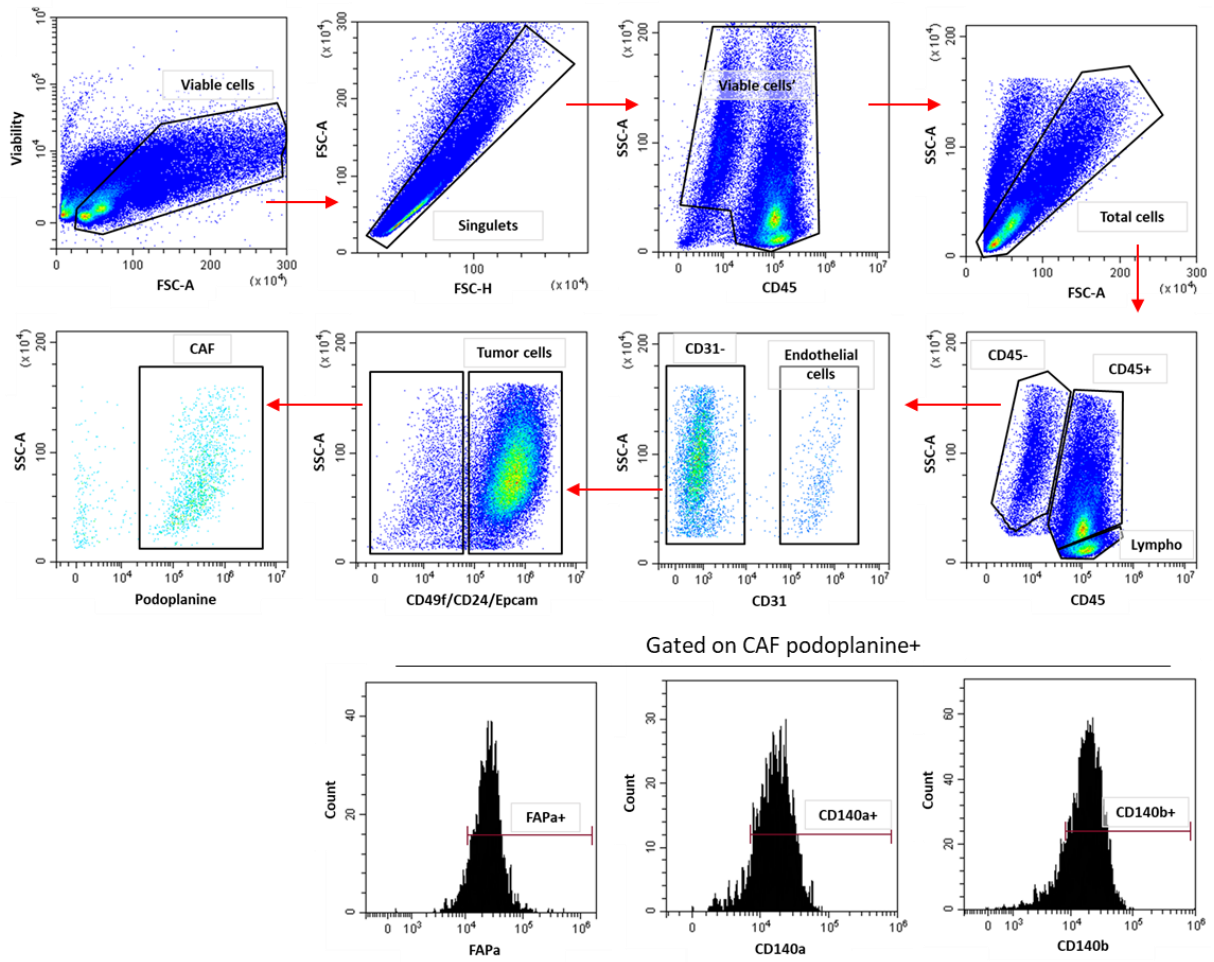
Annexe 7 : Stratégie d'analyse du panel myéloïde

Myeloid cells gating strategy

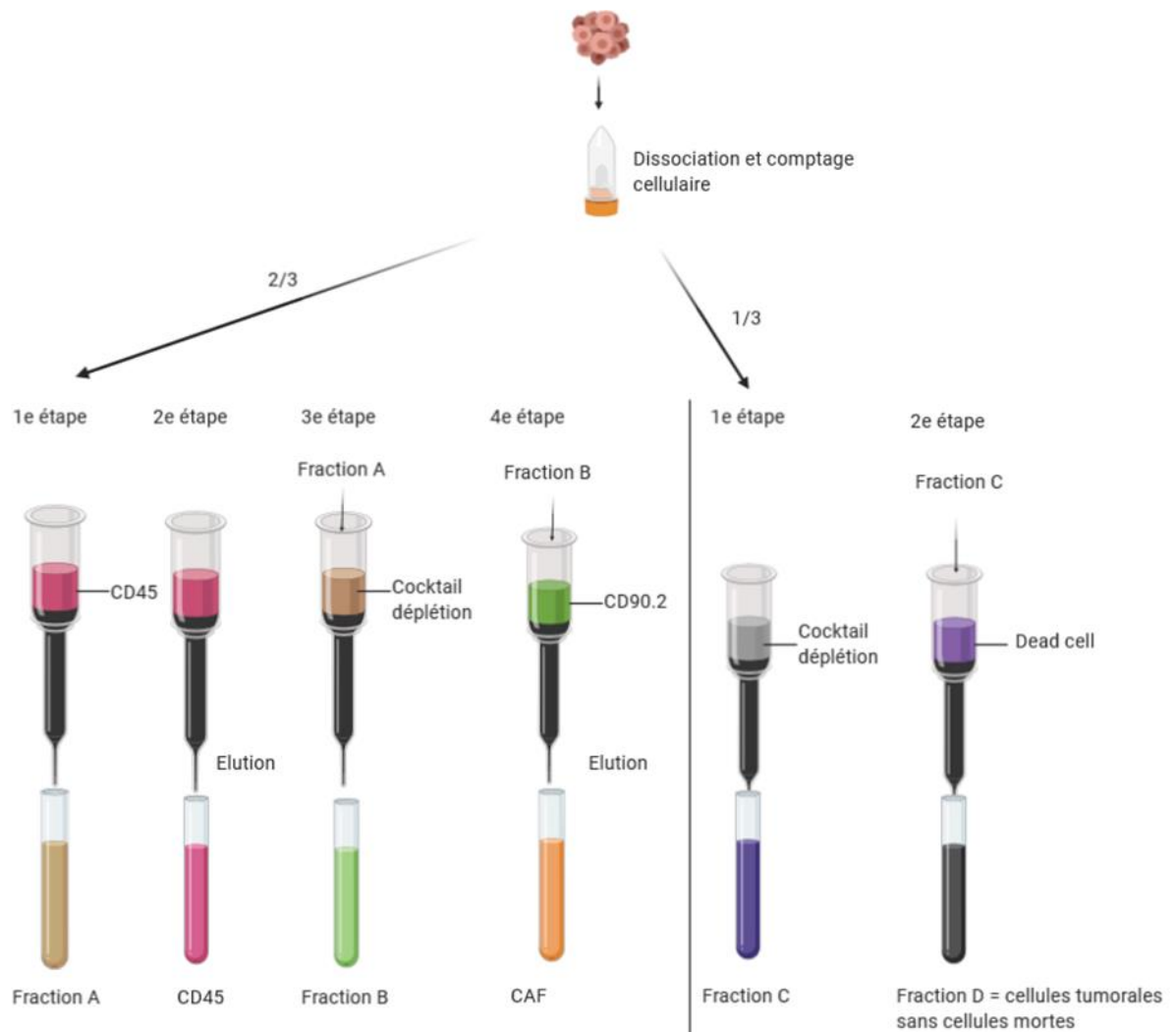


## Annexe 8 : Stratégie d'analyse du panel CAF

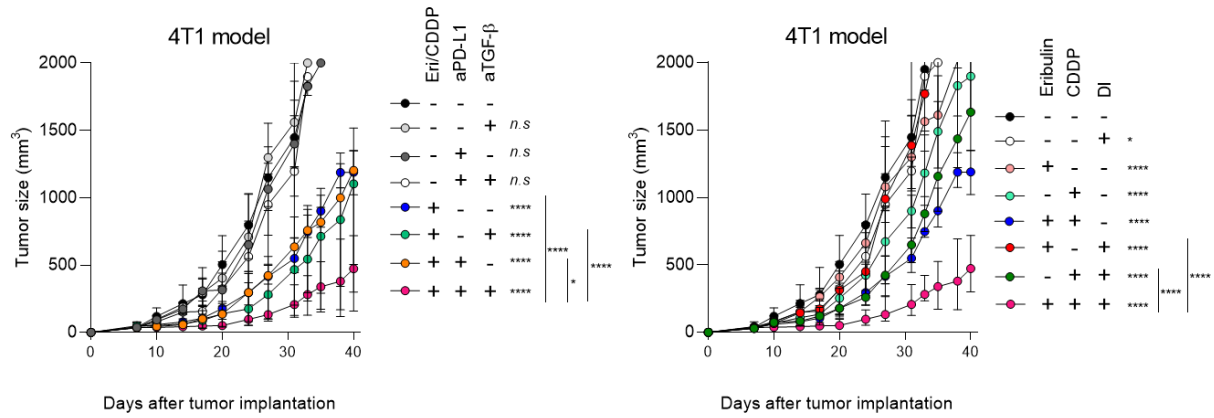
### CAF gating strategy



Annexe 9 : schéma récapitulatif des différentes étapes d'isolation des populations intra-tumorales.



Annexe 10 : courbes de croissances tumorales 4T1 en fonction des différents traitements.





Annexe 11 : Revue Cancers “*Clinical challenges and medical perspectives of therapeutic associations with anti PD-1/PD-L1 in breast cancer*”

Review

# Therapeutic Associations Comprising Anti-PD-1/PD-L1 in Breast Cancer: Clinical Challenges and Perspectives

Fanny Ledys<sup>1,2,3,†</sup>, Laura Kalfeist<sup>1,2,3,†</sup>, Loick Galland<sup>1,4</sup>, Emeric Limagne<sup>1,2,3,‡</sup> and Sylvain Ladoire<sup>1,2,3,4,\*,‡</sup>

<sup>1</sup> Platform of Transfer in Cancer Biology, Georges-François Leclerc Center, 21000 Dijon, France; fledys@cgfl.fr (F.L.); lkalfeist@cgfl.fr (L.K.); lgalland@cgfl.fr (L.G.); elimagne@cgfl.fr (E.L.)

<sup>2</sup> School of Medicine and Pharmacy, University of Burgundy Franche-Comté, 21000 Dijon, France

<sup>3</sup> UMR INSERM 1231, Lipides Nutrition Cancer, 21000 Dijon, France

<sup>4</sup> Department of Medical Oncology, Georges-François Leclerc Center, 21000 Dijon, France

\* Correspondence: sladoire@cgfl.fr

† These authors contributed equally.

‡ Senior author.

**Simple Summary:** Breast cancer remains the leading cause of death in women. Despite improved treatment in recent years, new therapeutic options are still needed for some types of breast cancer. In view of the poor response of breast cancer to immunotherapy, it is important to develop therapeutic combinations in order to sensitize breast tumors to anti-PD-(L)1 immunotherapy. This review presents the different combinations developed in pre-clinical and clinical studies according to the immune characterization of breast cancers.

**Abstract:** Despite a few cases of long-responder patients, immunotherapy with anti-PD-(L)1 has so far proved rather disappointing in monotherapy in metastatic breast cancer, prompting the use of synergistic therapeutic combinations incorporating immunotherapy by immune-checkpoint inhibitors. In addition, a better understanding of both the mechanisms of sensitivity and resistance to immunotherapy, as well as the immunological effects of the usual treatments for breast cancer, make it possible to rationally consider this type of therapeutic combination. For several years, certain treatments, commonly used to treat patients with breast cancer, have shown that in addition to their direct cytotoxic effects, they may have an impact on the tumor immune microenvironment, by increasing the antigenicity and/or immunogenicity of a “cold” tumor, targeting the immunosuppressive microenvironment or counteracting the immune-exclusion profile. This review focuses on preclinical immunologic synergic mechanisms of various standard therapeutic approaches with anti-PD-(L)1, and discusses the potential clinical use of anti-PD-1/L1 combinations in metastatic or early breast cancer.

**Keywords:** breast cancer; PD-1/PD-L1 blockade; immune response; chemotherapies; kinase inhibitors; targeted therapies



**Citation:** Ledys, F.; Kalfeist, L.; Galland, L.; Limagne, E.; Ladoire, S. Therapeutic Associations Comprising Anti-PD-1/PD-L1 in Breast Cancer: Clinical Challenges and Perspectives. *Cancers* **2021**, *13*, 5999. <https://doi.org/10.3390/cancers13235999>

Academic Editor: Andrea Cavazzoni

Received: 18 October 2021

Accepted: 19 November 2021

Published: 29 November 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/>).

## 1. Background and Current Development of Immunotherapy with Anti-PD-1/PD-L1 in Breast Cancer

According to the latest global cancer statistics (GLOBOCAN 2020), breast cancer (BC) ranks among the most frequently encountered cancers, with a rate of 11.7%. BC accounted for 6.9% of cancer deaths in 2020, making it the leading cause of cancer death in women worldwide [1]. BC has traditionally been classified into three subtypes associated with different prognosis and substantial microenvironment heterogeneity. Among these subsets, luminal cancers are characterized by estrogen (ER) +/– progesterone receptor (PR) expression. Conventional systemic treatment (both in the adjuvant and metastatic setting) is based on hormone therapy, and prognosis is relatively good. The second type, called HER2-positive BC, is characterized by high expression of this receptor and does

not express hormone receptors, and is treated with HER2-targeted therapies, most often in combination with chemotherapy. Finally, the third type is triple-negative BC (TNBC), which is characterized by the absence of expression of any of the three predictive markers (i.e., ER, PR or HER2). Therefore, there is currently no specific targeted therapy for this subtype, and chemotherapy remains the standard of systemic treatment, always in the adjuvant or metastatic setting. The latter two types of cancer have a poor prognosis [2].

Tumor-mediated immune escape is one of the hallmarks of cancer that blunts cancer cell detection and elimination by cytotoxic lymphocytes. This phenomenon implicates a large number of biological processes, and one of them is immune checkpoint induction, such as cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) or PD-1, which have suppressive functions against activation of anti-tumor lymphocytes. Blockade of these immune checkpoints by monoclonal antibodies has positively impacted the therapeutic management of a broad number of malignancies, by enabling profound and lasting tumor responses to be obtained, albeit in a small subset of patients [3].

Historically, BC was not considered to be immunologically active, especially compared to other tumors such as melanoma, renal or lung cancers [4,5], most often due to an “immunologically cold” contexture, associating low immune cell infiltration (in particular, cytotoxic T lymphocytes), and low tumor mutational burden (TMB). This is especially true for HER2 negative luminal tumors, which account for the overwhelming majority of breast cancers [6].

Nevertheless, there is mounting evidence that some BCs can present a more favorable immune biology, with a high level of tumor infiltrating lymphocytes (TILs). This infiltration is associated with better prognosis and also has a positive predictive impact on chemosensitivity, particularly in the context of neoadjuvant chemotherapy, where higher TIL level is associated with higher probability of pathological complete response (pCR) [7,8]. However, this prognostic and predictive impact of the efficacy of chemotherapy depends on the breast cancer subtype, and is particularly marked in the triple negative and HER2 positive subtypes, in which there is more often a higher TMB, as well as greater inflammatory signature expression. Moreover, in the HER2 positive subtype, the immune response (in particular TIL levels) also seems to influence the effectiveness of anti-HER2 treatments, in particular monoclonal antibodies (possibly by the phenomenon of Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity (ADCC)) [7,9–11]. Among TILs, the presence of CD8<sup>+</sup> T cells, as well as the ratio between effector CD8<sup>+</sup> and regulatory FoxP3<sup>+</sup> T cells, appears to be associated with both better prognosis and long-term survival [7,12,13]. T cells infiltration is variable between different breast cancer subtypes. Indeed, TNBC and HER2 positive tumors appear to be the most CD8<sup>+</sup> T cells infiltrated with a median percentage of patients with high CD8<sup>+</sup> T cells levels of 60% and 61% respectively compared to the RH+ subtype with 43%. Furthermore, 70% and 67% of TNBC and HER2 patients had high levels of FoxP3+ T cells compared to 38% of HR+ patients [14,15].

These observations suggest that therapeutic strategies based on cytotoxic immune cell stimulation and/or immunosuppression blockade can be effective for BC treatment. Among these strategies, the discovery of immune checkpoints, which regulate immune activation, and their blockade with monoclonal antibodies targeting PD-1/PD-L1, has been considered and tested.

The first studies were carried out with anti PD-(L)1 monotherapy in patients with advanced metastatic disease, and TNBC (supposed to be more immunogenic). Initial studies carried out with atezolizumab (anti PD-L1) or pembrolizumab (anti-PD-1) as monotherapy and in advanced stage, found objective response rates (ORR) around 20% (including in patients with PD-L1 negative tumors), with long-lasting tumor responses in some patients [16,17]. The mechanisms behind these very low response rates are still largely unknown. Like other tumor types, certain breast cancer tumor cells are, for example, capable of co-expressing PD-1 and PD-L1, which slows down tumor growth. Targeting PD-1 or PD-L1 is then paradoxically able to stimulate tumor growth. Whether this mecha-

nism could explain the poor results of anti-PD-1 or anti PD-L1 monotherapy remains an unanswered question [18].

Higher ORRs were observed in patients treated in first line, especially if the tumor expressed PD-L1 and if a higher level of TIL infiltration was observed [19]. In the various cohorts of the Keynote 086 study (phase II), pembrolizumab monotherapy made it possible to obtain higher response rates in patients with PD-L1 positive tumors, in the first line of treatment (ORR: 23%, with 4% achieving complete response), compared to patients who had already received chemotherapy, and not selected for tumor PD-L1 status (ORR: 4.7%) [20]. These first results, suggesting a greater benefit during early use, and when the tumor expresses PD-L1 by immunohistochemistry, were confirmed in the phase III Keynote 119 study, in which pembrolizumab monotherapy was used in second or third line of metastatic TNBC treatment, without better ORR as compared to single-agent chemotherapy. A significant increase in survival was nevertheless seen for patients with higher tumoral PD-L1 expression [21]. Beyond mTNBC, avelumab, an anti-PD-L1, has been used as monotherapy in patients with different subtypes of metastatic breast cancer, and yielded an ORR of 2.8% for ER+/HER2– tumors, but no response in HER2 positive tumors (compared to an ORR of 5.2% in patients with mTNBC) [22].

These first results, therefore, seem to indicate that a small group of patients (difficult to identify due to imperfect selection biomarkers) with metastatic breast cancer (and not only of the TNBC subtype), may benefit from therapeutic approaches by ICB (immune checkpoint blockade) monotherapy, but also that it is necessary to develop therapeutic strategies in order to increase the number of responding patients. Thus, concerted efforts have been made to better understand the mechanisms responsible for defects in spontaneous immune response against BC, and how to make it more efficient from a therapeutic point of view, in order to rationally combine ICB with other treatments.

Many treatments used in oncology are indeed capable of inducing immunogenic cell death (ICD) [23,24]. ICD is a mode of drug-induced cell death characterized by molecular hallmarks including the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) by dying cancer cells [25]. ICD can initiate efficient antitumor immunity, and thus augment the therapeutic effect of a given cytotoxic drug [26]. Besides this effect, some commonly used chemotherapies also appear able to modulate the tumor immune microenvironment quantitatively or qualitatively, influence antigen presentation or release of tumor antigens or chemokines, or are capable of remodeling the tumor stroma in a manner more favorable to immune cell trafficking [27]. Since many chemotherapy drugs are able to act at these different levels, and chemotherapy is part of the usual treatments for localized or metastatic breast cancer, numerous studies involving ICB+ chemotherapy have been performed, in TNBC and other subtypes.

Initial phase I-II trials testing combinations involved chemotherapies usually used for the treatment of metastatic breast cancer (MBC), in particular nab-paclitaxel [28], or eribulin mesylate [29], and clearly showed higher response rates (26–39%) than monotherapy with ICB, whether in the first or second line, again with lasting tumor response. Following these encouraging results, several randomized phase III trials were performed to confirm the value of adding anti-PD(L)-1 treatment to first-line chemotherapy in metastatic TNBC (mTNBC). However, currently available results from these studies are conflicting: the IMpassion 130 trial (NCT02425891), which randomized patients to nab-paclitaxel vs nab-paclitaxel + atezolizumab as first-line treatment for mTNBC, showed a significant benefit in terms of PFS in the overall population, but also an especially marked benefit in patients with a PD-L1 positive tumors (7.5 vs. 5.0 months,  $p < 0.001$ ) [30]. A benefit in OS was not shown in the overall population, but an exploratory analysis in the PD-L1 positive population highlighted a median OS of 25 months in the atezolizumab group, compared to 15.5 months in the placebo group. These results contrast with those from the IMpassion 131 trial (NCT03125902), in which mTNBC patients were randomized between paclitaxel and paclitaxel + atezolizumab, with no advantage in terms of OS or PFS for patients receiving anti PD-L1 [31]. These results are particularly intriguing, and remain unexplained,

especially since a third study (Keynote-355, NCT02819518) conducted in the same type of patient (first-line treatment of mTNBC) reported a clinically meaningful improvement in PFS among patients treated with pembrolizumab in combination with chemotherapy (nab-paclitaxel, paclitaxel or gemcitabine-carboplatin) [32], compared to chemotherapy alone. The pembrolizumab benefit was seen especially in patients whose tumor expressed significant levels of PD-L1 by IHC (CPS score  $\geq 10$ ) (median PFS 9.7 vs. 5.6 months). Interestingly, in this study, patients treated with paclitaxel + pembrolizumab seemed to benefit as much from ICB as those who received nab-paclitaxel + pembrolizumab, compared to patients treated with the same chemotherapies plus placebo. The reasons for these discordant results between phase III trials are not fully understood, and the results of other first-line studies incorporating ICB in association with standard of care are eagerly awaited (e.g., the IMpassion 132 trial NCT03371017 in mTNBC, or NCT03199885 in HER2+ BC). In this review, we will discuss some hypotheses that may explain these differences from an immunological point of view.

Taking into account immunosuppressive load, and tumor clonal heterogeneity, probably at a lower level as compared to metastatic disease, it would be expected to obtain deeper tumor responses in early breast cancer (eBC) with chemotherapy + ICB. As the efficacy of neoadjuvant chemotherapy (NAC) can be evaluated by pathologic complete response (pCR) in eBC, many clinical trials have evaluated the combination of chemotherapy + ICB in this setting. Earliest phase Ib studies, like Keynote 173 [33] showed impressive pCR rates of around 60% in PD-L1 unselected eTNBC patients. Higher pretreatment expression of PD-L1, and stromal TIL levels were significantly associated with higher pCR rates. I-SPY 2 is a phase II trial platform that is evaluating novel neoadjuvant agents on top of a classical NAC backbone of taxane/anthracycline, with pCR estimation by Bayesian models. With this approach, combining pembrolizumab with NAC made it possible to triple pCR probability not only in eTNBC (60% vs. 20%), but also in ER+/HER2- eBC (34% vs. 13%) [34]. These encouraging results have prompted larger randomized trials comparing NAC to NAC + ICB in eBC. In the phase II GeparNuevo trial [35], surprisingly, there was no difference in pCR between patients treated with NAC alone and NAC + durvalumab, except in those with a short run-in of durvalumab monotherapy before NAC + ICB (pCR: 61% vs. 44.2% in the placebo arm). These results highlight the need to better understand how to sequence ICB with chemotherapy, and to discover the optimal “immunologic window” in which to use immunotherapy during the treatment course. Of note, after extended follow-up, patients treated with durvalumab had better 3-year survival (distant-DFS, and OS) [36]. More recently, 2 phase III randomized trials clearly indicated a significant benefit of adding anti-PD-(L)1 to NAC for the treatment of eTNBC: in the IMpassion 031 trial, an absolute pCR increase of 17% was observed in patients randomized to the atezolizumab + NAC arm, compared to NAC alone (58% vs. 41%) [37]. In the Keynote 522 trial, patients treated with NAC + pembrolizumab had a pCR rate of 65%, significantly higher than in patients who received NAC only (51%) [38]. Interestingly, in these two positive studies, PD-L1 tumor expression was not predictive of ICB benefit, but was associated with a higher probability of achieving pCR, both with ICB + NAC, and with NAC alone. In contrast, in a third study called neoTRIP [39], no difference in pCR was observed between patients treated with NAC alone, and those treated with NAC + atezolizumab. An explanation for these apparently contradictory results could be the nature of the chemotherapy backbone, which comprised anthracyclines (sequenced with taxane +/- carboplatin) in IMpassion 031 and Keynote 522, but not in neoTRIP (paclitaxel + carboplatin). Given the differences in immunological properties of these drugs, which we will discuss in this review, these clinical results highlight the importance of considering the therapeutic partners of ICB from an immunological perspective. In eTNBC, many other large clinical trials evaluating PD-(L)1 blockade are ongoing, in the neoadjuvant setting (like NSABP B-59 NCT03281954), the adjuvant setting (Impassion 030 NCT03498716), or in post-neoadjuvant high risk patients with post-NAC residual disease (SWOG S1418/BR006 (NCT02954874), A-Brave (NCT02926196). The same

neoadjuvant strategy incorporating pembrolizumab with standard NAC is also being explored in high risk ER+/HER2- eBC patients in the Keynote 756 study (NCT03725059).

Several lessons can be learned from these clinical and biological results. First, concerning the predictive value of PD-L1 status, all these studies show that it is not the perfect biomarker for predicting the benefit of immunotherapy. Moreover, while increased expression of PD-L1 makes it possible to select a population who probably benefit more from immunotherapy (in monotherapy or in combination with chemotherapy compared to chemotherapy alone), on the other hand in early stage disease (neoadjuvant setting), PD-L1 expression is probably linked to intra-tumoral immune response and TIL infiltration, which is a prognostic and predictive factor for chemotherapy efficacy. In TNBC, the differences in the efficacy of chemotherapy + immunotherapy combinations between localized and metastatic stages are probably partially explained by the immunosuppressive load, and increasing tumor heterogeneity with more advanced disease stage, [40–42]. Moreover, metastatic spread could also reflect escape from immune surveillance at the primary tumor site, and thus, the presence of immunoselected disease that may be less sensitive to immunotherapeutic approaches [43]. As “hot” immunogenic BC components are usually more chemo-sensitive, the metastatic disease is probably also enriched in “cold” tumor clones, previously selected by initial chemotherapy. For metastatic patients, the predictive value of PD-L1 expression is also partly related to the presence of an anti-tumor immune response, and suggests that it is essential to use therapeutic partners capable of converting a cold and/or immunosuppressed tumor microenvironment into a hot, activated immune context, in order to sensitize the tumor to PD-1 blockade. However, considering the immunological properties of paclitaxel (the most widely used first-line treatment in mTNBC), it is unlikely that this drug class is the best companion for immunotherapy in BC. Indeed, preclinical and human data have shown that paclitaxel is not a strong ICD inducer and has a limited effect on selective depletion/inhibition of immunosuppressive cells [27,44]. In the absence of a clear and substantial benefit of chemo-immunotherapy in metastatic BC, it seems essential to consider new therapeutic combinations by exploring the immune effects of different therapies. This “pick the winner” approach was recently tested in the TONIC trial [45], and showed that not all chemotherapies used in MBC have the same effect on the induction of an immune response amenable to enhancing the efficacy of immunotherapy with nivolumab.

Several important points should thus be taken into account: (i) the immunological effect of the therapies conventionally used in BC (targeted therapies, chemotherapy, kinase inhibitors, etc.) and (ii) the immune tumor microenvironment. The immunological effects of drugs can vary widely, but the tumor itself can also modulate its environment in various ways, in quantitative, qualitative and topographical terms, to make it hostile to the immune response. This leads to the appearance of different tumor subgroups, namely inflammatory tumors termed “hot” tumors; non-inflammatory or “cold” tumors, and “immune-excluded” tumors. A hot tumor is described as a tumor highly infiltrated by immune cells and frequently associated with high PD-L1 and interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) signature expression (and therefore, a priori, sensitive to anti-tumor immunity). Conversely, a cold tumor is characterized by a paucity, or total lack of immune cell infiltration and anti-tumor immune response [46]. Immune-excluded tumors are tumors where the action of the immune system is limited by the presence of a physical barrier that prevents the immune cells from infiltrating the tumor. There is thus a strong rationale for combining immunotherapy comprising an anti-PD-L1/PD1 checkpoint inhibitor with therapies capable of converting a cold tumor into a hot tumor, enabling increased expression of PD-L1. On the other hand, it also seems possible to combine ICB with some conventional therapies capable of eliminating the physical barrier, thereby activated and efficient immune cells to infiltrate the tumor.

The objective of this review is to take stock of preclinical and clinical data in order to identify, among the therapies used in breast cancer, those most relevant to sensitize: (i) non-immunogenic or non-antigenic cold tumors, (ii) immunosuppressed cold tumors,

and (iii) immune-excluded tumors. There are currently a large number of clinical trials testing therapeutic combinations with immunotherapy in breast cancer, most of them evaluating combinations incorporating PD-(L)1 inhibitors [47].

## 2. Turning a Non-Antigenic and Non-Immunogenic “Cold” BC Tumor into a “Hot” Tumor

It is now well recognized that the quantitative and qualitative composition of the tumor immune micro-environment influences not only the prognosis of the disease but also the effectiveness of certain treatments such as ICI. Patients with apparently the same type of tumor can in fact have immunologically very different immune TME, which is important to know in order to adapt the therapeutic strategy. In a simple way, tumors can be divided into two main categories according to their immune TME. “Hot” tumors are characterized by a strong infiltration of T lymphocytes, transcriptomic signatures of a favorable inflammatory response (interferon- $\gamma$ ), and frequently a strong expression of PD-L1 testifying to this immune response. These tumors have a high probability of responding well to therapeutic approaches based on ICI. Conversely, cold tumors are characterized by low T lymphocyte infiltration (immune desert) or T infiltration remaining at the periphery of the tumor (immuno-excluded phenotype), associated with the absence of other signs of an effective inflammatory response [48,49]. Several mechanisms can explain the “cold” tumor phenotype associated with resistance to PD-(L)1 blockade. The two main ones are: (i) loss of antigenicity, and/or (ii) loss of immunogenicity.

Poorly antigenic tumor can be explained by a low tumor mutational burden (TMB), which is common in BC [50], and associated with a lower probability of expressing tumor-specific antigens (neoantigens). Tumor cells can also lose their capacity for antigen processing and/or presentation, for example after genetic deletion of MHC-I loci or by *JAK1/2* mutation and subsequent inhibition of INF $\gamma$ -induced MHC-I expression [51–54]. Reduced expression of MHC I has been observed in human breast cancer samples [55].

The absence of immunogenicity may be due to low release during ICD of DAMPs such as extracellular high mobility group box 1 (HMGB1), adenosine tri phosphate (ATP), calreticulin (CRT), or double-stranded DNA (dsDNA) (Figure 1), and/or the induction of inhibitory pathways, such as toll like receptor 4 (TLR4) signaling inhibition, CD39/CD73, CD47 or Treg expression [56]. Accordingly, tumors with both poor antigenicity and a low level of inflammation are generally much more resistant to immunotherapy [57]. This is the case of the majority of BC, which present both a low TBM and a low level of inflammation, unlike immunogenic NSCLC or melanoma tumors [58]. Therefore, identifying therapies that can upregulate antigenicity and/or immunogenicity in breast tumors is essential to sensitize these tumors to immunotherapy, particularly inhibitors of the PD1/PD-L1 axis. The first part of this review will therefore focus on the effects of existing therapies capable of stimulating these two biological processes.

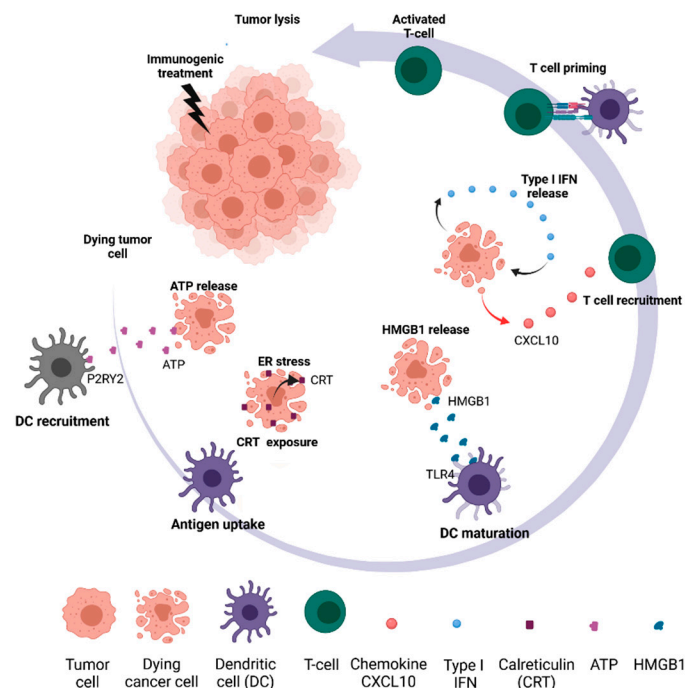
### 2.1. Therapeutic Approaches to Increasing Antigenicity

#### 2.1.1. Poly ADP Ribose Polymerase Inhibitors (PARPi)

PARPi (olaparib, talazoparib) are currently approved for MBC patients with deleterious germline BRCA1/2 mutations. These tumors with homologous recombination deficiency and treated with PARPi are characterized by high genomic instability, and high numbers of DNA breaks, thus generating dsDNA fragments able to activate the interferon pathway (and thus increased MHC expression) in treated cancer cells by stimulating the STING (Stimulator of Interferon Genes) pathway [60,61]. Moreover, it has been postulated that this high genomic instability could also generate non-synonymous mutations, translating into potentially immunogenic neoantigens. These BRCA-mutated tumors have been also described as being more infiltrated by immune cells [62].

Additionally, in cancer cell lines, xenograft and syngeneic mouse models of BC, administration of PARPi (olaparib and talazoparib) has been shown to induce PD-L1 expression [63]. In the context of BRCA2-deficient BC, Sato et al. reported that PARPi-induced dsDNA

breaks could directly regulate PD-L1 through the ATM-ATR-Chk1 pathway, independently of the type I interferon pathway [64]. A further study found that upregulation of PD-L1 was mainly linked to the increase in anti-cancer immune response and relied on activation of the STING/TBK1/IRF3 pathway by cytosolic dsDNA generation after olaparib treatment [65]. Consequently, preclinical studies shown that the combination of PD-L1 blockade plus PARPi is additive against tumor growth in different TNBC and ovarian models [60,63]. Based on the encouraging results of these preclinical studies, a series of clinical trials are underway to assess the efficacy of PARPi in combination with ICI in a wide range of cancers, including BC.



**Figure 1.** Molecular basis of immunogenic cancer cell death (ICD) (Inspired by Galluzzi et al. 2016 [59] and created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)).

The association of durvalumab (an anti PD-L1) with olaparib in patients with germline BRCA1/2 metastatic ER+ or TNBC yielded a disease control rate of 80% at 12 weeks (primary efficacy endpoint), with a median duration of response of 9.2 months in the phase I/II MEDIOLA [66].

The phase II Keynote-162/TOPACIO study evaluated the effect of a combination of niraparib and pembrolizumab in mTNBC [67] (NCT02657889). This combination appeared to be safe and provided an interesting antitumor effect (29% overall response rate), particularly in patients with germline BRCA mutation (67% overall response rate) [67]. Moreover, PD-L1-positive tumors responded better than PD-L1 negative (33% vs. 15%).

### 2.1.2. MEK Inhibitors

Multiple signaling pathways involved in oncogenesis can be activated in parallel to the PD-L1 pathway during tumor immune escape. For example, the MAPkinase pathway is involved in the fight against inflammation by inhibiting the secretion of pro-inflammatory cytokines such as IFN $\gamma$  [68]. An interesting opportunity for therapeutic synergy is, therefore, to target oncogenic pathways when these also participate in immune escape. Accordingly, inhibition of the MAP kinase pathway (frequently activated in many solid tumors including BC) using a MEK inhibitor seems capable of increasing expression of MHC I and II, PD-L1 expression, tumor infiltration by CD8<sup>+</sup> T cells, thereby sensitizing tumors to anti-PD-1 immunotherapy [69,70].

It was recently observed that a combination of anti-PD-(L)1 and a MEK inhibitor (trametinib) yielded an increase in MHC class I and II expression, and of PD-L1 in vitro



in human and murine mammary cancer cells, as well as in vivo in mice [71]. In addition, one study showed that, by adding trametinib to anti-PD1 treatment in mice, a significant reduction in tumor volume was observed [70].

Conversely, the recent phase II COLET study combining paclitaxel, atezolizumab and cobimetinib (a MEK inhibitor) did not show any additional efficacy compared to treatment with paclitaxel and atezolizumab only [72]. A possible explanation for these disappointing results is that MEK inhibition could be detrimental to the functionality and activation of T lymphocytes [73]. These preclinical data illustrate the difficulty of targeting a cellular pathway that may have opposing roles in immune and tumor cells. Other BC studies are under way with various MEK inhibitors such as selumetinib, which showed an acceptable toxicity profile in combination with an mTORC1/2 inhibitor (vistusertib) in a phase Ib/IIa trial, with lasting stability in mTNBC patients [74]. A phase I/II clinical trial of pembrolizumab plus binimetinib is currently ongoing in the setting of local and metastatic triple negative breast cancer (NCT03106415).

### 2.1.3. CDK4/6 Inhibitors

CDK4/6 inhibitors such as palbociclib, ribociclib, and abemaciclib have led to improved progression-free and overall survival in HR+ patients [75]. Some studies show that treatment with CDK4/6 inhibitors increases MHC class I expression by BC cells. CDK4/6 inhibitors work primarily by suppressing the phosphorylation of retinoblastoma protein (Rb) in cancer cells, which stops the cell cycle and inhibits proliferation. Besides these anti-proliferative effects, it has been shown that CDK4/6 inhibitors can increase antigen presentation by MHC class I molecules in models of BC lines, and increase expression of MHC class I and II molecules, partly through re-expression of endogenous retroviral sequences. CDK4/6 inhibitors are also able to induce cell-cycle arrest and tumor cell senescence, thus leading to the activation of the SASP (senescence-associated secretory phenotype); which in turn can induce recruitment of immune cells into the tumor microenvironment [76–78].

In these mouse models, CDK4/6 inhibitors synergized with immunotherapy, or immunogenic chemotherapy and increased survival in treated animals. The first phase I/II clinical study to show favorable results tested abemaciclib and pembrolizumab in patients with HR + metastatic BC, and reported four patients (14%) with objective response at 24 weeks [79]. Similar studies are under way in other types of cancer.

### 2.1.4. Combinations with Other Immunotherapies

Targeting the PD-1/PDL1 axis as the sole immunotherapy approach is arguably insufficient to reinvigorate the anti-tumor immune response in many patients.

Complementary immunotherapy approaches to anti-PD-1/PD-L1 must therefore be devised in order to increase the presentation of tumor antigens, increase tumor infiltration into immune cells, and/or increase the activity of cellular effectors.

These alternative immunotherapy approaches make use of anti-tumor vaccines, cytokines, or molecules targeting other activating or inhibiting checkpoints of the immune response. The rationale for their combination with anti-PD-1/PD-L1 has been the subject of many recent reviews, e.g., [80].

To date, relatively few combined immunotherapy approaches have been reported in BC. However, many studies have been launched (with T-cell targeted immunomodulators, other immunomodulators, cancer vaccines, oncolytic viruses, or T-cell targeted bispecific mAb) [47]. Antibodies targeting LAG3 are one example of the type of immunotherapy aimed at increasing antigenicity: LAG3 is a surface molecule that binds to MHC class II on antigen presenting cells, thereby preventing T cells from binding to MHC class II, thus preventing their activation. A number of antibodies targeting LAG3 are under development, as well as bispecific antibodies that engage both LAG-3 and PD-1/L1 (NCT03219268, NCT03440437) (Table 1).

**Table 1.** Immunotherapy combinations in clinical trial including anti-PD-(L)1 antibody.

Trial Name/Number	Phase	Subtype/Condition	Immunotherapy Combinations
NCT03219268	I	HER2/TNBC Advanced Solid Tumors	MGD013:Bispecific antibodies anti-LAG3/anti-PD-1
NCT03440437	I/II	Advanced Cancer Metastatic Cancer	FS118: Bispecific antibodies anti-LAG3/anti-PD-L1
DUET-2 NCT03517488	I	Advanced Solid Tumors	XmAb@20717: Bispecific antibodies anti-CTLA4/anti-PD-1
NCT01968109	I/2a	Advanced Solid Tumors	Nivolumab (anti-PD-1 antibody) + BMS-936558 (anti-LAG3 antibody)
AIPAC-002 NCT04252768	I	Metastatic Breast Cancer HR+	Eftilagimod Alpha (Soluble LAG-3 Protein) + paclitaxel
InCITe NCT03971409	II	Stage IV or Unresectable TNBC	PF-04518600 (Anti-OX40 antibody) + Avelumab (anti-PD-L1 antibody)
			4-1BB/CD137 agonist+ avelumab
			Sacituzumab govitecan (anti-Trop2 antibody) + avelumab
NCT02794571	Ia/Ib	Advanced/Metastatic Tumors	Tiragolumab (anti-TIGIT antibody) + Atezolizumab (anti-PD-L1 antibody) + chemotherapies
NCT04584112	Ib	TNBC	Tiragolumab + Atezolizumab + chemotherapies
NCT03742349	I	TNBC	Spartalizumab (anti-PD-1 antibody) + LAG525(anti-LAG-3 antibody) + NIR178 or capmatinib or MCS110 or canakinumab (anti IL-1 $\beta$ antibody)

In addition, antibodies targeting PD-(L)1 checkpoint inhibitors can also be combined with an antibody targeting the CTLA-4 molecule. The CTLA-4 receptor functions as an immune checkpoint to moderate the immune response. It acts as a switch that will inhibit the action of the lymphocyte when it comes into contact with CD80 or CD86 proteins on the surface of an antigen presenting cell [81]. Thus, an anti-CTLA-4 strategy unblocks the antigenic priming phase.

Dual co-inhibition of anti-CTLA-4 and anti-PD-1/L1 has shown improved PFS and OS in melanoma, and there is preclinical data to support its use in BC [82]. A pilot trial of durvalumab (an anti-PD-L1) and tremelimumab (an anti-CTLA-4) in metastatic BC observed an ORR of 17% in ER+ patients, but an ORR of 43% in patients TNBC, suggesting that patients with TNBC may be better candidates for this type of treatment [83]. Nevertheless, the toxicity of this double inhibition remains a concern, as a recent analysis of trials in melanoma/renal carcinoma showed increased efficacy but a near doubling of grade 3–4 toxicity compared to Ipilimumab as monotherapy. Dual bispecific immunomodulators combining two inhibitory functions are under study [84]. A phase I trial on the XmAb20717 molecule, a combined PD-1 and CTLA-4 antibody in certain advanced solid tumors is underway (NCT03517488).

The discovery of ICIs involved in T lymphocyte depletion such as LAG-3 or TIGIT has also enabled the development of treatments targeting these molecules, some of which are being tested in advanced BC, in particular TNBC (NCT03742349, NCT01968109, NCT04252768, NCT03971409, NCT02794571, NCT04584112).

### 2.1.5. Targeting Tumor Antigenicity with Immunological Synergy: The Paradigm of HER-2 Directed Monoclonal Antibodies

The HER2 oncogene is amplified in about 15% of BCs, and this tumor associated antigen (TAA) constitutes a target for HER-2 directed monoclonal antibodies (mAbs). These mAbs, e.g., trastuzumab, constitute a pivotal axis of treatment for this BC subtype. In the past few years, it has become clear that part of the antitumor activity of trastuzumab is in fact mediated by the immune system, especially by antibody-dependent cellular

cytotoxicity (ADCC). Several studies have shown that induction of ADCC is associated with an increase in TILs within the tumors of patients treated with trastuzumab [9,85,86]. Similar observations have been made in preclinical mouse models, and in patients with other HER2-targeting mAbs, such as pertuzumab and T-DM1 (an antibody-drug conjugate) [87,88]. In preclinical models of BC, these treatments synergize with diverse immunotherapies, including anti PD-(L)1 [89].

Clinical responses have been observed with the association of trastuzumab and pembrolizumab in patients harboring trastuzumab-resistant tumors [90]. The combination of T-DM1 + atezolizumab also seems feasible, without additional toxicity, but did not show any benefit compared to T-DM1 alone in the KATE-2 study, except in patients with a PD-L1 positive tumor, in whom there was a slight benefit in PFS [91].

These clinical results are ultimately quite disappointing, but trials are still recruiting patients at earlier stages of the disease, especially in the first line of metastatic setting (NCT03199885).

## 2.2. Therapeutic Approaches to Increasing Immunogenicity

After seeing the impact of different therapeutics on the antigenicity of tumor cells, a second step may be involved in the success of combination treatments containing immunotherapy, namely tumor cell immunogenicity. This concept has been demonstrated in mouse models of colorectal cancer treated with anthracyclines [92]. After treatment, and in addition to the purely cytotoxic effect, dying tumor cells may emit danger signals, characterized in particular by the extracellular release of HMGB1 or ATP, membrane calreticulin (CRT) exposure, or secretion of type I interferons and chemoattracting chemokines (CXCL10) (Figure 1). These “danger” signals are intended to alert and mobilize the immune system to recognize antigens and eliminate tumor cells. The association of an immunogenic therapy with immunotherapy therefore makes sense, by enabling the recruitment and activation of immune cells within the tumor [26].

### 2.2.1. Chemotherapies

Among the chemotherapies currently used in BC, anthracyclines, notably doxorubicin, epirubicin or mitoxantrone, are molecules known to induce ICD in different tumor models [92,93]. ICD is considered as a stress response associated with the release of diverse DAMPs (CRT, HMGB1, ATP etc., Figure 1) in addition to enhanced antigen presentation [26,27]. Among the DAMPs, HMGB1 release and CRT re-localization has been established in BC following exposure of human tumor cells *in vitro*, but also *in vivo* in patients treated with doxorubicin or paclitaxel [94]. Moreover, the efficacy of anthracycline-based adjuvant chemotherapy has been shown to be associated with the integrity of the HMGB1/TLR4 axis [95,96]. In a trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer model, an anti-HER2 conjugate carrying an anthracycline derivative was shown to induce ICD. Further, combining this with an anti-PD-1 antibody improved tumor regression after treatment [97]. The combination of NKT cell activation with chemotherapy, e.g., gemcitabine or cyclophosphamide (currently used in BC treatment), enhanced the immunogenicity of breast tumor cells by increasing ICD signals (CRT, ATP, HMGB1) in metastatic breast cancer [98].

A fourth hallmark of ICD has recently been discovered, linked to autocrine signaling of type I interferons (INF-I). The release of nucleic acids by anthracycline-killed tumor cells is detected by TLR3 on persistent viable cells, and acts as a transcription signal for type 1 interferon genes. INF-I in turn acts on their INF-I receptors in an autocrine manner, leading to an autocrine INF-I signature that comprises essential chemotactic factors for the recruitment of immune effectors, like CXCL10 [99].

Expression of chemoattracting chemokines seems crucial for the efficacy of ICIs [100], and it is therefore important to know that certain chemotherapies, such as anthracyclines, are likely to induce their expression.

However, although chemotherapy and anti-PD1 synergy has been shown in many preclinical models, few clinical trials have compared different chemotherapy regimens in association with the same immunotherapy.

In the phase III Keynote 355 trial, the addition of pembrolizumab to chemotherapy as the first treatment for patients with mTNBC showed an improvement in PFS regardless of the associated chemotherapy (gemcitabine + carboplatin or different taxanes), but there was no arm with anthracyclines [32]. Conversely, at advanced stages of the disease, doxorubicin and cisplatin were shown to be more likely to give synergic responses in combination with nivolumab in the phase II TONIC trial [45].

Interestingly, the only negative trial (no improvement in pCR with immunotherapy) combining chemotherapy + immunotherapy in the neoadjuvant treatment of TNBC, is the one in which neoadjuvant chemotherapy did not include anthracyclines [39].

There is therefore a growing body of indirect evidence suggesting that chemotherapeutic agents capable of inducing ICD can synergize more effectively with anti PD-(L)1.

### 2.2.2. Radiotherapy

Radiation therapy is another type of treatment used in BC. In addition to inducing lethal DNA damage in tumor cells, it appears to have an effect on tumor immunity. Indeed, the exposure of tumor cells *in vitro* and *in vivo* to different doses of radiation appears to lead to an increase in ICD signals and antigen processing machinery [23,100]. Radiotherapy is able to induce ICD of tumor cells, in connection with danger signals emitted as a result of DNA damage caused by radiation [101]. This could explain the abscopal effect of radiotherapy, observed in certain patients [102]. Moreover, in preclinical models of TNBC, Dovedi et al. showed that low dose fractionated radiotherapy could upregulate PD-L1 ligand expression by tumor cells [103]. The combination of radiotherapy and anti-PD-(L)1 immunotherapy produced effective anti-tumor immunity and long-term control of the tumor. BC is a disease that is usually radiosensitive, and radiotherapy is part of the standard treatment for localized breast cancer. Therefore, the association of radiotherapy with immunotherapy could be synergic in BC, as has been shown in lung cancer, for example, in the PACIFIC phase III trial [104]. Many association studies including radiotherapy are currently under way, and have recently been reviewed [105]. In BC, the recently published results of a phase II trial show an encouraging response rate (17.6%) in heavily pretreated patients when pembrolizumab is added to palliative irradiation of a metastatic site [106,107].

Importantly, it should be noted that the optimal radiation therapy treatment plan (dose and fractionation) to obtain optimal immunological synergy is currently unknown.

Depending on the scheme used, radiotherapy may also have immunosuppressive effects [108], part of which can be counteracted by anti-PD-1 drugs [102,103,109]. The timing of the radiation therapy in relation to the administration of immunotherapy (concurrent or sequential), and the administration schedule of the radiotherapy are possibly at the origin of variable immunological consequences [23,103,108,109] and must be taken into account in the therapeutic combinations. Research is currently ongoing to try to answer these new questions, and to investigate the integration of stereotactic radiotherapy into combination strategies with immunotherapy [110].

### 2.2.3. STING Agonists

STING agonists have emerged as good candidates to promote the recruitment of immune cells in the tumor microenvironment. Indeed, the activation of this pathway leads to the production of type I interferons and an adaptive immune response [111]. Injection of cGAS-NP, a liposomal STING inducer, in preclinical BC models resistant to anti-PD-L1 immunotherapy showed a strong increase in IFN $\beta$  expression and secretion, as well as STING/interferon  $\alpha/\beta$  receptor (IFNAR)-pathway-dependent tumor regression [112]. The generation of an adaptive immune response was demonstrated by the rejection observed following re-challenge of tumor cells from different mouse models, such as the

4T1 TNBC, proving that administration of STING agonists provided long-lasting immune memory [113]. The combination with anti-PDL1 immunotherapy is promising because, as proven in melanoma, cGAMP would activate and recruit CD8<sup>+</sup> T cells in the microenvironment, and cGAS seems essential for the success of PD-L1 treatment [114]. Interestingly, there seems to be immunological synergy between these treatments, and others capable of strongly inducing breaks in DNA, such as PARPi (especially in BRCA-associated BC) [115].

Currently, there are few available human clinical data in BC and no clinical trials are currently open.

### 3. Targeting the Immunosuppressive Microenvironment

In addition to cancer cells, tumors contain a repertoire of recruited immune and non-immune cells that contribute to the creation of the “tumor microenvironment”. Among these populations, certain cell types have immunosuppressive action, such as macrophages associated with type 2 tumors (TAM2), regulatory T lymphocytes (Treg), tumor associated neutrophils (TAN), Myeloid-Derived Suppressor Cells (MDSC), or cancer associated fibroblasts (CAF). Certain therapies are capable of inhibiting or depleting these immunosuppressive populations, but also of inhibiting the cytokines produced by these immunosuppressive cells. Targeting these cell populations could help to reduce immunosuppression within the tumor, which would in turn sensitize the tumor to immunotherapy via checkpoint inhibitors.

#### 3.1. Chemotherapies

Besides the possible induction of ICD, some chemotherapies are known for their depleting effects on immunosuppressive populations, such as cyclophosphamide for Treg lymphocytes [116] or gemcitabine or 5-fluorouracil for MDSC [117]. A preclinical evaluation of a combination of anti-PD-L1 and cyclophosphamide in a mouse model of BC failed to demonstrate a superior effect over cyclophosphamide monotherapy [118]. In contrast, the phase II CHEMOIMMUNE trial of pembrolizumab following treatment with metronomic cyclophosphamide is currently underway in lymphopenic patients with metastatic BC (NCT03139851). Other chemotherapies are able to modify the phenotype of immunosuppressive cells. Indeed, paclitaxel enables repolarization of M2 type macrophages into the M1 antitumor phenotype in a TLR4-dependent manner; this has been shown both in vitro and in vivo in preclinical studies in a 4T1 BC model [119]. In addition, another study revealed that paclitaxel at ultra-low concentrations enables the differentiation of MDSCs into dendritic cells in vitro in a TLR4-independent manner [120].

#### 3.2. IDO Inhibitors

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is an enzyme that converts tryptophan to kynurenine, exerting an immunosuppressive effect within the tumor microenvironment. Indeed, kynurenine is an enzyme capable of inactivating effector T lymphocytes and promoting regulatory T lymphocytes [121]. Like PD-L1, IDO is upregulated by T cells secreting IFN $\gamma$  in the microenvironment as a means of immune escape, and both of these pathways are potentially redundant pathways of immune suppression in BC that present TILs. The combination of indoximod, an orally administered IDO inhibitor, and docetaxel has been tested in solid tumors including BC. The results showed evidence of clinical activity: two partial responses and two minor responses in BC were observed [122] (NCT01792050). Several clinical trials are evaluating the activity of indoximod in combination with anti-PD1 in multiple types of tumors, including BC. Epacadostat is another inhibitor of IDO that recently showed a response rate of 10% in combination with pembrolizumab in mTNBC [123].

#### 3.3. The CD39/CD73/Adenosine Pathway

In BC, adenosine, produced by the CD39 and CD73 ectonucleotidases, mediates numerous molecular pathways of immunosuppression, especially inhibition of T cell

proliferation, cytotoxicity, or cytokine production [124,125]. Ectonucleotidase CD73 is particularly expressed in TNBC, and is associated with chemo-resistance [126].

In a preclinical model of TNBC, inhibition of adenosine receptors synergizes with anti-PD-1 in a CD8<sup>+</sup> T cell/NK cell/ and interferon-dependent manner [127]. Oleclumab, an inhibitor of CD73, is currently under clinical evaluation in combination with paclitaxel + carboplatin + durvalumab (anti PD-L1) in the phase I/II SYNERGY in mTNBC patients (NCT03616886).

#### 3.4. PI3K/AKT Inhibition

The PI3K/mTOR/AKT pathway is one of the most frequently mutated pathways in BC, prompting the development of various pharmacological inhibitors (PI3 kinase, AKT or mTOR) for BC treatment. Moreover, this pathway also participates in the development of an immunosuppressive environment by increasing the expression of immunosuppressive cytokines and chemokines. This occurs via the recruitment of MDSCs and regulatory T lymphocytes within the tumor, and through an increase in PD-L1 ligand expression by tumor cells [128,129]. Inhibitors targeting this pathway have been developed in recent years such as ipatasertib (an AKT inhibitor), whose first results show a decrease in the number of regulatory T lymphocytes within the tumor accompanied by an increase in differentiation of CD8<sup>+</sup> lymphocytes into CD8<sup>+</sup> memory [130]. In addition, it has been shown that PI3K inhibitors enabled polarization of M2 macrophages from an immunosuppressive phenotype into M1-type macrophages of the antitumor phenotype. Inhibition of PI3K $\gamma$  appears to sensitize tumors to anti-PD-1 antibody therapy and to slow tumor growth by increasing the level of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes within the tumor [131]. These encouraging preclinical results have prompted the development of these associations in the clinic. Indeed, a study testing ipatasertib in combination with atezolizumab and paclitaxel in patients with localized or metastatic TNBC is currently underway (NCT04177108). Another phase II clinical study combining a PI3K- $\gamma$  inhibitor, IPI-549 (because of the important role of this PI3K isoform in the functions of immunosuppressive myeloid cells), with atezolizumab and nab-paclitaxel is ongoing (NCT03961698).

#### 3.5. HDAC Inhibitors

A number of pharmacological agents capable of modifying epigenetics, such as HDAC inhibitors, are currently being investigated in BC.

Besides their direct effect on tumor cells (apoptosis, cell differentiation, growth inhibition), there is great interest in the potential of epigenetic therapy to prime the response to immunotherapy in BC. Studies have shown that epigenetic modulation can promote an IFN type I response and restore production of Th1-type cytokines and chemokines [132,133]. Another preclinical study showed that treating mice bearing solid tumors (including tumors generated with the 4T1 mouse model) with the HDAC inhibitor entinostat, combined with CTLA-4 and PD-1 antibodies, could eradicate both primary tumors and metastases by reducing granulocytic MDSCs [134]. HDAC inhibitors are thus able to reduce the immunosuppressive activity of Tregs and MDSCs [134,135].

A phase II clinical trial showed that adding entinostat to exemestane in patients with advanced ER+ BC resulted in an 8.3-month improvement in OS compared to patients treated with exemestane alone [136]. Exploratory studies on blood samples from 34 patients showed a lower number of MDSCs, a decrease in CD40 expression of MDSCs, and an increase in MHC class II expression on CD14<sup>+</sup> monocytes two weeks after treatment initiation. No alteration of T cell phenotypes was observed. Multiple clinical trials are under way evaluating the combination of epigenetic modulation with PD-(L)1 blockade, or combined blockade of CTLA-4 and PD-1 [137].

#### 3.6. CDK4/6 Inhibitors

Beside their effects on tumor antigenicity, CDK4/6 inhibitors increase the function of effector T lymphocytes while markedly suppressing the proliferation of regulatory T

lymphocytes [138]. Preclinical and clinical studies have confirmed the increased tumor infiltration by T cells [139] and the decrease in Tregs in treated tumors [140].

### 3.7. Autophagy Inhibition

Certain immunosuppressive populations and their impact on the tumor microenvironment, such as angiogenesis or hypoxia, can promote cancer stem cell (CSCs) resistance [141]. Conversely, CSCs can also interact with these immunosuppressive populations to activate and stimulate them, such as inducing the recruitment and polarization of TAM2 [142]. CSCs are known to be involved in the metastatic capacity of cancers, particularly in breast cancer [143]. Indeed, through their capacity for self-renewal, differentiation and proliferation, these cells will promote the aggressiveness of cancerous lesions. One strategy to target CSCs is the inhibition of autophagy. Indeed, autophagy appears to promote the maintenance and resistance of CSCs in tumors to anti-cancer therapies [144,145]. Targeting this catabolic process could therefore become an interesting approach to limit resistant CSCs. Numerous phase I/II clinical trials evaluating the efficacy of autophagy inhibitors such as chloroquine or hydroxychloroquine are currently being investigated in the treatment of breast cancer [146]. Autophagy inhibition has also shown a positive impact on inflammation and recruitment of cytotoxic populations and appears to improve the efficacy of immunotherapy and justify its combination [147,148].

## 4. Counteract Immune-Excluded Tumors

### 4.1. Fibrosis

Some tumors manage to escape the immune system thanks to the formation of a barrier around their perimeter that prevents the arrival of immune cells within the tumor bed. The formation of this barrier can be explained by the marked fibroblast activation by tumor cells and other immunosuppressive cells, via the influence of TGF- $\beta$ 1. Cancer-associated fibroblasts (CAF) and tumor cells produce collagen and matrix proteins that participate in the formation of a fibrous capsule, also called peritumoral fibrosis. Interestingly, in TNBC, specific tumor microenvironment profiles (including a margin-restricted profile of CD8 infiltration) are linked to different transcriptomic subtypes of TNBC [149]. A margin-restricted profile of immune cells is more frequently observed in the mesenchymal stem-like TNBC subtype. This fibrotic barrier consisting of dense tissue enables the tumor to evade the immune system [150]. Furthermore, TGF- $\beta$ 1 produced within the tumor microenvironment has a central role in immunosuppression, as this cytokine can alter the efficacy of anti-tumor populations and promote pro-tumor populations [151]. Targeting this molecule could therefore make it possible to sensitize BCs to other immunotherapeutic approaches, including anti PD-(L)1. Several methods are currently available to target TGF- $\beta$ 1, such as monoclonal antibodies or TGF- $\beta$ 1 receptor inhibitors. Tauriello et al. have shown that in mouse models of colon and liver cancer, treatment with galunisertib, a TGF- $\beta$ 1 receptor II inhibitor, resulted in an increase in T-CD8<sup>+</sup> cell activation, associated with a decrease in the number of metastases. In contrast, there appears to be no improvement in survival when targeting TGF- $\beta$ 1 alone [152]. In addition, immune system involvement, specifically CD8<sup>+</sup> T cells, was found to be involved in the response to galunisertib treatment in a 4T1 mouse model of BC [153]. Bholra et al. combined galunisertib with paclitaxel treatment in mice, and observed a decrease in tumor volume with inactivation of the SMAD pathway, compared to paclitaxel treatment alone [154]. In BC, a combination of galunisertib and paclitaxel is currently being tested in patients with TNBC (NCT02672475).

Targeting TGF- $\beta$ 1 is also possible with the use of monoclonal antibodies. Preclinical use of dual immunotherapy comprising an anti-TGF- $\beta$ 1 and an anti-PD-L1 significantly increases mouse survival [155]. The authors proposed that TGF- $\beta$ 1, by repressing lymphocyte infiltration within the tumor, prevents the action of anti-PD-1 or anti-PD-L1 treatment [155]. In humans, an anti-TGF- $\beta$ 1 antibody, fresolimumab is being tested in clinical trials, particularly in combination with radiotherapy in MBC. Results to date showed that patients

receiving the highest dose of fresolimumab had a favorable systemic immune response and longer median OS than the lowest dose group (NCT01401062) [156].

In parallel, M7824 (bintrafusp alfa), a bifunctional fusion protein targeting TGF- $\beta$  and PD-L1, is currently being tested in phase II and III clinical trials for many types of cancer. Compared to dual immunotherapy, M7824 showed greater anti-tumor efficacy in the EMT6 preclinical model [157]. Clinical studies are evaluating the efficacy of M7824 in HER2+ breast cancer (NCT03620201) and in TNBC (NCT04489940). In addition, the combination of this bispecific antibody with other therapies such as chemotherapy and radiotherapy is also being investigated. The effects of the combination of M7824 and chemotherapy with eribulin are currently being studied in TNBC (NCT03579472M). Lastly, the combination of radiotherapy and the M7824 antibody is currently being investigated in metastatic ER+/HER2- BC patients (NCT03524170).

#### 4.2. Tumor Angiogenesis

Angiogenesis is the process of creating new vessels. During tumor growth, angiogenesis is necessary to reduce hypoxia and increase nourishment for tumor cell development [158]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and fibroblast growth factor (FGF) are two angiogenic growth factors involved in tumor progression [159]. In addition to reducing the density of neo tumor vessels, leading to hypoxia in cancer cells, anti-angiogenic therapies could help to normalize the tumor vasculature, thus facilitating immune cell trafficking in the tumor [160]. Moreover, certain agents targeting VEGF or its receptors have also shown that they could selectively deplete certain populations of immunoregulatory cells, as well as increase tumor expression of PD-L1 [161].

Pre-clinical data suggest that targeting the proangiogenic cytokines Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and angiopoietin-2 (Ang-2) by a bispecific blocking antibody in an inducible model of BC leads to an increase in PD-L1 expression on epithelial cells in response to the induction of IFN $\gamma$  and cytotoxic T lymphocytes. In this setting, combining this approach with anti-PD-L1 immunotherapy yields a prolongation of survival in 30% of mice compared to monotherapy [162].

The MORPHEUS phase 1b/II clinical trial is currently recruiting patients HR+HER2- or TNBC to evaluate the efficacy and toxicity of combining treatments with immunotherapy, such as atezolizumab + bevacizumab + endocrine therapy or atezolizumab + bevacizumab + anti-CD40 (NCT03280563) (NCT03424005). The ECLIPSE II clinical trial is evaluating the effects of combination immunotherapy in ER+HER2- patients. Atezolizumab is combined with anti-MEK, anti-PI3K or bevacizumab+anti-MEK (NCT03395899). Another phase II clinical trial was conducted in women with TNBC treated by an anti-PD1 in combination with a VEGFR2 inhibitor. This combination seems to be effective, and to display strong synergy, with an ORR of 43.3% vs. <20% for monotherapies (NCT03394287) [163].

New anti-angiogenic compounds like famitinib are also in development in association with a new anti-PD-1, camrelizumab, in mTNBC with nab-paclitaxel as the chemotherapy backbone (NCT04129996).

### 5. Other Approaches

Innovative new approaches to immunotherapy are being developed with the aim of “heating up” cold or immune-excluded tumors. Among the options being investigated is intra-tumor administration of talimogene laherparepvec (T-VEC), an oncolytic herpes simplex 1 virus approved for the treatment of melanoma. A phase 1 trial of T-VEC in combination with neoadjuvant chemotherapy for the treatment of non-metastatic TNBC recently reported that this combination was feasible and led to a complete response rate of 55% [122]. Other trials associating T-VEC with ICI are ongoing, for example TVEC + atezolizumab in residual disease after standard neoadjuvant chemotherapy (NCT03802604).

Adoptive cell therapy using CAR-T cells or TILs in association with anti PD-(L)1 ICI are starting to be developed in BC, and some case reports have shown that this strategy can give strong and lasting tumor responses in very selected patients [164]. In mTNBC,

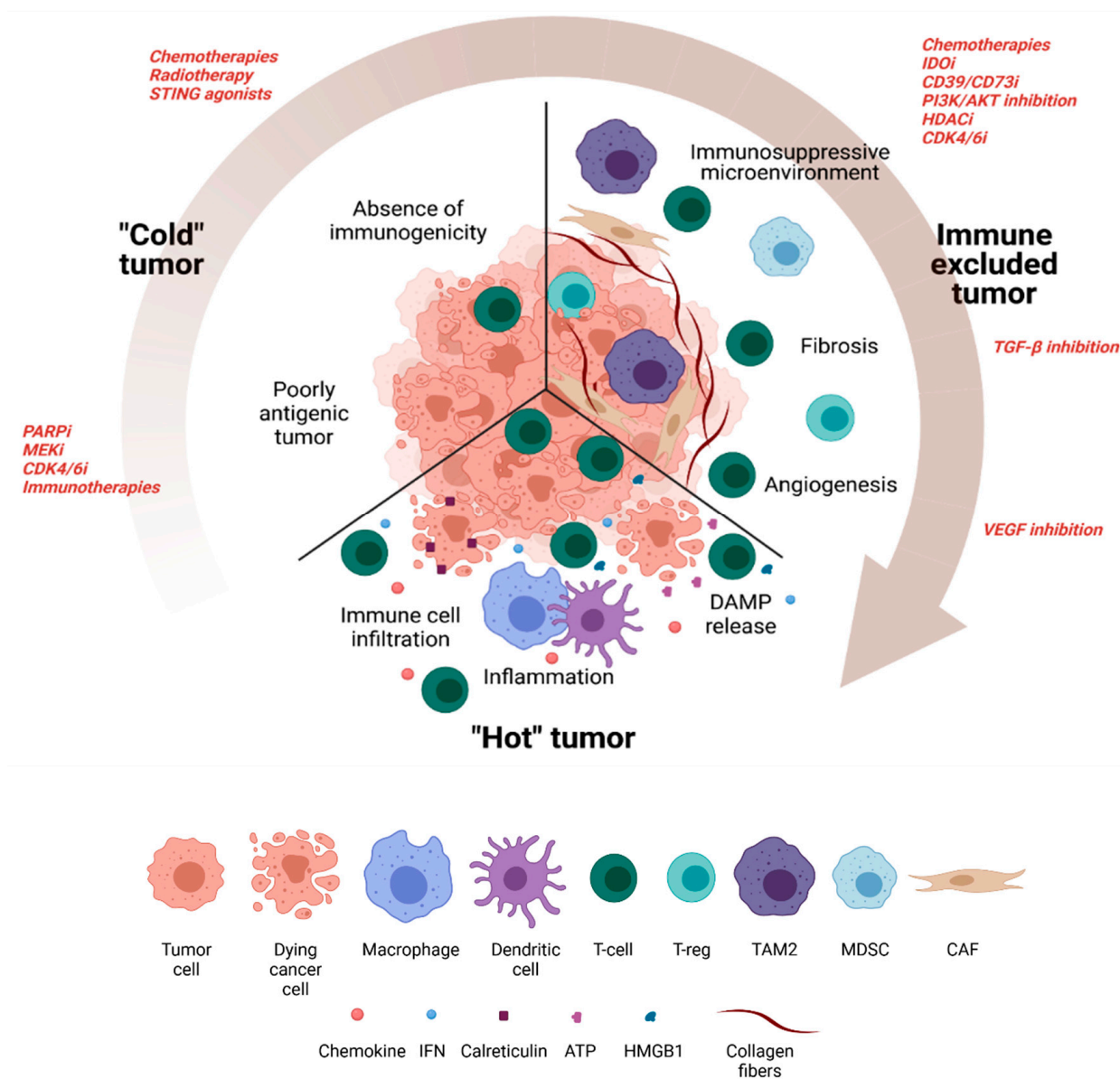


numerous phase 1 trials are currently ongoing with CAR-T cells directed against various tumor antigens (mesothelin, cMET, MUC1, . . . ) [165].

It should be noted that many new effective cytotoxic treatments are currently being developed in BC in the form of antibiotic-drug conjugates (ADC): even in the absence of a strong immunological rationale, several combination trials are already testing anti-PD-1 with sacituzumab govitecan (an antibody targeting the human trophoblast cell-surface antigen 2) (NCT03424005, NCT04468061), or ladiratuzumab vedotin [166].

### 6. Conclusions

Clinical results with anti-PD-(L)1 immunotherapy in breast cancer are mixed. It seems that monotherapy with these ICIs is clearly not sufficient to induce a deep and lasting response in the majority of patients, making it necessary to combine them with other treatments to achieve therapeutic synergy (Figure 2).



**Figure 2.** The different tumor immunophenotypes in breast cancer: “cold” tumor, immune-excluded tumor and “hot” tumor (Created with BioRender.com).

A large number of association trials are currently under way in all BC subtypes, and, in parallel, in metastatic and in early stage disease. However, it is worrying to note that all these efforts are moving forward in an uncoordinated manner, and most often without a strong immunological rationale.

It is quite probable that treatments based on immunotherapy only work in certain subgroups of BC subtypes and/or patients. Consequently, identifying these different clinical-biological entities, and their respective probability of response, should be a priority, in order to select the patients who may most benefit now from existing drugs (to clearly confirm the benefit), and conversely to prioritize access to clinical research programs for others, with a view to increasing the probability of response through therapeutic associations. In addition, the optimal schedule of administration of ICIs targeting PD-1 or PD-L1 with other therapeutic partners, their respective doses, and the treatment sequence are points that remain to be clarified.

The challenges to be faced in the years to come are daunting if immunotherapy is to reach its full potential in breast cancer. We must continue our search to find the best possible combination for a given patient, depending on the subtype of disease, the tumor immune microenvironment, and the patient's immunological context (degree of immunosuppression, microbiota, comedications, etc.).

**Author Contributions:** Writing review and editing, F.L., L.K. and L.G.; supervision, E.L. and S.L.; funding acquisition, S.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** F.L., L.K., E.L. and S.L. are supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipes labellisées), the Ligue Nationale contre le Cancer Grand-Est, the Institut National du Cancer (INCa), the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC), the Fondation AMGEN, the LabEx LipSTIC, the Région Bourgogne-Franche-Comté (BFC), and the I-Site-BFC program. This study was also supported by the Georges-François Leclerc Cancer Center.

**Conflicts of Interest:** S.L. received fees for oral communication and travel grants from Lilly, Pfizer, Novartis, Bristol-Myers Squibb, Roche, Ipsen, Janssen Oncology, and Sanofi. Other authors have no potential conflict of interest to disclose. Other authors declare no conflict of interest.

## References

1. Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R.L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J. Clin.* **2021**, *71*, 209–249. [[CrossRef](#)]
2. Loibl, S.; Poortmans, P.; Morrow, M.; Denkert, C.; Curigliano, G. Breast Cancer. *Lancet* **2021**, *397*, 1750–1769. [[CrossRef](#)]
3. Darvin, P.; Toor, S.M.; Sasidharan Nair, V.; Elkord, E. Immune Checkpoint Inhibitors: Recent Progress and Potential Biomarkers. *Exp. Mol. Med.* **2018**, *50*, 1–11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. De La Cruz, L.M.; Czerniecki, B.J. Immunotherapy for Breast Cancer Is Finally at the Doorstep: Immunotherapy in Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.* **2018**, *25*, 2852–2857. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Solinas, C.; Gombos, A.; Latifyan, S.; Piccart-Gebhart, M.; Kok, M.; Buisseret, L. Targeting Immune Checkpoints in Breast Cancer: An Update of Early Results. *ESMO Open* **2017**, *2*, e000255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Griguolo, G.; Serna, G.; Pascual, T.; Fasani, R.; Guardia, X.; Chic, N.; Paré, L.; Pernas, S.; Muñoz, M.; Oliveira, M.; et al. Immune Microenvironment Characterisation and Dynamics during Anti-HER2-Based Neoadjuvant Treatment in HER2-Positive Breast Cancer. *NPJ Precis. Oncol.* **2021**, *5*, 1–12. [[CrossRef](#)]
7. Loi, S.; Michiels, S.; Salgado, R.; Sirtaine, N.; Jose, V.; Fumagalli, D.; Kellokumpu-Lehtinen, P.-L.; Bono, P.; Kataja, V.; Desmedt, C.; et al. Tumor Infiltrating Lymphocytes Are Prognostic in Triple Negative Breast Cancer and Predictive for Trastuzumab Benefit in Early Breast Cancer: Results from the FinHER Trial. *Ann. Oncol.* **2014**, *25*, 1544–1550. [[CrossRef](#)]
8. Savas, P.; Salgado, R.; Denkert, C.; Sotiriou, C.; Darcy, P.K.; Smyth, M.J.; Loi, S. Clinical Relevance of Host Immunity in Breast Cancer: From TILs to the Clinic. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2016**, *13*, 228–241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Musolino, A.; Naldi, N.; Bortesi, B.; Pezzuolo, D.; Capelletti, M.; Missale, G.; Laccabue, D.; Zerbini, A.; Camisa, R.; Bisagni, G.; et al. Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms and Clinical Efficacy of Trastuzumab-Based Therapy in Patients with HER-2/Neu-Positive Metastatic Breast Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 1789–1796. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Denkert, C.; von Minckwitz, G.; Darb-Esfahani, S.; Lederer, B.; Heppner, B.I.; Weber, K.E.; Budczies, J.; Huober, J.; Klauschen, F.; Furlanetto, J.; et al. Tumour-Infiltrating Lymphocytes and Prognosis in Different Subtypes of Breast Cancer: A Pooled Analysis of 3771 Patients Treated with Neoadjuvant Therapy. *Lancet Oncol.* **2018**, *19*, 40–50. [[CrossRef](#)]

11. He, L.; Wang, Y.; Wu, Q.; Song, Y.; Ma, X.; Zhang, B.; Wang, H.; Huang, Y. Association between Levels of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Different Subtypes of Primary Breast Tumors and Prognostic Outcomes: A Meta-Analysis. *BMC Womens Health* **2020**, *20*, 194. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Ladoire, S.; Martin, F.; Ghiringhelli, F. Prognostic Role of FOXP3+ Regulatory T Cells Infiltrating Human Carcinomas: The Paradox of Colorectal Cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 909–918. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Ladoire, S.; Arnould, L.; Apetoh, L.; Coudert, B.; Martin, F.; Chauffert, B.; Fumoleau, P.; Ghiringhelli, F. Pathologic Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy of Breast Carcinoma Is Associated with the Disappearance of Tumor-Infiltrating Foxp3+ Regulatory T Cells. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 2413–2420. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Stanton, S.E.; Adams, S.; Disis, M.L. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol.* **2016**, *2*, 1354–1360. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Dieci, M.V.; Miglietta, F.; Guarneri, V. Immune Infiltrates in Breast Cancer: Recent Updates and Clinical Implications. *Cells* **2021**, *10*, 223. [[CrossRef](#)]
16. Nanda, R.; Chow, L.Q.M.; Dees, E.C.; Berger, R.; Gupta, S.; Geva, R.; Pusztai, L.; Pathiraja, K.; Aktan, G.; Cheng, J.D.; et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 2460–2467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Emens, L.A.; Cruz, C.; Eder, J.P.; Braiteh, F.; Chung, C.; Tolaney, S.M.; Kuter, I.; Nanda, R.; Cassier, P.A.; Delord, J.-P.; et al. Long-Term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses of Atezolizumab Therapy for Patients With Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: A Phase 1 Study. *JAMA Oncol.* **2019**, *5*, 74–82. [[CrossRef](#)]
18. Wang, X.; Yang, X.; Zhang, C.; Wang, Y.; Cheng, T.; Duan, L.; Tong, Z.; Tan, S.; Zhang, H.; Saw, P.E.; et al. Tumor Cell-Intrinsic PD-1 Receptor Is a Tumor Suppressor and Mediates Resistance to PD-1 Blockade Therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 6640–6650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Schmid, P.; Cruz, C.; Braiteh, F.S.; Eder, J.P.; Tolaney, S.; Kuter, I.; Nanda, R.; Chung, C.; Cassier, P.; Delord, J.-P.; et al. Abstract 2986: Atezolizumab in Metastatic TNBC (MTNBC): Long-Term Clinical Outcomes and Biomarker Analyses. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 2986.
20. Adams, S.; Schmid, P.; Rugo, H.S.; Winer, E.P.; Loirat, D.; Awada, A.; Cescon, D.W.; Iwata, H.; Campone, M.; Nanda, R.; et al. Pembrolizumab Monotherapy for Previously Treated Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: Cohort A of the Phase II KEYNOTE-086 Study. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 397–404. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Cortés, J.; Lipatov, O.; Im, S.-A.; Gonçalves, A.; Lee, K.S.; Schmid, P.; Tamura, K.; Testa, L.; Witzel, I.; Ohtani, S.; et al. LBA21-KEYNOTE-119: Phase III Study of Pembrolizumab (Pembro) versus Single-Agent Chemotherapy (Chemo) for Metastatic Triple Negative Breast Cancer (MTNBC). *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, v859–v860. [[CrossRef](#)]
22. Dirix, L.Y.; Takacs, I.; Jerusalem, G.; Nikolinakos, P.; Arkenau, H.-T.; Forero-Torres, A.; Boccia, R.; Lippman, M.E.; Somer, R.; Smakal, M.; et al. Avelumab, an Anti-PD-L1 Antibody, in Patients with Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer: A Phase 1b JAVELIN Solid Tumor Study. *Breast Cancer Res. Treat.* **2018**, *167*, 671–686. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gameiro, S.R.; Jammed, M.L.; Wattenberg, M.M.; Tsang, K.Y.; Ferrone, S.; Hodge, J.W. Radiation-Induced Immunogenic Modulation of Tumor Enhances Antigen Processing and Calreticulin Exposure, Resulting in Enhanced T-Cell Killing. *Oncotarget* **2013**, *5*, 403–416. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Aymeric, L.; Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Tesniere, A.; Martins, I.; Kroemer, G.; Smyth, M.J.; Zitvogel, L. Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 855–858. [[CrossRef](#)]
25. Hernandez, C.; Huebener, P.; Schwabe, R.F. Damage-Associated Molecular Patterns in Cancer: A Double-Edged Sword. *Oncogene* **2016**, *35*, 5931–5941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kroemer, G.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Zitvogel, L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu. Rev. Immunol.* **2013**, *31*, 51–72. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Galluzzi, L.; Buqué, A.; Kepp, O.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Immunological Effects of Conventional Chemotherapy and Targeted Anticancer Agents. *Cancer Cell* **2015**, *28*, 690–714. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Adams, S.; Diamond, J.; Hamilton, E.; Pohlmann, P.; Tolaney, S.; Chang, C.-W.; Zhang, W.; Iizuka, K.; Foster, P.; Molinero, L.; et al. Atezolizumab Plus Nab-Paclitaxel in the Treatment of Metastatic Triple-Negative Breast Cancer With 2-Year Survival Follow-up: A Phase 1b Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2018**, *5*, 334–342. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Tolaney, S.M.; Barroso-Sousa, R.; Keenan, T.; Li, T.; Trippa, L.; Vaz-Luis, I.; Wulf, G.; Spring, L.; Sinclair, N.F.; Andrews, C.; et al. Effect of Eribulin with or without Pembrolizumab on Progression-Free Survival for Patients With Hormone Receptor-Positive, ERBB2-Negative Metastatic Breast Cancer: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*, 1598–1605. [[CrossRef](#)]
30. Schmid, P.; Adams, S.; Rugo, H.S.; Schneeweiss, A.; Barrios, C.H.; Iwata, H.; Diéras, V.; Hegg, R.; Im, S.-A.; Shaw Wright, G.; et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2108–2121. [[CrossRef](#)]
31. Miles, D.; Gligorov, J.; André, F.; Cameron, D.; Schneeweiss, A.; Barrios, C.; Xu, B.; Wardley, A.; Kaen, D.; Andrade, L.; et al. Primary Results from IMpassion131, a Double-Blind, Placebo-Controlled, Randomised Phase III Trial of First-Line Paclitaxel with or without Atezolizumab for Unresectable Locally Advanced/Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Ann. Oncol.* **2021**, *32*, 994–1004. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Cortes, J.; Cescon, D.W.; Rugo, H.S.; Nowecki, Z.; Im, S.-A.; Yusof, M.M.; Gallardo, C.; Lipatov, O.; Barrios, C.H.; Holgado, E.; et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy versus Placebo plus Chemotherapy for Previously Untreated Locally Recurrent Inoperable or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer (KEYNOTE-355): A Randomised, Placebo-Controlled, Double-Blind, Phase 3 Clinical Trial. *Lancet* **2020**, *396*, 1817–1828. [[CrossRef](#)]
33. Schmid, P.; Salgado, R.; Park, Y.H.; Muñoz-Couselo, E.; Kim, S.B.; Sohn, J.; Im, S.-A.; Foukakis, T.; Kuemmel, S.; Dent, R.; et al. Pembrolizumab plus Chemotherapy as Neoadjuvant Treatment of High-Risk, Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer: Results from the Phase 1b Open-Label, Multicohort KEYNOTE-173 Study. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 569–581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Nanda, R.; Liu, M.C.; Yau, C.; Shatsky, R.; Pusztai, L.; Wallace, A.; Chien, A.J.; Forero-Torres, A.; Ellis, E.; Han, H.; et al. Effect of Pembrolizumab Plus Neoadjuvant Chemotherapy on Pathologic Complete Response in Women With Early-Stage Breast Cancer: An Analysis of the Ongoing Phase 2 Adaptively Randomized I-SPY2 Trial. *JAMA Oncol.* **2020**, *6*, 676–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Loibl, S.; Untch, M.; Burchardi, N.; Huober, J.; Sinn, B.V.; Blohmer, J.-U.; Grischke, E.-M.; Furlanetto, J.; Tesch, H.; Hanusch, C.; et al. A Randomised Phase II Study Investigating Durvalumab in Addition to an Anthracycline Taxane-Based Neoadjuvant Therapy in Early Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Results and Biomarker Analysis of GeparNuevo Study. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 1279–1288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Loibl, S.; Schneeweiss, A.; Huober, J.B.; Braun, M.; Rey, J.; Blohmer, J.U.; Furlanetto, J.; Zahm, D.M.; Hanusch, C.; Thomalla, J.; et al. Durvalumab Improves Long-Term Outcome in TNBC: Results from the Phase II Randomized GeparNUEVO Study Investigating Neoadjuvant Durvalumab in Addition to an Anthracycline/Taxane Based Neoadjuvant Chemotherapy in Early Triple-Negative Breast Cancer (TNBC). *JCO* **2021**, *39*, 506. [[CrossRef](#)]
37. Mittendorf, E.A.; Zhang, H.; Barrios, C.H.; Saji, S.; Jung, K.H.; Hegg, R.; Koehler, A.; Sohn, J.; Iwata, H.; Telli, M.L.; et al. Neoadjuvant Atezolizumab in Combination with Sequential Nab-Paclitaxel and Anthracycline-Based Chemotherapy versus Placebo and Chemotherapy in Patients with Early-Stage Triple-Negative Breast Cancer (IMpassion031): A Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial. *Lancet* **2020**, *396*, 1090–1100. [[CrossRef](#)]
38. Schmid, P.; Cortes, J.; Pusztai, L.; McArthur, H.; Kümmel, S.; Bergh, J.; Denkert, C.; Park, Y.H.; Hui, R.; Harbeck, N.; et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *382*, 810–821. [[CrossRef](#)]
39. Gianni, L.; Huang, C.-S.; Egle, D.; Bermejo, B.; Zamagni, C.; Thill, M.; Anton, A.; Zambelli, S.; Bianchini, G.; Russo, S.; et al. Abstract GS3-04: Pathologic Complete Response (PCR) to Neoadjuvant Treatment with or without Atezolizumab in Triple Negative, Early High-Risk and Locally Advanced Breast Cancer. NeoTRIPaPDL1 Michelangelo Randomized Study. *Cancer Res.* **2020**, *80*, GS3-04.
40. Lüönd, F.; Tiede, S.; Christofori, G. Breast Cancer as an Example of Tumour Heterogeneity and Tumour Cell Plasticity during Malignant Progression. *Br. J. Cancer* **2021**, 1–12. [[CrossRef](#)]
41. Salemme, V.; Centonze, G.; Cavallo, F.; Defilippi, P.; Conti, L. The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 289. [[CrossRef](#)]
42. Karn, T.; Jiang, T.; Hatzis, C.; Sängler, N.; El-Balat, A.; Rody, A.; Holtrich, U.; Becker, S.; Bianchini, G.; Pusztai, L. Association Between Genomic Metrics and Immune Infiltration in Triple-Negative Breast Cancer. *JAMA Oncol.* **2017**, *3*, 1707–1711. [[CrossRef](#)]
43. Szekely, B.; Bossuyt, V.; Li, X.; Wali, V.B.; Patwardhan, G.A.; Frederick, C.; Silber, A.; Park, T.; Harigopal, M.; Pelekanou, V.; et al. Immunological Differences between Primary and Metastatic Breast Cancer. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, 2232–2239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hodge, J.W.; Garnett, C.T.; Farsaci, B.; Palena, C.; Tsang, K.-Y.; Ferrone, S.; Gameiro, S.R. Chemotherapy-Induced Immunogenic Modulation of Tumor Cells Enhances Killing by Cytotoxic T Lymphocytes and Is Distinct from Immunogenic Cell Death. *Int. J. Cancer* **2013**, *133*, 624–636. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Voorwerk, L.; Slagter, M.; Horlings, H.M.; Sikorska, K.; van de Vijver, K.K.; de Maaker, M.; Nederlof, I.; Kluin, R.J.C.; Warren, S.; Ong, S.; et al. Immune Induction Strategies in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer to Enhance the Sensitivity to PD-1 Blockade: The TONIC Trial. *Nat. Med.* **2019**, *25*, 920–928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Bonaventura, P.; Shekarian, T.; Alcazer, V.; Valladeau-Guilemond, J.; Valsesia-Wittmann, S.; Amigorena, S.; Caux, C.; Depil, S. Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 168. [[CrossRef](#)]
47. Esteva, F.J.; Hubbard-Lucey, V.M.; Tang, J.; Pusztai, L. Immunotherapy and Targeted Therapy Combinations in Metastatic Breast Cancer. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, e175–e186. [[CrossRef](#)]
48. Duan, Q.; Zhang, H.; Zheng, J.; Zhang, L. Turning Cold into Hot: Firing up the Tumor Microenvironment. *Trends Cancer* **2020**, *6*, 605–618. [[CrossRef](#)]
49. Hegde, P.S.; Chen, D.S. Top 10 Challenges in Cancer Immunotherapy. *Immunity* **2020**, *52*, 17–35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Barroso-Sousa, R.; Jain, E.; Cohen, O.; Kim, D.; Buendia-Buendia, J.; Winer, E.; Lin, N.; Tolaney, S.M.; Wagle, N. Prevalence and Mutational Determinants of High Tumor Mutation Burden in Breast Cancer. *Ann. Oncol.* **2020**, *31*, 387–394. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Shin, D.S.; Zaretsky, J.M.; Escuin-Ordinas, H.; Garcia-Diaz, A.; Hu-Lieskovan, S.; Kalbasi, A.; Grasso, C.S.; Hugo, W.; Sandoval, S.; Torrejon, D.Y.; et al. Primary Resistance to PD-1 Blockade Mediated by JAK1/2 Mutations. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 188–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kim, J.Y.; Kronbichler, A.; Eisenhut, M.; Hong, S.H.; van der Vliet, H.J.; Kang, J.; Shin, J.I.; Gamerith, G. Tumor Mutational Burden and Efficacy of Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Cancers* **2019**, *11*, 1798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

53. Gettinger, S.; Choi, J.; Hastings, K.; Truini, A.; Datar, I.; Sowell, R.; Wurtz, A.; Dong, W.; Cai, G.; Melnick, M.A.; et al. Impaired HLA Class I Antigen Processing and Presentation as a Mechanism of Acquired Resistance to Immune Checkpoint Inhibitors in Lung Cancer. *Cancer Discov.* **2017**, *7*, 1420–1435. [[CrossRef](#)]
54. Chowell, D.; Morris, L.G.T.; Grigg, C.M.; Weber, J.K.; Samstein, R.M.; Makarov, V.; Kuo, F.; Kendall, S.M.; Requena, D.; Riaz, N.; et al. Patient HLA Class I Genotype Influences Cancer Response to Checkpoint Blockade Immunotherapy. *Science* **2018**, *359*, 582–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. De kruijf, E.; van Nes, J.; Sajet, A.; Tummers, Q.; Putter, H.; Osanto, S.; Speetjens, F.; Smit, V.; Liefers, G.-J.; Velde, C.; et al. The Predictive Value of HLA Class I Tumor Cell Expression and Presence of Intratumoral Tregs for Chemotherapy in Patients with Early Breast Cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2010**, *16*, 1272–1280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Chen, D.S.; Mellman, I. Elements of Cancer Immunity and the Cancer-Immune Set Point. *Nature* **2017**, *541*, 321–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Sade-Feldman, M.; Jiao, Y.J.; Chen, J.H.; Rooney, M.S.; Barzily-Rokni, M.; Eliane, J.-P.; Bjorgaard, S.L.; Hammond, M.R.; Vitzthum, H.; Blackmon, S.M.; et al. Resistance to Checkpoint Blockade Therapy through Inactivation of Antigen Presentation. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1136. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Cristescu, R.; Mogg, R.; Ayers, M.; Albright, A.; Murphy, E.; Yearley, J.; Sher, X.; Liu, X.Q.; Lu, H.; Nebozhyn, M.; et al. Pan-Tumor Genomic Biomarkers for PD-1 Checkpoint Blockade-Based Immunotherapy. *Science* **2018**, *362*, eaar3593. [[CrossRef](#)]
59. Galluzzi, L.; Buqué, A.; Kepp, O.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Immunogenic Cell Death in Cancer and Infectious Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2017**, *17*, 97–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Ding, L.; Kim, H.-J.; Wang, Q.; Kearns, M.; Jiang, T.; Ohlson, C.E.; Li, B.B.; Xie, S.; Liu, J.F.; Stover, E.H.; et al. PARP Inhibition Elicits STING-Dependent Antitumor Immunity in Brca1-Deficient Ovarian Cancer. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 2972–2980.e5. [[CrossRef](#)]
61. Pantelidou, C.; Sonzogni, O.; De Oliveria Taveira, M.; Mehta, A.K.; Kothari, A.; Wang, D.; Visal, T.; Li, M.K.; Pinto, J.; Castrillon, J.A.; et al. PARP Inhibitor Efficacy Depends on CD8+ T-Cell Recruitment via Intratumoral STING Pathway Activation in BRCA-Deficient Models of Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 722–737. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Wen, W.X.; Leong, C.-O. Association of BRCA1- and BRCA2-Deficiency with Mutation Burden, Expression of PD-L1/PD-1, Immune Infiltrates, and T Cell-Inflamed Signature in Breast Cancer. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0215381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Jiao, S.; Xia, W.; Yamaguchi, H.; Wei, Y.; Chen, M.-K.; Hsu, J.-M.; Hsu, J.L.; Yu, W.-H.; Du, Y.; Lee, H.-H.; et al. PARP Inhibitor Upregulates PD-L1 Expression and Enhances Cancer-Associated Immunosuppression. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 3711–3720. [[CrossRef](#)]
64. Sato, H.; Niimi, A.; Yasuhara, T.; Permata, T.B.M.; Hagiwara, Y.; Isono, M.; Nuryadi, E.; Sekine, R.; Oike, T.; Kakoti, S.; et al. DNA Double-Strand Break Repair Pathway Regulates PD-L1 Expression in Cancer Cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)]
65. Sen, T.; Rodriguez, B.L.; Chen, L.; Corte, C.M.D.; Morikawa, N.; Fujimoto, J.; Cristea, S.; Nguyen, T.; Diao, L.; Li, L.; et al. Targeting DNA Damage Response Promotes Antitumor Immunity through STING-Mediated T-Cell Activation in Small Cell Lung Cancer. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 646–661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Domchek, S.M.; Postel-Vinay, S.; Im, S.-A.; Park, Y.H.; Delord, J.-P.; Italiano, A.; Alexandre, J.; You, B.; Bastian, S.; Krebs, M.G.; et al. Olaparib and Durvalumab in Patients with Germline BRCA-Mutated Metastatic Breast Cancer (MEDIOLA): An Open-Label, Multicentre, Phase 1/2, Basket Study. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 1155–1164. [[CrossRef](#)]
67. Vinayak, S.; Tolaney, S.M.; Schwartzberg, L.S.; Mita, M.M.; McCann, G.A.-L.; Tan, A.R.; Wahner Hendrickson, A.E.; Forero-Torres, A.; Anders, C.K.; Wulf, G.M.; et al. TOPACIO/Keynote-162: Niraparib + Pembrolizumab in Patients (Pts) with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer (TNBC), a Phase 2 Trial. *JCO* **2018**, *36*, 1011. [[CrossRef](#)]
68. Hu-Lieskovan, S.; Mok, S.; Moreno, B.H.; Tsoi, J.; Faja, L.R.; Goedert, L.; Pinheiro, E.M.; Koya, R.C.; Graeber, T.; Comin-Anduix, B.; et al. Improved Antitumor Activity of Immunotherapy with BRAF and MEK Inhibitors in BRAFV600E Melanoma. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 279ra41. [[CrossRef](#)]
69. Ebert, P.J.R.; Cheung, J.; Yang, Y.; McNamara, E.; Hong, R.; Moskalenko, M.; Gould, S.E.; Maecker, H.; Irving, B.A.; Kim, J.M.; et al. MAP Kinase Inhibition Promotes T Cell and Anti-Tumor Activity in Combination with PD-L1 Checkpoint Blockade. *Immunity* **2016**, *44*, 609–621. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Loi, S.; Dushyanthen, S.; Beavis, P.A.; Salgado, R.; Denkert, C.; Savas, P.; Combs, S.; Rimm, D.L.; Giltnane, J.M.; Estrada, M.V.; et al. RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 1499–1509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Franklin, D.A.; James, J.L.; Axelrod, M.L.; Balko, J.M. MEK Inhibition Activates STAT Signaling to Increase Breast Cancer Immunogenicity via MHC-I Expression. *Cancer Drug Resist.* **2020**, *3*, 603–612. [[CrossRef](#)]
72. Brufsky, A.; Kim, S.B.; Zvirbulė, Ž.; Eniu, A.; Mebis, J.; Sohn, J.H.; Wongchenko, M.; Chohan, S.; Amin, R.; Yan, Y.; et al. A Phase II Randomized Trial of Cobimetinib plus Chemotherapy, with or without Atezolizumab, as First-Line Treatment for Patients with Locally Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer (COLET): Primary Analysis. *Ann. Oncol.* **2021**, *32*, 652–660. [[CrossRef](#)]
73. Dushyanthen, S.; Teo, Z.L.; Caramia, F.; Savas, P.; Mintoff, C.P.; Virassamy, B.; Henderson, M.A.; Luen, S.J.; Mansour, M.; Kershaw, M.H.; et al. Agonist Immunotherapy Restores T Cell Function Following MEK Inhibition Improving Efficacy in Breast Cancer. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 606. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

74. Schmid, P.; Forster, M.D.; Summers, Y.J.; Good, J.; Sarker, S.-J.; Lim, L.; Mousa, K.; Middleton, G.W. A Study of Vistusertib in Combination with Selumetinib in Patients with Advanced Cancers: TORCMEK Phase Ib Results. *JCO* **2017**, *35*, 2548. [[CrossRef](#)]
75. Li, J.; Huo, X.; Zhao, F.; Ren, D.; Ahmad, R.; Yuan, X.; Du, F.; Zhao, J. Association of Cyclin-Dependent Kinases 4 and 6 Inhibitors With Survival in Patients With Hormone Receptor-Positive Metastatic Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *JAMA Netw. Open* **2020**, *3*, e2020312. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Goel, S.; DeCristo, M.J.; Watt, A.C.; BrinJones, H.; Sceneay, J.; Li, B.B.; Khan, N.; Ubellacker, J.M.; Xie, S.; Metzger-Filho, O.; et al. CDK4/6 Inhibition Triggers Anti-Tumour Immunity. *Nature* **2017**, *548*, 471–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Deng, J.; Wang, E.S.; Jenkins, R.W.; Li, S.; Dries, R.; Yates, K.; Chhabra, S.; Huang, W.; Liu, H.; Aref, A.R.; et al. CDK4/6 Inhibition Augments Antitumor Immunity by Enhancing T-Cell Activation. *Cancer Discov.* **2018**, *8*, 216–233. [[CrossRef](#)]
78. Lai, A.Y.; Sorrentino, J.A.; Dragnev, K.H.; Weiss, J.M.; Owonikoko, T.K.; Rytlewski, J.A.; Hood, J.; Yang, Z.; Malik, R.K.; Strum, J.C.; et al. CDK4/6 Inhibition Enhances Antitumor Efficacy of Chemotherapy and Immune Checkpoint Inhibitor Combinations in Preclinical Models and Enhances T-Cell Activation in Patients with SCLC Receiving Chemotherapy. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, e000847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Rugo, H.S.; Kabos, P.; Beck, J.T.; Chisamore, M.J.; Hossain, A.; Chen, Y.; Tolaney, S.M. A Phase Ib Study of Abemaciclib in Combination with Pembrolizumab for Patients with Hormone Receptor Positive (HR+), Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Negative (HER2-) Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer (MBC) (NCT02779751): Interim Results. *JCO* **2020**, *38*, 1051. [[CrossRef](#)]
80. Meric-Bernstam, F.; Larkin, J.; Tabernero, J.; Bonini, C. Enhancing Anti-Tumour Efficacy with Immunotherapy Combinations. *Int. J. STD AIDS* **2021**, *397*, 1010–1022. [[CrossRef](#)]
81. Chikuma, S. CTLA-4, an Essential Immune-Checkpoint for T-Cell Activation. *Curr Top. Microbiol. Immunol.* **2017**, *410*, 99–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Rotte, A. Combination of CTLA-4 and PD-1 Blockers for Treatment of Cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Santa-Maria, C.A.; Kato, T.; Park, J.-H.; Kiyotani, K.; Rademaker, A.; Shah, A.N.; Gross, L.; Blanco, L.Z.; Jain, S.; Flaum, L.; et al. A Pilot Study of Durvalumab and Tremelimumab and Immunogenomic Dynamics in Metastatic Breast Cancer. *Oncotarget* **2018**, *9*, 18985–18996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Dahlén, E.; Veitonmäki, N.; Norlén, P. Bispecific Antibodies in Cancer Immunotherapy. *Adv. Vaccines Immunother.* **2018**, *6*, 3–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Gennari, R.; Menard, S.; Fagnoni, F.; Ponchio, L.; Scelsi, M.; Tagliabue, E.; Castiglioni, F.; Villani, L.; Magalotti, C.; Gibelli, N.; et al. Pilot Study of the Mechanism of Action of Preoperative Trastuzumab in Patients with Primary Operable Breast Tumors Overexpressing HER2. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 5650–5655. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Arnould, L.; Gelly, M.; Penault-Llorca, F.; Benoit, L.; Bonnetain, F.; Migeon, C.; Cabaret, V.; Fermeaux, V.; Bertheau, P.; Garnier, J.; et al. Trastuzumab-Based Treatment of HER2-Positive Breast Cancer: An Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Mechanism? *Br. J. Cancer* **2006**, *94*, 259–267. [[CrossRef](#)]
87. Holgado, E.; Perez-Garcia, J.; Gion, M.; Cortes, J. Is There a Role for Immunotherapy in HER2-Positive Breast Cancer? *NPJ Breast Cancer* **2018**, *4*, 21. [[CrossRef](#)]
88. Müller, P.; Kreuzaler, M.; Khan, T.; Thommen, D.S.; Martin, K.; Glatz, K.; Savic, S.; Harbeck, N.; Nitz, U.; Gluz, O.; et al. Trastuzumab Emtansine (T-DM1) Renders HER2+ Breast Cancer Highly Susceptible to CTLA-4/PD-1 Blockade. *Sci. Transl. Med.* **2015**, *7*, 315ra188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Stagg, J.; Loi, S.; Divisekera, U.; Ngiow, S.F.; Duret, H.; Yagita, H.; Teng, M.W.; Smyth, M.J. Anti-ErbB-2 MAb Therapy Requires Type I and II Interferons and Synergizes with Anti-PD-1 or Anti-CD137 MAb Therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 7142–7147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Loi, S.; Giobbie-Hurder, A.; Gombos, A.; Bachelot, T.; Hui, R.; Curigliano, G.; Campone, M.; Biganzoli, L.; Bonnefoi, H.; Jerusalem, G.; et al. Pembrolizumab plus Trastuzumab in Trastuzumab-Resistant, Advanced, HER2-Positive Breast Cancer (PANACEA): A Single-Arm, Multicentre, Phase 1b–2 Trial. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 371–382. [[CrossRef](#)]
91. Emens, L.A.; Esteva, F.J.; Beresford, M.; Saura, C.; De Laurentiis, M.; Kim, S.-B.; Im, S.-A.; Wang, Y.; Salgado, R.; Mani, A.; et al. Trastuzumab Emtansine plus Atezolizumab versus Trastuzumab Emtansine plus Placebo in Previously Treated, HER2-Positive Advanced Breast Cancer (KATE2): A Phase 2, Multicentre, Randomised, Double-Blind Trial. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 1283–1295. [[CrossRef](#)]
92. Casares, N.; Pequignot, M.O.; Tesniere, A.; Ghiringhelli, F.; Roux, S.; Chaput, N.; Schmitt, E.; Hamai, A.; Hervas-Stubbs, S.; Obeid, M.; et al. Caspase-Dependent Immunogenicity of Doxorubicin-Induced Tumor Cell Death. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 1691–1701. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Apetoh, L.; Mignot, G.; Panaretakis, T.; Kroemer, G.; Zitvogel, L. Immunogenicity of Anthracyclines: Moving towards More Personalized Medicine. *Trends Mol. Med.* **2008**, *14*, 141–151. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Aoto, K.; Mimura, K.; Okayama, H.; Saito, M.; Chida, S.; Noda, M.; Nakajima, T.; Saito, K.; Abe, N.; Ohki, S.; et al. Immunogenic Tumor Cell Death Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer and Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Oncol. Rep.* **2018**, *39*, 151–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

95. Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Tesniere, A.; Obeid, M.; Ortiz, C.; Criollo, A.; Mignot, G.; Maiuri, M.C.; Ullrich, E.; Saulnier, P.; et al. Toll-like Receptor 4-Dependent Contribution of the Immune System to Anticancer Chemotherapy and Radiotherapy. *Nat. Med.* **2007**, *13*, 1050–1059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Ladoire, S.; Enot, D.; Senovilla, L.; Ghiringhelli, F.; Poirier-Colame, V.; Chaba, K.; Semeraro, M.; Chaix, M.; Penault-Llorca, F.; Arnould, L.; et al. The Presence of LC3B Puncta and HMGB1 Expression in Malignant Cells Correlate with the Immune Infiltrate in Breast Cancer. *Autophagy* **2016**, *12*, 864–875. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. D’Amico, L.; Menzel, U.; Prummer, M.; Müller, P.; Buchi, M.; Kashyap, A.; Haessler, U.; Yermanos, A.; Gébleux, R.; Briendl, M.; et al. A Novel Anti-HER2 Anthracycline-Based Antibody-Drug Conjugate Induces Adaptive Anti-Tumor Immunity and Potentiates PD-1 Blockade in Breast Cancer. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Gebremeskel, S.; Lobert, L.; Tanner, K.; Walker, B.; Oliphant, T.; Clarke, L.E.; Dellaire, G.; Johnston, B. Natural Killer T-Cell Immunotherapy in Combination with Chemotherapy-Induced Immunogenic Cell Death Targets Metastatic Breast Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 1086–1097. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Sistigu, A.; Yamazaki, T.; Vacchelli, E.; Chaba, K.; Enot, D.P.; Adam, J.; Vitale, I.; Goubar, A.; Baracco, E.E.; Remédios, C.; et al. Cancer Cell-Autonomous Contribution of Type I Interferon Signaling to the Efficacy of Chemotherapy. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1301–1309. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Litchfield, K.; Reading, J.L.; Puttick, C.; Thakkar, K.; Abbosh, C.; Bentham, R.; Watkins, T.B.K.; Rosenthal, R.; Biswas, D.; Rowan, A.; et al. Meta-Analysis of Tumor- and T Cell-Intrinsic Mechanisms of Sensitization to Checkpoint Inhibition. *Cell* **2021**, *184*, 596–614.e14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Ludgate, C.M. Optimizing Cancer Treatments to Induce an Acute Immune Response: Radiation Abscopal Effects, PAMPs, and DAMPs. *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 4522–4525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Twyman-Saint Victor, C.; Rech, A.J.; Maity, A.; Rengan, R.; Pauken, K.E.; Stelekati, E.; Benci, J.L.; Xu, B.; Dada, H.; Odorizzi, P.M.; et al. Radiation and Dual Checkpoint Blockade Activate Non-Redundant Immune Mechanisms in Cancer. *Nature* **2015**, *520*, 373–377. [[CrossRef](#)]
103. Dovedi, S.J.; Adlard, A.L.; Lipowska-Bhalla, G.; McKenna, C.; Jones, S.; Cheadle, E.J.; Stratford, I.J.; Poon, E.; Morrow, M.; Stewart, R.; et al. Acquired Resistance to Fractionated Radiotherapy Can Be Overcome by Concurrent PD-L1 Blockade. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 5458–5468. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Antonia, S.J.; Villegas, A.; Daniel, D.; Vicente, D.; Murakami, S.; Hui, R.; Yokoi, T.; Chiappori, A.; Lee, K.H.; de Wit, M.; et al. Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *377*, 1919–1929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Cao, K.; Abbassi, L.; Romano, E.; Kirova, Y. Radiation Therapy and Immunotherapy in Breast Cancer Treatment: Preliminary Data and Perspectives. *Expert Rev. Anticancer* **2021**, *21*, 501–510. [[CrossRef](#)]
106. Ho, A.Y.; Barker, C.A.; Arnold, B.B.; Powell, S.N.; Hu, Z.I.; Gucalp, A.; Lebron-Zapata, L.; Wen, H.Y.; Kallman, C.; D’Agnolo, A.; et al. A Phase 2 Clinical Trial assessing the efficacy and Safety of Pembrolizumab and Radiotherapy in Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer* **2020**, *126*, 850–860. [[CrossRef](#)]
107. Hu, Z.I.; McArthur, H.L.; Ho, A.Y. The Abscopal Effect of Radiation Therapy: What Is It and How Can We Use It in Breast Cancer? *Curr. Breast Cancer Rep.* **2017**, *9*, 45–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Crocenzi, T.; Cottam, B.; Newell, P.; Wolf, R.F.; Hansen, P.D.; Hammill, C.; Solhjem, M.C.; To, Y.-Y.; Greathouse, A.; Tormoen, G.; et al. A Hypofractionated Radiation Regimen Avoids the Lymphopenia Associated with Neoadjuvant Chemoradiation Therapy of Borderline Resectable and Locally Advanced Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Immunother. Cancer* **2016**, *4*, 45. [[CrossRef](#)]
109. Morisada, M.; Clavijo, P.E.; Moore, E.; Sun, L.; Chamberlin, M.; Van Waes, C.; Hodge, J.W.; Mitchell, J.B.; Friedman, J.; Allen, C.T. PD-1 Blockade Reverses Adaptive Immune Resistance Induced by High-Dose Hypofractionated but Not Low-Dose Daily Fractionated Radiation. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1395996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Demaria, S.; Coleman, C.N.; Formenti, S.C. Radiotherapy: Changing the Game in Immunotherapy. *Trends Cancer* **2016**, *2*, 286–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
111. Corrales, L.; Gajewski, T.F. Molecular Pathways: Targeting the Stimulator of Interferon Genes (STING) in the Immunotherapy of Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2015**, *21*, 4774–4779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Cheng, N.; Watkins-Schulz, R.; Junkins, R.D.; David, C.N.; Johnson, B.M.; Montgomery, S.A.; Peine, K.J.; Darr, D.B.; Yuan, H.; McKinnon, K.P.; et al. A Nanoparticle-Incorporated STING Activator Enhances Antitumor Immunity in PD-L1-Insensitive Models of Triple-Negative Breast Cancer. *JCI Insight* **2018**, *3*, 120638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Corrales, L.; Glickman, L.H.; McWhirter, S.M.; Kanne, D.B.; Sivick, K.E.; Katibah, G.E.; Woo, S.-R.; Lemmens, E.; Banda, T.; Leong, J.J.; et al. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep.* **2015**, *11*, 1018–1030. [[CrossRef](#)]
114. Wang, H.; Hu, S.; Chen, X.; Shi, H.; Chen, C.; Sun, L.; Chen, Z.J. CGAS Is Essential for the Antitumor Effect of Immune Checkpoint Blockade. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 1637–1642. [[CrossRef](#)]
115. Pantelidou, C.; Jadhav, H.; Kothari, A.; Liu, R.; Guerriero, J.L.; Shapiro, G.I. STING Agonism Enhances Anti-Tumor Immune Responses and Therapeutic Efficacy of PARP Inhibition in BRCA-Associated Breast Cancer. *bioRxiv* **2021**. [[CrossRef](#)]
116. Ghiringhelli, F.; Larmonier, N.; Schmitt, E.; Parcellier, A.; Cathelin, D.; Garrido, C.; Chauffert, B.; Solary, E.; Bonnotte, B.; Martin, F. CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Tumor Immunity but Are Sensitive to Cyclophosphamide Which Allows Immunotherapy of Established Tumors to Be Curative. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 336–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

117. Vincent, J.; Mignot, G.; Chalmin, F.; Ladoire, S.; Bruchard, M.; Chevriaux, A.; Martin, F.; Apetoh, L.; Rébé, C.; Ghiringhelli, F. 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 3052–3061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Khan, K.A.; Ponce de León, J.L.; Benguigui, M.; Xu, P.; Chow, A.; Cruz-Muñoz, W.; Man, S.; Shaked, Y.; Kerbel, R.S. Immunostimulatory and Anti-Tumor Metronomic Cyclophosphamide Regimens Assessed in Primary Orthotopic and Metastatic Murine Breast Cancer. *NPJ Breast Cancer* **2020**, *6*, 1–13. [[CrossRef](#)]
119. Wanderley, C.W.; Colón, D.F.; Luiz, J.P.M.; Oliveira, F.F.; Viacava, P.R.; Leite, C.A.; Pereira, J.A.; Silva, C.M.; Silva, C.R.; Silva, R.L.; et al. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Res.* **2018**, *78*, 5891–5900. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Michels, T.; Shurin, G.V.; Naiditch, H.; Sevko, A.; Umansky, V.; Shurin, M.R. Paclitaxel Promotes Differentiation of Myeloid-Derived Suppressor Cells into Dendritic Cells in Vitro in a TLR4-Independent Manner. *J. Immunotoxicol.* **2012**, *9*, 292–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
121. Munn, D.H. Indoleamine 2,3-Dioxygenase, Tregs and Cancer. *Curr. Med. Chem.* **2011**, *18*, 2240–2246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
122. Soliman, H.H.; Jackson, E.; Neuger, T.; Dees, E.C.; Harvey, R.D.; Han, H.; Ismail-Khan, R.; Minton, S.; Vahanian, N.N.; Link, C.; et al. A First in Man Phase I Trial of the Oral Immunomodulator, Indoximod, Combined with Docetaxel in Patients with Metastatic Solid Tumors. *Oncotarget* **2014**, *5*, 8136–8146. [[CrossRef](#)]
123. Mitchell, T.C.; Hamid, O.; Smith, D.C.; Bauer, T.M.; Wasser, J.S.; Olszanski, A.J.; Luke, J.J.; Balmanoukian, A.S.; Schmidt, E.V.; Zhao, Y.; et al. Epcadostat Plus Pembrolizumab in Patients With Advanced Solid Tumors: Phase I Results From a Multicenter, Open-Label Phase I/II Trial (ECHO-202/KEYNOTE-037). *JCO* **2018**, *36*, 3223–3230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Beavis, P.A.; Stagg, J.; Darcy, P.K.; Smyth, M.J. CD73: A Potent Suppressor of Antitumor Immune Responses. *Trends Immunol.* **2012**, *33*, 231–237. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Beavis, P.A.; Divisekera, U.; Paget, C.; Chow, M.T.; John, L.B.; Devaud, C.; Dwyer, K.; Stagg, J.; Smyth, M.J.; Darcy, P.K. Blockade of A2A Receptors Potently Suppresses the Metastasis of CD73+ Tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 14711–14716. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
126. Loi, S.; Pommey, S.; Haibe-Kains, B.; Beavis, P.A.; Darcy, P.K.; Smyth, M.J.; Stagg, J. CD73 Promotes Anthracycline Resistance and Poor Prognosis in Triple Negative Breast Cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 11091–11096. [[CrossRef](#)]
127. Mittal, D.; Young, A.; Stannard, K.; Yong, M.; Teng, M.W.L.; Allard, B.; Stagg, J.; Smyth, M.J. Antimetastatic Effects of Blocking PD-1 and the Adenosine A2A Receptor. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 3652–3658. [[CrossRef](#)]
128. Peng, W.; Chen, J.Q.; Liu, C.; Malu, S.; Creasy, C.; Tetzlaff, M.T.; Xu, C.; McKenzie, J.A.; Zhang, C.; Liang, X.; et al. Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 202–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Lastwika, K.J.; Wilson, W.; Li, Q.K.; Norris, J.; Xu, H.; Ghazarian, S.R.; Kitagawa, H.; Kawabata, S.; Taube, J.M.; Yao, S.; et al. Control of PD-L1 Expression by Oncogenic Activation of the AKT-MTOR Pathway in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 227–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
130. Abu-Eid, R.; Samara, R.N.; Ozgun, L.; Abdalla, M.Y.; Berzofsky, J.A.; Friedman, K.M.; Mkrtychyan, M.; Khleif, S.N. Selective Inhibition of Regulatory T Cells by Targeting the PI3K–Akt Pathway. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 1080–1089. [[CrossRef](#)]
131. Kaneda, M.M.; Messer, K.S.; Ralainirina, N.; Li, H.; Leem, C.J.; Gorjestani, S.; Woo, G.; Nguyen, A.V.; Figueiredo, C.C.; Foubert, P.; et al. PI3K $\gamma$  Is a Molecular Switch That Controls Immune Suppression. *Nature* **2016**, *539*, 437–442. [[CrossRef](#)]
132. Chiappinelli, K.B.; Strissel, P.L.; Desrichard, A.; Li, H.; Henke, C.; Akman, B.; Hein, A.; Rote, N.S.; Cope, L.M.; Snyder, A.; et al. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via DsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell* **2015**, *162*, 974–986. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Peng, D.; Kryczek, I.; Nagarsheth, N.; Zhao, L.; Wei, S.; Wang, W.; Sun, Y.; Zhao, E.; Vatan, L.; Szeliga, W.; et al. Epigenetic Silencing of TH1-Type Chemokines Shapes Tumour Immunity and Immunotherapy. *Nature* **2015**, *527*, 249–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Kim, K.; Skora, A.D.; Li, Z.; Liu, Q.; Tam, A.J.; Blosser, R.L.; Diaz, L.A.; Papadopoulos, N.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.; et al. Eradication of Metastatic Mouse Cancers Resistant to Immune Checkpoint Blockade by Suppression of Myeloid-Derived Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 11774–11779. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Gameiro, S.R.; Malamas, A.S.; Tsang, K.Y.; Ferrone, S.; Hodge, J.W. Inhibitors of Histone Deacetylase 1 Reverse the Immune Evasion Phenotype to Enhance T-Cell Mediated Lysis of Prostate and Breast Carcinoma Cells. *Oncotarget* **2016**, *7*, 7390–7402. [[CrossRef](#)]
136. Tomita, Y.; Lee, M.-J.; Lee, S.; Tomita, S.; Chumsri, S.; Cruickshank, S.; Ordentlich, P.; Trepel, J.B. The Interplay of Epigenetic Therapy and Immunity in Locally Recurrent or Metastatic Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer: Correlative Analysis of ENCORE 301, a Randomized, Placebo-Controlled Phase II Trial of Exemestane with or without Entinostat. *Oncoimmunology* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Forero, A.; Stroyakovskiy, D.; Cha, E.; Cruickshank, S.; Hasapidis, J.; Meyers, M.L.; Slamon, D.J. Abstract OT2-01-12: ENCORE 602: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind, Multicenter Phase 2 Study (with a Phase 1b Lead-in) of Atezolizumab with or without Entinostat in Patients with Advanced Triple Negative Breast Cancer (ATNBC). *Cancer Res.* **2017**, *77*, OT2-01-12. [[CrossRef](#)]



138. Schaer, D.A.; Beckmann, R.P.; Dempsey, J.A.; Huber, L.; Forest, A.; Amaladas, N.; Li, Y.; Wang, Y.C.; Rasmussen, E.R.; Chin, D.; et al. The CDK4/6 Inhibitor Abemaciclib Induces a T Cell Inflamed Tumor Microenvironment and Enhances the Efficacy of PD-L1 Checkpoint Blockade. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 2978–2994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Hurvitz, S.; Martin, M.; Abad, M.F.; Chan, D.; Rostorfer, R.; Petru, E.; Barriga, S.; Costigan, T.M.; Caldwell, C.W.; Nguyen, T.; et al. Abstract S4-06: Biological Effects of Abemaciclib in a Phase 2 Neoadjuvant Study for Postmenopausal Patients with HR+, HER2- Breast Cancer. *Cancer Res.* **2017**, *77*, S4-S4-06. [[CrossRef](#)]
140. Page, D.B.; Bear, H.; Prabhakaran, S.; Gatti-Mays, M.E.; Thomas, A.; Cobain, E.; McArthur, H.; Balko, J.M.; Gameiro, S.R.; Nanda, R.; et al. Two May Be Better than One: PD-1/PD-L1 Blockade Combination Approaches in Metastatic Breast Cancer. *NPJ Breast Cancer* **2019**, *5*, 34. [[CrossRef](#)]
141. Das, M.; Law, S. Role of Tumor Microenvironment in Cancer Stem Cell Chemoresistance and Recurrence. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2018**, *103*, 115–124. [[CrossRef](#)]
142. Chen, P.; Hsu, W.-H.; Han, J.; Xia, Y.; DePinho, R.A. Cancer Stemness Meets Immunity: From Mechanism to Therapy. *Cell Rep.* **2021**, *34*, 108597. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Song, K.; Farzaneh, M. Signaling Pathways Governing Breast Cancer Stem Cells Behavior. *Stem Cell Res. Ther.* **2021**, *12*, 245. [[CrossRef](#)]
144. Gong, C.; Song, E.; Codogno, P.; Mehrpour, M. The Roles of BECN1 and Autophagy in Cancer Are Context Dependent. *Autophagy* **2012**, *8*, 1853–1855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Kumar, B.; Ahmad, R.; Sharma, S.; Gowrikumar, S.; Primeaux, M.; Rana, S.; Natarajan, A.; Oupicky, D.; Hopkins, C.R.; Dhawan, P.; et al. PIK3C3 Inhibition Promotes Sensitivity to Colon Cancer Therapy by Inhibiting Cancer Stem Cells. *Cancers* **2021**, *13*, 2168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Cocco, S.; Leone, A.; Piezzo, M.; Caputo, R.; Di Lauro, V.; Di Rella, F.; Fusco, G.; Capozzi, M.; di Gioia, G.; Budillon, A.; et al. Targeting Autophagy in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Janji, B.; Hasmin, M.; Parpal, S.; De Milito, A.; Berchem, G.; Noman, M.Z. Lighting up the Fire in Cold Tumors to Improve Cancer Immunotherapy by Blocking the Activity of the Autophagy-Related Protein PIK3C3/VPS34. *Autophagy* **2020**, *16*, 2110–2111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Thorburn, A.; Towers, C.G. Enhancing Anti-Tumor Immunity by Autophagy Inhibition. *Nat. Cancer* **2021**, *2*, 484–486. [[CrossRef](#)]
149. Bareche, Y.; Buisseret, L.; Gruosso, T.; Girard, E.; Venet, D.; Dupont, F.; Desmedt, C.; Larsimont, D.; Park, M.; Rothé, F.; et al. Unraveling Triple-Negative Breast Cancer Tumor Microenvironment Heterogeneity: Towards an Optimized Treatment Approach. *J. Natl. Cancer Inst.* **2020**, *112*, 708–719. [[CrossRef](#)]
150. Jiang, H.; Hegde, S.; DeNardo, D.G. Tumor-Associated Fibrosis as a Regulator of Tumor Immunity and Response to Immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2017**, *66*, 1037–1048. [[CrossRef](#)]
151. Yang, L.; Pang, Y.; Moses, H.L. TGF- $\beta$  and Immune Cells: An Important Regulatory Axis in the Tumor Microenvironment and Progression. *Trends Immunol.* **2010**, *31*, 220–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
152. Tauriello, D.V.F.; Palomo-Ponce, S.; Stork, D.; Berenguer-Llargo, A.; Badia-Ramentol, J.; Iglesias, M.; Sevillano, M.; Ibiza, S.; Cañellas, A.; Hernando-Mombona, X.; et al. TGF $\beta$  Drives Immune Evasion in Genetically Reconstituted Colon Cancer Metastasis. *Nature* **2018**, *554*, 538–543. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Holmgaard, R.B.; Schaer, D.A.; Li, Y.; Castaneda, S.P.; Murphy, M.Y.; Xu, X.; Inigo, I.; Dobkin, J.; Manro, J.R.; Iversen, P.W.; et al. Targeting the TGF $\beta$  Pathway with Galunisertib, a TGF $\beta$ RI Small Molecule Inhibitor, Promotes Anti-Tumor Immunity Leading to Durable, Complete Responses, as Monotherapy and in Combination with Checkpoint Blockade. *J. Immunother. Cancer* **2018**, *6*, 47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Bholra, N.E.; Balko, J.M.; Dugger, T.C.; Kuba, M.G.; Sánchez, V.; Sanders, M.; Stanford, J.; Cook, R.S.; Arteaga, C.L. TGF- $\beta$  Inhibition Enhances Chemotherapy Action against Triple-Negative Breast Cancer. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 1348–1358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Mariathasan, S.; Turley, S.J.; Nickles, D.; Castiglioni, A.; Yuen, K.; Wang, Y.; Kadel, E.E.; Koepfen, H.; Astarita, J.L.; Cubas, R.; et al. TGF $\beta$  Attenuates Tumour Response to PD-L1 Blockade by Contributing to Exclusion of T Cells. *Nature* **2018**, *554*, 544–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Formenti, S.C.; Lee, P.; Adams, S.; Goldberg, J.D.; Li, X.; Xie, M.W.; Ratican, J.A.; Felix, C.; Hwang, L.; Faull, K.F.; et al. Focal Irradiation And Systemic Transforming Growth Factor  $\beta$  Blockade in Metastatic Breast Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2018**, *24*, 2493–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Lan, Y.; Zhang, D.; Xu, C.; Hance, K.W.; Marelli, B.; Qi, J.; Yu, H.; Qin, G.; Sircar, A.; Hernández, V.M.; et al. Enhanced Preclinical Antitumor Activity of M7824, a Bifunctional Fusion Protein Simultaneously Targeting PD-L1 and TGF- $\beta$ . *Sci. Transl. Med.* **2018**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Lugano, R.; Ramachandran, M.; Dimberg, A. Tumor Angiogenesis: Causes, Consequences, Challenges and Opportunities. *Cell. Mol. Life Sci.* **2020**, *77*, 1745–1770. [[CrossRef](#)]
159. Madu, C.O.; Wang, S.; Madu, C.O.; Lu, Y. Angiogenesis in Breast Cancer Progression, Diagnosis, and Treatment. *J. Cancer* **2020**, *11*, 4474–4494. [[CrossRef](#)]
160. Lee, W.S.; Yang, H.; Chon, H.J.; Kim, C. Combination of Anti-Angiogenic Therapy and Immune Checkpoint Blockade Normalizes Vascular-Immune Crosstalk to Potentiate Cancer Immunity. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 1475–1485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

161. De Aguiar, R.B.; de Moraes, J.Z. Exploring the Immunological Mechanisms Underlying the Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Activity in Tumors. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Schmittnaegel, M.; Rigamonti, N.; Kadioglu, E.; Cassarà, A.; Wyser Rmili, C.; Kiiialainen, A.; Kienast, Y.; Mueller, H.-J.; Ooi, C.-H.; Laoui, D.; et al. Dual Angiopoietin-2 and VEGFA Inhibition Elicits Antitumor Immunity That Is Enhanced by PD-1 Checkpoint Blockade. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaak9670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Yi, M.; Jiao, D.; Qin, S.; Chu, Q.; Wu, K.; Li, A. Synergistic Effect of Immune Checkpoint Blockade and Anti-Angiogenesis in Cancer Treatment. *Mol. Cancer* **2019**, *18*, 60. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Zacharakis, N.; Chinnasamy, H.; Black, M.; Xu, H.; Lu, Y.-C.; Zheng, Z.; Pasetto, A.; Langan, M.; Shelton, T.; Prickett, T.; et al. Immune Recognition of Somatic Mutations Leading to Complete Durable Regression in Metastatic Breast Cancer. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 724–730. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Dees, S.; Ganesan, R.; Singh, S.; Grewal, I.S. Emerging CAR-T Cell Therapy for the Treatment of Triple-Negative Breast Cancer. *Mol. Cancer* **2020**, *19*, 2409–2421. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Han, H.H.; Diab, S.; Alemany, C.; Basho, R.; Brown-Glaberman, U.; Meisel, J.; Pluard, T.; Cortes, J.; Dillon, P.; Ettl, J.; et al. Abstract PD1-06: Open Label Phase 1b/2 Study of Ladiratuzumab Vedotin in Combination with Pembrolizumab for First-Line Treatment of Patients with Unresectable Locally-Advanced or Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Res.* **2020**, *80*, PD1-06.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin.* 2021;71(3):209-49.
2. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell.* 4 mars 2011;144(5):646-74.
3. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* oct 2006;6(10):715-27.
4. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* nov 2002;3(11):991-8.
5. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The Three Es of Cancer Immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 19 mars 2004;22(1):329-60.
6. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science.* 25 mars 2011;331(6024):1565-70.
7. Alhmoud JF, Woolley JF, Al Moustafa A-E, Malki MI. DNA Damage/Repair Management in Cancers. *Cancers [Internet].* 23 avr 2020
8. Nastasi C, Mannarino L, D'Incalci M. DNA Damage Response and Immune Defense. *Int J Mol Sci [Internet].* 12 oct 2020
9. IRF Family of Transcription Factors as Regulators of Host Defense | Annual Review of Immunology [Internet].
10. Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial Sensing by Toll-Like Receptors and Intracellular Nucleic Acid Sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1 janv 2015;7(1):a016246.
11. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* mai 2010;11(5):373-84.
12. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, et al. MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Mol Cell.* 1 août 1998;2(2):253-8.
13. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP Synthase is a Cytosolic DNA Sensor that Activates the Type-I Interferon Pathway. *Science.* 15 févr 2013;339(6121):10.1126/science.1232458.
14. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol.* juin 2013;13(6):397-411.
15. Bai L, Li W, Zheng W, Xu D, Chen N, Cui J. Promising targets based on pattern recognition receptors for cancer immunotherapy. *Pharmacol Res.* 1 sept 2020;159:105017.

16. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol.* déc 2002;2(12):957-65.
17. Vilgelm AE, Richmond A. Chemokines Modulate Immune Surveillance in Tumorigenesis, Metastasis, and Response to Immunotherapy. *Front Immunol*
18. Böttcher JP, Reis e Sousa C. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends Cancer.* nov 2018;4(11):784-92.
19. Finn OJ. *Cancer Immunology* [Internet]. <http://dx.doi.org.proxy.insermbiblio.inist.fr/10.1056/NEJMra072739>. Massachusetts Medical Society; 2009
20. Rooney MS, Shukla SA, Wu CJ, Getz G, Hacohen N. Molecular and Genetic Properties of Tumors Associated with Local Immune Cytolytic Activity. *Cell.* 15 janv 2015;160(1):48-61.
21. Zacharakis N, Chinnasamy H, Black M, Xu H, Lu Y-C, Zheng Z, et al. Immune recognition of somatic mutations leading to complete durable regression in metastatic breast cancer. *Nat Med.* juin 2018;24(6):724-30.
22. Criscitiello C. Tumor-Associated Antigens in Breast Cancer. *Breast Care.* août 2012;7(4):262-6.
23. Loirat D, Diéras V. Immunité et tumeurs du sein HER2+ : impact de l'environnement immunologique et nouvelles approches thérapeutiques. :10.
24. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: A double-edged sword. *Oncogene.* 17 nov 2016;35(46):5931-41.
25. Gattinoni L, Lugli E, Ji Y, Pos Z, Paulos CM, Quigley MF, et al. A human memory T-cell subset with stem cell-like properties. *Nat Med.* 18 sept 2011;17(10):1290-7.
26. Mosser DM, Zhang X. Activation of Murine Macrophages. *Curr Protoc Immunol.* 2008;83(1):14.2.1-14.2.8.
27. Gordon S, Martinez FO. Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity.* 28 mai 2010;32(5):593-604.
28. DeNardo DG, Barreto JB, Andreu P, Vasquez L, Tawfik D, Kolhatkar N, et al. CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell.* 4 août 2009;16(2):91-102.
29. Barron L, Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol.* mai 2011;300(5):G723-8.
30. Desmetz C, Mangé A, Solassol J. Étude de la réaction immunitaire humorale aux cancers par des approches protéomiques. *médecine/sciences.* 1 déc 2008;24(12):1071-6.
31. Di Modugno F, Bronzi G, Scanlan MJ, Del Bello D, Cascioli S, Ventura I, et al. Human mena protein, a serex-defined antigen overexpressed in breast cancer eliciting both humoral and CD8+ T-cell immune response. *Int J Cancer.* 2004;109(6):909-18.

32. Chapman C, Murray A, Chakrabarti J, Thorpe A, Woolston C, Sahin U, et al. Autoantibodies in breast cancer: their use as an aid to early diagnosis. *Ann Oncol*. 1 mai 2007;18(5):868-73.
33. Lowe DB, Shearer MH, Jumper CA, Bright RK, Kennedy RC. Fcγ Receptors Play a Dominant Role in Protective Tumor Immunity against a Virus-Encoded Tumor-Specific Antigen in a Murine Model of Experimental Pulmonary Metastases. *J Virol*. févr 2007;81(3):1313-8.
34. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, et al. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. déc 2007;450(7171):903-7.
35. Wu X, Peng M, Huang B, Zhang H, Wang H, Huang B, et al. Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. *Cancer Lett*. 28 oct 2013;340(1):124-33.
36. So T, Takenoyama M, Mizukami M, Ichiki Y, Sugaya M, Hanagiri T, et al. Haplotype Loss of HLA Class I Antigen as an Escape Mechanism from Immune Attack in Lung Cancer. *Cancer Res*. 1 juill 2005;65(13):5945-52.
37. Atkins D, Breuckmann A, Schmahl GE, Binner P, Ferrone S, Krummenauer F, et al. MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 2004;109(2):265-73.
38. Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICA in malignant diseases. *Int J Cancer*. 2006;118(3):684-7.
39. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. janv 2014;15(1):49-63.
40. Medema JP, Jong J de, Peltenburg LTC, Verdegaal EME, Gorter A, Bres SA, et al. Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 25 sept 2001;98(20):11515-20.
41. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EWT, Chang F, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1 août 2007;1773(8):1263-84.
42. Sadough A, Afshari M, Rostami F, Barzegari S, Janbabaee G, Tabrizi R, et al. A systematic review and meta-analysis on the prevalence of kras gene mutation in samples of colorectal cancer. :19.
43. Moses H, Barcellos-Hoff MH. TGF-β Biology in Mammary Development and Breast Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 janv 2011;3(1):a003277.
44. Wang J, Ye C, Chen C, Xiong H, Xie B, Zhou J, et al. Glucose transporter GLUT1 expression and clinical outcome in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*. 7 févr 2017;8(10):16875-86.
45. de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol [Internet]*. 1 nov 2019

46. Harmon C, Robinson MW, Hand F, Almuaili D, Mentor K, Houlihan DD, et al. Lactate-Mediated Acidification of Tumor Microenvironment Induces Apoptosis of Liver-Resident NK Cells in Colorectal Liver Metastasis. *Cancer Immunol Res.* 1 févr 2019;7(2):335-46.
47. Xie D, Zhu S, Bai L. Lactic acid in tumor microenvironments causes dysfunction of NKT cells by interfering with mTOR signaling. *Sci China Life Sci.* 1 déc 2016;59(12):1290-6.
48. Fischer K, Hoffmann P, Voelkl S, Meidenbauer N, Ammer J, Edinger M, et al. Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells. *Blood.* 1 mai 2007;109(9):3812-9.
49. Colegio OR, Chu N-Q, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature.* 25 sept 2014;513(7519):559-63.
50. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, et al. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med.* sept 2007;13(9):1050-9.
51. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med.* 22 déc 2010;2(63):63ra94.
52. Zhang W, Huang Q, Xiao W, Zhao Y, Pi J, Xu H, et al. Advances in Anti-Tumor Treatments Targeting the CD47/SIRP $\alpha$  Axis. *Front Immunol*
53. Bidwell BN, Slaney CY, Withana NP, Forster S, Cao Y, Loi S, et al. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nat Med.* août 2012;18(8):1224-31.
54. Bi X, Hameed M, Mirani N, Pimenta EM, Anari J, Barnes BJ. Loss of interferon regulatory factor 5 (IRF5) expression in human ductal carcinoma correlates with disease stage and contributes to metastasis. *Breast Cancer Res BCR.* 2011;13(6):R111.
55. Stecca BA, Nardo B, Chieco P, Mazziotti A, Bolondi L, Cavallari A. Aberrant dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) expression in human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 1 août 1997;27(2):337-45.
56. Carbone A, Gloghini A, Zagonel V, Aldinucci D, Gattei V, Degan M, et al. The expression of CD26 and CD40 ligand is mutually exclusive in human T-cell non-Hodgkin's lymphomas/leukemias. *Blood.* 15 déc 1995;86(12):4617-26.
57. Barreira da Silva R, Laird ME, Yatim N, Fiette L, Ingersoll MA, Albert ML. Dipeptidylpeptidase 4 inhibition enhances lymphocyte trafficking, improving both naturally occurring tumor immunity and immunotherapy. *Nat Immunol.* août 2015;16(8):850-8.
58. Mittendorf EA, Philips AV, Meric-Bernstam F, Qiao N, Wu Y, Harrington S, et al. PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Cancer. *Cancer Immunol Res.* avr 2014;2(4):361-70.
59. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol.* déc 2005;6(12):1245-52.
60. Leone RD, Emens LA. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 18 juin 2018;6(1):57.

61. Menetrier-Caux C, Montmain G, Dieu MC, Bain C, Favrot MC, Caux C, et al. Inhibition of the Differentiation of Dendritic Cells From CD34+ Progenitors by Tumor Cells: Role of Interleukin-6 and Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Blood*. 15 déc 1998;92(12):4778-91.
62. Hamidullah, Changkija B, Konwar R. Role of interleukin-10 in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1 mai 2012;133(1):11-21.
63. Thomas DA, Massagué J. TGF- $\beta$  directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell*. 1 nov 2005;8(5):369-80.
64. Yang L, Pang Y, Moses HL. TGF- $\beta$  and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression. *Trends Immunol*. 1 juin 2010;31(6):220-7.
65. Groth C, Hu X, Weber R, Fleming V, Altevogt P, Utikal J, et al. Immunosuppression mediated by myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) during tumour progression. *Br J Cancer*. janv 2019;120(1):16-25.
66. Chalmin F, Ladoire S, Mignot G, Vincent J, Bruchard M, Remy-Martin J-P, et al. Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. *J Clin Invest*. 1 févr 2010;120(2):457-71.
67. Nagaraj S, Youn J-I, Gabrilovich DI. Reciprocal Relationship between Myeloid-Derived Suppressor Cells and T Cells. *J Immunol*. 1 juill 2013;191(1):17-23.
68. Bronte V, Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol*. août 2005;5(8):641-54.
69. Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, et al. Tumor-Infiltrating Monocytic Myeloid-Derived Suppressor Cells Mediate CCR5-Dependent Recruitment of Regulatory T Cells Favoring Tumor Growth. *J Immunol*. 15 déc 2012;189(12):5602-11.
70. Schrijver IT, Théroude C, Roger T. Myeloid-Derived Suppressor Cells in Sepsis. *Front Immunol*. 2019;10:327.
71. Ohue Y, Nishikawa H. Regulatory T (Treg) cells in cancer: Can Treg cells be a new therapeutic target? *Cancer Sci*. 2019;110(7):2080-9.
72. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Exp Med*. 20 juill 1998;188(2):287-96.
73. Togashi Y, Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. juin 2019;16(6):356-71.
74. Quaranta V, Schmid MC. Macrophage-Mediated Subversion of Anti-Tumour Immunity. *Cells*. juill 2019;8(7):747.
75. Mimura K, Kono K, Takahashi A, Kawaguchi Y, Fujii H. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol Immunother*. 1 juin 2007;56(6):761-70.

76. Takahashi A, Kono K, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. Vascular endothelial growth factor inhibits maturation of dendritic cells induced by lipopolysaccharide, but not by proinflammatory cytokines. *Cancer Immunol Immunother.* 1 juin 2004;53(6):543-50.
77. Motz GT, Coukos G. The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales. *Nat Rev Immunol.* oct 2011;11(10):702-11.
78. Vito A, El-Sayes N, Mossman K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells.* avr 2020;9(4):992.
79. Pai SI, Cesano A, Marincola FM. The Paradox of Cancer Immune Exclusion: Immune Oncology Next Frontier. *Cancer Treat Res.* 2020;180:173-95.
80. Salerno EP, Bedognetti D, Mauldin IS, Deacon DH, Shea SM, Pinczewski J, et al. Human melanomas and ovarian cancers overexpressing mechanical barrier molecule genes lack immune signatures and have increased patient mortality risk. *Oncoimmunology* [Internet]. 18 oct 2016
81. Mariathasan S, Turley SJ, Nickles D, Castiglioni A, Yuen K, Wang Y, et al. TGF- $\beta$  attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells. *Nature.* 22 févr 2018;554(7693):544-8.
82. Gunderson AJ, Yamazaki T, McCarty K, Fox N, Phillips M, Alice A, et al. TGF $\beta$  suppresses CD8 + T cell expression of CXCR3 and tumor trafficking. *Nat Commun.* 9 avr 2020;11(1):1-13.
83. Winters S, Martin C, Murphy D, Shokar NK. Chapter One - Breast Cancer Epidemiology, Prevention, and Screening. In: Lakshmanaswamy R, éditeur. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* [Internet]. Academic Press; 2017
84. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer Targets Ther.* 10 avr 2019;11:151-64.
85. Themes UFO. Nongenetic Factors in the Causation of Breast Cancer [Internet]. *Oncohemat Key.* 2016 [cité 12 nov 2020].
86. Couch FJ, Shimelis H, Hu C, Hart SN, Polley EC, Na J, et al. Associations Between Cancer Predisposition Testing Panel Genes and Breast Cancer. *JAMA Oncol.* 1 sept 2017;3(9):1190-6.
87. Tung N, Lin NU, Kidd J, Allen BA, Singh N, Wenstrup RJ, et al. Frequency of Germline Mutations in 25 Cancer Susceptibility Genes in a Sequential Series of Patients With Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 1 mai 2016;34(13):1460-8.
88. Boyle P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann Oncol.* 1 août 2012;23:vi7-12.
89. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin Cancer Res.* 1 août 2007;13(15):4429-34.
90. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, André F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to Neoadjuvant Therapy and Long-Term Survival in Patients With Triple-Negative Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 10 mars 2008;26(8):1275-81.



91. Goetz MP, Gradishar WJ, Anderson BO, Abraham J, Aft R, Allison KH, et al. NCCN Guidelines Insights: Breast Cancer, Version 3.2018: Featured Updates to the NCCN Guidelines. *J Natl Compr Canc Netw*. 1 févr 2019;17(2):118-26.
92. Cosimo SD. Advancing immunotherapy for early-stage triple-negative breast cancer. *The Lancet*. 10 oct 2020;396(10257):1046-8.
93. Cardoso F, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rubio IT, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 1 août 2019;30(8):1194-220.
94. Tutt A, Tovey H, Cheang MCU, Kernaghan S, Kilburn L, Gazinska P, et al. Carboplatin in BRCA1/2-mutated and triple-negative breast cancer BRCAness subgroups: the TNT Trial. *Nat Med*. mai 2018;24(5):628-37.
95. Zhang J, Fan M, Xie J, Wang Z, Wang B, Zhang S, et al. Chemotherapy of metastatic triple negative breast cancer: Experience of using platinum-based chemotherapy. *Oncotarget*. 3 oct 2015;6(40):43135-43.
96. Cortes J, O'Shaughnessy J, Loesch D, Blum JL, Vahdat LT, Petrakova K, et al. Eribulin monotherapy versus treatment of physician's choice in patients with metastatic breast cancer (EMBRACE): a phase 3 open-label randomised study. *The Lancet*. mars 2011;377(9769):914-23.
97. Kaufman PA, Awada A, Twelves C, Yelle L, Perez EA, Velikova G, et al. Phase III Open-Label Randomized Study of Eribulin Mesylate Versus Capecitabine in Patients With Locally Advanced or Metastatic Breast Cancer Previously Treated With an Anthracycline and a Taxane. *J Clin Oncol*. 20 févr 2015;33(6):594-601.
98. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 1 juill 2011;121(7):2750-67.
99. Barroso-Sousa R, Jain E, Cohen O, Kim D, Buendia-Buendia J, Winer E, et al. Prevalence and mutational determinants of high tumor mutation burden in breast cancer. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. mars 2020;31(3):387-94.
100. O'Meara TA, Tolaney SM. Tumor mutational burden as a predictor of immunotherapy response in breast cancer. *Oncotarget*. 2 mars 2021;12(5):394-400.
101. Whitford P, George WD, Campbell AM. Flow cytometric analysis of tumour infiltrating lymphocyte activation and tumour cell MHC Class I and II expression in breast cancer patients. *Cancer Lett*. 10 janv 1992;61(2):157-64.
102. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol*. févr 2015;26(2):259-71.
103. Rakha EA, Aleskandarany M, El-Sayed ME, Blamey RW, Elston CW, Ellis IO, et al. The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. *Eur J Cancer*. 1 juill 2009;45(10):1780-7.
104. Oshi M, Asaoka M, Tokumaru Y, Yan L, Matsuyama R, Ishikawa T, et al. CD8 T Cell Score as a Prognostic Biomarker for Triple Negative Breast Cancer. *Int J Mol Sci [Internet]*. 22 sept 2020

105. Gao G, Wang Z, Qu X, Zhang Z. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with triple-negative breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 4 mars 2020;20(1):179.
106. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Lee AHS, Ellis IO, et al. An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1 mai 2011;127(1):99-108.
107. Mahmoud SMA, Paish EC, Powe DG, Macmillan RD, Grainge MJ, Lee AHS, et al. Tumor-Infiltrating CD8+ Lymphocytes Predict Clinical Outcome in Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 20 mai 2011;29(15):1949-55.
108. West NR, Kost SE, Martin SD, Milne K, deLeeuw RJ, Nelson BH, et al. Tumour-infiltrating FOXP3 + lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer*. janv 2013;108(1):155-62.
109. Denkert C, Minckwitz G von, Darb-Esfahani S, Heppner BI, Klauschen F, Furlanetto J, et al. Abstract S1-09: Evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) as predictive and prognostic biomarker in different subtypes of breast cancer treated with neoadjuvant therapy - A metaanalysis of 3771 patients. *Cancer Res*. 15 févr 2017;77(4 Supplement):S1-09.
110. Vinayak S, Gray RJ, Adams S, Jensen KC, Manola J, Afghahi A, et al. Association of increased tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) with immunomodulatory (IM) triple-negative breast cancer (TNBC) subtype and response to neoadjuvant platinum-based therapy in PreCOG0105. *J Clin Oncol*. 20 mai 2014;32(15\_suppl):1000-1000.
111. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Müller BM, Komor M, et al. Tumor-Associated Lymphocytes As an Independent Predictor of Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *J Clin Oncol*. 1 janv 2010;28(1):105-13.
112. Burstein HJ. Estimating the benefits of therapy for early-stage breast cancer: the St. Gallen International Consensus Guidelines for the primary therapy of early breast cancer 2019. *Ann Oncol*. 2019;30(10):17.
113. Immuno-oncology score predicts response to atezolizumab in TNBC [Internet]. *Daily Reporter*.
114. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. avr 2012;12(4):252-64.
115. Crane CA, Panner A, Murray JC, Wilson SP, Xu H, Chen L, et al. PI(3) kinase is associated with a mechanism of immunoresistance in breast and prostate cancer. *Oncogene*. janv 2009;28(2):306-12.
116. Mandai M, Hamanishi J, Abiko K, Matsumura N, Baba T, Konishi I. Dual Faces of IFN $\gamma$  in Cancer Progression: A Role of PD-L1 Induction in the Determination of Pro- and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res*. 15 mai 2016;22(10):2329-34.
117. Sznol M, Chen L. Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer. *Clin Cancer Res*. 1 mars 2013;19(5):1021-34.
118. Nakanishi J, Wada Y, Matsumoto K, Azuma M, Kikuchi K, Ueda S. Overexpression of B7-H1 (PD-L1) significantly associates with tumor grade and postoperative prognosis in human urothelial cancers. *Cancer Immunol Immunother*. 1 août 2007;56(8):1173-82.

119. Muenst S, Schaerli AR, Gao F, Däster S, Trella E, Droeser RA, et al. Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* juill 2014;146(1):15-24.
120. Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, Harvey K, et al. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Histopathology.* 2016;69(1):25-34.
121. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci Transl Med.* 28 mars 2012;4(127):127ra37.
122. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 Expression on Non-Small Cell Lung Cancer Cells and Its Relationship with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Their PD-1 Expression. *Clin Cancer Res.* 1 août 2004;10(15):5094-100.
123. Sabatier R, Finetti P, Mamessier E, Adelaide J, Chaffanet M, Ali HR, et al. Prognostic and predictive value of PDL1 expression in breast cancer. *Oncotarget.* 31 déc 2014;6(7):5449-64.
124. Carlson RD, Flickinger JC, Snook AE. Talkin' Toxins: From Coley's to Modern Cancer Immunotherapy. *Toxins.* 9 avr 2020;12(4):241.
125. Chow MT, Möller A, Smyth MJ. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin Cancer Biol.* 1 févr 2012;22(1):23-32.
126. Dobosz P, Dzieciatkowski T. The Intriguing History of Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 17 déc 2019;10:2965.
127. Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, et al. Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma [Internet].
128. Bartholeyns J, Bardot V, Chokri M, Romet-Lemonne JL. Immunothérapie adoptive : bilan et perspectives dans le traitement de certains cancers. *Rev Médecine Interne.* 1 oct 2000;21(10):863-71.
129. Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol.* août 2003;3(8):609-20.
130. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med.* déc 1999;5(12):1365-9.
131. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the Pd-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J Exp Med.* 2 oct 2000;192(7):1027-34.
132. Zhao Z, Zheng L, Chen W, Weng W, Song J, Ji J. Delivery strategies of cancer immunotherapy: recent advances and future perspectives. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 28 nov 2019;12(1):126.
133. Bruni D, Angell HK, Galon J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer.* nov 2020;20(11):662-80.

134. Samstein RM, Lee C-H, Shoushtari AN, Hellmann MD, Shen R, Janjigian YY, et al. Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat Genet.* févr 2019;51(2):202-6.
135. Chan TA, Yarchoan M, Jaffee E, Swanton C, Quezada SA, Stenzinger A, et al. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: utility for the oncology clinic. *Ann Oncol.* janv 2019;30(1):44-56.
136. Torrejon DY, Abril-Rodriguez G, Champhekar AS, Tsoi J, Campbell KM, Kalbasi A, et al. Overcoming genetically-based resistance mechanisms to PD-1 blockade. *Cancer Discov.* août 2020;10(8):1140-57.
137. Lin H, Kryczek I, Li S, Green MD, Ali A, Hamasha R, et al. Stanniocalcin 1 is a phagocytosis checkpoint driving tumor immune resistance. *Cancer Cell.* 12 avr 2021;39(4):480-493.e6.
138. Liu Y-T, Sun Z-J. Turning cold tumors into hot tumors by improving T-cell infiltration. *Theranostics.* 11 mars 2021;11(11):5365-86.
139. van der Woude LL, Gorris MAJ, Halilovic A, Figdor CG, de Vries IJM. Migrating into the Tumor: a Roadmap for T Cells. *Trends Cancer.* nov 2017;3(11):797-808.
140. TGF- $\beta$  attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells [Internet].
141. Tzavlaki K, Moustakas A. TGF- $\beta$  Signaling. *Biomolecules.* 23 mars 2020;10(3):487.
142. Clayton SW, Ban GI, Liu C, Serra R. Canonical and noncanonical TGF- $\beta$  signaling regulate fibrous tissue differentiation in the axial skeleton. *Sci Rep.* 7 déc 2020;10(1):21364.
143. Salmon H, Franciszkiewicz K, Damotte D, Dieu-Nosjean M-C, Validire P, Trautmann A, et al. Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J Clin Invest.* 1 mars 2012;122(3):899-910.
144. Feig C, Jones JO, Kraman M, Wells RJB, Deonaraine A, Chan DS, et al. Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10 déc 2013;110(50):20212-7.
145. DeNardo DG, Ruffell B. Macrophages as regulators of tumor immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* juin 2019;19(6):369-82.
146. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2 avr 2010;141(1):52-67.
147. Kerbel RS. Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med.* 8 mai 2008;358(19):2039-49.
148. Apte RS, Chen DS, Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell.* 7 mars 2019;176(6):1248-64.
149. Peng W, Chen JQ, Liu C, Malu S, Creasy C, Tetzlaff MT, et al. Loss of PTEN promotes resistance to T cell-mediated immunotherapy. *Cancer Discov.* févr 2016;6(2):202-16.
150. Chen DS, Mellman I. Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature.* janv 2017;541(7637):321-30.

151. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, et al. Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature*. févr 2006;439(7077):682-7.
152. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. nov 2014;515(7528):563-7.
153. Bai X, Ni J, Beretov J, Graham P, Li Y. Immunotherapy for triple-negative breast cancer: A molecular insight into the microenvironment, treatment, and resistance. *J Natl Cancer Cent [Internet]*. 6 juill 2021
154. Emens LA. Breast Cancer Immunotherapy: Facts and Hopes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 févr 2018;24(3):511-20.
155. Progress and challenges of immunotherapy in triple-negative breast cancer. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 1 déc 2021;1876(2):188593.
156. Schmid P, Cruz C, Braiteh FS, Eder JP, Tolaney S, Kuter I, et al. Abstract 2986: Atezolizumab in metastatic TNBC (mTNBC): Long-term clinical outcomes and biomarker analyses. *Cancer Res*. 1 juill 2017;77(13 Supplement):2986-2986.
157. Emens LA, Loi S, Rugo HS, Schneeweiss A, Diéras V, Iwata H, et al. IMpassion130: Efficacy in immune biomarker subgroups from the global, randomized, double-blind, placebo- controlled, Phase III study of atezolizumab + nab-paclitaxel in patients with treatment-naïve, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. 2018;17.
158. Rugo HS, Loi S, Adams S, Schmid P, Schneeweiss A, Barrios CH, et al. PD-L1 Immunohistochemistry Assay Comparison in Atezolizumab Plus nab-Paclitaxel-Treated Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1 déc 2021;113(12):1733-43.
159. Research C for DE and. FDA approves atezolizumab for PD-L1 positive unresectable locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer. *FDA [Internet]*. 20 déc 2019
160. Loi S, Winer E, Lipatov O, Im S-A, Goncalves A, Cortes J, et al. Abstract PD5-03: Relationship between tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) and outcomes in the KEYNOTE-119 study of pembrolizumab vs chemotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC). *Cancer Res*. 15 févr 2020;80(4 Supplement):PD5-03.
161. Emens LA, Goldstein LD, Schmid P, Rugo HS, Adams S, Barrios CH, et al. The tumor microenvironment (TME) and atezolizumab + nab-paclitaxel (A+nP) activity in metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): IMpassion130. *J Clin Oncol [Internet]*. 28 mai 2021
162. Winer EP, Lipatov O, Im S-A, Goncalves A, Muñoz-Couselo E, Lee KS, et al. Association of tumor mutational burden (TMB) and clinical outcomes with pembrolizumab (pembro) versus chemotherapy (chemo) in patients with metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC) from KEYNOTE-119. *J Clin Oncol*. 20 mai 2020;38(15\_suppl):1013-1013.
163. Alva AS, Mangat PK, Garrett-Mayer E, Halabi S, Alvarez RH, Calfa CJ, et al. Pembrolizumab (P) in patients (pts) with metastatic breast cancer (MBC) with high tumor mutational burden (HTMB): Results from the Targeted Agent and Profiling Utilization Registry (TAPUR) Study. *J Clin Oncol*. 20 mai 2019;37(15\_suppl):1014-1014.

164. Barroso-Sousa R, Keenan TE, Pernas S, Exman P, Jain E, Garrido-Castro AC, et al. Tumor Mutational Burden and PTEN Alterations as Molecular Correlates of Response to PD-1/L1 Blockade in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 juin 2020;26(11):2565-72.
165. McGrail DJ, Pilié PG, Rashid NU, Voorwerk L, Slagter M, Kok M, et al. High tumor mutation burden fails to predict immune checkpoint blockade response across all cancer types. *Ann Oncol.* 1 mai 2021;32(5):661-72.
166. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. *Science.* 28 juill 2017;357(6349):409-13.
167. Gianni L, Huang C-S, Egle D, Bermejo B, Zamagni C, Thill M, et al. Abstract GS3-04: Pathologic complete response (pCR) to neoadjuvant treatment with or without atezolizumab in triple negative, early high-risk and locally advanced breast cancer. NeotRIPaPDL1 Michelangelo randomized study. *Cancer Res.* 15 févr 2020;80(4 Supplement):GS3-GS3-04.
168. Loibl S, Untch M, Burchardi N, Huober J, Sinn BV, Blohmer J-U, et al. A randomised phase II study investigating durvalumab in addition to an anthracycline taxane-based neoadjuvant therapy in early triple-negative breast cancer: clinical results and biomarker analysis of GeparNuevo study. *Ann Oncol.* 1 août 2019;30(8):1279-88.
169. Loibl S, Schneeweiss A, Huober JB, Braun M, Rey J, Blohmer JU, et al. Durvalumab improves long-term outcome in TNBC: results from the phase II randomized GeparNUEVO study investigating neoadjuvant durvalumab in addition to an anthracycline/taxane based neoadjuvant chemotherapy in early triple-negative breast cancer (TNBC). *J Clin Oncol.* 20 mai 2021;39(15\_suppl):506-506.
170. Schmid P, Cortes J, Pusztai L, McArthur H, Kümmel S, Bergh J, et al. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 27 févr 2020;382(9):810-21.
171. Harbeck N, Zhang H, Barrios CH, Saji S, Jung KH, Hegg R, et al. LBA11 IMpassion031: Results from a phase III study of neoadjuvant (neoadj) atezolizumab + chemotherapy in early triple-negative breast cancer (TNBC). *Ann Oncol.* 1 sept 2020;31:S1144.
172. Saji S, McArthur HL, Ignatiadis M, Bailey A, El-Abed S, Brandao M, et al. ALEXANDRA/IMpassion030: A phase 3 study of standard adjuvant chemotherapy with or without atezolizumab in patients with early-stage triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 20 mai 2021;39(15\_suppl):TPS597-TPS597.
173. Schmid P, Adams S, Rugo HS, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med.* 29 nov 2018;379(22):2108-21.
174. Schmid P, Rugo HS, Adams S, Schneeweiss A, Barrios CH, Iwata H, et al. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 1 janv 2020;21(1):44-59.
175. Cortes J, Cescon DW, Rugo HS, Nowecki Z, Im S-A, Yusof MM, et al. Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *The Lancet.* 5 déc 2020;396(10265):1817-28.

176. Merck Announces Phase 3 KEYNOTE-355 Trial Met Primary Endpoint of Overall Survival (OS) in Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer Whose Tumors Expressed PD-L1 (CPS  $\geq$ 10) [Internet]. Merck.com.
177. Longer survival with pembro plus chemo in TNBC [Internet]. Daily Reporter.
178. Zitvogel L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Kroemer G. Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol.* janv 2008;8(1):59-73.
179. Chen G, Emens LA. Chemoimmunotherapy: reengineering tumor immunity. *Cancer Immunol Immunother.* 1 févr 2013;62(2):203-16.
180. Alagkiozidis I, Facciabene A, Tsiatas M, Carpenito C, Benencia F, Adams S, et al. Time-dependent cytotoxic drugs selectively cooperate with IL-18 for cancer chemo-immunotherapy. *J Transl Med.* 25 mai 2011;9:77.
181. Ding L, Kim H-J, Wang Q, Kearns M, Jiang T, Ohlson CE, et al. PARP Inhibition Elicits STING-Dependent Antitumor Immunity in Brca1-Deficient Ovarian Cancer. *Cell Rep.* 11 déc 2018;25(11):2972-2980.e5.
182. Pantelidou C, Sonzogni O, De Oliveria Taveira M, Mehta AK, Kothari A, Wang D, et al. PARP inhibitor efficacy depends on CD8+ T cell recruitment via intratumoral STING pathway activation in BRCA-deficient models of triple-negative breast cancer. *Cancer Discov.* juin 2019;9(6):722-37.
183. Jiao S, Xia W, Yamaguchi H, Wei Y, Chen M-K, Hsu J-M, et al. PARP Inhibitor Upregulates PD-L1 Expression and Enhances Cancer-Associated Immunosuppression. *Clin Cancer Res.* 15 juill 2017;23(14):3711-20.
184. Loi S, Dushyanthen S, Beavis PA, Salgado R, Denkert C, Savas P, et al. RAS/MAPK Activation Is Associated with Reduced Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple-Negative Breast Cancer: Therapeutic Cooperation Between MEK and PD-1/PD-L1 Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin Cancer Res.* 15 mars 2016;22(6):1499-509.
185. Franklin DA, James JL, Axelrod ML, Balko JM. MEK inhibition activates STAT signaling to increase breast cancer immunogenicity via MHC-I expression. *Cancer Drug Resist Alhambra Calif.* 2020;3:603-12.
186. Goel S, DeCristo MJ, Watt AC, BrinJones H, Sceneay J, Li BB, et al. CDK4/6 inhibition triggers anti-tumour immunity. *Nature.* août 2017;548(7668):471-5.
187. Brossart P. The Role of Antigen Spreading in the Efficacy of Immunotherapies. *Clin Cancer Res.* 1 sept 2020;26(17):4442-7.
188. Voorwerk L, Slagter M, Horlings HM, Sikorska K, Vijver KK van de, Maaker M de, et al. Immune induction strategies in metastatic triple-negative breast cancer to enhance the sensitivity to PD-1 blockade: the TONIC trial. *Nat Med.* juin 2019;25(6):920-8.
189. Casares N, Pequignot MO, Tesniere A, Ghiringhelli F, Roux S, Chaput N, et al. Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med.* 19 déc 2005;202(12):1691-701.

190. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, et al. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med.* janv 2007;13(1):54-61.
191. Panaretakis T, Joza N, Modjtahedi N, Tesniere A, Vitale I, Durchschlag M, et al. The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell Death Differ.* sept 2008;15(9):1499-509.
192. Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund A-C, Chapman DC, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J.* 4 mars 2009;28(5):578-90.
193. Gameiro SR, Jammeh ML, Wattenberg MM, Tsang KY, Ferrone S, Hodge JW. Radiation-induced immunogenic modulation of tumor enhances antigen processing and calreticulin exposure, resulting in enhanced T-cell killing. *Oncotarget.* 31 déc 2013;5(2):403-16.
194. Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science.* 16 déc 2011;334(6062):1573-7.
195. Martins I, Wang Y, Michaud M, Ma Y, Sukkurwala AQ, Shen S, et al. Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ.* janv 2014;21(1):79-91.
196. Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 $\beta$ -dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med.* oct 2009;15(10):1170-8.
197. Haabeth OAW, Lorvik KB, Yagita H, Bogen B, Corthay A. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. *Oncoimmunology [Internet].* 25 juill 2015
198. Sáez PJ, Vargas P, Shoji KF, Harcha PA, Lennon-Duménil A-M, Sáez JC. ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X7 receptors. *Sci Signal.* 21 nov 2017;10(506):eaah7107.
199. Martins I, Tesniere A, Kepp O, Michaud M, Schlemmer F, Senovilla L, et al. Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle.* 15 nov 2009;8(22):3723-8.
200. Aymeric L, Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Martins I, Kroemer G, et al. Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity. *Cancer Res.* 1 févr 2010;70(3):855-8.
201. Yu Y, Tang D, Kang R. Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Front Physiol [Internet].* 7 avr 2015
202. Rapoport BL, Steel HC, Theron AJ, Heyman L, Smit T, Ramdas Y, et al. High Mobility Group Box 1 in Human Cancer. *Cells.* juill 2020;9(7):1664.
203. Tripathi A, Shrinet K, Kumar A. HMGB1 protein as a novel target for cancer. *Toxicol Rep.* 1 janv 2019;6:253-61.
204. Venereau E, Casalgrandi M, Schiraldi M, Antoine DJ, Cattaneo A, De Marchis F, et al. Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release. *J Exp Med.* 6 août 2012;209(9):1519-28.



205. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):59-66.
206. Yamazaki T, Hannani D, Poirier-Colame V, Ladoire S, Locher C, Sistigu A, et al. Defective immunogenic cell death of HMGB1-deficient tumors: compensatory therapy with TLR4 agonists. *Cell Death Differ.* janv 2014;21(1):69-78.
207. Gao Q, Wang S, Chen X, Cheng S, Zhang Z, Li F, et al. Cancer-cell-secreted CXCL11 promoted CD8+ T cells infiltration through docetaxel-induced-release of HMGB1 in NSCLC. *J Immunother Cancer* [Internet]. 11 févr 2019
208. Zhu X, Messer JS, Wang Y, Lin F, Cham CM, Chang J, et al. Cytosolic HMGB1 controls the cellular autophagy/apoptosis checkpoint during inflammation. *J Clin Invest.* 2 mars 2015;125(3):1098-110.
209. Wang S, Zhang Y. HMGB1 in inflammation and cancer. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol.* 24 août 2020;13(1):116.
210. Paudel YN, Angelopoulou E, Piperi C, Balasubramaniam VRMT, Othman I, Shaikh MF. Enlightening the role of high mobility group box 1 (HMGB1) in inflammation: Updates on receptor signalling. *Eur J Pharmacol.* 5 sept 2019;858:172487.
211. Harlin H, Meng Y, Peterson AC, Zha Y, Tretiakova M, Slingluff C, et al. Chemokine Expression in Melanoma Metastases Associated with CD8+ T-Cell Recruitment. *Cancer Res.* 1 avr 2009;69(7):3077-85.
212. Hong M, Puaux A-L, Huang C, Loumagne L, Tow C, Mackay C, et al. Chemotherapy Induces Intratumoral Expression of Chemokines in Cutaneous Melanoma, Favoring T-cell Infiltration and Tumor Control. *Cancer Res.* 15 nov 2011;71(22):6997-7009.
213. Shatz M, Menendez D, Resnick MA. The human TLR innate immune gene family is differentially influenced by DNA stress and p53 status in cancer cells. *Cancer Res.* 15 août 2012;72(16):3948-57.
214. Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, et al. Cancer cell–autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med.* nov 2014;20(11):1301-9.
215. LIU M, GUO S, STILES JK. The emerging role of CXCL10 in cancer (Review). *Oncol Lett.* juill 2011;2(4):583-9.
216. Ma Y, Mattarollo SR, Adjemian S, Yang H, Aymeric L, Hannani D, et al. CCL2/CCR2-dependent recruitment of functional antigen-presenting cells into tumors upon chemotherapy. *Cancer Res.* 15 janv 2014;74(2):436-45.
217. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):15-27.
218. Fucikova J, Kralikova P, Fialova A, Brtnicky T, Rob L, Bartunkova J, et al. Human Tumor Cells Killed by Anthracyclines Induce a Tumor-Specific Immune Response. *Cancer Res.* 15 juill 2011;71(14):4821-33.

219. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur J Immunol.* 2004;34(2):336-44.
220. Ghiringhelli F, Menard C, Puig PE, Ladoire S, Roux S, Martin F, et al. Metronomic cyclophosphamide regimen selectively depletes CD4+CD25+ regulatory T cells and restores T and NK effector functions in end stage cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 1 mai 2007;56(5):641-8.
221. Traverso I, Fenoglio D, Negrini S, Parodi A, Battaglia F, Kalli F, et al. Cyclophosphamide inhibits the generation and function of CD8+ regulatory T cells. *Hum Immunol.* 1 mars 2012;73(3):207-13.
222. Vicari AP, Luu R, Zhang N, Patel S, Makinen SR, Hanson DC, et al. Paclitaxel reduces regulatory T cell numbers and inhibitory function and enhances the anti-tumor effects of the TLR9 agonist PF-3512676 in the mouse. *Cancer Immunol Immunother.* 1 avr 2009;58(4):615-28.
223. Abu-Eid R, Samara R, Ozbun L, Abdalla M, Berzofsky J, Friedman K, et al. Selective inhibition of regulatory T cells by targeting PI3K-Akt pathway. *Cancer Immunol Res.* nov 2014;2(11):1080-9.
224. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-Fluorouracil Selectively Kills Tumor-Associated Myeloid-Derived Suppressor Cells Resulting in Enhanced T Cell-Dependent Antitumor Immunity. *Cancer Res.* 15 avr 2010;70(8):3052-61.
225. Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M, Rébé C, Derangère V, Chevriaux A, et al. Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX–Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer Res.* 15 sept 2016;76(18):5241-52.
226. Mittal D, Young A, Stannard K, Yong M, Teng MWL, Allard B, et al. Antimetastatic Effects of Blocking PD-1 and the Adenosine A2A Receptor. *Cancer Res.* 15 juill 2014;74(14):3652-8.
227. Tauriello DVF, Palomo-Ponce S, Stork D, Berenguer-Llergo A, Badia-Ramentol J, Iglesias M, et al. TGF $\beta$  drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis. *Nature.* févr 2018;554(7693):538-43.
228. Lan Y, Zhang D, Xu C, Hance KW, Marelli B, Qi J, et al. Enhanced preclinical antitumor activity of M7824, a bifunctional fusion protein simultaneously targeting PD-L1 and TGF- $\beta$ . *Sci Transl Med.* 17 janv 2018;10(424):eaan5488.
229. Bruchard M, Mignot G, Derangère V, Chalmin F, Chevriaux A, Végran F, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med.* janv 2013;19(1):57-64.
230. Shintani Y, Okimura A, Sato K, Nakagiri T, Kadota Y, Inoue M, et al. Epithelial to Mesenchymal Transition Is a Determinant of Sensitivity to Chemoradiotherapy in Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg.* 1 nov 2011;92(5):1794-804.
231. Bholra NE, Balko JM, Dugger TC, Kuba MG, Sánchez V, Sanders M, et al. TGF- $\beta$  inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest.* 1 mars 2013;123(3):1348-58.
232. Maccubbin DL, Cohen SA, Ehrke MJ. Indomethacin modulation of adriamycin-induced effects on multiple cytolytic effector functions. *Cancer Immunol Immunother CII.* 1990;31(6):373-80.

233. Apetoh L, Mignot G, Panaretakis T, Kroemer G, Zitvogel L. Immunogenicity of anthracyclines: moving towards more personalized medicine. *Trends Mol Med*. 1 avr 2008;14(4):141-51.
234. Kaneno R, Shurin GV, Kaneno FM, Naiditch H, Luo J, Shurin MR. Chemotherapeutic agents in low noncytotoxic concentrations increase immunogenicity of human colon cancer cells. *Cell Oncol*. avr 2011;34(2):97-106.
235. Aoto K, Mimura K, Okayama H, Saito M, Chida S, Noda M, et al. Immunogenic tumor cell death induced by chemotherapy in patients with breast cancer and esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. janv 2018;39(1):151-9.
236. Ma Y, Adjemian S, Mattarollo SR, Yamazaki T, Aymeric L, Yang H, et al. Anticancer Chemotherapy-Induced Intratumoral Recruitment and Differentiation of Antigen-Presenting Cells. *Immunity*. 18 avr 2013;38(4):729-41.
237. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal Role of Innate and Adaptive Immunity in Anthracycline Chemotherapy of Established Tumors. *Cancer Res*. 15 juill 2011;71(14):4809-20.
238. D'Amico L, Menzel U, Prummer M, Müller P, Buchi M, Kashyap A, et al. A novel anti-HER2 anthracycline-based antibody-drug conjugate induces adaptive anti-tumor immunity and potentiates PD-1 blockade in breast cancer. *J Immunother Cancer*. 21 janv 2019;7(1):16.
239. Wanderley CW, Colón DF, Luiz JPM, Oliveira FF, Viacava PR, Leite CA, et al. Paclitaxel Reduces Tumor Growth by Reprogramming Tumor-Associated Macrophages to an M1 Profile in a TLR4-Dependent Manner. *Cancer Res*. 15 oct 2018;78(20):5891-900.
240. Javeed A, Ashraf M, Riaz A, Ghafoor A, Afzal S, Mukhtar MM. Paclitaxel and immune system. *Eur J Pharm Sci*. 5 nov 2009;38(4):283-90.
241. Kubo M, Morisaki T, Matsumoto K, Tasaki A, Yamanaka N, Nakashima H, et al. Paclitaxel probably enhances cytotoxicity of natural killer cells against breast carcinoma cells by increasing perforin production. *Cancer Immunol Immunother*. 1 mai 2005;54(5):468-76.
242. Tsavaris N, Kosmas C, Vadiaka M, Kanelopoulos P, Boulamatsis D. Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *Br J Cancer*. juill 2002;87(1):21-7.
243. Kodumudi KN, Woan K, Gilvary DL, Sahakian E, Wei S, Djeu JY. A Novel Chemoimmunomodulating Property of Docetaxel: Suppression of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearers. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res [Internet]*. 15 sept 2010
244. Dybdal-Hargreaves NF, Risinger AL, Mooberry SL. Eribulin Mesylate: Mechanism of Action of a Unique Microtubule-Targeting Agent. *Clin Cancer Res*. 1 juin 2015;21(11):2445-52.
245. Kuznetsov G, TenDyke K, Yu M, Littlefield B. Antiproliferative effects of halichondrin B analog eribulin mesylate (E7389) against paclitaxel-resistant human cancer cells in vitro. *Mol Cancer Ther*. 1 nov 2007;6(11 Supplement):C58-C58.
246. Funahashi Y, Okamoto K, Adachi Y, Semba T, Uesugi M, Ozawa Y, et al. Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models. *Cancer Sci*. oct 2014;105(10):1334-42.

247. Ueda S, Saeki T, Takeuchi H, Shigekawa T, Yamane T, Kuji I, et al. In vivo imaging of eribulin-induced reoxygenation in advanced breast cancer patients: a comparison to bevacizumab. *Br J Cancer*. mai 2016;114(11):1212-8.
248. Eribulin mesylate reduces tumor microenvironment abnormality by vascular remodeling in preclinical human breast cancer models - Funahashi - 2014 - *Cancer Science* - Wiley Online Library [Internet].
249. Tolaney SM, Kalinsky K, Kaklamani VG, D'Adamo DR, Aktan G, Tsai ML, et al. Eribulin Plus Pembrolizumab in Patients with Metastatic Triple-Negative Breast Cancer (ENHANCE 1): A Phase Ib/II Study. *Clin Cancer Res*. 1 juin 2021;27(11):3061-8.
250. Adams S, Loi S, Toppmeyer D, Cescon DW, De Laurentiis M, Nanda R, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously untreated, PD-L1-positive, metastatic triple-negative breast cancer: cohort B of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*. 1 mars 2019;30(3):405-11.
251. Li CH, Karantza V, Aktan G, Lala M. Current treatment landscape for patients with locally recurrent inoperable or metastatic triple-negative breast cancer: a systematic literature review. *Breast Cancer Res*. 16 déc 2019;21(1):143.
252. Cortés J, Lipatov O, Im S-A, Gonçalves A, Lee KS, Schmid P, et al. LBA21 - KEYNOTE-119: Phase III study of pembrolizumab (pembro) versus single-agent chemotherapy (chemo) for metastatic triple negative breast cancer (mTNBC). *Ann Oncol*. 1 oct 2019;30:v859-60.
253. Adams S, Schmid P, Rugo HS, Winer EP, Loirat D, Awada A, et al. Pembrolizumab monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer: cohort A of the phase II KEYNOTE-086 study. *Ann Oncol*. 1 mars 2019;30(3):397-404.
254. Nanda R, Chow LQM, Dees EC, Berger R, Gupta S, Geva R, et al. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J Clin Oncol*. 20 juill 2016;34(21):2460-7.
255. Rocha CRR, Silva MM, Quinet A, Cabral-Neto JB, Menck CFM. DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship. *Clinics* [Internet]. 6 sept 2018
256. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 5 oct 2014;0:364-78.
257. Wan S, Pestka S, Jubin RG, Lyu YL, Tsai Y-C, Liu LF. Chemotherapeutics and Radiation Stimulate MHC Class I Expression through Elevated Interferon-beta Signaling in Breast Cancer Cells. *PLOS ONE*. 1 mars 2012;7(3):e32542.
258. Hu X-C, Zhang J, Xu B-H, Cai L, Ragaz J, Wang Z-H, et al. Cisplatin plus gemcitabine versus paclitaxel plus gemcitabine as first-line therapy for metastatic triple-negative breast cancer (CBCSG006): a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 1 avr 2015;16(4):436-46.
259. De Giovanni C, Nicoletti G, Landuzzi L, Palladini A, Lollini P-L, Nanni P. Bioprofiling TS/A Murine Mammary Cancer for a Functional Precision Experimental Model. *Cancers*. 27 nov 2019;11(12):1889.

260. Attalla S, Taifour T, Bui T, Muller W. Insights from transgenic mouse models of PyMT-induced breast cancer: recapitulating human breast cancer progression in vivo. *Oncogene*. janv 2021;40(3):475-91.
261. Kaul R, Risinger AL, Mooberry SL. Eribulin rapidly inhibits TGF- $\beta$ -induced Snail expression and can induce Slug expression in a Smad4-dependent manner. *Br J Cancer*. 1 oct 2019;121(7):611-21.
262. Jain N, Nguyen H, Chambers C, Kang J. Dual function of CTLA-4 in regulatory T cells and conventional T cells to prevent multiorgan autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 janv 2010;107(4):1524-8.
263. Nolan E, Savas P, Policheni AN, Darcy PK, Vaillant F, Mintoff CP, et al. Combined immune checkpoint blockade as a therapeutic strategy for BRCA1-mutated breast cancer. *Sci Transl Med*. 7 juin 2017;9(393):eaal4922.
264. Adams S, Othus M, Patel SP, Chae YK, Miller K, Chugh R, et al. Dual anti-CTLA-4 and anti-PD-1 blockade in metaplastic carcinoma of the breast: Dart (SWOG S1609, Cohort 36). *J Clin Oncol*. 20 mai 2020;38(15\_suppl):1073-1073.
265. Fan J-B, Miyauchi S, Xu H-Z, Liu D, Kim LJY, Burkart C, et al. Type I Interferon Regulates a Coordinated Gene Network to Enhance Cytotoxic T Cell-Mediated Tumor Killing. *Cancer Discov*. 1 mars 2020;10(3):382-93.
266. Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway | Science [Internet].
267. Lee BL, Barton GM. Trafficking of endosomal Toll-like receptors. *Trends Cell Biol*. juin 2014;24(6):360-9.
268. Grabosch S, Bulatovic M, Zeng F, Ma T, Zhang L, Ross M, et al. Cisplatin-induced immune modulation in ovarian cancer mouse models with distinct inflammation profiles. *Oncogene*. mars 2019;38(13):2380-93.
269. Lee WJ, Song SY, Roh H, Ahn HM, Na Y, Kim J, et al. Profibrogenic effect of high-mobility group box protein-1 in human dermal fibroblasts and its excess in keloid tissues. *Sci Rep*. 30 mai 2018;8(1):1-10.
270. Marullo R, Werner E, Degtyareva N, Moore B, Altavilla G, Ramalingam SS, et al. Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions. *PLOS ONE*. 19 nov 2013;8(11):e81162.
271. Ježek J, Cooper KF, Strich R. Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Dynamics: The Yin and Yang of Mitochondrial Dysfunction and Cancer Progression. *Antioxidants*. janv 2018;7(1):13.
272. Yi E-Y, Park S-Y, Jung S-Y, Jang W-J, Kim Y-J. Mitochondrial dysfunction induces EMT through the TGF- $\beta$ /Smad/Snail signaling pathway in Hep3B hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*. 1 nov 2015;47(5):1845-53.
273. Richter K, Konzack A, Pihlajaniemi T, Heljasvaara R, Kietzmann T. Redox-fibrosis: Impact of TGF $\beta$ 1 on ROS generators, mediators and functional consequences. *Redox Biol*. 1 déc 2015;6:344-52.

274. Artlett C. The Role of the NLRP3 Inflammasome in Fibrosis. *Open Rheumatol J.* 15 juin 2012;6:80-6.
275. Farhood B, khodamoradi E, Hoseini-Ghahfarokhi M, Motevaseli E, Mirtavoos-Mahyari H, Eleojo Musa A, et al. TGF- $\beta$  in radiotherapy: Mechanisms of tumor resistance and normal tissues injury. *Pharmacol Res.* 1 mai 2020;155:104745.
276. Formenti SC, Lee P, Adams S, Goldberg JD, Li X, Xie MW, et al. Focal Irradiation And Systemic Transforming Growth Factor  $\beta$  Blockade in Metastatic Breast Cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 juin 2018;24(11):2493-504.
277. Bouquet F, Pal A, Pilonas KA, Demaria S, Hann B, Akhurst RJ, et al. TGF $\beta$ 1 Inhibition Increases the Radiosensitivity of Breast Cancer Cells In Vitro and Promotes Tumor Control by Radiation In Vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 1 nov 2011;17(21):6754-65.
278. Anscher MS. Targeting the TGF- $\beta$ 1 Pathway to Prevent Normal Tissue Injury After Cancer Therapy. *The Oncologist.* avr 2010;15(4):350-9.
279. Straub JM, New J, Hamilton CD, Lominska C, Shnayder Y, Thomas SM. Radiation-induced fibrosis: mechanisms and implications for therapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 1 nov 2015;141(11):1985-94.
280. Flechsig P, Dadrich M, Bickelhaupt S, Jenne J, Hauser K, Timke C, et al. LY2109761 Attenuates Radiation-Induced Pulmonary Murine Fibrosis via Reversal of TGF- $\beta$  and BMP-Associated Proinflammatory and Proangiogenic Signals. *Clin Cancer Res.* 1 juill 2012;18(13):3616-27.
281. Vanpouille-Box C, Diamond JM, Pilonas KA, Zavadil J, Babb JS, Formenti SC, et al. TGF $\beta$  Is a Master Regulator of Radiation Therapy-Induced Antitumor Immunity. *Cancer Res.* 1 juin 2015;75(11):2232-42.
282. Funaki S, Shintani Y, Kawamura T, Kanzaki R, Minami M, Okumura M. Chemotherapy enhances programmed cell death 1/ligand 1 expression via TGF- $\beta$  induced epithelial mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. *Oncol Rep.* 1 oct 2017;38(4):2277-84.
283. Amptoulach S, Tsavaris N. Neurotoxicity Caused by the Treatment with Platinum Analogues. *Chemother Res Pract.* 2011;2011:843019.
284. Swami U, Chaudhary I, Ghalib MH, Goel S. Eribulin—A review of preclinical and clinical studies. *Crit Rev Oncol Hematol.* févr 2012;81(2):163-84.
285. Tan AR, Sarantopoulos J, Lee L, Reyderman L, He Y, Olivo M, et al. Pharmacokinetics of eribulin mesylate in cancer patients with normal and impaired renal function. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76(5):1051-61.
286. Kim B-G, Malek E, Choi SH, Ignatz-Hoover JJ, Driscoll JJ. Novel therapies emerging in oncology to target the TGF- $\beta$  pathway. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* 6 avr 2021;14(1):55.
287. Herbertz S, Sawyer JS, Stauber AJ, Gueorguieva I, Driscoll KE, Estrem ST, et al. Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Des Devel Ther.* 10 août 2015;9:4479-99.

288. Litton JK, Damodaran S, Wistuba II, Yang F, Contreras A, Tam A, et al. 383TiP - Bintrafusp alfa (M7824) and eribulin mesylate in treating patients with metastatic triple negative breast cancer (TNBC)(NCT03579472). *Ann Oncol.* 1 oct 2019;30:v139.
289. Yoo C, Oh D-Y, Choi HJ, Kudo M, Ueno M, Kondo S, et al. Phase I study of bintrafusp alfa, a bifunctional fusion protein targeting TGF- $\beta$  and PD-L1, in patients with pretreated biliary tract cancer. *J Immunother Cancer.* 1 mai 2020;8(1):e000564.

**Mots clés :** mort cellulaire immunogène, cancer du sein triple négatif, éribuline, cisplatine, immunothérapie, TGF- $\beta$

**Résumé :** Le cancer du sein triple négatif (CSTN) est le sous-type de cancer du sein le plus agressif et le plus difficile à traiter car l'arsenal thérapeutique est limité et l'efficacité réelle de l'immunothérapie (notamment par anti PD-1/anti PD-L1) reste controversée.

Dans le but de restaurer l'efficacité anti-tumorale de l'immunothérapie dans cette pathologie, nous avons étudié les effets immunologiques de deux molécules de chimiothérapie fréquemment utilisées dans le CSTN (l'éribuline et le cisplatine). En effet, leurs effets immunogènes, autrement dit leur capacité à stimuler une réponse immunitaire spécifique à la tumeur, ne sont pas ou peu décrits à l'heure actuelle. Nous les avons ainsi combinés car leur association, potentiellement faisable chez l'homme, pourrait permettre d'augmenter l'efficacité anti-tumorale.

Dans notre modèle murin de CSTN (4T1), le cisplatine semble être une drogue immunogène (ICD), au contraire de l'éribuline qui induit peu de signaux permettant le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. *In vitro* et *in vivo*, la combinaison de ces chimiothérapies n'induit pas plus de signaux de danger que le cisplatine seul, mais permet d'augmenter l'infiltration tumorale en

cellules cytotoxiques (lymphocytes T-CD8<sup>+</sup> et Natural Killer).

Malheureusement, l'induction en parallèle de l'expression de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta 1), une cytokine pro-oncogénique dans un contexte tumoral, semble induire un environnement tumoral immunosuppresseur et pro-fibrotique potentiellement médié par les fibroblastes associés au cancer (CAF) rendant la tumeur résistante à l'association d'un anti-PD-L1 avec les chimiothérapies. Ces deux phénomènes sont donc susceptibles de s'opposer et de contrebalancer les effets, en théorie favorables, de l'augmentation du recrutement intra-tumoral de cellules immunitaires.

Afin de remédier à ces phénomènes de résistance, nous avons ensuite évalué l'efficacité de l'association éribuline-cisplatine en combinaison à une immunothérapie par anti-PD-L1 et un traitement ciblant le TGF- $\beta$ . L'ajout de cet inhibiteur a permis d'augmenter l'immuno-stimulation par les traitements et de restaurer l'effet anti-tumoral de l'immunothérapie auparavant inefficace dans notre modèle murin.

**Keywords :** immunogenic cell death, triple-negative breast cancer, eribulin, cisplatin, immunotherapy, TGF- $\beta$

**Abstract :** Triple-negative breast cancer (TNBC) is the most aggressive and difficult subtype of breast cancer to treat as the therapeutic arsenal is limited and the actual efficacy of immunotherapy (especially anti PD-1/anti PD-L1) remains controversial.

In order to restore the anti-tumor efficacy of immunotherapy regarding this disease, we studied the immunological effects of two chemotherapy molecules frequently used in TNBC (eribulin and cisplatin). At this time, their immunogenic effects, in other words their capacity to stimulate a tumor-specific immune response, are not or rarely described. We decided to associate them since their combination is potentially feasible in human, and thereby could increase anti-tumor efficacy.

In our mouse model of TNBC (4T1), cisplatin appears to be an immunogenic drug (ICD) in contrast with eribulin, which induces few signals allowing the recruitment and activation of immune cells. *In vitro* and *in vivo*, the combination of these chemotherapies does not induce more danger signals than cisplatin alone but increases tumor infiltration of cytotoxic cells (T-CD8<sup>+</sup> and natural killer lymphocytes).

Unfortunately, the parallel induction of TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta 1) expression, a pro-oncogenic cytokine in a tumor setting, appears to induce an immunosuppressive and pro-fibrotic tumor environment potentially mediated by cancer associated fibroblasts (CAF) causing the tumor to be resistant to the combination of anti-PD-L1 with chemotherapies. These two phenomena are thus likely to oppose themselves and counterbalance the theoretically favourable effects of increased intra-tumor recruitment of immune cells.

To address these resistance phenomena, we then evaluated the efficacy of eribulin-cisplatin in combination with anti-PD-L1 immunotherapy and TGF- $\beta$  targeting therapy. The addition of this inhibitor has increased the immuno-stimulation through the treatments and restored the anti-tumor effect of the previously ineffective immunotherapy observed in our mouse model.