



# THÈSE

## En vue de l'obtention du DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par

**Elie MARCHETEAU**

Le 17 mai 2019

**Effet de l'inhibition par ARN interférence de la Thrombospondine-1 sur la potentialisation de la réponse immune dans un contexte tumoral**

---

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **CANCEROLOGIE**

Unité de recherche :

**CRCT - Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse**

Thèse dirigée par

**Bruno SEGUI et Hervé PRATS**

Jury

**Mme Nathalie BONNEFOY**, Rapporteur

**M. Gilles PAGES**, Rapporteur

**M. Salem CHOUAIB**, Rapporteur

**Mme Magali TERME**, Examinatrice

**Mme Florence CABON**, Examinatrice

**M. Bruno SEGUI**, Directeur de thèse

**M. Hervé PRATS**, Co-directeur de thèse



## Résumé

Le cancer du sein est actuellement le cancer le plus fréquent et le plus mortel chez la femme. Malgré le fait que la prise en charge des patientes ait été améliorée dans nos sociétés occidentales au cours des dernières années, la principale cause de mortalité reste la dissémination métastatique. Force est de constater que de nombreuses stratégies thérapeutiques, comme des traitements anti-angiogéniques ou des immunothérapies ciblant des points de contrôle immunitaire, sont toujours en échec dans ce type de cancer, notamment dans les cancers du sein triple négatifs (TNBC), forme la plus agressive. L'hypoxie tumorale est un facteur de mauvais pronostic car facilitant la dissémination métastatique et inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale. Dans ce contexte, la Thrombospondine-1 (TSP1), un anti-angiogène endogène majeur, a été décrite comme activatrice de TGF $\beta$ , une cytokine immunosuppressive facilitant la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses. Nous avons émis l'hypothèse que cibler la TSP1 dans les TNBC permettrait non seulement de normaliser l'angiogenèse tumorale mais aussi de faciliter la réponse immunitaire. Des analyses de bases de données publiques nous ont permis de montrer qu'une forte expression de TSP1 dans les biopsies tumorales est associée à une signature génique d'immunoéchappement et à un mauvais pronostic chez les patientes atteintes de TNBC. En accord avec ces observations, nos analyses d'immunohistochimie montrent une corrélation inverse entre l'infiltrat tumoral des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et l'expression de TSP1 dans des biopsies tumorales de TNBC. Dans un modèle préclinique de TNBC, basé sur l'injection orthotopique de cellules 4T1, l'inhibition de la TSP1 par interférence ARN dans les cellules tumorales (i) augmente significativement le nombre de vaisseaux au sein des tumeurs et l'infiltration intratumorale des lymphocytes, incluant les lymphocytes T CD8, (ii) diminue la dissémination métastatique des 4T1 chez les souris immunocompétentes, mais pas chez les souris Nude, (iii) augmente la réponse aux anti-PD-1. En conclusion, nos résultats montrent que la TSP1, produite par les cellules cancéreuses de TNBC, favorise un remodelage vasculaire, inhibe l'infiltration lymphocytaire et facilite la dissémination métastatique. Cibler la TSP-1 permet de réorganiser le microenvironnement tumoral, augmentant la réponse immunitaire anti-tumorale et la réponse aux anti-PD-1. Ainsi, cette étude ouvre vers de nouvelles perspectives thérapeutiques chez les patientes atteintes de TNBC et vise à combiner des thérapies « anti-angiogéniques » et des immunothérapies comme les anti-PD-1.



## Abstract

Breast cancer is currently the most common and fatal cancer in women. The main cause of death remains metastatic dissemination despite the improvement of patient care in Western societies during the last few years. It is clear that recent therapeutic strategies, such as anti-angiogenic treatments or immunotherapies targeting immune checkpoints, are still failing to eliminate this type of cancer, especially in triple negative breast cancer (TNBC), the most aggressive form of breast cancer. At least part of the inhibition of anti-tumor immune response could be due to tumor hypoxia, a poor prognostic factor also promoting metastatic dissemination. In this context, Thrombospondin-1 (TSP1), a major endogenous antiangiogenic factor, has been described as the main activator of TGF $\beta$ , an immunosuppressive cytokine facilitating the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells. We hypothesized that targeting TSP1 in TNBC would not only normalize tumor angiogenesis but also facilitate the immune response. Public database analyses have shown that high TSP1 expression in tumor biopsies is associated with an immune escape gene signature and a poor prognosis in TNBC patients. Consistent with these observations, our immunohistochemistry analyses show an inverse correlation between tumor infiltration of CD8+ T cells and TSP1 expression in tumor biopsies of TNBC. In a preclinical model of TNBC, based on the orthotopic injection of 4T1 cells, the inhibition of TSP1 synthesis by RNA interference in tumor cells leads to (i) a significant increase in the number of vessels within tumors and the tumor infiltration of lymphocytes, including CD8 T cells, (ii) a decrease of metastatic dissemination of 4T1 in immunocompetent mice, but not in Nude mice, (iii) a potentiation of response to anti-PD-1. Collectively, our results show that TSP1 produced by TNBC cancer cells promotes vascular remodelling, inhibition of lymphocyte infiltration and facilitation of metastatic dissemination. Targeting TSP-1 remodelates the tumor microenvironment, increasing the anti-tumor immune response and response to anti-PD-1. Thus, this study opens up new therapeutic strategies in patients with TNBC based on combining "anti-anti-angiogenic" strategies and immunotherapies such as anti-PD-1 treatment.



## Remerciements

Merci au Dr **Nathalie Bonnefoy**, au Dr **Magali Terme**, au Dr **Salem Chouaib** et au Dr **Gilles Pages** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier le Pr **Bruno Ségui**, pour m'avoir accompagné et soutenu lors de cette thèse. Merci pour ces bons conseils et ton aide tout au long de ce projet.

Merci au Pr **Hervé Prats** pour ses conseils et le fait de m'avoir fait apprécier la biologie moléculaire, monde totalement obscur à mon arrivée sur Toulouse.

Le Dr **Florence Cabon**, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser cette thèse sous ce financement CIFRE, la découverte du monde des siRNA mais également de m'avoir donné la chance de mettre un pied dans l'univers des sociétés pharmaceutiques.

J'ai commencé ce parcours au sein de laboratoires de recherche il y a 10 ans désormais, je tiens tout particulièrement à remercier le Dr **Ludovic Freyburger** qui le premier m'a fait confiance à mes débuts de technicien et surtout, merci Ludo d'avoir fini par me convaincre de poursuivre mes études ! Merci Ludo !

Ce fût un réel plaisir de découvrir l'immunologie au sein du laboratoire du Pr **Eric Tartour** en parallèle du monde vétérinaire qui m'a toujours passionné dans l'unité du Pr **Sylvie Chastant-Maillard**.

Un grand merci au Pr **Eric Tartour**, pour m'avoir fait confiance durant toutes ces années sur Paris. Mais également pour tous les conseils que vous m'avez donnés et votre savoir que vous prenez toujours le temps de transmettre avec passion.

**Magali**, merci de m'avoir débauché de l'école véto d'Alfort, de m'avoir permis de reprendre un Master et bien sûr épaulé pendant celui-ci. De m'avoir fait confiance sur les différents projets que nous avons réalisés ensemble, merci pour toutes les choses que tu m'as apprises. J'en profite au passage pour remercier les « vieux » de l'équipe 10 avec qui j'ai eu le plaisir de travailler : **Mevyn, Simon, Thibault, Thi, Nadine, Héléne, Marion, Charlotte, Corinne, Federico** et j'en oublie très certainement mais ils se reconnaîtront.

Mon arrivée sur Toulouse à SeleXel fût pour moi l'occasion de découvrir le monde obscur de la biologie moléculaire. Merci à **Hilary** pour ses idées parfois plus ou moins réalisables et nos discussions. Merci à **Steph** pour sa patience lors de mon apprentissage des techniques de

biologie moléculaire et de dosage de siRNA (#mapassion) ainsi que **Caroline** qui toutes deux me supportent avec patience dans le bureau! Et enfin merci à **Maud** pour sa transmission de ses connaissances en expérimentation animale, en biomol et tous ces bons moments partagés.

Ce projet fait suite au travail de **Julie et Guillaume**, merci à vous et j'espère vous avoir contaminé un peu avec l'immuno! ;)

Merci à l'équipe 4 et plus particulièrement au Pr **Thierry Levade**, au Dr **Nathalie Andrieu** et à **Bruno** de m'avoir accueilli pour que ce projet puisse se réaliser. Merci à **Virginie, Céline, Anne, Joëlle, Carine, Michaël, Elodie, Florie, Karine, Stéphane, les masters...** avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger sur des sujets aussi divers que variés et de travailler durant ces années.

Les anciens du noyau dur : **Fatima, Caroline, Justine, Marine** et **Patricia** sans qui cette thèse n'aurait pas été aussi drôle ! Merci à toutes pour les déconnades en salle de culture, les pauses café de 16h00 que je suis fier d'avoir instaurées, les potins « discrets » au milieu des couloirs et tous ces bons instants qui rendent les manip foireuses moins importantes. Je regrette cependant d'avoir toujours eu plus de succès pour un apéro que pour vous emmener au Touch-Rugby... ;) .  
Merci pour votre amitié.

Mon travail à cheval entre l'ITAV et le CRCT a été pour moi l'occasion de nombreuses rencontres avec qui c'est toujours un plaisir de discuter et rigoler aux pauses café, au Touch-Rugby, aux Scienti'Ludo ou encore hors du labo ! Vous vous reconnaîtrez et j'espère vous revoir très bientôt !

*"La véritable amitié commence quand les silences ne pèsent plus."*

*Romain Werlen*

Ces années parisiennes ont été pour moi l'occasion de rencontrer deux personnes formidables qui m'ont soutenues dans les moments difficiles et m'ont accueillies les bras ouverts au sein de leur colloc : **Mevyn et Mandy**. Merci pour tous ces moments partagés et pour votre amitié. La distance nous sépare désormais mais vous savez que vous comptez énormément pour moi. Prenez soin de vous et je ne doute pas que **Marine** et **Thomas** sont là pour veiller sur vous.

**Guigui**, merci pour tes cours de rattrapage en biologie moléculaire, les moments de rigolade, ta passion pour les jeux de société un peu contagieuse... et bien évidemment ton amitié !

Les anciens du master : **Ian, Mathilde, Guillaume R, Florence...** Désormais dispersés, c'est toujours un plaisir de passer du temps avec vous !



Enfin je tiens à remercier celles et ceux qui comptent pour moi, de Toulouse et d'ailleurs, et qui se reconnaîtront je n'en doute pas.

*“De toutes les manières imaginables, la famille est le lien avec notre passé et le pont vers notre avenir.”*

*Alex Haley*

Oncles, tantes, cousins, cousines... des 3 familles, je ne pourrais tous vous citer ici. Sachez que malgré la distance qui nous sépare et que nos moments de retrouvailles sont souvent comptés, ces moments sont pour moi inoubliables. Merci d'être présents et j'espère tous vous revoir très bientôt.

**Auré, Max et Gégé**, merci d'être là pour ces instants de vie partagés depuis l'enfance : ces échanges et ces sourires, sont pour moi mes véritables racines. Un de mes regrets est certainement de ne pas vous voir plus souvent et je compte bien y remédier pour que mini-nous découvre ses oncles formidables. Même si je n'ai pas besoin de l'écrire pour que vous soyez au courant : je vous aime.

Depuis 30 ans, la famille c'est également agrandie et mini-nous aura l'occasion de connaître des tantes merveilleuses : **Ludivine** et **Armelle**. Une petite pensée pour **Valentine, Clémence, Marcellin** et **Gustave** qui vont devoir faire de la place auprès de Mamoune et Papy Gépéto pour leur future cousine préférée ! ;)

**Papa** et **Maman**, merci de m'avoir permis de suivre mes passions, depuis les fourmières jusqu'aux papillons. De m'avoir donné toutes les cartes en mains pour suivre mon propre chemin. De m'avoir toujours soutenu dans les moments difficiles et rendu la vie plus facile. Merci de m'avoir transmis vos valeurs que je ne manquerai pas de transmettre à mon tour dans les mois à venir. Un Marcheteau ça ne parle pas beaucoup, mais je vous le dit quand même : je vous aime.

Je tiens à clôturer ces remerciements par toi, **Sarah**, mon ange, qui aurait cru qu'un simple pull nous permettrait d'écrire une si belle histoire ? Merci pour tout ton amour au quotidien et de m'avoir soutenu et convaincu de terminer ce projet qui était loin d'être simple. Merci également de réussir à supporter mon côté artiste (un poil bordélique), mon côté passionné (un poil envahissant) et mon côté tête en l'air (un poil sur la lune). Je te promets de grandir afin que tu n'aies pas bientôt deux enfants à gérer au quotidien, et d'ailleurs il me tarde de rencontrer notre mini-nous ! Je pourrais continuer encore longtemps mais le reste tu le sais déjà, je vais donc simplement conclure : tu es la plus belle chose qui me soit arrivée, je t'aime.



*... À mes grands-parents*



## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>3</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>7</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>17</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>19</b>
<b>I. Cancers : mieux les comprendre, pour mieux les traiter</b> .....	<b>21</b>
1. Un peu d'histoire .....	21
2. Epidémiologie .....	23
2.1 Quelques données mondiales .....	23
2.2 Et en France ? .....	24
3. Pourquoi meurt-on encore du cancer aujourd'hui ? .....	26
4. Le cancer, une pathologie complexe .....	26
4.1 Les cellules tumorales .....	26
4.2 Microenvironnement tumoral .....	28
4.2.1 Matrice extracellulaire .....	29
4.2.2 Composants cellulaires .....	29
4.2.2.1 Les cellules endothéliales .....	29
4.2.2.2 Les adipocytes associés aux cancers .....	29
4.2.2.3 Les fibroblastes associés aux cancers .....	30
4.2.2.4 Les cellules immunitaires .....	31
4.3 Dissémination métastatique .....	31
<b>II. Immunosurveillance et cancer</b> .....	<b>32</b>
1. Un organisme armé pour lutter .....	32
1.1 Réponse précoce : immunité innée .....	32
1.1.1 Les macrophages .....	32
1.1.2 Les cellules Natural Killer .....	34
1.1.3 Les cellules dendritiques .....	34
1.2 Réponse spécifique : immunité adaptative .....	35

1.2.1	Activation de la réponse immunitaire spécifique .....	35
1.2.1.1	Présentation antigénique .....	35
1.2.1.2	La théorie des 3 signaux.....	36
1.2.2	Les lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> .....	37
1.2.3	Les lymphocytes T CD4 <sup>+</sup> .....	38
1.2.3.1	Th1 .....	39
1.2.3.2	Th2 .....	40
1.2.3.3	Treg .....	40
1.2.4	Mémoire immunitaire .....	42
2.	Emergence du concept d'immunosurveillance .....	42
3.	Immunoediting .....	43
4.	Les mécanismes d'échappement.....	44
4.1	Phénomènes d'anergie et d'exhaustion.....	45
4.2	L'exemple de PD-1 (Programmed Cell Death-1).....	47
<b>III.</b>	<b>Cancer du sein.....</b>	<b>50</b>
1.	Généralités.....	50
2.	Dépistage.....	51
3.	Classification des cancers du sein .....	51
3.1	Classification histologique.....	51
3.2	Classification moléculaire.....	53
4.	Traitements de référence .....	54
4.1	Thérapies classiques.....	55
4.2	Thérapies ciblées et hormonothérapie .....	56
4.3	Immunothérapies.....	57
<b>IV.</b>	<b>Anti-angiogéniques.....</b>	<b>59</b>
1.	Angiogenèse tumorale.....	59
2.	Impact des anti-angiogéniques dans le cancer.....	61
2.1	Normalisation vasculaire .....	61
2.2	Impact du VEGF-A sur l'immunité.....	62

2.3	Qu'en est-il dans le cancer du sein ? .....	63
<b>V.</b>	<b>Impact de l'environnement hypoxique intratumoral .....</b>	<b>64</b>
1.	Hypoxie et système immunitaire .....	64
1.1	Hypoxie et Macrophages .....	66
1.2	Hypoxie et cellules dendritiques .....	67
1.3	Hypoxie et MDSC .....	67
1.4	Hypoxie et lymphocytes T .....	68
2.	Hypoxie et métastases .....	69
<b>VI.</b>	<b>Vers une nouvelle perspective thérapeutique dans les cancers du sein triple négatifs ? .....</b>	<b>70</b>
<b>VII.</b>	<b>La Thrombospondine-1, une nouvelle cible thérapeutique dans les cancers du sein triple négatifs ? .....</b>	<b>72</b>
1.	Généralités.....	72
1.1	Structure et interactome .....	72
1.2.	Régulations de la TSP1 .....	74
1.3	Rôles physiologiques .....	74
1.4.	TSP1 et angiogenèse.....	75
2.	TSP1 et immunité .....	75
2.1	TSP1 et CD47 .....	75
2.2.	TSP1 et CD36 .....	76
2.3	TSP1 et TGF $\beta$ .....	76
<b>VIII.</b>	<b>Objectif de la thèse .....</b>	<b>79</b>
<b>IX.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>80</b>
<b>X.</b>	<b>Discussion et conclusion.....</b>	<b>111</b>
<b>XI.</b>	<b>Références .....</b>	<b>120</b>
<b>XII.</b>	<b>Annexe.....</b>	<b>145</b>
	Article : Silencing antiangiogenic Thrombospondin-1 in high grade breast cancer reduces hypoxia and inhibits metastasis.....	145





## Liste des abréviations

- ADN	:	Acide Désoxyribonucléique
- Arg-1	:	Arginase-1
- ARN	:	Acide Ribonucléique
- CAA	:	Cancer Associated Adipocytes
- CAF	:	Cancer Associated Fibroblastes
- cDC	:	Cellules Dendritiques conventionnelles
- CMH	:	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
- CPA	:	Cellules Présentatrices d'Antigènes
- CTL	:	Cytotoxic T Lymphocyte
- DC	:	Cellules Dendritiques
- ER	:	Estrogen Receptor
- EPO	:	Erythropoïétine
- FIH	:	Factor Inhibiting HIF
- Foxp3	:	Forkhead box P3
- GATA3	:	Trans-Acting T-Cell-Specific Transcription Factor GATA-3
- GM-CSF	:	Granulocyte Macrophage Colony StimulatingFactor
- HER2	:	Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
- HIF	:	Hypoxia-Inductible Factor
- ICI	:	Immune Checkpoint Inhibitor
- IDO	:	Indoleamine 2,3-Dioxygenase
- IL-1	:	Interleukine 1
- IMC	:	Indice de Masse Corporelle
- INF $\gamma$	:	Interferon Gamma
- iNOS	:	Oxyde Nitrique Synthétase inductible
- ITAM	:	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
- iTreg	:	Lymphocytes T régulateurs inductibles
- LAG-3	:	Lymphocyte Activation Gene 3
- LAP	:	Latency-Associated Protein
- LN	:	Lymph Node
- LPS	:	Lipopolysaccharide
- LT	:	Lymphocyte T
- LT CD4	:	Lymphocyte T CD4+
- LT CD8	:	Lymphocyte T CD8+
- M-CSF	:	Macrophage Colony - Stimulating Factor
- MDSC	:	Myeloid-Derived Suppressor Cells
- MEC	:	Matrice Extracellulaire
- MMP	:	Métalloprotéinase matricielle
- moDC	:	Cellules Dendritiques inflammatoires

- MPEC	:	Memory Precursor Effector Cells
- NFAT	:	Nuclear Factor Of Activated T Cells
- NF-kB	:	Nuclear Factor-kappa B
- NK	:	Natural Killer
- NO	:	Oxyde Nitrique
- nTreg	:	Lymphocytes T régulateurs naturels
- OS	:	Overall Survival
- PBMC	:	Peripheral Blood Mononuclear Cell
- PD-1	:	Programmed cell Death 1
- pDC	:	Cellules Dendritiques plasmacytoïdes
- PDL-1	:	Programmed cell Death Ligand 1
- PFS	:	Progression Free Survival
- PGE2	:	Prostaglandine E2
- PgR	:	Progesterone Receptor
- SIRP	:	Signal Inhibitory Regulatory Protein
- STAT 1	:	Signal Transducer and Activator of Transcription 1
- TAA	:	Tumor Associated Antigen
- TAF	:	Tumor-Angiogenesis Factor
- TAM	:	Tumor Associated Macrophages
- T <sub>CM</sub>	:	LT Mémoires Centraux
- TCR	:	T Cell Receptor
- T <sub>EFF</sub>	:	LT Effecteurs
- T <sub>EM</sub>	:	LT Mémoires Effecteurs
- TGF-β	:	Tumor Growth Factor Beta
- TILs	:	Tumor Infiltrating Lymphocytes
- TIM-3	:	T cell Immunoglobulin and Mucin domain 3
- TLR	:	Toll Like Receptor
- TME	:	Tumor Microenvironnement
- TNBC	:	Cancers du sein triple négatifs
- TNFR-1	:	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
- TNFα	:	Tumor Necrosis Factor α
- Tr-1	:	Lymphocytes T Régulateurs producteurs d'IL10
- Treg	:	Lymphocyte T régulateur
- T <sub>RM</sub>	:	LT Résidents Mémoires
- TSA	:	Tumor Specific Antigen
- TSP1	:	Thrombospondine-1
- TSR	:	Thrombospondin type I repeats
- UV	:	Ultraviolet
- VEGF	:	Vascular Endothelial Growth Factor
- VEGF-R	:	Récepteur au VEGF

## Liste des Figures

Figure 1 : Données issues de l'observatoire global du cancer.....	23
Figure 2 : Données épidémiologiques du cancer en France Métropolitaine en 2017. Comparaison de l'incidence et de la mortalité chez les hommes et les femmes, prenant en compte la localisation des cancers.....	25
Figure 3 : Les « hallmarks » dans le cancer .....	27
Figure 4 : Schéma du microenvironnement tumoral.....	28
Figure 5 : Schéma représentant les différents types cellulaires du microenvironnement tumoral et leur impact. ....	30
Figure 6 : La polarisation des macrophages dans un contexte tumoral.....	33
Figure 7 : Activation lymphocytaire : théorie des 3 signaux. ....	36
Figure 8 : La cytotoxicité des lymphocytes T CD8+.....	37
Figure 9 : caractéristiques des sous-populations de LT-CD4 <sup>+</sup> .....	39
Figure 10 : Les différents sous-types de Treg .....	41
Figure 11 : Les différentes phases de l'immunoediting .....	43
Figure 12 : signaux activateurs et inhibiteurs du second signal. ....	46
Figure 13 : la signalisation de PD-1 .....	48
Figure 14 : Valeur pronostique des cancers du sein en fonction du stade de la maladie.....	53
Figure 15 : définitions des sous-types moléculaires du cancer du sein selon le consensus de St Gallen 2011.....	53
Figure 16 : Impact pronostique des sous-types moléculaires du cancer du sein sur la survie des patientes (au stade IV de la maladie).....	54
Figure 17 : Traitements des cancers du sein en fonction de la classification moléculaire décrite précédemment.....	55
Figure 18 : Impact d'un traitement ciblant la voie PD-1/PD-L1 sur l'immunité anti-tumorale. ....	57

Figure 19 : Extrait de l'article de J. Folkman (1971) .....	59
Figure 20 : « switch » angiogénique et ses principaux acteurs .....	60
Figure 21 : Schéma des modifications de la vascularisation tumorale au cours d'un traitement anti-angiogénique selon Jain .....	61
Figure 22 : Rôle du VEGF-A sur l'immunité : rationnel dans l'utilisation de molécules anti-angiogéniques dans le cancer.....	62
Figure 23 : Impact de l'hypoxie sur le système immunitaire .....	64
Figure 24 : Impact du taux d'O <sub>2</sub> sur HIF.....	65
Figure 25 : Gènes régulés par HIF au cours du processus métastatique .....	69
Figure 26 : 3 raisons pour tenter une nouvelle approche thérapeutique des TNBC.....	70
Figure 27 : Structures et domaines de la Thrombospondine humaine. ....	72
Figure 28 : Interactome de la TSP1 d'après Resovi, A., et al. (2014).....	73
Figure 29 : Synthèse des effets du TGF-β sur le système immunitaire .....	77

# I. Cancers : mieux les comprendre, pour mieux les traiter

## 1. Un peu d'histoire

Le cancer est aujourd'hui plus que jamais d'actualité. En effet, la prévention, le dépistage et une meilleure prise en charge des patients ont entraîné, dans nos sociétés, une prise de conscience collective et rendu ce terme moins tabou.

Il faut cependant garder à l'esprit que cette pathologie n'est pas nouvelle. Les premières traces de cancers ont été mises en évidence, par imagerie, sur des fossiles de dinosaures vieux de 70 millions d'années [1]. Des analyses récentes menées sur une momie retrouvée en Sibérie, datant de 2700 ans avant J.-C., mettent en évidence le plus vieux cas de cancer humain métastatique découvert à ce jour [2]. Les premiers cas humains documentés ont été retrouvés dans des écrits de l'ancienne Égypte découverts au 19<sup>ème</sup> siècle par Edwin Smith et George Ebers mettant ainsi en évidence que le cancer était déjà connu à cette époque.

Durant l'antiquité, Hippocrate (460-377 avant J.-C.), le premier, compare le cancer à un crabe par analogie à l'aspect des tumeurs qu'il observe. Les tumeurs sont en effet des formations arrondies entourées de prolongements semblables aux pattes d'un crabe. Galien (131-201 après J.-C.) reprend ultérieurement cette comparaison et rédigea le premier traité exclusivement dédié aux tumeurs [3].

Il faudra attendre l'invention du microscope pour mieux comprendre cette pathologie. Grâce à cette invention, Gaspard Asselli (1581-1625) découvrit le système lymphatique ce qui aboutira à une meilleure compréhension de la maladie. Suite à ces travaux, Henri François le Dran (1685-1770) explicita la formation de métastases à distance, à partir de la tumeur primitive localisée, par voie lymphatique et sanguine. Xavier Bichat (1771-1802) montra que les diverses localisations d'un cancer ne sont qu'une seule et même maladie. Enfin, en 1829, Joseph Récamier (1774-1852) publia un ouvrage sur le traitement du cancer dans lequel apparaît, la définition moderne du mot « métastases » [4].

La prise en charge spécifique des patients atteints de cancer débuta en 1740 avec l'ouverture à Reims du premier hôpital qui leur est dédié. Celui-ci fut construit par Jean Godinot (1661-1739) du fait qu'à cette époque la population croyait que le cancer était contagieux, les « cancéreux » ont donc été exclus des hôpitaux classiques par crainte d'une épidémie.

Concernant les traitements, la part belle a été faite, en tout temps, à la chirurgie mais assez rapidement les médecins se sont rendus compte que dans le cas de maladies avancées celle-ci était impossible, voire délétère pour le patient. Pour les traitements autres que la chirurgie et qui sont toujours d'actualité aujourd'hui, nous citerons ici bien évidemment la radiothérapie qui se

développa au début du XXème siècle. Ce sont les travaux de Marie Curie (1867-1934) avec la découverte du radium et du polonium, qui sont les éléments fondateurs de cette thérapie. Durant l'entre-deux-guerres, les rayonnements radioactifs (curiethérapie) ou les rayons X (röntgenthérapie) vont être largement utilisés pour tenter de traiter le cancer.

Après les premiers pas de la radiothérapie, il est également historiquement intéressant de s'arrêter quelques instants sur la découverte de la première chimiothérapie. Frederick Guthrie (1833–1886) fit en 1860, la première synthèse de ce qui se révélera l'une des armes chimiques les plus mortelles que le monde ait connu : le gaz moutarde. Deux chimistes allemands travaillant pour la société allemande Bayer AG, rendront la production de ce gaz à grande échelle possible. Destiné à l'armée allemande, la première utilisation de cette arme eu lieu en Juillet 1917.

*91 198, c'est le nombre de décès parmi les  
1,2 millions de soldats et civils exposés à  
ce gaz durant la première guerre mondiale.*

Cependant, en 1942, un premier patient atteint de lymphosarcome réfractaire à la radiothérapie est traité par ce gaz moutarde. En effet, depuis 1919, les médecins ont constaté que les survivants des attaques aux gaz moutarde voyaient leur moelle osseuse détruite et leurs globules blancs sanguins chuter. Différentes investigations furent alors menées, les premières observations des aspects anti-cancéreux du gaz moutarde sur modèle murin sont réalisées par Beremblum I. aux alentours des années 1930 [5].

Peu après c'est Alfred Gilman (1908-1984) et Louis S. Goodman (1906-2000) qui se penchent sur les effets thérapeutiques du gaz moutarde et ses dérivés. Après des essais prometteurs chez le lapin et la souris, le 27 Août 1942, Gilman et Goodman administraient à un patient du chirurgien Gustave Lindskog (1903-2002) la première dose intraveineuse de chimiothérapie (nommée alors substance « X »). Le patient vu son état s'améliorer et vécut 96 jours avant de décéder. Il faudra attendre 1946 pour que cette découverte soit révélée car depuis 1925, sous la pression de l'opinion publique, l'utilisation du gaz moutarde est interdite.

## 2. Epidémiologie

### 2.1 Quelques données mondiales

Le cancer touche l'ensemble de l'Humanité, mais il existe des différences entre les frontières locales, régionales et nationales en particulier lorsque l'on considère les types de tumeurs spécifiques plutôt que le cancer dans son ensemble.

Le cancer est la deuxième cause de mortalité à travers le monde (8,8 Millions de décès en 2015) [6]. Le cancer représente donc un enjeu majeur de santé publique puisqu'il cause près de 1 décès sur 6 à travers le monde.

Nous pouvons noter ici que 70% des décès associés au cancer sont localisés dans des pays avec des niveaux de revenu faible ou intermédiaire. Ceci s'explique notamment par une disparité des structures de diagnostic et de soins retardant le dépistage et la prise en charge des patients dans les pays pauvres. En effet, en 2017 seulement 30% des pays à revenu faible déclaraient être en mesure d'offrir des services de traitement contre 90% des pays présentant des revenus élevés. A cela, nous pouvons également associer une disparité liée au type de cancer observé, les pays à faible revenu présentent la plus grande proportion de cancers viro-induits (25%) [7].

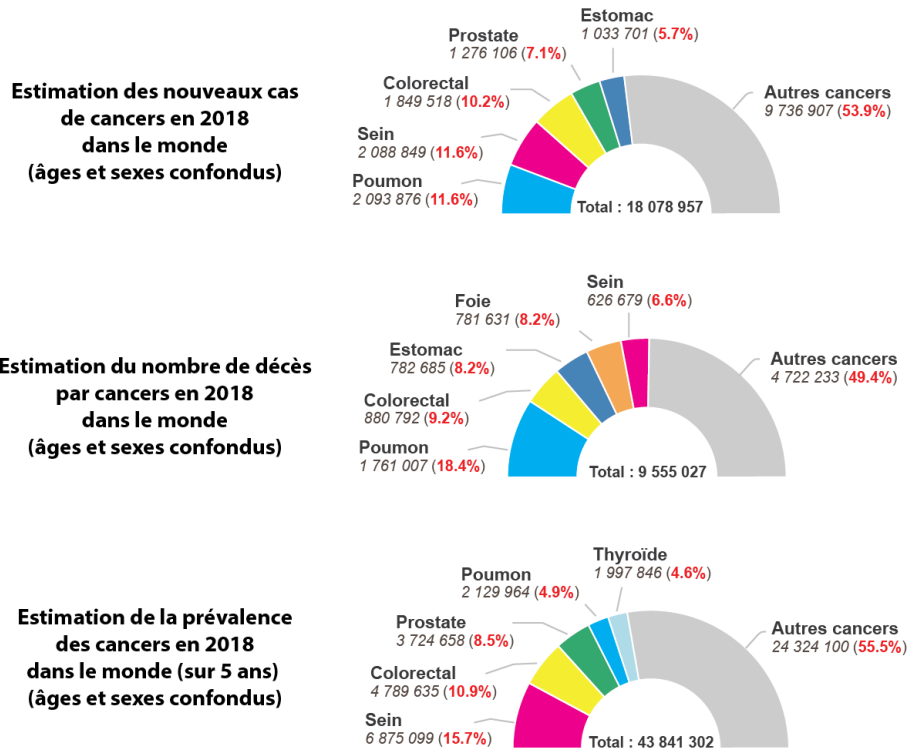


Figure 1 : Données issues de l'observatoire global du cancer (International Agency of Research of Cancer / World Health Organisation / => <http://gco.iarc.fr/>)

Les études épidémiologiques ont permis la mise en évidence de 5 principaux facteurs de risques. Le premier, le tabagisme est largement représenté puisqu'il est à l'origine de 22% des décès par cancer. Nous trouverons ensuite des facteurs comme l'alcoolisme et un indice de masse corporelle (IMC) élevé. Enfin, il a été mis en évidence que la faible consommation de fruits et de légumes ainsi qu'une absence d'activité physique sont également des facteurs de risque [8]. A titre d'exemple, en 2015 en France, il y a eu selon l'Institut National du Cancer, 346 000 nouveaux cas de cancer dont 41% sont des cancers évitables de part leur étiologie, et parmi ceux-ci, 50% sont attribués au tabagisme et à l'alcool.

En 2018, on estime qu'il y a eu 18 millions de nouveaux cas de cancers à travers le monde. Parmi ces cancers, ceux du poumon et du sein sont les plus représentés (11,6% des nouveaux cas de cancer chacun). Suivent le cancer colorectal (10,2%) et de la prostate (7,1%). Les estimations du nombre de décès liés aux cancers, pour cette même période, sont de 9,5 millions de décès à travers le monde. Le cancer le plus mortel est celui du poumon, il représente à lui seul 18,4% des décès. Le cancer colorectal (9,2%), de l'estomac (8,2%), du foie (8,2%) et du sein (6,6%) sont malheureusement également en tête de ce classement des cancers les plus mortels. La prévalence de cancer dans la population mondiale est de plus de 43 millions de personnes concernées sur une période de 5 ans. Le cancer du sein est ici le plus représenté avec 15,7% de cette prévalence (Figure 1).

L'impact économique de cette pathologie est également non négligeable. En 2010, on estime à 1160 milliards de dollars le coût annuel total du cancer [9]. Mais n'oublions pas le coût humain associé à cette pathologie. Derrière chaque annonce d'un nouveau cas de cancer se cache un visage individuel, accompagné des visages de la famille et des amis entraînés dans cet événement singulier. Une fois cette étape de diagnostic dépassé, nous avons pu voir que les expériences individuelles reflètent souvent les pires inégalités mondiales lors de la prise en charge.

## 2.2 Et en France ?

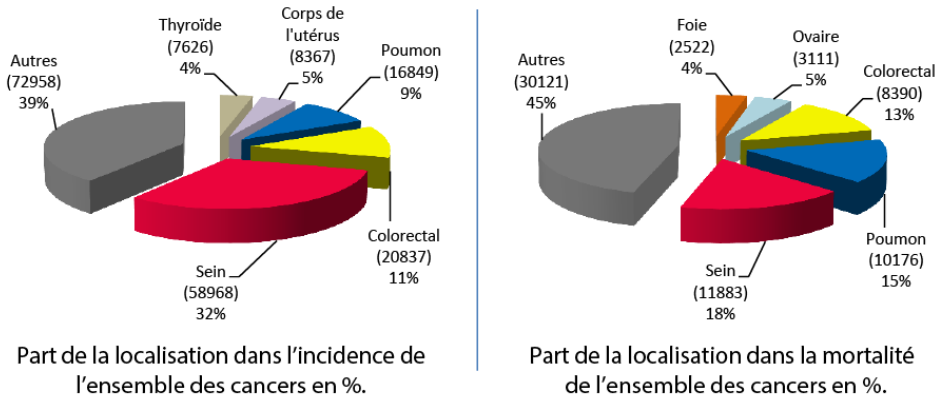
En France métropolitaine, 399 626 nouveaux cas de cancers ont été estimés en 2017 (214 021 hommes et 185 605 femmes). On constate une baisse du taux d'incidence des cancers chez les hommes (- 1,3 % par an entre 2005 et 2012) et à un ralentissement de la progression de ce taux chez les femmes (+ 0,2 % par an entre 2005 et 2012) [10].

Concernant le nombre de décès en 2017, 150 303 personnes sont concernées (84 100 hommes et 66 203 femmes). Notons ici que cette mortalité a diminuée de 1,5 % par an chez les hommes et de 1 % par an chez les femmes entre 1980 et 2012. Cette baisse est liée à des diagnostics plus précoces et à des traitements plus efficaces.



En France métropolitaine, le cancer avec l'incidence la plus élevée chez l'homme est celui de la prostate (23%) suivi de celui du poumon (15%). Cependant le cancer de la prostate ne concerne que 10% des décès, derrière le cancer colorectal (11%) et celui du poumon qui avec 25% se révèle être le plus mortel. Concernant les femmes, le cancer du sein a l'incidence la plus élevée (32%) et se révèle être également celui entraînant le plus de décès (18%). (Figure 2)

Incidence et mortalité projetée en 2017 chez la femme en France Métropolitaine



Incidence et mortalité projetée en 2017 chez l'homme en France Métropolitaine

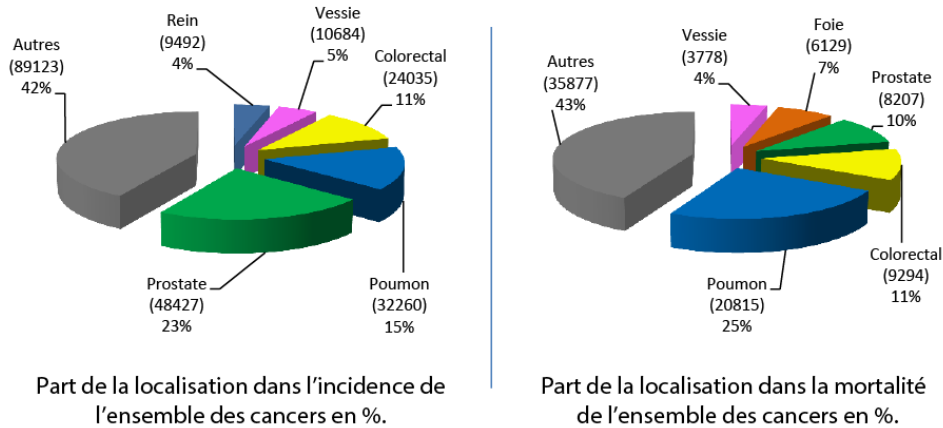


Figure 2 : Données épidémiologiques du cancer en France Métropolitaine en 2017. Comparaison de l'incidence et de la mortalité chez les hommes et les femmes, prenant en compte la localisation des cancers. (Données issues de <http://lesdonnees.e-cancer.fr>)

Il est également à noter que le risque d'un second cancer est augmenté en moyenne de 36 % par rapport au risque de cancer de la population générale.

Heureusement, la survie à 5 ans des patients atteints de cancer ne cesse de progresser depuis 1980 en France et ce pour tous les types de cancer. Un dépistage plus précoce, l'amélioration de l'efficacité des traitements existants et la mise sur le marché de nouveaux traitements

(immunothérapies, anti-angiogéniques, thérapies ciblées) contribuent au progrès de la survie en France. [11]

### 3. Pourquoi meurt-on encore du cancer aujourd'hui ?

Le développement du cancer est composé de plusieurs phases. Classiquement, les tumeurs sont classées en 4 stades qui représentent l'avancement de la maladie :

- **stade I** : qui correspond à une tumeur unique et de petite taille,
- **stade II** : qui correspond à une tumeur avec un volume local plus important,
- **stade III** : qui correspond à un envahissement des ganglions lymphatiques ou des tissus avoisinants,
- **stade IV** : qui correspond à une extension plus large dans l'organisme sous forme de métastases.

De ce classement va découler la prise en charge du patient. Au regard de ces différents stades, il est donc évident que plus le cancer sera pris en charge de façon précoce, plus il sera de bon pronostic. En effet, à titre d'exemple, la survie à 5 ans dans le cancer colorectal est de 93,2% pour le stade I, de 82,5% pour le stade II, de 59,5% pour le stade III et enfin de seulement 8,1% pour le stade IV [12].

Ces quelques données mettent donc en évidence que la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases à distance sont les principales causes de décès dans la pathologie cancéreuse.

## 4. Le cancer, une pathologie complexe

### 4.1 Les cellules tumorales

Le premier papillomavirus chez les mammifères a été décrit en 1933 par Richard Shope (1901-1966), qui a étudié les papillomes chez les lapins de garenne sauvages « verruqueux » [13]. Cette pathologie tumorale a ensuite été plus précisément décrite, ce nouveau modèle permet en effet aux chercheurs de montrer en 1935 que les tissus sains vont acquérir progressivement de nouveaux caractères jusqu'à l'apparition des cellules cancéreuses [14].

A partir de ces résultats, mais également en observant une incidence plus importante des cancers en fonction de l'âge, Michael J. Renan va estimer qu'il faut entre quatre et sept évènements

stochastiques pour conduire à une tumeur [15]. Ces anomalies successives vont conférer aux cellules tumorales un avantage de croissance résultant en une expansion clonale des cellules mutées.

Les anomalies cellulaires nécessaires à l'obtention de cet avantage de croissance ont été résumées par Hannahan et Weinber en 2000 sous la forme de 6 critères (ou "hallmarks") que sont: l'autosuffisance en signaux de prolifération, la capacité à induire la formation de nouveaux vaisseaux (angiogenèse), la capacité d'invasion et de dissémination à distance, l'insensibilité aux signaux inhibiteurs de prolifération, l'acquisition de capacités anormales de division ainsi que l'échappement aux processus de vieillissement cellulaire (sénescence) et de mort cellulaire programmée (apoptose) [16].

L'expression de certains « hallmarks » est aussi liée à l'interaction des cellules tumorales avec le microenvironnement. Ces découvertes concernant l'influence du microenvironnement tumoral sur la biologie du cancer, ont permis, en 2011, une révision des hallmarks initialement décrits. Weinberg et Hannahan soulignent entre autre l'importance du microenvironnement tumoral dans le processus d'angiogenèse et ajoutent aux hallmarks déjà décrits, la capacité des cellules tumorales à échapper au système immunitaire et la dérégulation du métabolisme (Figure 3) [17].

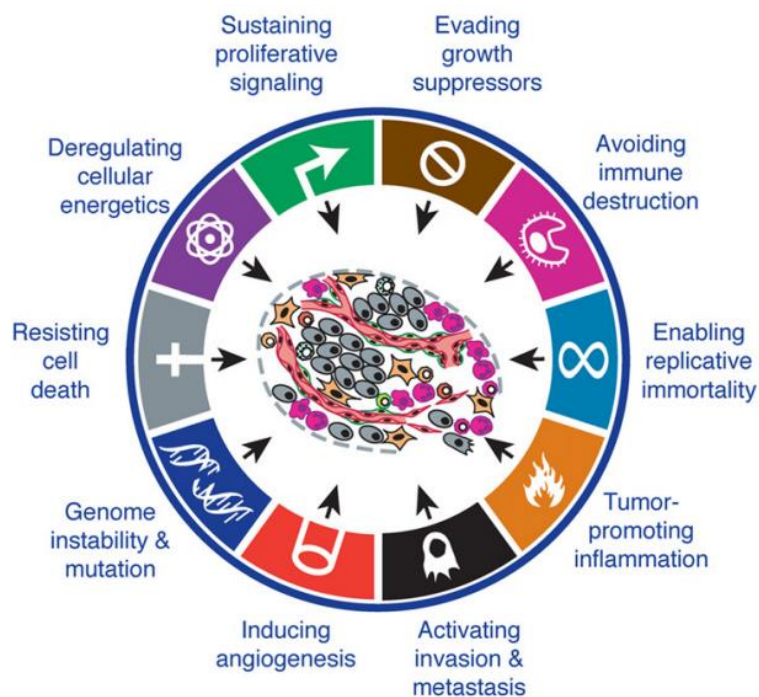


Figure 3 : Les « hallmarks » dans le cancer [17]

La forte dérégulation des cellules cancéreuses et les nombreuses mutations permettent aux tumeurs de s'adapter à la fois aux pressions de sélection de l'organisme mais également de résister aux traitements. On notera ici l'importance des cellules souches cancéreuses (CSC) dans ce processus de progression tumorale et de résistance aux thérapies [18]. En effet, ces CSC sont définies comme étant une petite sous-population distincte, capable de s'auto-renouveler, de se différencier, de donner naissance à des cellules de phénotypes divers et la source de la formation des cancers [19].

## 4.2 Microenvironnement tumoral

En 1889, Stephen Paget formule l'hypothèse du – seed and soil – (graine et sol) selon laquelle les métastases et donc les cellules tumorales (seed) privilégient certains organes pour se développer (soil) [20]. Il faudra attendre les années 1970 pour que cette théorie trouve écho dans la communauté scientifique et que l'on porte autant d'intérêt à étudier le microenvironnement tumoral que les cellules tumorales elles-mêmes.

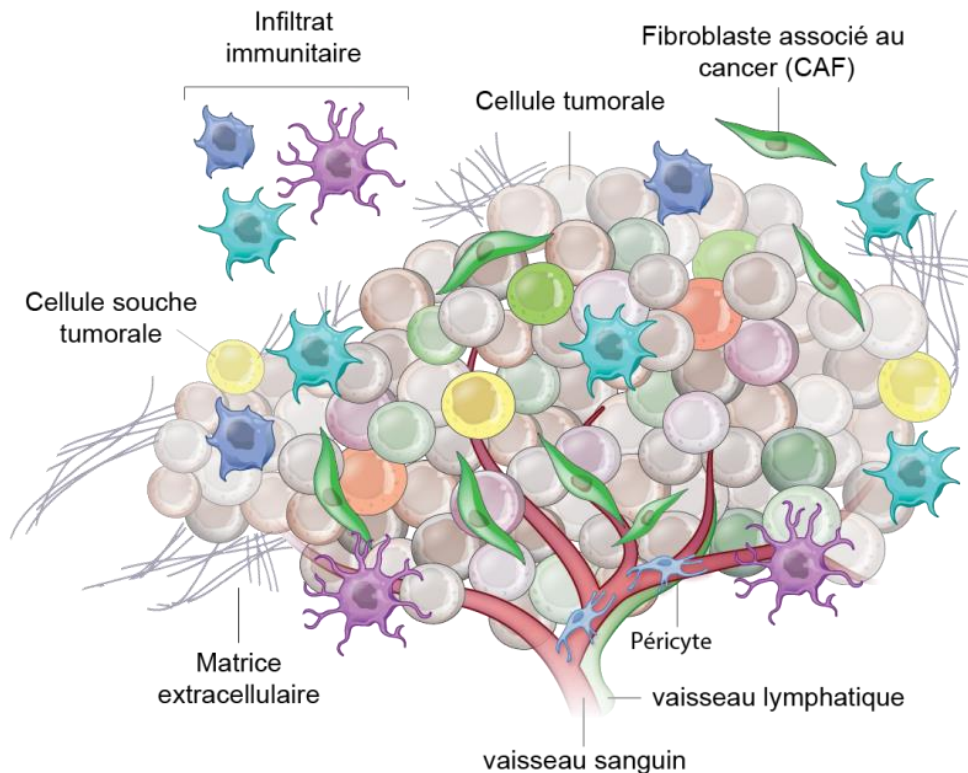


Figure 4 : Schéma du microenvironnement tumoral d'après la figure de M.R. Junttila & F.J. de Sauvage, Nature 2013.

Le cancer est donc une pathologie complexe du fait de la variabilité des cellules tumorales au sein d'une même tumeur mais également d'un microenvironnement extrêmement riche et diversifié. Le développement tumoral a lieu au sein d'un microenvironnement également appelé stroma tumoral. Celui-ci est composé de différents types cellulaires non tumoraux présents au sein d'une matrice extracellulaire support indispensable à la progression tumorale (Figure 4) [21, 22].

#### 4.2.1 Matrice extracellulaire

Le remodelage de la matrice extracellulaire est l'une des premières étapes dans la formation d'un microenvironnement tumoral [23]. Celle-ci est composée de nombreux constituants comme des fibres protéiques (collagène, élastine), des glycoconjugués structuraux (fibronectine, laminine), des glycosaminoglycanes (acide hyaluronique) et des protéoglycanes (héparane sulfate). Ces molécules sont retrouvées dans les tissus sains, mais les concentrations observées dans un contexte tumoral sont fortement modifiées [24]. On retrouve également des protéines matricielles comme l'ostéopontine, les tenascines ou les thrombospondines fortement régulées dans les tissus adultes, leur expression est largement augmentée dans le contexte tumoral [25-27]. Enfin, cette matrice extracellulaire est riche en enzymes de remodelage comme les métalloprotéinases matricielles (MMPs) qui vont favoriser la protéolyse du collagène et ainsi la dissémination métastatique [28, 29].

#### 4.2.2 Composants cellulaires

##### 4.2.2.1 Les cellules endothéliales

D'origine mésenchymateuse, les cellules endothéliales jouent un rôle crucial dans la structure des vaisseaux sanguins et lymphatiques. Dans les tissus adultes sains, la majorité des vaisseaux sanguins sont quiescents et l'angiogenèse n'a lieu que lors des cycles menstruels chez la femme ou lors de remodelage tissulaires liés par exemple à une blessure [30]. En 1971, Folkman mit en évidence l'importance de ces cellules dans le développement tumoral. De fait, il donna le postulat suivant : les tumeurs doivent nécessairement être vascularisées au-delà de  $2\text{mm}^3$  [31]. Nous pouvons noter ici, mais j'y reviendrai plus en détails, que cette néovascularisation n'est que peu efficace dans un contexte tumoral.

##### 4.2.2.2 Les adipocytes associés aux cancers

Il a été mis en évidence que les CAA (Cancer Associated Adipocytes) sont impliqués dans la progression tumorale [32]. En effet, les auteurs de cette étude montrent, qu'une lignée cellulaire de carcinome mammaire murin ne peut pas développer de tumeur lors d'une injection intradermique chez la souris. Par contre, ils mettent en évidence qu'une co-transplantation des cellules tumorales avec du tissu adipeux conduit à une prise tumorale mais également à la

dissémination métastatique des cellules cancéreuses. Cela s'applique également pour d'autres lignées tumorales, plusieurs études ont montré que la co-culture des cellules tumorales avec des adipocytes matures entraîne une augmentation des capacités invasives des cellules tumorales *in vivo* et *in vitro* [33].

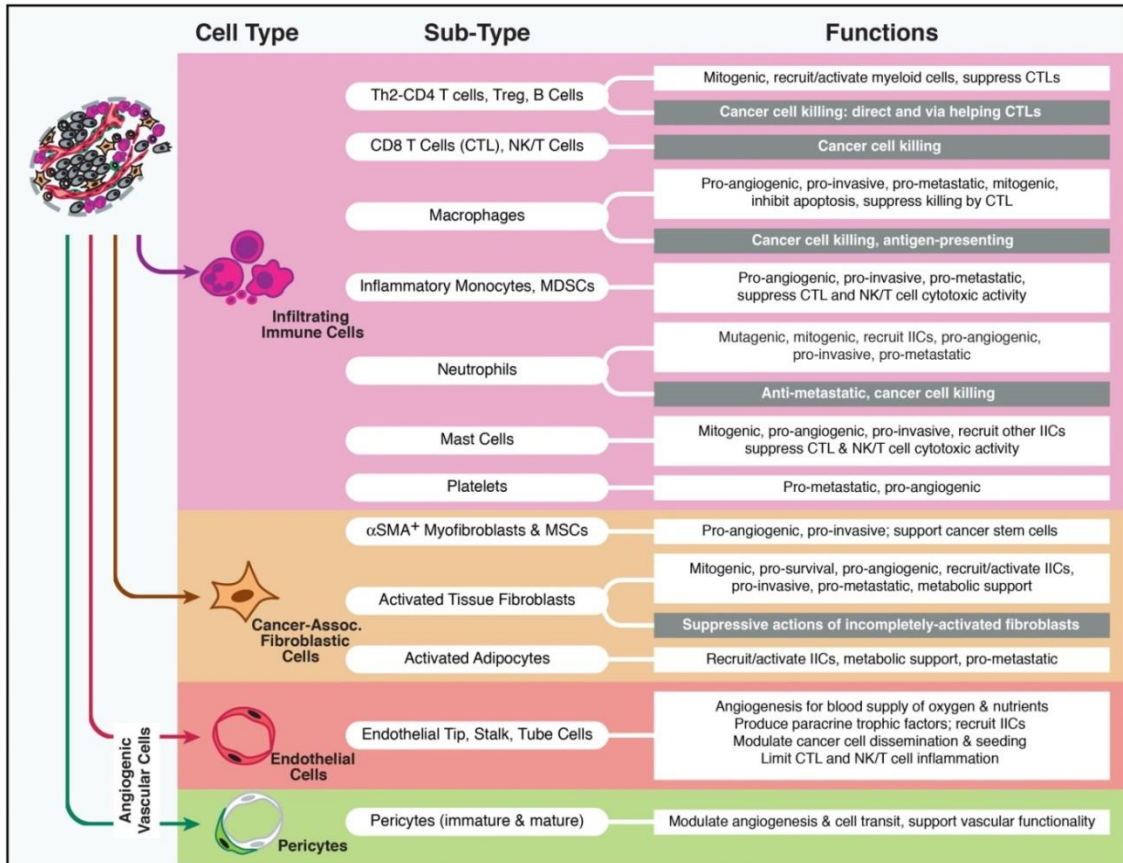


Figure 5 : Schéma représentant les différents types cellulaires du microenvironnement tumoral et leur impact. (Hanahan D. and all. Cancer Cell. 2012 [34])

Concernant le mécanisme, un rôle paracrine des adipocytes est envisageable. En plus de leur rôle dans le stockage des graisses, ces cellules sont en effet capables de sécréter de nombreuses adipokines (facteurs de croissance, cytokines...) mais également de la matrice extracellulaire. Enfin, nous pouvons rappeler ici que l'obésité est un facteur de mauvais pronostic dans certains cancers, comme celui du sein ou de la prostate [35].

#### 4.2.2.3 Les fibroblastes associés aux cancers

Les fibroblastes sont naturellement abondants dans les tissus sains dans lesquels ils jouent un rôle structural. En cas de blessure, dans un contexte non tumoral, ils sont activés temporairement le temps de supporter la réparation tissulaire. Ils jouent naturellement un rôle anti-tumoral mais les fibroblastes associés aux cancers peuvent favoriser de manière significative la progression

tumorale [36]. Contrairement aux fibroblastes tissulaires normaux, les CAF (Cancer-Associated Fibroblasts) ont une prolifération augmentée et une production accrue de matrice extracellulaire mais également de cytokines [37]. Etant donné leur production de matrice extracellulaire, les CAF sont englobés dans cette dernière et jouent un rôle prépondérant dans son remodelage. Ils sont à la fois source de collagène de type I, II, IV et V, de fibronectine et de laminine mais synthétisent également des protéases dégradant cette MEC [38, 39]. De nombreuses études mettent en évidence que les CAF vont supporter les processus de néoangiogenèse, de croissance tumorale ou encore de disséminations métastatiques en sécrétant différentes cytokines (TGF $\beta$ , VEGF, SDF-1...) [34, 36, 40, 41].

Il est également intéressant de noter que les CAF produisent de nombreuses cytokines pro-inflammatoires conduisant à une infiltration de la tumeur par des cellules immunosuppressives comme les Treg, les MDSC (Myeloid Derived Suppressor Cells) et les TAM (Tumor Associated Macrophages) [42].

#### 4.2.2.4 Les cellules immunitaires

De nombreuses cellules du système immunitaire, aussi bien inné qu'adaptatif, sont retrouvées dans l'infiltrat tumoral. Nous pouvons parler ici des TAM, des NK, des NKT, des cellules dendritiques, des lymphocytes T CD8+, des lymphocytes T CD4+, des Treg... (Figure 5).

Toutes ces populations seront décrites dans le chapitre II.

### 4.3 Dissémination métastatique

Le microenvironnement des cellules tumorales est un environnement complexe comme nous avons pu le voir précédemment. Différents éléments, comme l'immunité ou l'hypoxie, vont créer une pression de sélection sur les cellules tumorales très hétérogènes conduisant notamment au phénomène de dissémination métastatique. En effet, certaines cellules vont être capables d'accumuler suffisamment de caractéristiques nécessaires au processus métastatique et donc pouvoir s'établir à distance de la tumeur primaire. Les grandes étapes de la dissémination métastatique sont bien connues : perte d'adhésion cellulaire, augmentation de la motilité, capacité invasive des cellules tumorales (intravasation), survie dans la circulation sanguine, sortie de la circulation (extravasation) et enfin création d'un foyer tumoral à distance de la tumeur [43]. Cependant une fois les cellules tumorales établies à distance, elles peuvent soit immédiatement proliférer, soit rester en dormance. Ceci pose alors de nombreux problèmes pour la conduite thérapeutique à tenir et augmente considérablement le risque de rechute chez les patients [44].

## II. Immunosurveillance et cancer

### 1. Un organisme armé pour lutter

Le système immunitaire permet aux organismes pluricellulaires de maintenir la cohérence des cellules et des tissus qui le constituent et d'assurer son intégrité face aux agressions extérieures. Clé de voûte de l'évolution, le système immunitaire protège également l'organisme des perturbations internes, telles que le développement de cellules tumorales.

Pour y parvenir le système immunitaire possède la capacité de distinguer les différents constituants normaux de l'organisme (le « soi »), les constituants altérés (le « soi-modifié ») ou encore les agents pathogènes (le « non-soi »).

On distingue deux types de réactions du système immunitaire : la réaction immunitaire innée, commune à l'ensemble des organismes pluricellulaires et la réaction immunitaire adaptative apparue chez les vertébrés, il y a environ 500 millions d'années.

#### 1.1 Réponse précoce : immunité innée

La réaction immunitaire innée intervient toujours en première ligne. Elle est basée sur la reconnaissance de motifs spécifiques communs à un grand nombre de microorganismes pathogènes (PAMP : pathogen-associated molecular patterns). Ces motifs peuvent être ceux d'ADN viraux ou de constituants de la paroi bactérienne. La reconnaissance de ces motifs moléculaires induit un signal de danger conduisant à une réaction inflammatoire protégeant l'organisme.

##### 1.1.1 Les macrophages

Découverts par Elie Metchnikoff en 1884, ces cellules sont capables d'ingérer et de digérer des débris cellulaires ou des cellules cancéreuses entières par phagocytose [45, 46].

Les macrophages sont des effecteurs clés de la réponse immunitaire innée et une fois activés, ils sont capables de cytotoxicité tumorale directe et peuvent également sécréter des cytokines pour recruter d'autres cellules immunitaires.

Dans un contexte tumoral, les macrophages sont dénommés TAM pour Tumor-Associated Macrophages. Les TAM peuvent être de deux phénotypes principaux : les macrophages M1 dits anti-tumoraux (induits par l'INF $\gamma$  et le TNF $\alpha$ ) et les macrophages de type M2 dits pro-tumoraux (induits par le M-CSF, l'IL-4 et IL-13) [47] (Figure 6).



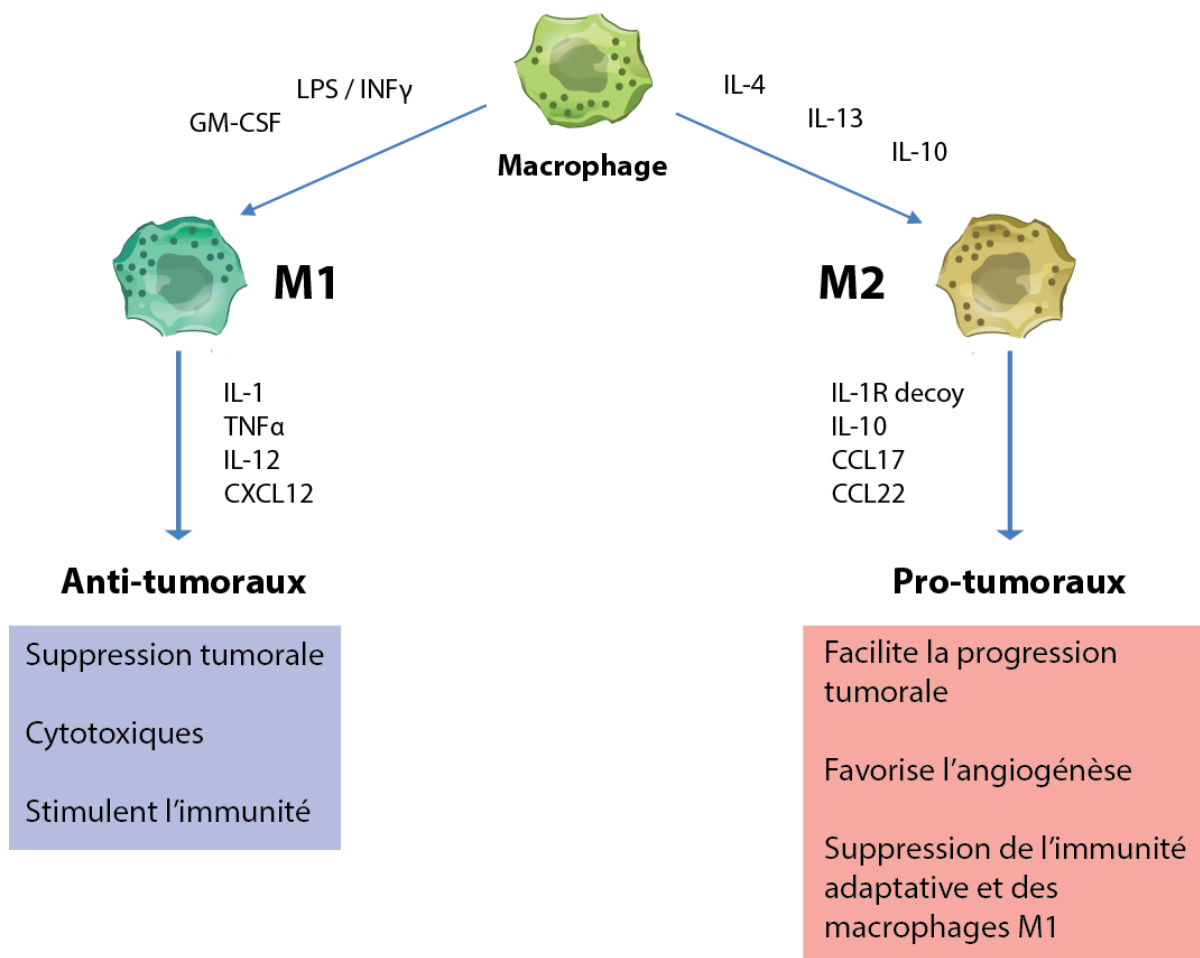


Figure 6 : La polarisation des macrophages dans un contexte tumoral [48].

Les macrophages activés de façon classique (phénotype M1) jouent un rôle important dans la première ligne de défense. Ils produisent de grandes quantités d'oxyde nitrique (NO) par l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) ainsi que des dérivés nitrés toxiques pour les cellules cancéreuses. Les macrophages de type M1, dans un contexte tumoral, sont également capables d'exprimer des cytokines pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et IL-12), mais aussi des molécules de surface cellulaire nécessaires pour la présentation d'antigène (CMH, CD80 et CD86) et facilitent ainsi des réponses de type Th1 [49].

En revanche, les macrophages activés de phénotype M2 jouent un rôle important dans la cicatrisation des plaies, la réparation et la régénération. Les macrophages M2 produisent de l'arginase-1 (Arg-1), du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta), de l'IL-10, et de la prostaglandine E2 (PGE2) qui vont favoriser l'angiogénèse par la production de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Ils expriment faiblement le CMH II. Dans un contexte tumoral, ils ont donc un rôle anti-inflammatoire et pro-angiogénique favorisant les réponses de type Th2 (Figure 6) [50].

### 1.1.2 Les cellules Natural Killer

Véritables gardiens de l'immunité innée, les cellules lymphoïdes NK jouent un rôle clé dans la surveillance anti-tumorale et le contrôle précoce des infections microbiennes [51]. Elles sont, en effet, capables de reconnaître et de lyser des cellules qui diminuent l'expression des molécules de CMH-I, comme les cellules tumorales, afin d'échapper à l'immunosurveillance par les lymphocytes T CD8+ (LT-CD8+). Ces cellules NK sont également activées lorsque des cellules cibles, suite à un stress, vont exprimer fortement des ligands qui interagissent avec les récepteurs activateurs (KAR : Killer Activation Receptor) situés à la membrane des NK. Les cellules NK activées vont également pouvoir favoriser la maturation des cellules dendritiques et modifier l'environnement cytokinique de façon favorable *via*, entre autres, la production d'INF- $\gamma$  [52, 53].

### 1.1.3 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont un rôle charnière entre l'immunité innée et adaptative. Elles sont capables de capturer et de dégrader des débris de cellules tumorales afin d'y présenter les peptides antigéniques tumoraux aux lymphocytes T CD4+ et CD8+.

Il existe différentes populations de DC ayant des fonctions et phénotypes très différents :

- Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) : elles sécrètent de l'interféron de type I indispensable à une réponse anti-virale. Ces cellules sont également capables d'exprimer de façon importante les molécules de CMH et les molécules de costimulation des LT.
- Les cellules dendritiques conventionnelles (cDC) : elles sont localisées soit dans les organes lymphoïdes, soit se sont des DC migratoires comme les cellules de Langherans situées dans l'épiderme ou des DC interstitielles situées dans les tissus conjonctifs. Après activation, elles ont la capacité de migrer vers des organes lymphoïdes secondaires pour y activer les LT. Ces cellules jouent également un rôle important dans la tolérance des auto-antigènes.
- Les cellules dendritiques inflammatoires (moDC) : elles n'apparaissent qu'en cas d'inflammation et sont issues de la différenciation de monocytes circulants.

Les DC immatures sont capables de capturer facilement des antigènes et elles expriment peu de molécules de costimulation et de CMH à leur surface. L'activation de ces cellules a lieu *via* l'activation de TLR (Toll-Like Receptor), de NLR (Nod-Like Receptor) ou *via* des cytokines dites pro-inflammatoires. Une fois activées, les cellules dendritiques deviennent matures et acquièrent une capacité de présentation des antigènes *via* les molécules de CMH en association avec d'autres molécules de costimulation. Cette capacité de présentation s'accompagne de la

possibilité de jouer sur l'environnement cytokinique pour orienter la différenciation des LT naïfs [54, 55].

## 1.2 Réponse spécifique : immunité adaptative

L'immunité adaptative est, quant à elle, dite « spécifique ». Chez les mammifères, elle fait intervenir des cellules d'origine hématopoïétique, les lymphocytes T et les lymphocytes B. Ces cellules sont activées grâce à la reconnaissance des antigènes pour lesquels elles présentent des récepteurs spécifiques TCR (T cell Receptor) ou BCR (B cell receptor) de forte affinité. Toutefois, ces processus d'apprentissage requièrent du temps et les acteurs de la réaction immunitaire adaptative ne sont pleinement actifs que plusieurs jours après le début d'une infection. Le bénéfice majeur de ce système est la mise en place d'une mémoire immunologique permettant à l'organisme de réagir plus rapidement lors d'une seconde infection.

### 1.2.1 Activation de la réponse immunitaire spécifique

#### 1.2.1.1 Présentation antigénique

Afin de permettre au système immunitaire de reconnaître le « soi » du « non soi », la majorité des cellules nucléées présentent à la surface des complexes de CMH-I associés à des peptides dérivés de protéines endogènes. Ce système permet aux LT CD8<sup>+</sup>, *via* leur TCR, de repérer des cellules infectées ou transformées qui présentent alors des antigènes anormaux, ce qui conduit à une élimination de la cellule cible par cytotoxicité.

Les lymphocytes T CD4 (LT CD4+), quant à eux, sont capables de reconnaître des peptides anormaux qui leurs sont présentés via des molécules de CMH de classe II. La particularité de cette présentation est qu'elle fait intervenir des peptides issus de protéines exogènes captées par des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Il est à noter que les CPA peuvent également réaliser une présentation croisée des antigènes exogènes en les chargeant sur des molécules de CMH-I alors qu'elles ne sont pas elles-mêmes infectées par le pathogène.

Enfin dans un contexte tumoral, deux types d'antigènes tumoraux peuvent être retrouvés [56].

- TSA (Tumor Specific Antigen) : ces antigènes sont spécifiques des cellules tumorales et ne sont jamais retrouvés dans des cellules saines. Ce sont des néoantigènes produits suite à des mutations géniques.
- TAA (Tumor-Associated Antigen) : ces antigènes sont enrichis dans les tumeurs mais leur expression peut être retrouvée au sein d'autres cellules.

Les TSA constituent des cibles de choix pour des thérapies anti-tumorales telles que des stratégies vaccinales ou l'utilisation d'anticorps monoclonaux.

### 1.2.1.2 La théorie des 3 signaux

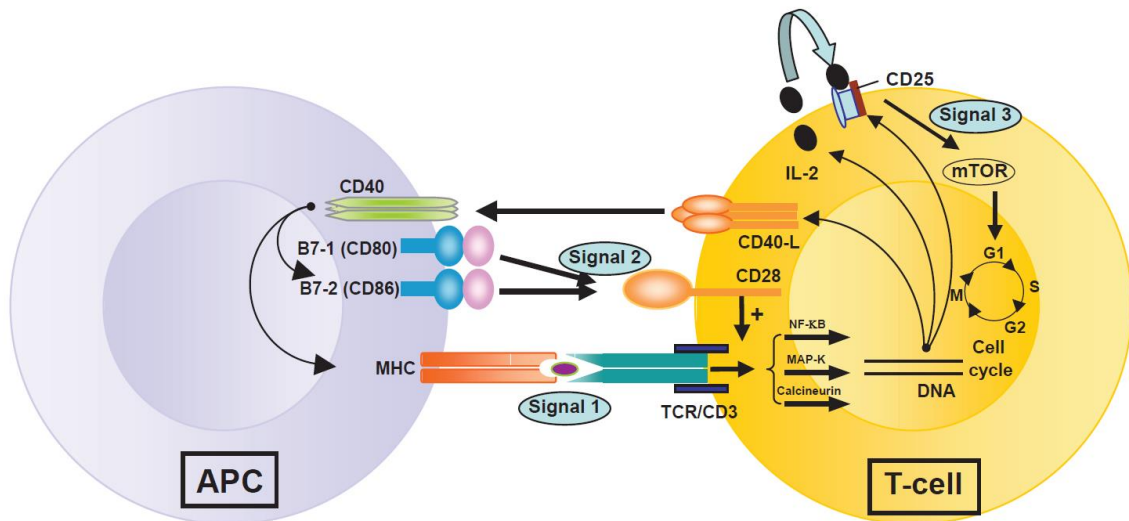


Figure 7 : Activation lymphocytaire : théorie des 3 signaux. [57]

L'activation des lymphocytes T passe par 3 étapes indispensables à l'enclenchement d'une réponse (Figure 7):

- Signalisation du TCR : composé de deux chaînes protéiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ), le TCR va reconnaître le complexe CMH/peptide exogène. Cette liaison est alors stabilisée grâce aux molécules CD4 et CD8 qui vont se lier respectivement au CMH-II et CMH-I. Le premier signal est ensuite conduit via le CD3 et ces motifs fortement conservés dans la partie intracellulaire, connu sous le nom d'ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif).
- Signal de costimulation : Les LT naïfs possèdent à leur membrane le récepteur CD28. Celui-ci va s'associer aux molécules costimulatrices CD80 (B7-1) et CD86 (B7-2) exprimées par les CPA ce qui conduira à l'activation du signal 2. L'absence de ce signal 2 conduit à un processus d'anergie du LT naïf.
- Environnement cytokinique : Les cytokines présentes dans l'environnement des LT vont permettre d'orienter la réponse immune notamment pour la différenciation des LT CD4+ (Th1, Th2, Treg...). Cet environnement est alors considéré comme étant le 3<sup>ème</sup> signal indispensable à l'activation lymphocytaire. Dans ce contexte, l'IL-2 joue un rôle majeur.

## 1.2.2 Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

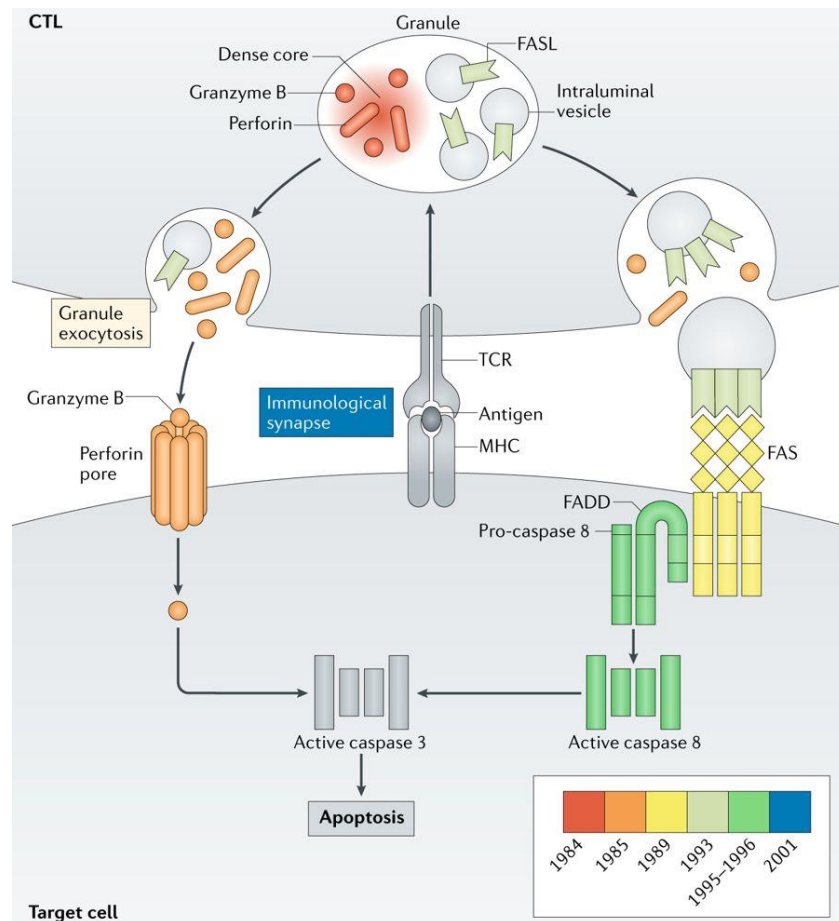


Figure 8 : La cytotoxicité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> [58].

Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (LT-CD8<sup>+</sup>) sont divisés en différentes populations. Parmi celles-ci, on distingue les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs qui n'ont pas encore rencontré d'antigène et n'ont donc pas été activés. Une fois activés par présentation antigénique, les LT-CD8<sup>+</sup> naïfs prolifèrent et quelques jours après stimulation deviennent des LT-CD8<sup>+</sup> effecteurs (Teff). Les Teff vont, grâce à la reconnaissance sur les cellules cibles de peptides anormaux présentés sur le complexe majeur d'histocompatibilité de classe 1 (CMH I), induire une réponse spécifique provoquant la lyse de cette cellule alors considérée comme anormale. S'en suit une phase de contraction de la réponse immune, lors de cette phase les Teff vont entrer, pour plus de 90% d'entre eux, en apoptose par un mécanisme dit d'AICD (Activation-Induced Cell Death) [59]. Les Teff restant, vont eux participer à la mise en place d'une mémoire immunitaire avec l'apparition de LT-CD8<sup>+</sup> de type mémoire centraux (Tcm) et de LT de type mémoire effecteur (Tem) [60].

Il n'est plus à prouver le rôle anti-tumoral des LT-CD8<sup>+</sup> que ce soit chez l'Homme ou dans les modèles animaux dans lesquels différents types de cancer ont été étudiés [61, 62]. Dans ce

contexte tumoral, Les LT-CD8<sup>+</sup> permettent une action précise, moins délétère pour les tissus environnant que la réponse inflammatoire. La cytotoxicité des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est dépendante de différents mécanismes moléculaires comme la perforine qui permet de créer des pores dans les membranes cellulaires des cellules cibles. Ils possèdent également des granzymes, ces protéases vont permettre un déclenchement, dans les cellules cibles, d'une cascade enzymatique conduisant à l'apoptose *via* les caspases. Cependant, les granzymes ne peuvent pénétrer directement dans les cellules cibles, elles ont besoin des pores formés par les perforines.

Les LT-CD8<sup>+</sup> produisent de façon importante l'INF $\gamma$  et le TNF $\alpha$ , ceux-ci permettent respectivement d'augmenter l'expression du CMH-I sur les cellules environnantes pour l'INF $\gamma$  et d'induire l'apoptose *via* l'interaction avec le TNFR1 pour le TNF $\alpha$ . L'INF $\gamma$  et le TNF $\alpha$  vont agir également sur le recrutement et l'activation des macrophages. Enfin, deux autres membres de la famille du TNF peuvent être exprimés par les LT CD8<sup>+</sup> : FasL (CD95L) et TRAIL. A l'instar du TNF $\alpha$ , FasL et TRAIL peuvent être sécrétés ou exprimés à la surface des LT CD8<sup>+</sup> et stimuler des récepteurs de mort conduisant à l'activation des caspases dans les cellules cibles. Ainsi, l'engagement de récepteurs de mort Fas (CD95), DR4 (TRAIL-R1) et DR5 (TRAIL-R2), exprimés à la surface des cellules cibles, conduit à leur apoptose (Figure 8).

Il est important de souligner que l'infiltration de tumeurs solides par les LT-CD8<sup>+</sup> est de bon pronostic [63]. Des études mettent également en évidence la corrélation de l'induction de LT-CD8<sup>+</sup> anti-tumoraux avec la réponse anti-tumorale observée non seulement dans des modèles murins mais aussi chez l'Homme [64, 65].

### 1.2.3 Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, une fois activés, présentent de nombreuses sous-populations. Cette hétérogénéité leur permet notamment d'orienter et d'adapter la réponse immune en fonction du pathogène rencontré (bactérie, parasite...) ou lors d'une réponse anti-tumorale. La plupart des sous-populations de LT-CD4<sup>+</sup> se distinguent par leur profil cytokinique (Figure 9). Historiquement, les Th1 et Th2 furent les premières sous-populations identifiées grâce à cette différence de profil [66]. Actuellement, cinq autres sous-populations ont été identifiées à la fois grâce aux différentes cytokines qu'elles produisent mais également d'après leurs fonctions biologiques : Th9, Th17, Treg, Th22 et Tfh [67].

Des études récentes ont mis en évidence que la différenciation des LT-CD4<sup>+</sup> n'était pas forcément terminale, une plasticité a été mise en évidence :

- Th2 → Th9 lors d'un environnement riche en TGF- $\beta$  [68].
- Treg → Th17 grâce à l'IL-6 [69]

- Th17 → Th1 en présence d'IL-12 [70] ou Th17 → Th2 par l'action de l'IL-4 [71]

Je parlerai ici un peu plus précisément des LT-CD4+ Th1, Th2, et Treg qui restent, à ce jour, les populations les plus étudiées.

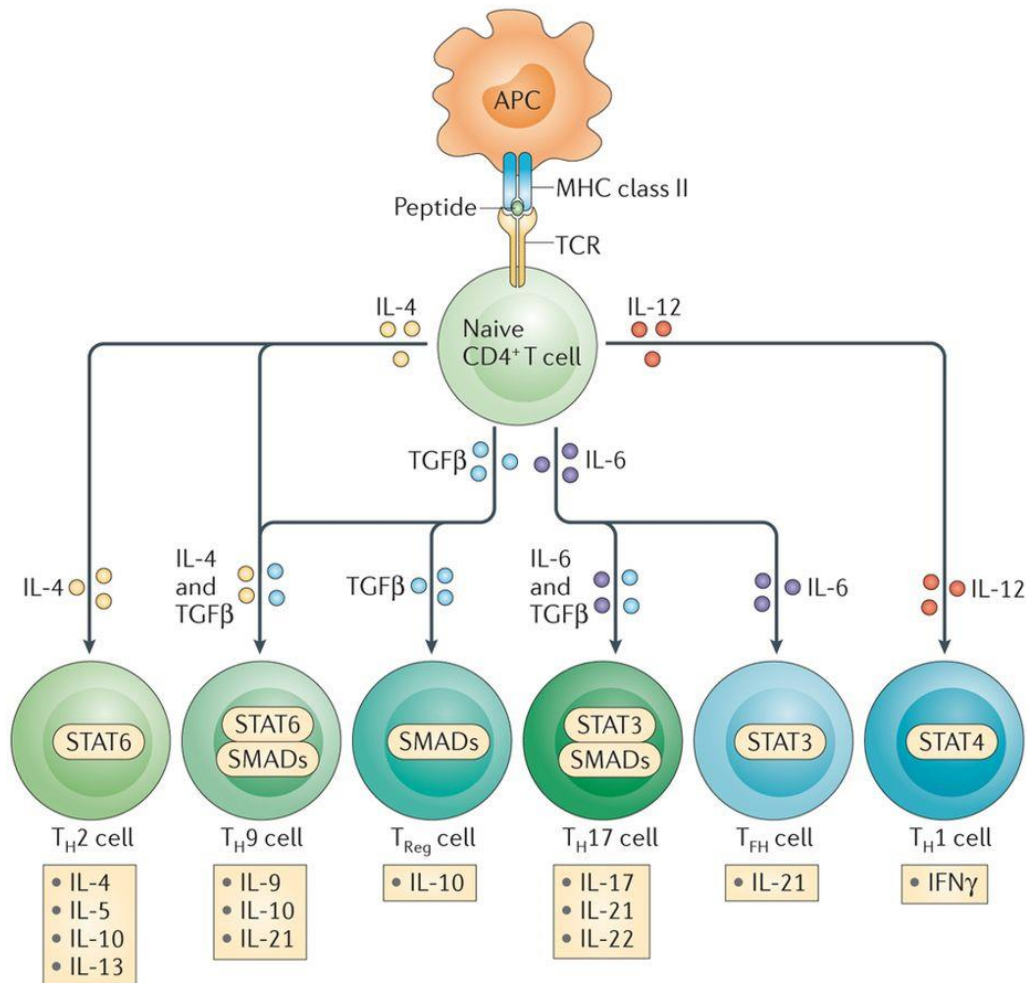


Figure 9 : caractéristiques des sous-populations de LT-CD4+ [72].

### 1.2.3.1 Th1

L'interleukine 12 (IL-12) et l'interféron γ (IFNγ) sont les cytokines indispensables à l'induction de la polarisation Th1 [73]. L'IL-12 est sécrétée en grande quantité par les APC activées afin d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse cytotoxique [74, 75]. L'IL-12 va également permettre le recrutement de cellules NK produisant de l'IFNγ. De nombreux facteurs de transcription interviennent au cours de la différenciation des cellules en Th1 (T-bet, STAT1, STAT4, Eomes...) [76, 77]. Cependant, le plus important de ces facteurs est T-bet car non seulement il est capable d'activer les gènes nécessaires à la différenciation Th1 mais il joue également un rôle suppresseur pour la différenciation des LT-CD4+ vers d'autres sous-populations (Th2, Th17) [77, 78]. T-bet

induit également une forte production d'INF $\gamma$  et d'IL-2 par les Th1. Ce qui conduit à une boucle d'amplification, l'INF $\gamma$  entraînant l'up-régulation de T-bet et de l'IL-12R $\beta$ 2. Toutefois, des études récentes ont identifié un nouveau rôle du T-bet en tant que répresseur transcriptionnel. En effet, T-bet, par l'induction du répresseur transcriptionnel Bcl-6, réprime l'activité de l'INF $\gamma$  dans les stades avancés de la différenciation Th1 afin d'éviter le développement de maladies auto-immunes qui pourraient découler d'une suractivation du système immunitaire [79].

L'orientation Th1 est nécessaire aux réponses immunes impliquant des pathogènes intracellulaires ou lors d'une réponse immune dans un contexte tumoral. Dans un contexte tumoral, l'INF $\gamma$  produit par les Th1 participe à la cytotoxicité et conduit, entre autre, à une augmentation des molécules de CMH-I à la surface des cellules tumorales et donc à une meilleure immunogénicité [67]. L'INF $\gamma$  permet également d'augmenter le recrutement des cellules NK et des macrophages ainsi que l'activité de phagocytose des macrophages [80]. L'IL-2 produite par les Th1 va, quant à elle, favoriser la prolifération des LT-CD8<sup>+</sup> et leur acquisition d'un profil cytolytique [81, 82]. Cette interleukine joue également un rôle dans l'établissement de LT-CD8<sup>+</sup> au phénotype mémoire [83].

#### 1.2.3.2 Th2

L'IL-4 et L'IL-2 sont indispensables à la différenciation des LT-CD4<sup>+</sup> vers un phénotype Th2. Pour les Th2, c'est GATA3 et STAT6 qui sont les facteurs de transcription indispensables au LT-CD4<sup>+</sup> pour l'engagement dans la lignée Th2. L'expression de STAT6, grâce à la signalisation de l'IL-4, entraîne l'expression de GATA3 [84-86]. GATA3 a ensuite trois fonctions principales : (i) favoriser la production de cytokines pro-Th2, (ii) induire la prolifération des Th2, (iii) inhiber la différenciation en Th1. Concernant l'inhibition de l'engagement dans la voie Th1, il a été montré que GATA3 était capable de réprimer STAT4 [85].

L'orientation vers une réponse Th2 est prise en cas de reconnaissance d'un parasite extracellulaire. La réponse Th2 joue également un rôle important dans les cas d'allergie ou d'asthme chronique notamment *via* l'IL-4 qui induit un « switch » vers la production d'IgE par les lymphocytes B. De plus, l'IL-4 augmente les récepteurs aux IgE sur les LB, les mastocytes et les basophiles [87, 88].

#### 1.2.3.3 Treg

Parmi les LT-CD4<sup>+</sup> différenciés en Treg, on distingue quatre populations : les Lymphocytes T régulateurs naturels « nTreg », les lymphocytes T régulateurs induits « iTreg » Foxp3<sup>+</sup>, les Tregs producteurs d'IL-10 « Tr-1 » ou de TGF- $\beta$  « Th3 » (Figure 10) [89]. Je ne parlerai ici que des deux premiers groupes historiquement découverts à savoir, les nTreg et les iTreg. Ces deux sous-groupes de Treg se distinguent par leur lieu de différenciation. En effet, les nTreg sont libérés du



thymus en exprimant déjà Foxp3 (Forkhead transcription factor) contrairement aux iTreg qui eux apparaissent lors du priming antigénique dans les organes lymphoïdes périphériques et qui présentent les marqueurs CD4+ CD25+ Foxp3+ à la fin de leur différenciation [90]. Le TGF- $\beta$  est la cytokine indispensable à l'initiation de la différenciation des LT naïfs vers les iTreg. L'engagement du TCR et la signalisation du TGF- $\beta$  entraîne l'activation de Foxp3, le facteur de transcription indispensable à la lignée Treg. Toutefois, Foxp3 n'est pas le seul facteur de transcription nécessaire à la différenciation complète en Treg ; Smad2, Smad3, STAT5 et NFAT sont également indispensables [91-93].

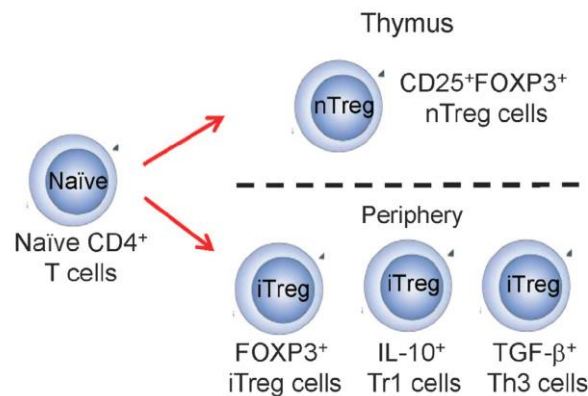


Figure 10 : Les différents sous-types de Treg [94] .

Les Treg jouent un rôle crucial dans le phénomène de tolérance des antigènes du soi, mais également dans la résolution de la réponse immunitaire après la disparition de l'antigène. Ce système de contrôle négatif va ainsi prévenir les maladies auto-immunes. Pour cela, les Treg produisent de nombreuses cytokines comme l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . L'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont des cytokines immunosuppressives permettant de supprimer la réponse pro-inflammatoire ce qui limite les dommages tissulaires lors d'une réponse immunitaire [95, 96]. Elles sont de plus capables d'abolir la production d'IgE, ce qui laisse penser qu'elles inhibent les réponses inflammatoires de type allergique [97]. Parmi les mécanismes immunosuppresseurs connus, les Tregs (i) produisent des cytokines immunosuppressives, (ii) attirent l'IL-2 *via* une forte expression du récepteur à l'IL-2, (iii) produisent de l'AMPc, qui transmis *via* les jonctions communicantes, inhibe les lymphocytes T conventionnels, (iv) expriment CD39, une ectonucléotidase qui transforme l'ATP en ADP, (v) induisent la mort des lymphocytes T conventionnels [98].

Telle une épée à double tranchant, les Treg sont donc indispensables dans la prévention des maladies auto-immune, les allogreffes ou même pour prévenir le rejet du fœtus durant la grossesse [99]. Cependant dans un contexte tumoral, les Treg sont décrits comme étant pro-

tumoraux du fait de l'inhibition du système immunitaire, contribuant au développement d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur [100].

#### 1.2.4 Mémoire immunitaire

La mémoire immunitaire est très certainement l'un des plus gros avantages de la réponse immunitaire adaptative, c'est d'ailleurs sur ce système que repose le principe de vaccination. En effet, après la première rencontre antigénique, les LT naïfs vont se différencier en lymphocytes T effecteurs (Teff) afin de permettre l'élimination de l'antigène présent dans l'organisme. Une fois l'antigène éliminé, la majorité des lymphocytes Teff vont entrer en apoptose. Cependant, il existe une sous-population lymphocytaire les MPEC (Memory Precursor Effector Cells) qui peuvent se différencier en lymphocytes mémoires possédant un potentiel de survie à long terme. Une fois de plus, la localisation de cette sous-population jouera un rôle dans leur dénomination : on nommera les LT effecteurs mémoires ( $T_{EM}$ ) localisés dans les tissus, et les LT centraux mémoires ( $T_{CM}$ ) présents dans les organes lymphoïdes secondaires.

Parmi les  $T_{EM}$  on distingue deux sous-populations :

- Les  $T_{EM}$  « classiques » ( $CCR7^+CD45RA^-$ ) capables de proliférer, de sécréter rapidement des cytokines et possédant des granules cytotoxiques présents dans les tissus non lymphoïdes et le sang.
- Les  $T_{EM}$  de différenciation terminale ( $T_{EMRA} / CCR7^-CD45RA^+$ ) possédant des fonctions effectrices immédiates mais de faibles capacités prolifératives.

Les  $T_{CM}$  eux sont  $CCR7^+CD62L^+CD45RA^-$  et proviennent des LT naïfs. Ils sont par conséquent moins différenciés mais ont de bonnes capacités prolifératives [101, 102].

Récemment, une nouvelle population de lymphocytes mémoires T CD8+ indispensables dans la protection anti-tumorale a été identifiée. Il s'agit des LT résidents mémoires ( $T_{RM}$ ). Les  $T_{RM}$  expriment classiquement l'intégrine CD103 mais également l'intégrine CD49a. Ces intégrines sont nécessaires non seulement à leur survie mais également à leur migration/rétention au sein des tumeurs [103-105].

## 2. Emergence du concept d'immunosurveillance

Dès 1900, Paul Ehrlich fut le premier à émettre l'idée que le système immunitaire était capable de réprimer l'apparition de tumeur et ainsi de limiter la fréquence des cancers chez les mammifères. Cette théorie a été reformulée par Sir Macfarlane Burnet et Lewis Thomas, 50 ans plus tard, sous le concept "d'immunosurveillance anti-tumorale". Selon ces auteurs, ce mécanisme

immunologique serait dépendant de la présence d'antigènes spécifiques à la surface des cellules tumorales permettant ainsi au système immunitaire de reconnaître ces cellules et de les détruire.

C'est seulement à la fin des années 1990 et, grâce à l'amélioration des modèles de souris immunodéficientes, que certains groupes ont réexploré l'influence du système immunitaire dans le contrôle du cancer. Shankaran et al. ont ainsi pu démontrer que les souris insensibles à l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) (souris déficientes pour le récepteur à l'IFN $\gamma$  ou pour le facteur de transcription STAT-1 sous-jacent), ou les souris déficientes en lymphocytes T et B (RAG2 -/-) étaient plus susceptibles à la formation de tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes [106, 107].

Chez l'Homme, le rôle du système immunitaire dans le contrôle du développement tumoral est suggéré par l'augmentation de l'incidence de certains cancers (pulmonaires, cutanés et coliques) dans des cohortes de patients immunodéprimés (infection par le VIH ou traitement immunosuppresseur secondaire à une transplantation) [108-110]. De plus, plusieurs études ont montré que les lymphocytes infiltrant les tumeurs pouvaient limiter la croissance tumorale et étaient corrélés à un meilleur pronostic dans différents cancers (cancer du sein [111], mélanome [112, 113], cancer colorectal [114]). Toutes ces données permettent de conclure que le système immunitaire peut fonctionner comme un système de suppression des tumeurs.

### 3. Immunoediting

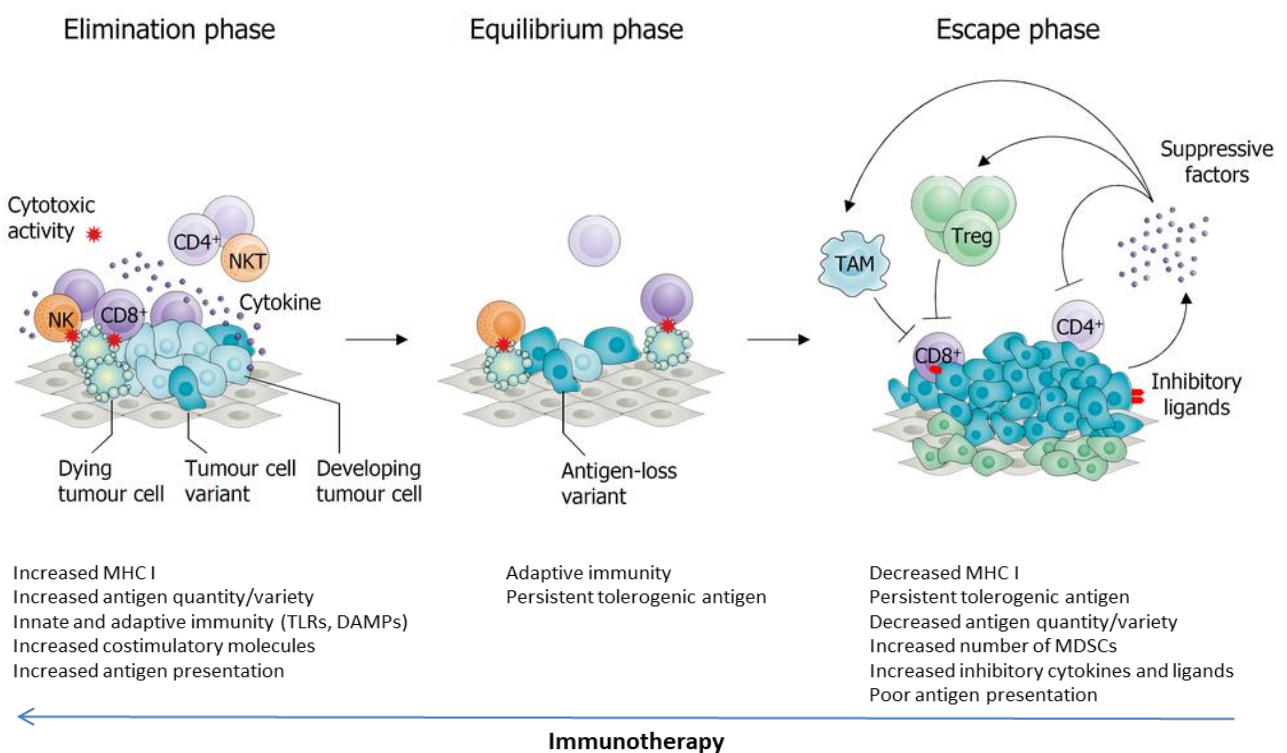


Figure 11 : Les différentes phases de l'immunoediting [115]

Suite à l'observation de la forte immunogénicité des tumeurs chez des souris immunodéficientes RAG2-/- (ne possédant ni LT, ni LB, ni cellules NK) et comparativement à celle bien plus faible observée chez des souris immunocompétentes, les chercheurs ont émis la théorie des trois E (Elimination – Equilibre - Echappement) (Figure 11) [116].

- **Elimination** : Cette phase représente ce qui est observé le plus couramment chez un individu sain. Il y a alors mise en place d'une réponse cytotoxique efficace, impliquant des NK pour la réponse innée ou des LT CD8+ pour la réponse adaptative, stoppant nette une éventuelle progression tumorale. L'initiation de cette réponse intervient dès le début du remodelage du stroma qui entraîne inévitablement la production de cytokines pro-inflammatoires et donc le recrutement de cellules spécialisées de l'immunité. L'augmentation des cytokines pro-inflammatoires dans le microenvironnement peut provenir également de cytokines produites par les cellules tumorales elles-mêmes [117].
- **Equilibre** : Lors de cette phase un équilibre dynamique se met en place. Les cellules tumorales ayant survécu à l'élimination sont soumises à une pression de sélection de la part des lymphocytes capable de contenir mais pas de détruire toutes les cellules tumorales. Lors de cette étape une sélection Darwinienne des cellules tumorales va s'opérer du fait de la pression de sélection mais également avec la capacité intrinsèque des cellules tumorales à accumuler les mutations. C'est très probablement la phase la plus longue des trois. En effet il n'est pas rare de voir des tumeurs humaines se développer 20 ans après l'exposition au cancérigène et la détection clinique de la tumeur [118].
- **Echappement** : Les cellules tumorales parvenues à accumuler les « bonnes » mutations lors de la phase d'équilibre ont désormais la capacité de proliférer malgré la présence du système immunitaire. En effet, ici les cellules peuvent échapper à l'immunosurveillance anti-tumorale par différents mécanismes que je détaillerai dans le paragraphe suivant.

#### **4. Les mécanismes d'échappement**

Les variants de cellules tumorales sélectionnées lors d'un processus Darwinien par le système immunitaire vont alors pouvoir utiliser différents mécanismes pour échapper au contrôle de l'organisme :

- **Perte d'expression des antigènes tumoraux** : cette anomalie cellulaire est principalement liée à l'acquisition de nouvelles altérations génétiques sélectionnées et aboutissant à la formation d'une tumeur faiblement immunogénique qui devient presque invisible pour le

système immunitaire. On peut également citer ici la perte d'expression des molécules du CMH ou même de molécules de translocation de peptides antigéniques comme les TAP (transporter associated with antigen processing).

- Augmentation de l'expression de molécules anti-apoptotiques : cette seconde modification intrinsèque des cellules tumorales leur permettant d'échapper au système immunitaire est l'augmentation des résistances aux effets cytotoxiques du système immunitaire (induction de mécanisme anti-apoptotique via l'activation de STAT3, ou l'induction de BCL-2)
- Expression de molécules favorisant l'apoptose des lymphocytes : avec l'expression de molécules comme Fas-L ou TNF.
- Production de cytokines immunosuppressives : TGF $\beta$ , IL-10
- Altérations métaboliques : indolamine-2,3-dioxygénase (IDO), arginase, CD39, CD73
- Recrutement de cellules immunosuppressives : avec l'apparition de cellules dans le microenvironnement tumoral comme les LTreg, les macrophages de type M2 et les MDSC qui participent à l'inhibition de l'activité des lymphocytes cytotoxiques.
- Favoriser l'anergie et/ou l'épuisement des lymphocytes T effecteurs intratumoraux : Ce mécanisme qui conduit une nouvelle fois au maintien de la prolifération tumorale permet d'abolir les fonctions des lymphocytes T effecteurs intratumoraux. (voir chapitre 4.1 Phénomènes d'anergie et d'exhaustion)

Ces phénomènes d'immunosuppression et d'échappement ne vont cesser de s'amplifier au cours de l'histoire de la maladie [119, 120].

## 4.1 Phénomènes d'anergie et d'exhaustion

L'anergie et l'exhaustion sont deux mécanismes aboutissant à l'inhibition des fonctions effectrices des lymphocytes T (cytotoxicité, production de cytokines).

Comme nous avons pu le voir précédemment l'activation d'un lymphocyte T spécifique d'un antigène nécessite plusieurs signaux. Le premier est basé sur la reconnaissance spécifique par son TCR d'un complexe CMH-peptide antigénique. Cette reconnaissance est ensuite suivie de l'interaction d'une molécule de co-stimulation exprimée par le LT (CD28) avec ses ligands (CD80 /CD86) exprimés par la cellule présentatrice d'antigène. Cependant en l'absence de ce second signal le lymphocyte T est non réactif au stimulus antigénique et devient anergique [121]. Il a également été montré que dans un environnement tumoral les CPA n'expriment que faiblement les molécules de costimulation favorisant ainsi le développement de ce phénomène d'anergie [122, 123].

Cependant, il faut garder à l'esprit que cette théorie des 3 signaux est assez simpliste et que l'on sait désormais que les mécanismes d'activation des lymphocytes T sont beaucoup plus

complexes. En effet la découverte récente de molécules de co-stimulation inhibitrices, comme PD-1, CTLA4, LAG3, TIGIT et Tim3, implique que le second signal serait le résultat d'une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs (Figure 12). De plus, l'induction de l'expression de certaines de ces molécules de co-stimulation au cours de l'activation des lymphocytes T est en faveur d'un modèle dynamique permettant de moduler la fonctionnalité de ces cellules tout au long de la réponse immunitaire adaptative [123].

L'expression de molécules inhibitrices telles que PD-1 est indispensable lors de la phase de contraction de la réponse immunitaire. Par exemple, lors d'une infection virale aiguë, l'expression de PD-1 augmente de manière précoce à la surface des lymphocytes T puis diminue après élimination du pathogène [124].

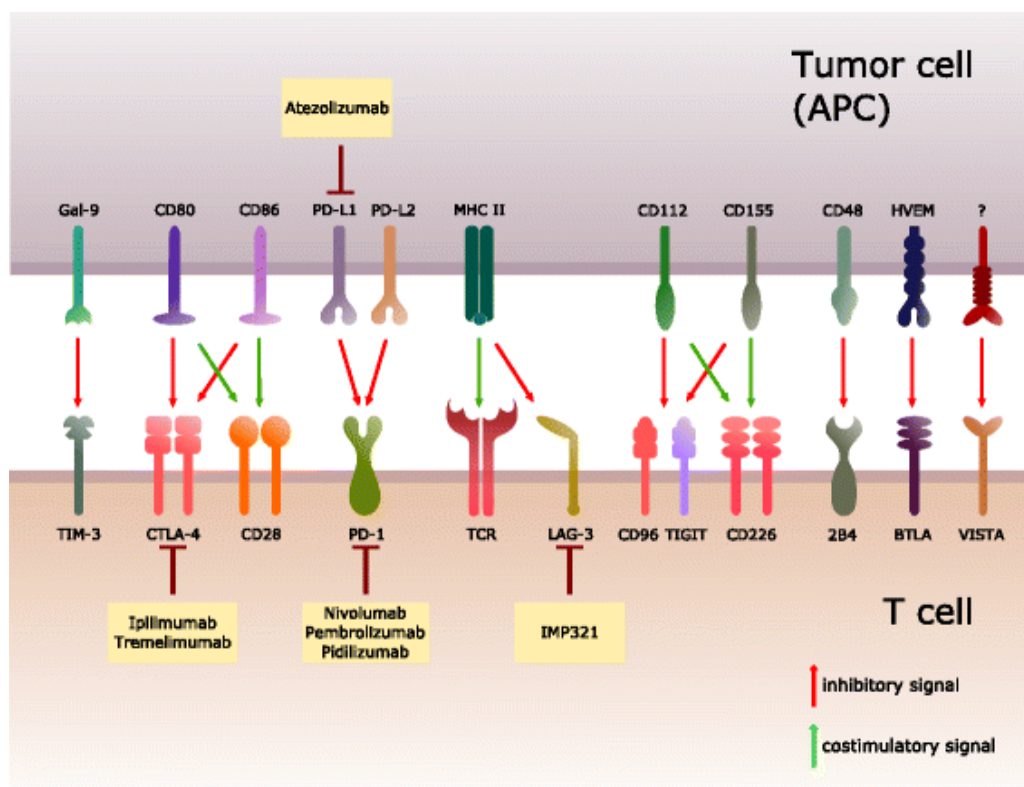


Figure 12 : signaux activateurs et inhibiteurs du second signal. [125]

Cependant, lors d'une infection virale chronique ou dans un contexte tumoral, les lymphocytes T expriment de façon persistante de nombreuses molécules de co-stimulation inhibitrices qui sont associées à une perte progressive de leurs fonctions effectrices. Blackburn montre en 2009, dans un contexte viral chronique, que l'accumulation de co-récepteurs inhibiteurs différents à la surface des lymphocytes T entraîne une perte de fonction plus importante de ces cellules [126]. Cette perte de fonctions appelée "exhaustion ou épuisement" est un processus hiérarchisé où la perte de certaines fonctions, comme la production d'IL-2, la capacité de prolifération et la cytotoxicité,

surviennent précocement, contrairement à la sécrétion d'IFN $\gamma$  qui persiste jusqu'à un stade d'exhaustion avancée.

Les observations réalisées lors de maladie chronique semblent mettre en avant la persistance antigénique comme étant impliquée dans ces phénomènes d'exhaustion mais les mécanismes d'induction et de maintien de l'exhaustion sont à l'heure actuelle mal connus. Parmi les molécules de co-stimulation inhibitrices, exprimées de façon prolongée et en grande quantité à la surface des lymphocytes T et jouant un rôle majeur dans ces phénomènes, on trouve PD-1, Tim3 et CTLA4 qui sont également appelés «immune checkpoints ». La connaissance de ces molécules de co-stimulation inhibitrices et l'utilisation récente d'anticorps dirigés contre elles, à visée thérapeutique, ont permis d'obtenir des résultats prometteurs en immunothérapie anti-tumorale [127, 128].

## 4.2 L'exemple de PD-1 (Programmed Cell Death-1)

PD-1 (CD279), a été découvert par Tasuku Honjo [129], qui vient d'obtenir le prix Nobel de Physiologie et de Médecine en 2018 pour ses travaux remarquables [129]. PD-1 est décrit comme étant un récepteur transmembranaire, appartenant à la superfamille des immunoglobulines, exprimé à la membrane cellulaire sous forme de monomère. L'expression de PD-1 peut être observée sur des cellules de l'immunité innée (Natural Killer (NK), monocytes et certaines cellules dendritiques) mais également sur des cellules de l'immunité adaptative (sur les lymphocytes T (CD4+ et CD8+), les lymphocytes B). L'expression de PD-1 est alors généralement inductible, et dans le cas des lymphocytes, elle est augmentée après activation.

Il est à noter que deux ligands de PD-1 ont été décrits: PD-L1 (B7:H1, CD274) et PD-L2 (B7-DC, CD273) et que ces ligands diffèrent concernant leur affinité pour PD-1 (PD-L2 est 3 fois plus affin que PD-L1 pour PD-1). Ces deux ligands présentent également une différence d'expression: PD-L2 n'est exprimé que sur les macrophages, certaines cellules dendritiques et certaines cellules B, tandis-ce que le profil d'expression de PD-L1 est extrêmement large, portant sur des cellules hématopoïétiques (CPA, lymphocytes T) mais également non hématopoïétiques [130].

Si les thérapies anti-tumorales utilisant des anti-PD-1 ou anti-PD-L1 ont vu le jour, c'est notamment au regard de l'expression massive de PD-L1 et PD-L2 dans la majorité des tumeurs murines et humaines [131] et des effets thérapeutiques de ces anticorps dans des modèles précliniques de cancers [132].

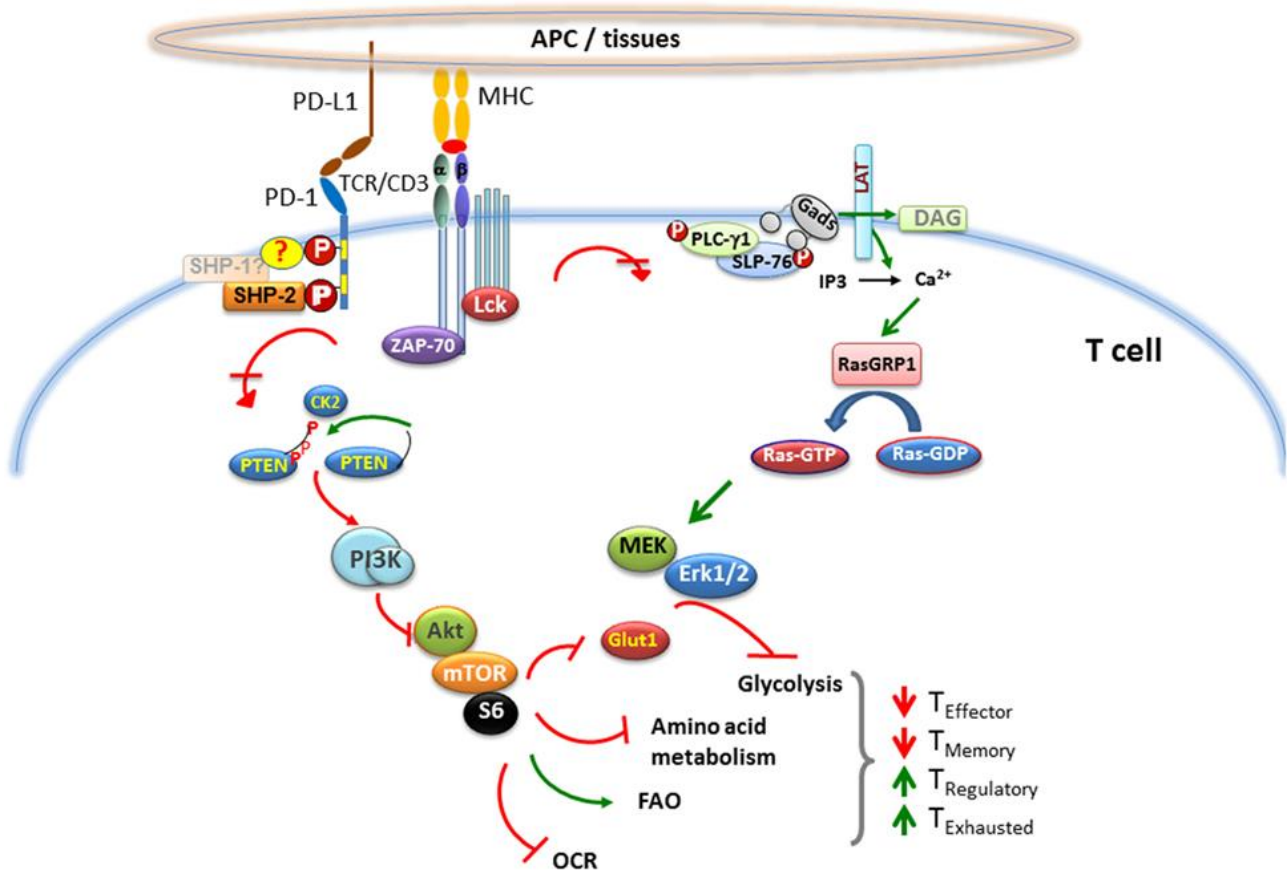


Figure 13 : la signalisation de PD-1 [133]

D'un point de vue moléculaire, l'engagement de PD-1 sur les lymphocytes T entraîne une phosphorylation de ses motifs inhibiteurs (ITIM : Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif et ITSM : Immunoreceptor Tyrosine-based Switch Motif) puis un recrutement des protéines tyrosine phosphatases SHP-2 qui vont réguler négativement les voies PI3K et AKT et ainsi bloquer la prolifération, diminuer la survie, abolir la production de cytokines et enfin inhiber l'activité cytolytique. Alors on observe une modification de la réponse immunitaire avec la diminution de l'activité des LT<sub>EFF</sub> et LT<sub>MEM</sub> au profit des LTreg et des LT épuisés, ce qui conduit nécessairement à une réponse immunitaire moins efficace.

Chez les patients atteints de tumeurs solides, les traitements anti-PD-1 ou anti-PD-L1 ont apporté de réels gains sur la survie des patients ce qui souligne une fois de plus l'importance de la voie PD-1/PD-L1 dans l'exhaustion des lymphocytes T. En effet, dans plus de 15 types de cancers différents, une efficacité clinique de ces traitements a été mise en évidence comme dans le mélanome, le cancer du rein ou le cancer de la vessie [134, 135]. Cependant, il existe toujours des types de cancers réfractaires à ces thérapies mais également des patients présentant une résistance après traitement par anti-PD1 conduisant alors à une rechute [136, 137]. Il est donc primordial de ne pas perdre de vue que le cancer est une maladie complexe. Il est désormais rare



de n'avoir recours qu'à un seul type de traitement mais les associations thérapeutiques sont maintenant privilégiées afin d'améliorer l'efficacité de la prise en charge des patients. L'anti-PD-1 a notamment été associé à l'inhibition d'autres checkpoints inhibiteurs comme l'anti-CTLA-4 (clinicalTrial.gov; NCT02205333 / NCT01303705) ou l'anti-LAG3 (clinicalTrial.gov ; NCT01968109) afin de bloquer de manière synergique ce phénomène d'exhaustion. D'autres molécules associées à l'anti-PD-1 vont permettre un remodelage plus large du microenvironnement afin d'obtenir une réponse anti-tumorale efficace. Nous pouvons noter ici l'association à un anti-VEGF (clinicalTrial.gov; NCT0145410), la radiothérapie (ClinicalTrial.gov; NCT0261758) ou encore à des chimiothérapies, comme la doxorubicine, induisant la mort immunogénique (ClinicalTrial.gov; NCT02423954) [134].

### III. Cancer du sein

*1 Française sur 8 sera concernée  
par le cancer du sein au cours de sa vie.*

#### 1. Généralités

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme puisqu'il représente un tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancer dans cette population. En effet, en France, cette pathologie entraîne 11 000 décès par an et plus de 50 000 nouveaux cas sont détectés chaque année. Parmi ces nouveaux cas, la majorité des patientes a entre 50 et 70 ans lors du dépistage. C'est également le cancer hormonodépendant le plus représenté, bien avant celui de l'endomètre et celui de la prostate.

L'étude de Belot met en évidence une augmentation de l'incidence du cancer du sein en France entre 2000 et 2005 (+2,1% chaque année en moyenne) [11]. L'auteur constate également une diminution de la mortalité par cancer du sein lors de cette même période (-1,3% par an en moyenne). Ces deux phénomènes trouvent leur explication dans l'apparition d'un dépistage organisé conduisant à une prise en charge plus précoce mais aussi la mise en place de nouveaux traitements plus efficaces. Cette prise en charge précoce permet le plus souvent un diagnostic avant la phase métastatique de la maladie.

Différents facteurs de risque ont été identifiés dans l'apparition de ce cancer, on citera ici uniquement quelques exemples des trois principales catégories représentées :

- Facteurs de risques hormonaux : puberté précoce (<10 ans), absence d'allaitement, nulliparité, obésité ou encore une ménopause tardive (>55 ans).
- Facteurs de risques familiaux : antécédents familiaux de cancer du sein, facteurs génétiques. 4% des formes héréditaires sont notamment associées à l'apparition de la mutation BRCA1 qui entraîne une augmentation du risque de 45% et de 80% respectivement pour le cancer de l'ovaire et du sein.
- Facteurs de risques environnementaux : tabac, alcool, antécédent d'irradiation ou encore niveau socio-économique élevé.

## 2. Dépistage

En France, un dépistage gratuit a été mis en place pour les femmes de 50 à 74 ans. Ce programme national gratuit comprend au minimum une mammographie deux incidences (face et oblique externe) par sein. On utilise les critères de l'American College of Radiology (ACR) pour classer les lésions mammaires observées à la mammographie :

- ACR 0 : examen non concluant
- ACR 1 : mammographie normale (aucune anomalie)
- ACR 2 : mammographie subnormale (petite anomalie non retenue)
- ACR 3 : probablement bénigne > **mammographie** à 4 mois si nodule ou 6 mois si microcalcifications
- ACR 4 : image justifiant une preuve histologique > **biopsie**
- ACR 5 : image typique de cancer du sein > **biopsie**
- ACR 6 : cancer prouvé histologiquement

Une échographie mammaire bilatérale comprenant l'examen des aires axillaires est systématique si la patiente présente un ACR $\geq$ 3. Celle-ci est particulièrement contributive en cas d'image douteuse à la mammographie et de savoir si une biopsie est nécessaire.

A noter qu'un dépistage individuel est réalisé en cas de risque très élevé de cancer du sein, que ce soit lié à des mutations (BRCA1/2) ou à des antécédents familiaux nombreux évalués avec le score d'Einsinger, permettant de graduer le risque de prédisposition génétique de cancer du sein en l'absence de mutation familiale identifiée [138].

## 3. Classification des cancers du sein

### 3.1 Classification histologique

Fort heureusement la plupart du temps les lésions observées sont bénignes (kystes, hyperplasie canalaire...). C'est lors de l'analyse anatomo-pathologique de la biopsie que le diagnostic sera réellement posé et la prise en charge décidée.

Si la tumeur s'avère maligne, il existe une classification prenant en compte à la fois les caractéristiques invasives (infiltrant), ou non (*in situ*), du cancer, et les caractéristiques morphologiques et l'origine des cellules tumorales elles-mêmes. 95% des cancers du sein ont comme origine les cellules épithéliales qui composent la glande mammaire : ce sont des

adénocarcinomes. De par leur faible fréquence, les autres tumeurs malignes sont dites rares (carcinomes tubuleux, médullaire ou mucineux, sarcome...).

Concernant les carcinomes *in situ*, les cellules tumorales, bien qu'en prolifération, restent enfermées dans les structures qui composent normalement le sein sans en détruire la membrane basale. On en distingue de deux types selon l'emplacement de la prolifération : le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS) et le carcinome canalaire *in situ* (CCIS).

Les adénocarcinomes infiltrants peuvent eux être également de deux types :

- Adénocarcinome canalaire infiltrant (le plus fréquent 90%) : prolifération maligne d'origine épithéliale franchissant la membrane basale et envahissant le tissu conjonctif. Ils présentent un fort risque d'adénopathies et de métastases.
- Adénocarcinome lobulaire infiltrant (plus rare) : souvent bilatéraux et/ou multicentriques.

Enfin à l'aide à la fois du bilan d'extension de l'imagerie médicale et l'anatomopathologie les tumeurs seront classées selon la classification TNM de l'IUCC (International Union of Cancer Control) [139] :

- **Tumeurs (T) : T1** ≤ 2 cm **T2** = 2 à 5 cm **T3** > 5 cm  
**T4a** : paroi thoracique (hors pectoral)  
**T4b** : oedème ou ulcération cutanée  
**T4c** : 4a + 4b  
**T4d** : cancer inflammatoire
- **Ganglions lymphatiques (N) : N1mi** : micro-métastase (entre 0,2 et 2 mm)  
**N1** : c = ADP axillaire mobile p = 1 à 3 ADP axillaire  
**N2** : c = ADP axillaire fixée p = 4 à 9 ADP axillaire  
**N3** : c = ADP mammaire interne p = ≥ 10 ADP axillaire ou ≥ 1 ADP sous-clavière
- **Métastases (M) : M1** = métastase (y compris ADP sus-claviculaire)

Cette classification TNM permet ensuite une classification du stade de la maladie :

- **stade I** : qui correspond à une tumeur unique et de petite taille,
- **stade II** : qui correspond à une tumeur avec un volume local plus important,
- **stade III** : qui correspond à un envahissement des ganglions lymphatiques ou des tissus avoisinants,
- **stade IV** : qui correspond à une extension plus large dans l'organisme sous forme de métastases.

Elle a alors une valeur pronostique et permet d'adapter la prise en charge thérapeutique des patients (Figure 14) [140].

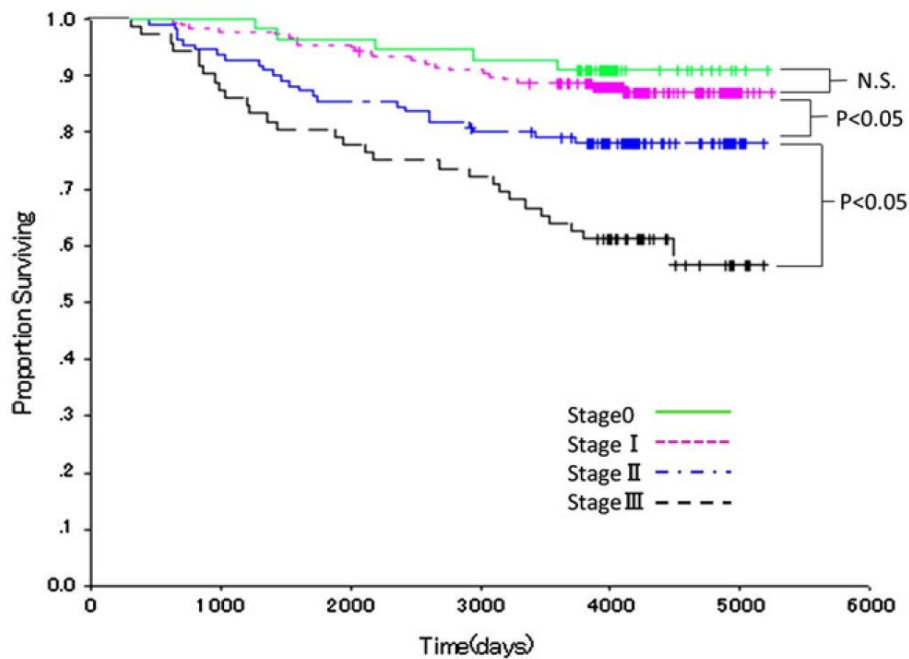


Figure 14 : Valeur pronostique des cancers du sein en fonction du stade de la maladie. [140]

### 3.2 Classification moléculaire

<i>Molecular subtype</i>	<i>Surrogate subtype</i>	<i>ER</i>	<i>PgR</i>	<i>HER2</i>	<i>PI (Ki-67)</i>
Luminal A	Luminal A-like	+ or +	-	<14%	
Luminal B	Luminal B-like (HER2-negative)	+ or +	-	≥14%	
	Luminal B-like (HER2-positive)	+ or +	+	Any	
HER2-overexpression	HER2-positive	-	-	+	Any
Basal-like	Triple negative	-	-	-	Any

ER: Estrogen receptor; PgR: Progesterone receptor; HER2: Human epidermal growth factor receptor 2; PI: Proliferation index; +: Positive; -: Negative

Figure 15 : définitions des sous-types moléculaires du cancer du sein selon le consensus de St Gallen 2011 [141]

L'évolution de nos connaissances en génétique ainsi que l'amélioration des techniques de biologie moléculaire permettent actuellement de créer une nouvelle classification des cancers du sein (Figure 15). Un consensus international a été établi se basant sur l'expression de trois principaux marqueurs : le récepteur aux œstrogènes (ER), le récepteur à la progestérone (PR) et le Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 (HER2). Ainsi, ces marqueurs permettent de classifier les cancers du sein en quatre catégories : luminal A (ER+ +/- PR+), luminal B (ER+ +/- PR+ +/- HER2+), HER2+ (ER- PR- HER2+) et ceux de type basal-like dits triple négatifs (ER- PR- HER2-) (TNBC) (Figure 15). Il est à noter que les luminaux B ont une fréquence augmentée des cellules tumorales proliférantes (Ki67+) en comparaison aux luminaux A.

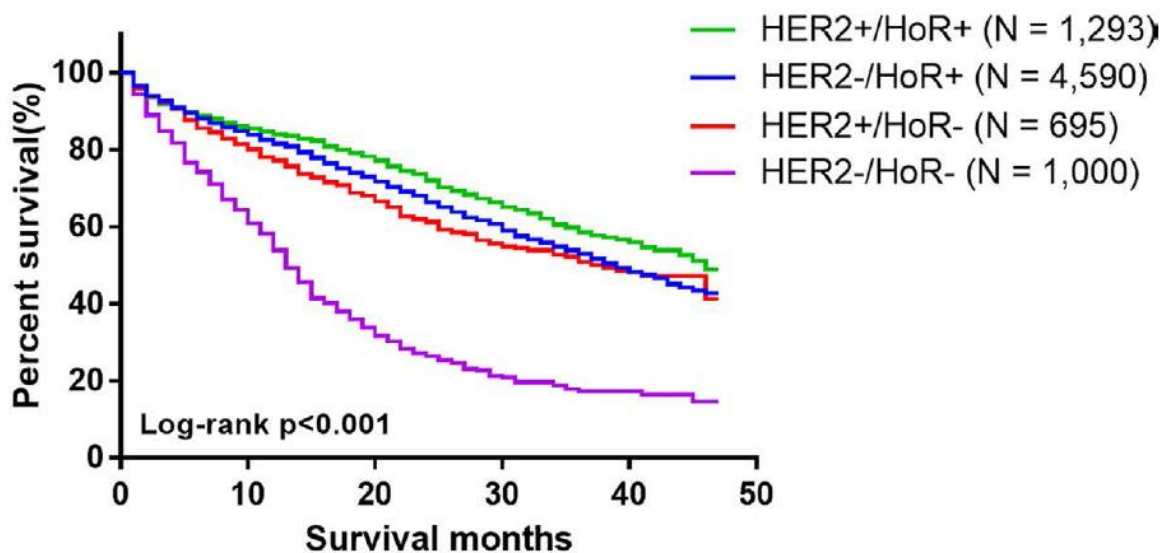


Figure 16 : Impact pronostique des sous-types moléculaires du cancer du sein sur la survie des patientes (au stade IV de la maladie) [142]

De plus cette classification moléculaire a également un rôle pronostique (figure 16) et nous pouvons noter ici l'agressivité des cancers TNBC n'exprimant ni HER2, ni des récepteurs hormonaux (ER / PR) [142].

#### 4. Traitements de référence

Comme nous l'avons vu précédemment il existe de nombreux sous-types de cancers du sein. Le premier impact pour les patientes d'une telle classification de ces cancers est la rationalisation des traitements en fonction des cibles thérapeutiques disponibles (Figure 17) [143].

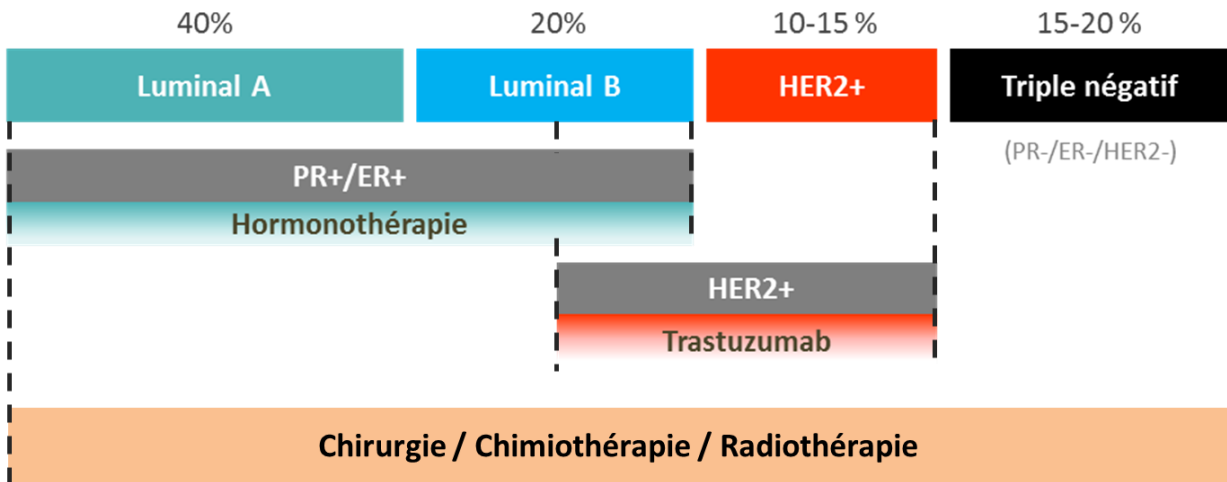


Figure 17 : Traitements des cancers du sein en fonction de la classification moléculaire décrite précédemment [144].

## 4.1 Thérapies classiques

Concernant la prise en charge des cancers du sein, trois traitements sont classiquement utilisés et ont montré leur efficacité dans de nombreux cancers [143] :

- La chirurgie locale mammaire : nous distinguerons ici la tumorectomie de la mastectomie. La tumorectomie est un traitement conservateur qui va permettre l'élimination de la tumeur palpable à condition que celle-ci soit d'un diamètre inférieur à 3 cm et que ce ne soit pas une récurrence. La mastectomie est quant à elle un traitement radical du fait de l'exérèse totale de la glande mammaire avec conservation du muscle pectoral. Cette chirurgie est pratiquée pour les tumeurs volumineuses. Une reconstruction mammaire peut par la suite être envisagée généralement à distance de la première chirurgie. La mastectomie totale permet bien évidemment la diminution du risque de récurrence sans toutefois augmenter la survie globale en comparaison au traitement conservateur.
- La chirurgie régionale ganglionnaire : cette chirurgie intervient dans le même temps opératoire que l'exérèse locale mammaire. Elle est systématique en cas de cancer infiltrant. On distingue l'exérèse du ganglion sentinelle permettant de s'assurer de la dissémination, ou non, de cellules tumorales, du curage ganglionnaire axillaire intervenant si N+ ou tumeur supérieure à 3 cm ou T4.
- Radiothérapie externe : intervenant en post-opératoire, elle est destinée à prévenir les récurrences locorégionales. Le taux de récurrence locale est alors de 10% contre 40% en l'absence de radiothérapie.

- Chimiothérapie adjuvante : elle est indiquée en cas d'envahissement ganglionnaire ou lorsque la patiente présente au moins un facteur de risque de métastases à savoir :
  - Taille de la tumeur infiltrante > 2 cm
  - Tumeur inflammatoire
  - Grade histo-pronostique de Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grade II ou III
  - Index mitotique élevé ou facteur de prolifération Ki67 > 20%
  - Emboles vasculaires péri-tumoraux
  - Absence de récepteurs hormonaux (tumeur indifférenciée de mauvais pronostic)
  - Surexpression tumorale d'HER2 (3+) en IHC

Cette chimiothérapie est alors réalisée dans les 3 à 6 semaines après chirurgie et avant de commencer des cycles de radiothérapie.

- Chimiothérapie néo-adjuvante : bien qu'aucune amélioration n'ait été prouvée sur la survie globale des patientes, la chimiothérapie néo-adjuvante permet de réduire de 50% les mastectomies. Elle est bien évidemment recommandée pour des tumeurs volumineuses ou non opérables en première intention.

## 4.2 Thérapies ciblées et hormonothérapie

L'apparition d'anticorps monoclonaux en thérapie humaine a permis d'apporter des solutions nouvelles permettant d'améliorer l'espérance de vie des patientes [143]. Nous pouvons parler ici des anticorps monoclonaux anti-HER2 : le Trastuzumab (Herceptin<sup>®</sup>) indiqué dans les cancers sur-exprimant HER2, qu'il soit métastatique ou non. Ces tumeurs sont classiquement fortement prolifératives, l'anticorps bloquant la dimérisation d'HER2 empêche ainsi l'initiation du signal prolifératif.

L'hormonothérapie, quant à elle, améliore la survie globale des patientes et diminue les récurrences locales et métastatiques. Elle est indiquée lorsque les cellules tumorales présentent des récepteurs hormonaux aux œstrogènes et/ou à la progestérone (RH>1-5%). Ce sont des traitements au long terme puisque leur durée d'utilisation est de 5 ans. Plusieurs approches sont alors possibles :

- Les anti-œstrogènes : utilisés chez les femmes non ménopausées ou ménopausées qui ne supportent pas le traitement aux anti-aromatases. Dans le cancer du sein c'est le Tamoxifène qui est utilisé. Le Tamoxifène est un anti-œstrogène agissant par inhibition compétitive de la liaison de l'estradiol avec ses récepteurs diminuant ainsi la prolifération



cellulaire. Il peut être également associé aux antagonistes de la LH-RH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) si le cancer est de mauvais pronostic.

- Les anti-aromatases : utilisées chez la femme ménopausée, les anti-aromatases (Anastrole, létrozole...) empêchent la production d'oestrogènes chez la femme ménopausée.
- Les analogues de la LH-RH : suppriment la production des hormones par les ovaires chez la femme non ménopausée.

### 4.3 Immunothérapies

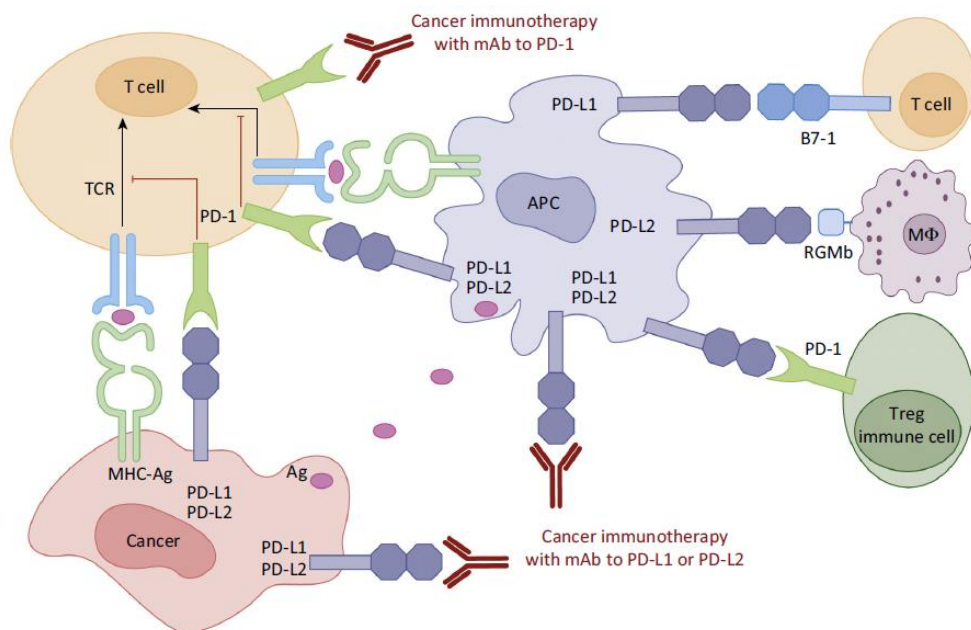


Figure 18 : Impact d'un traitement ciblant la voie PD-1/PD-L1 sur l'immunité anti-tumorale [145].

Dans un contexte tumoral, différentes approches d'immunothérapies peuvent être envisagées. Il existe des approches vaccinales, de thérapies cellulaires basées notamment sur le transfert adoptif de cellules T ou encore l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant les checkpoints immunitaires [105, 146-148]. Elles sont pour le moment en phase de développement préclinique ou clinique et montrent pour la plupart des résultats encourageants. Nous ne détaillerons ici que la stratégie de blocage de la voie PD-1/PD-L1 que nous avons utilisé dans ce projet et son utilisation actuelle dans le cancer du sein.

L'objectif des anticorps monoclonaux ciblant PD-1 est de restaurer les fonctions effectrices des lymphocytes T. En effet, l'une des stratégies efficaces des cellules tumorales pour échapper au

contrôle du système immunitaire est l'expression des ligands de PD-1, à savoir PD-L1 et PD-L2, ce qui conduit à l'inhibition du signal TCR dans les LT, incluant les LTCD8<sup>+</sup>. Ces ligands peuvent également être exprimés par des cellules du système immunitaire comme les CPA lorsqu'elles se retrouvent dans l'environnement fortement immunosuppresseur des tumeurs.

Les anti-PD1 ont donné de très bons résultats dans le mélanome et le cancer de l'ovaire par exemple [149]. Cependant utilisé seul, ce traitement anti-PD1 n'a montré que de très faibles résultats dans le cancer du sein. A titre d'exemple, dans les cancers du sein ER+HER2- et PD-L1+ le taux de réponse durable après traitement au Pembrolizumab n'est que de 8% (KEYNOTE-028) [150]. Dans les TNBC métastatiques (tous niveaux d'expression de PD-L1 dans les tumeurs), le taux de réponse est de 23% de réponse globale si le Pembrolizumab est donné en première ligne et de 4,7% si il est utilisé après l'échec d'un premier traitement (KEYNOTE-086) [151, 152].

L'utilisation d'un anticorps anti-PD-1 a pour conséquence à la fois le blocage de la signalisation PD-1/PD-L1 mais également de PD-1/PD-L2. Il est tout de même important de prendre en considération que la voie PD-1/PD-L2 a un rôle important dans la tolérance aux antigènes du soi. Ainsi, les anti-PD-1 peuvent induire des phénomènes d'autoimmunité. Une autre approche consiste à administrer des anti-PD-L1. Les anti-PD-L1 visent non seulement à limiter la toxicité du traitement d'immunothérapie (en comparaison aux anti-PD-1) mais également à bloquer simultanément PD-1 et CD80. En effet, CD80 (B7.1) peut être exprimé par les LT CD8<sup>+</sup>. Il interagit avec une haute affinité avec PD-L1, pouvant conduire à l'inhibition de la prolifération des LT CD8<sup>+</sup> [153], voire à leur mort [154]. Toutefois, les anti-PD-L1 montrent également une très faible efficacité dans les cancers du sein puisqu'elle est de 4,8% de réponse globale [155].

Après l'enthousiasme des années passées autour des immunothérapies il s'avère que celles-ci sont largement perfectibles dans le cancer du sein. Des associations avec d'autres molécules, comme c'est déjà le cas dans d'autres cancers, sont tout à fait envisageables [156, 157].

## IV. Anti-angiogéniques

A l'instar de tout tissu de l'organisme, la tumeur a besoin de se nourrir et de respirer. En effet, dès 1971 Judah Folkman pose le concept suivant : « les tumeurs doivent être vascularisées au-dessus de  $2\text{mm}^3$  et cette vascularisation est induite par des facteurs diffusibles produits par les cellules tumorales (TAF) » (Figure 19) [31].

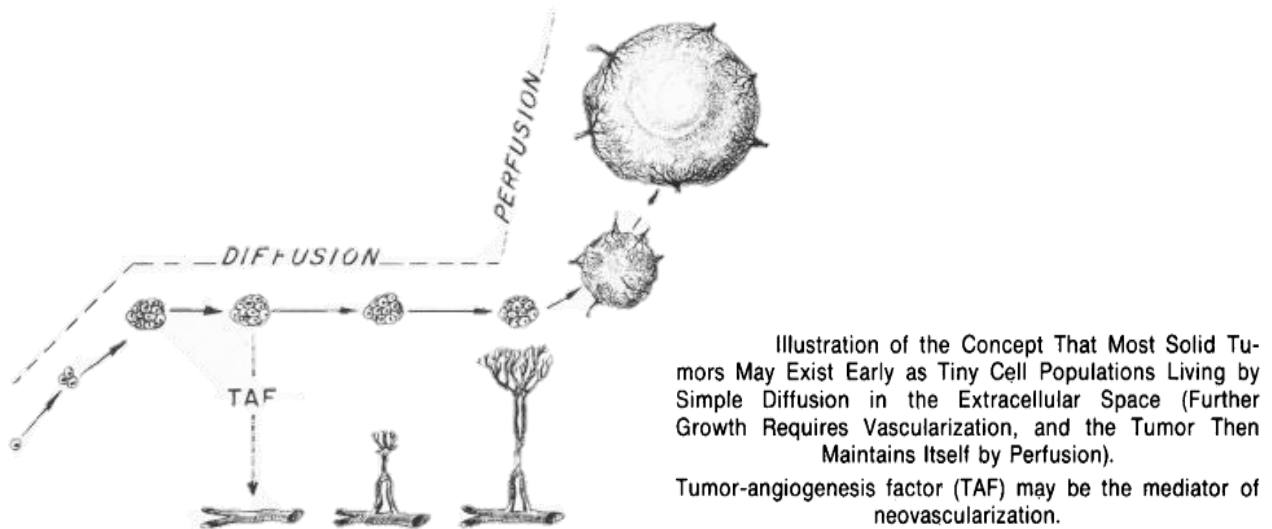


Figure 19 : Extrait de l'article de J. Folkman (1971), *Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications*, où il propose le concept de facteurs diffusibles produits par les cellules tumorales (TAF).

Priver la tumeur de vascularisation devient alors une cible des plus séduisantes et rapidement les journaux en font les gros titres aux États-Unis et, une année plus tard, en France. Il faudra attendre 2004 pour que les premières thérapies ciblant la voie du VEGF-A donnent leurs premiers résultats [158]. Plusieurs stratégies pour cibler cette voie ont été mises en place. On distingue un ciblage spécifique avec le Bevacizumab (AVASTIN®), un anticorps monoclonal bloquant le VEGF-A, et des approches pharmacologiques aspécifiques basées sur l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase (Sunitinib (SUTENT®)).

### 1. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse, définie par le développement de néo-vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants, est un phénomène biologique complexe qui peut être physiologique (réparation et régénération tissulaire, croissance, formation du placenta) mais également pathologique. Ce processus est notamment indispensable à la croissance tumorale et au développement de métastases. On parle alors de « switch » angiogénique, événement au cours duquel l'équilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques est rompu au profit de la pro-angiogenèse entraînant

le passage d'une hyperplasie avasculaire dormante à une tumeur vascularisée en croissance conduisant parfois à une progression tumorale maligne (Figure 20).

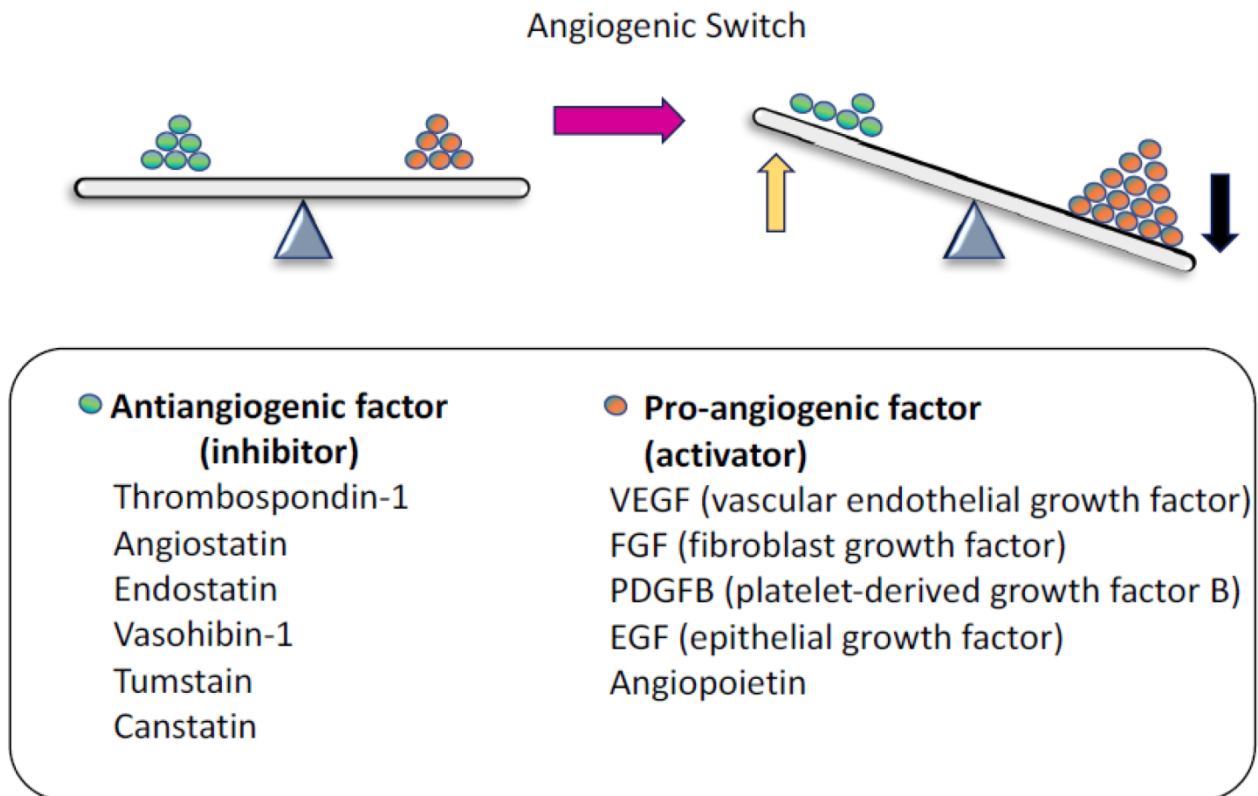


Figure 20 : « switch » angiogénique et ses principaux acteurs [159].

C'est donc un processus dynamique, impliquant un grand nombre de facteurs pro-angiogéniques partiellement contre balancés par des molécules anti-angiogéniques, répond à la nécessité pour la tumeur d'augmenter sa perfusion assurant ainsi l'apport en nutriments et, dans une moindre mesure, en oxygène. Cependant, ce processus désordonné conduit à la formation de néo-vaisseaux qui ne sont que partiellement fonctionnels. L'importance de la néo-vascularisation est alors une solution transitoire à un déficit d'efficacité des néo vaisseaux pour la perfusion de la tumeur. Parmi les différents facteurs pro-angiogéniques impliqués dans cette angiogenèse tumorale pathologique, le « vascular endothelial growth factor-A » (VEGF-A) semble jouer un rôle majeur. Il s'agit d'un polypeptide exprimé sous forme dimérique, dont le poids moléculaire est de 45 kDa. Il appartient à la famille des VEGF comprenant aussi les VEGF-B, -C, -D et -E, ainsi que les « placental growth factor » (PIGF) 1 et 2. Le VEGF-A exerce ses effets pro-angiogéniques en se liant à des récepteurs spécifiques, à activité tyrosine kinase, les VEGFR (VEGFR1 (ou Flt-1) et VEGFR2 (ou flk-1/KDR), et à un co-récepteur (Neuropiline 1).

## 2. Impact des anti-angiogéniques dans le cancer

La thérapeutique initiale consiste en des anticorps monoclonaux ciblant directement le VEGF-A bloquant ainsi ses interactions avec les VEGFR. Il s'agit principalement du Bevacizumab (AVASTIN®), anticorps monoclonal recombinant humanisé (anti-VEGF-A) qui, en association avec une chimiothérapie de référence, a montré un bénéfice significatif sur la survie sans progression, dans les cancers colorectaux métastatiques, les cancers pulmonaires à petites cellules et les glioblastomes.

Par la suite, des inhibiteurs pharmacologiques de tyrosine kinases ciblant directement la partie intracellulaire des récepteurs à activité tyrosine kinase, dont les VEGFR, ont été utilisés. Il s'agit généralement d'inhibiteurs multi-cibles. Parmi eux, le sunitinib (Sutent®), dont l'efficacité a été démontré dans les cancers du rein, et le sorafénib (Nexavar®), utilisé pour le traitement des Carcinomes Hépatocellulaires non résecables, ciblent la voie VEGF/VEGFR [160].

Ces deux types de traitements vont pouvoir jouer sur différents axes, facilitant (i) la normalisation vasculaire (Figure 21) et (ii) l'activation de la réponse immunitaire (Figure 22).

### 2.1 Normalisation vasculaire

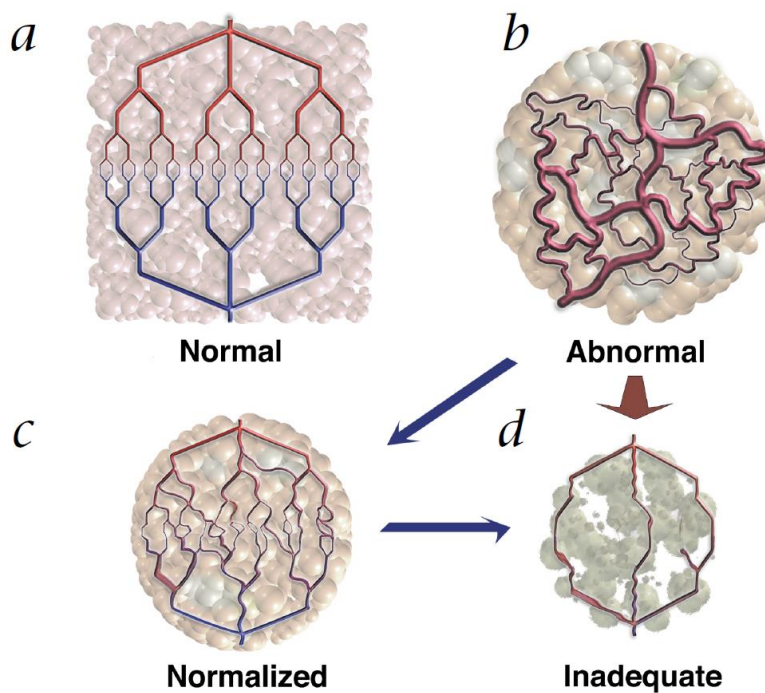


Figure 21 : Schéma des modifications de la vascularisation tumorale au cours d'un traitement anti-angiogénique selon Jain [161].

Ce phénomène va permettre, de façon transitoire, une meilleure vascularisation (partie C de la figure 21) diminuant l'hypoxie intra-tumorale et permettant une meilleure diffusion de molécules comme les chimiothérapies par exemple, mais également permettre aux cellules de l'immunité de pénétrer plus profondément au sein des tumeurs [162, 163]. Malheureusement ce phénomène de normalisation vasculaire n'est que transitoire et constitue une « fenêtre thérapeutique » qu'il n'est pas toujours évident de maîtriser. Actuellement, l'effet recherché avec de telles thérapies est de normaliser durablement la vascularisation tumorale et non pas de priver la vascularisation les tumeurs. Différentes approches sont en phase de développement comme l'utilisation des anti-VEGF en association avec d'autres cibles ou la chimiothérapie à dose métronomique [164-166].

## 2.2 Impact du VEGF-A sur l'immunité

Mais le VEGF-A a aussi des activités immunomodulatrices permettant aux tumeurs d'échapper plus facilement à la surveillance du système immunitaire. Dans un premier temps, il a été démontré que le VEGF induit une diminution des molécules d'adhésion ICAM-1 exprimées par les cellules endothéliales au sein de la tumeur, diminuant ainsi le recrutement lymphocytaire intratumoral [167]. L'utilisation d'anti-VEGF dans un modèle murin de mélanome (B16) augmente le nombre et la proportion des lymphocytes intratumoraux [168].

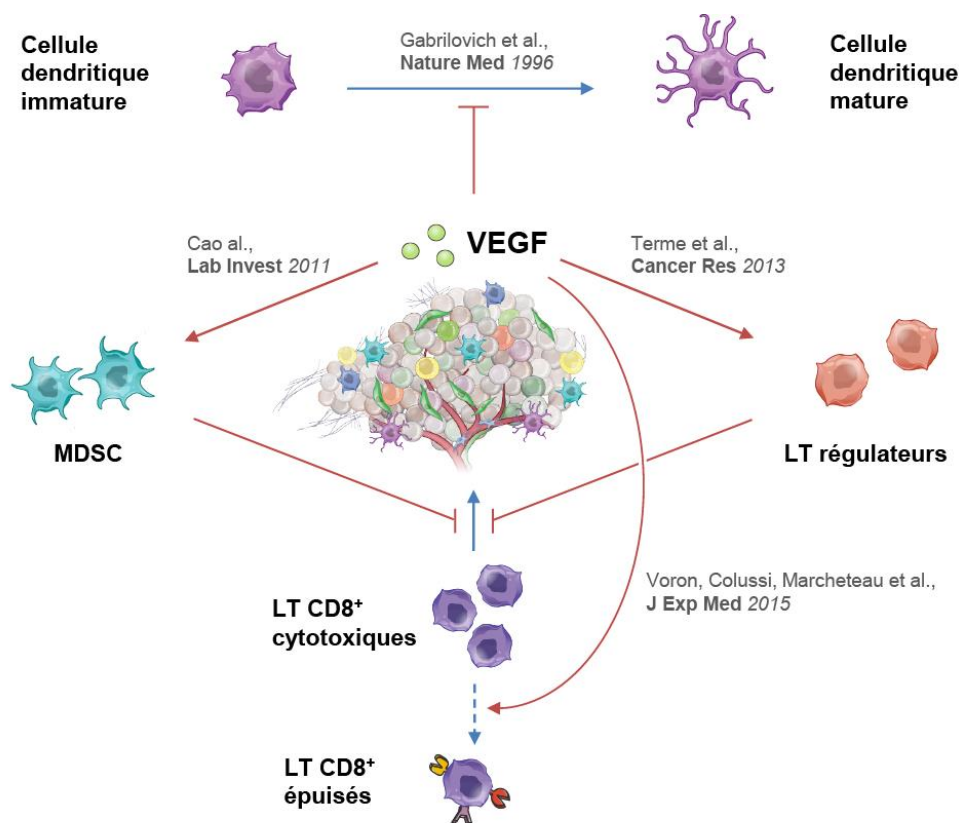


Figure 22 : Rôle du VEGF-A sur l'immunité : rationnel dans l'utilisation de molécules anti-angiogéniques dans le cancer.

Les travaux de Gabrilovich, entre autres, ont également mis en évidence les capacités d'inhibition de la maturation des cellules dendritiques *via* le VEGFR de type 1 ayant pour conséquence directe une diminution de la présentation antigénique et donc de l'activation lymphocytaire [169, 170]. Le VEGF a également été montré comme participant activement à l'accumulation intratumorale des cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) [171]. De plus, les cellules tumorales, *via* la production de VEGF, sont capables d'augmenter la proportion des lymphocytes T régulateurs, indirectement en inhibant la maturation des cellules dendritiques ou en favorisant l'accumulation intratumorale de MDSC [172]. Lors de mes travaux au sein de l'équipe d'Eric Tartour, j'ai également eu l'opportunité de travailler sur les anti-angiogéniques et leur impact sur l'immunité. Nous avons notamment mis en évidence l'action directe du VEGF-A sur la prolifération des lymphocytes T régulateurs *via* le VEGFR2. De plus, les thérapies anti-angiogéniques ciblant cette voie (anti-VEGFA et sunitinib) entraînent une diminution du taux de lymphocytes T régulateurs tumoraux et circulants, chez la souris et chez l'Homme [173-175]. La continuité des travaux réalisés durant mon Master 2 a permis de mettre en évidence également un impact *via* la même voie VEGF-A/VEGFR2 sur les LT CD8<sup>+</sup>. Ainsi, le VEGFA favorise l'exhaustion de ces lymphocytes dans un modèle murin de cancer colorectal (Figure 22) [174, 176].

## 2.3 Qu'en est-il dans le cancer du sein ?

Le bevacizumab a été approuvé pour le traitement du cancer du sein métastatique HER2-négatif en 2008, sur la base de l'essai E2100 et du critère de l'amélioration de la survie sans progression (PFS). Dans l'essai, la survie sans progression était significativement prolongée, passant de 5,9 mois à 11,8 mois (hazard ratio, 0,60; P <0,001) [177]. La PFS augmentée ne s'est toutefois pas traduite par une amélioration de la survie globale (OS) et, en 2011, la FDA a retiré son approbation d'utilisation du bevacizumab pour le cancer du sein [178, 179].

Ce paradoxe - amélioration de la PFS mais non de la survie globale - résultait de plusieurs essais cliniques utilisant le bevacizumab dans divers contextes de cancer du sein, notamment un traitement de première intention associé à une chimiothérapie ou à un traitement hormonal. Bien que le taux de réponse ait augmenté avec l'ajout du bevacizumab à la chimiothérapie en deuxième et troisième lignes, il n'y a pas de différence entre la PFS et l'OS [180-182].

Le bevacizumab a également été évalué dans le cancer du sein au stade précoce, mais les données dans ce contexte sont mitigées et largement décevantes. Plusieurs essais cliniques n'ont pas démontré de différence entre la survie sans progression ou la survie globale avec le bevacizumab dans les contextes néoadjuvant et adjuvant [183, 184]. Des résultats décevants ont également été rapportés avec des inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant des facteurs angiogéniques, tels que le sunitinib et le sorafénib [185].

## V. Impact de l'environnement hypoxique intratumoral

Dans les tumeurs solides, on estime que les zones hypoxiques ou anoxiques représentent entre 50 et 60% du volume tumoral observé notamment à cause de la mauvaise qualité de la vascularisation des tumeurs. Cette hypoxie intratumorale peut également être augmentée par l'utilisation d'anti-angiogéniques. Mais quel est l'impact réel de cette hypoxie sur le système immunitaire et la dissémination métastatique?

### 1. Hypoxie et système immunitaire

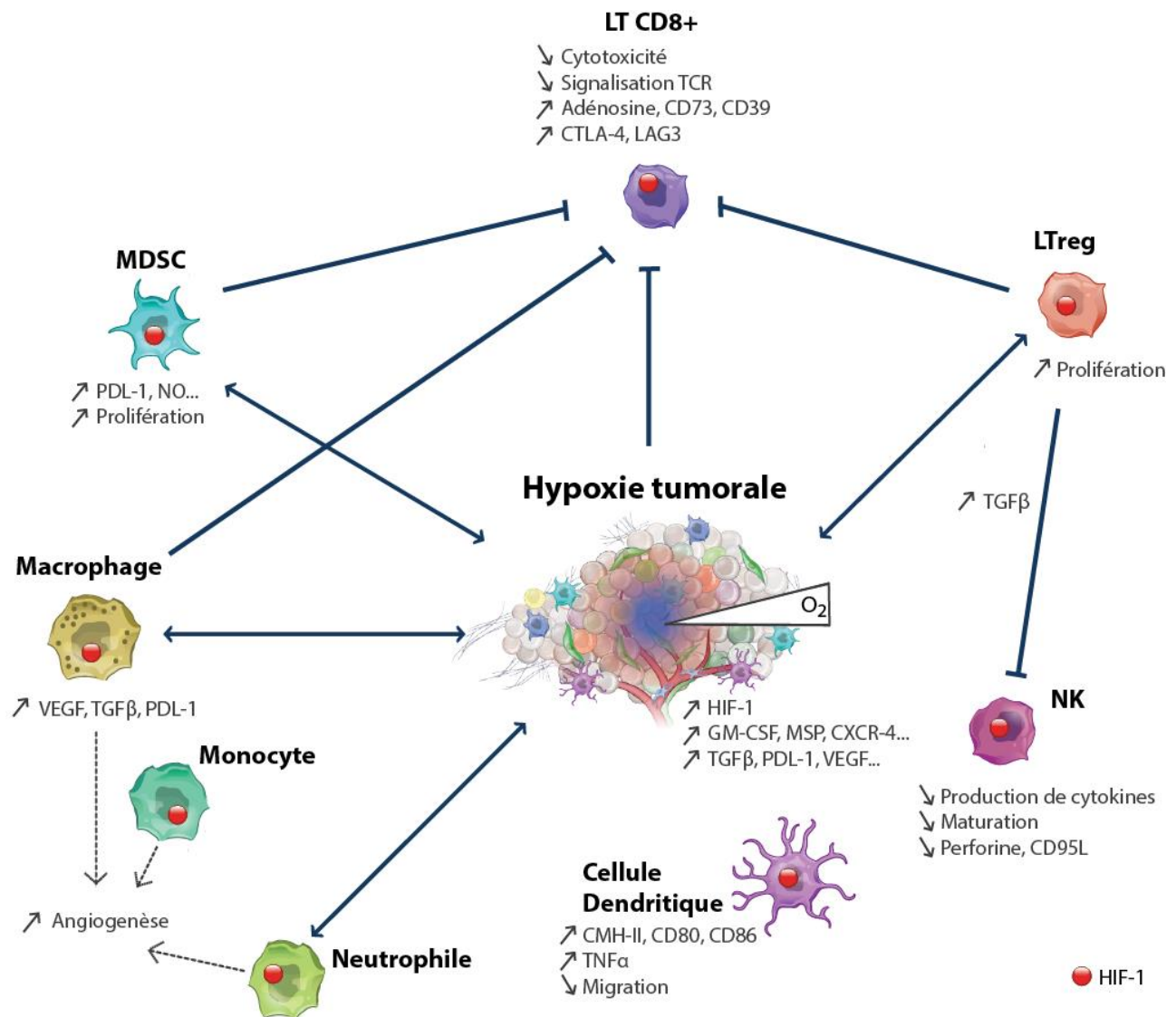


Figure 23 : Impact de l'hypoxie sur le système immunitaire [186-188].

Les cellules immunitaires peuvent être résidentes de tissus ou recrutées depuis le système circulatoire riche en oxygène vers des zones hypoxiques. Ces zones sont soit physiologiquement



hypoxiques, comme pour la muqueuse intestinale, soit il s'agit d'un environnement pathologiquement hypoxique comme les tumeurs, les zones d'inflammation, les tissus infectés ou ischémiques. Dans un contexte d'hypoxie physiologique, les HIF (Hypoxia-Inductible Factors) contribuent à l'homéostasie des cellules immunitaires innée et adaptative [189]. Dans l'hypoxie pathologique, la signalisation HIF peut provoquer des lésions tissulaires et un dysfonctionnement des cellules immunitaires par divers mécanismes moléculaires (Figure 23). L'hypoxie est une caractéristique des tumeurs solides et un puissant facteur de malignité [189]. HIF a été décrit comme étant le principal régulateur de la réponse cellulaire à l'hypoxie [190].

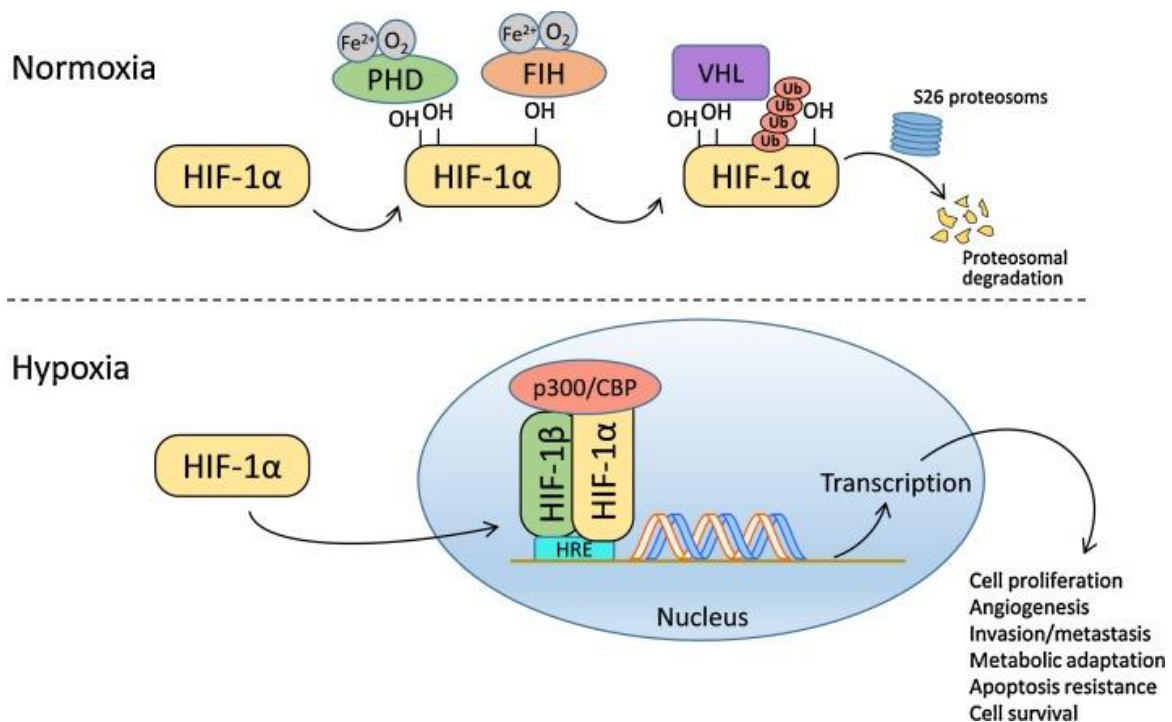


Figure 24 : Impact du taux d'O<sub>2</sub> sur HIF [191].

Les HIF sont des hétérodimères composés d'une sous-unité β constitutive (généralement HIF-1 β) ainsi que d'une sous-unité α inductible (HIF-1α, HIF-2α ou HIF-3α). Très instable en normoxie, la sous-unité alpha, dès sa synthèse dans le cytoplasme, subit une hydroxylation, par des prolyl-hydroxylases (PHD) dépendante de l'oxygène. Cette hydroxylation de proline induit sa liaison à la protéine E3 ligase pVHL (von Hippel Lindau protein), entraînant une poly-ubiquitination et une dégradation très rapide par le protéasome. De plus, la normoxie cellulaire entraîne aussi l'activation de la protéine « factor inhibiting HIF-1 » (FIH-1) qui agit au niveau du noyau en bloquant la transcription de gènes cibles comme l'EPO [192]. Inversement, en hypoxie, la sous-unité α est stabilisée et se complexe avec la sous-unité β. Par la suite, ce complexe transcrit des

gènes cibles possédant sur leur promoteur des séquences consensus. Parmi ces gènes cibles, les principaux sont les gènes impliqués dans l'angiogenèse (pour augmenter l'apport en O<sub>2</sub>) et la glycolyse (les cellules ne peuvent plus compter sur la phosphorylation oxydative dépendante de l'O<sub>2</sub> pour la production d'énergie) (Figures 24) [193].

Les cellules immunitaires infiltrant la tumeur sont soumises à l'hypoxie locale et à l'activation de la voie de signalisation HIF qui a un impact sur le devenir et la fonction de ces cellules, y compris la stimulation de l'expression des gènes glycolytiques après l'activation de différentes cellules immunitaires [194-196]. En effet, une réponse immunitaire adéquate nécessite une production rapide d'ATP en utilisant généralement la glycolyse aérobie afin générer des précurseurs pour la synthèse des lipides, des acides aminés et des nucléotides nécessaires à la prolifération cellulaire rapide et aux fonctions effectrices [197]. Cependant, « l'immuno-métabolisme » ne peut être résumé à la production d'ATP et on peut supposer que le remodelage métabolique est un des moteurs du phénotype des cellules immunitaires. Il a été entre autre montré que la fonction des cellules immunitaires peut être altérée via l'impact de HIF sur diverses autres voies métaboliques que la glycolyse, telles que la synthèse des acides gras, le cycle de l'acide tricarboxylique, la voie du pentose phosphate ou le métabolisme des acides aminés [196].

## 1.1 Hypoxie et Macrophages

Les macrophages sont attirés par les régions hypoxiques et l'hypoxie intratumorale joue un rôle important dans la régulation des macrophages associés aux tumeurs (TAM). Au cours de la dernière décennie, les TAM ont attiré beaucoup d'attention, car ils affectent plusieurs aspects de la progression tumorale, tels que la survie des cellules tumorales et l'angiogenèse. En outre, ils sont engagés dans l'interaction avec différentes cellules du système immunitaire adaptatif tel que les cellules T.

Des recherches ont mis en évidence que HIF-1 améliore la migration des macrophages vers le site de l'infection en stimulant l'expression de CXCR4 et en diminuant celle de CCR5, ce qui conduit à la rétention de macrophages dans la zone de l'infection [198, 199]. La délétion spécifique de HIF-1 dans les macrophages perturbe leur production d'ATP, affectant ainsi la survie, l'invasion, la motilité, l'agrégation et l'activité bactéricide des macrophages murins et humains [200]. Il a été démontré qu'en normoxie, la protéase MT1-MMP / MMP-14 (Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase) lie HIF-1 et peut ainsi favoriser l'activité de HIF-1. L'activation de HIF-1 par MT1-MMP améliore la glycolyse aérobie des macrophages ce qui conduit à la stimulation de la production d'ATP par glycolyse [201]. Cela suggère que HIF-1 joue un rôle important dans la polarisation des macrophages [202].

Une étude suggère que l'hypoxie commande la fonction pro-tumorale des TAM de type M2. Ils ont en effet démontré que les macrophages sont attirés dans les tumeurs hypoxiques par la Sémaphorine 3, induite par l'hypoxie, et se liant à la Neuropiline 1 (co-récepteur du VEGF) exprimé par les macrophages. Une fois arrivés dans les zones hypoxiques, les macrophages sont conservés et leur phénotype pro-tumorigène va par la suite faciliter l'angiogenèse, les métastases et l'immunosuppression [203].

## 1.2 Hypoxie et cellules dendritiques

Il a été démontré que l'activation de la voie de signalisation HIF affecte plusieurs fonctions des cellules dendritiques, y compris la survie, la différenciation, la maturation, la migration et la présentation d'antigènes [204]. De plus, les HIF sont montrés comme étant des régulateurs essentiels dans la synthèse d'interleukines. En effet HIF-1 entraîne la production d'IL-22 importante pour l'inflammation, et à contrario, l'hypoxie diminue par exemple la production de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 dans les cellules dendritiques humaines et murines [205]. En outre, l'hypoxie régule l'expression de diverses chimiokines et récepteurs attirant les neutrophiles, telles que CXCR2, CXCR3, CCR5 et CXCL8 dans les cellules dendritiques humaines et murines [204-206]. La reprogrammation métabolique joue un rôle important lors de l'activation des cellules dendritiques. Des données récemment publiées ont indiqué que l'activation des DC par le lipopolysaccharide bactérien (LPS) sous normoxie favorise la production de HIF-1 $\alpha$  à des niveaux supérieurs à ceux induits par l'hypoxie elle-même [207]. L'accumulation de HIF-1 $\alpha$  est cruciale pour ce processus, en raison de l'induction ultérieure de gènes cibles de HIF codant pour des protéines impliquées dans la glycolyse telles que le transporteur de glucose GLUT1 [207]. De nombreux aspects du métabolisme des DC dans un contexte hypoxique sont discutés et doivent encore être élucidés, mais les données actuelles suggèrent que la reprogrammation métabolique médiée par HIF est impliquée dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose de ces cellules.

## 1.3 Hypoxie et MDSC

Au sein des tumeurs nous retrouvons également une population de cellules myéloïdes immatures, les MDSC, qui sont des constituants majeurs de l'immunosuppression tumorale. En effet, il a été démontré que les MDSC sont capables notamment de produire différentes molécules immunosuppressives. Nous parlerons ici de l'arginase-1 induisant une privation en L-arginine qui est essentielle à la prolifération des LT [208], du TGF $\beta$  et l'IL-10 inhibant les fonctions des LT effecteurs [209, 210] ou encore la production d'oxyde nitrique (NO) impactant entre autre directement l'activation et l'infiltration intratumorale des LT [211]. Dans un contexte hypoxique, il a été démontré que HIF-1 $\alpha$  augmente l'expression de NO et d'arginase-1 par les MDSC. Il est à

noter également la capacité d'HIF-1 $\alpha$  à entraîner l'expression de PD-L1 à la surface des MDSC [188].

## 1.4 Hypoxie et lymphocytes T

Les lymphocytes T sont soumis *in vivo* à une large plage de concentration en O<sub>2</sub> qui varie de 13% dans le sang artériel périphérique à 5% dans les tissus normaux et à moins de 2% dans les tissus chroniquement enflammés et les tumeurs solides [212-214]. La concentration locale en O<sub>2</sub> est un facteur qui affecte de façon significative la fonction des cellules T [215]. En particulier, une faible concentration en O<sub>2</sub> (1% O<sub>2</sub>; hypoxie) entrave la prolifération des lymphocytes T du sang périphérique humain *in vitro* et l'activation des lymphocytes T spléniques de souris *in vivo* [216]. Alternativement, des recherches ont montré dans des modèles tumoraux murins qu'une hyperoxie (c.-à-d. une atmosphère contenant jusqu'à 60% d'O<sub>2</sub>) favorise une régression tumorale dépendante des cellules NK et T. L'étude a montré que les zones hypoxiques étaient réduites et que l'infiltration des cellules NK et T a été améliorée [217].

Cependant, les effets inhibiteurs supposés de l'hypoxie sur les cellules T sont incompatibles avec l'expansion des lymphocytes T observée dans de nombreux sites inflammatoires hypoxiques comme lors d'infections virales du système nerveux central [218]. Des études récentes démontrent que les voies liées à l'hypoxie peuvent faciliter la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques CD8<sup>+</sup> et la clairance des infections virales chroniques ou encore des tumeurs [219].

Dans les lymphocytes T, l'expression de HIF-1 $\alpha$  est favorisée à la fois sur le plan transcriptionnel et traductionnel lors de la stimulation du TCR de ces cellules [220]. Cette augmentation entraîne la transcription d'enzymes du métabolisme glycolytique [221, 222]. L'augmentation de la glycolyse induite par HIF-1 $\alpha$  ressemble au «switch métabolique» observé lors de l'activation des cellules T [221, 223]. Les lymphocytes T au repos utilisent principalement la phosphorylation oxydative (OXPHOS) pour générer de l'ATP, les LT activés eux reprogramment leur métabolisme pour favoriser la glycolyse afin de répondre aux besoins énergétiques nécessaires à une prolifération rapide, et ce même lorsque l'oxygène est disponible [223]. Etant donné que la voie HIF-1 est active et facilite la glycolyse pendant la stimulation des Lymphocytes T, que HIF-1 est induit lors de l'hypoxie, on peut alors concevoir que dans un contexte d'hypoxie inflammatoire les CTL sont capables de proliférer. Il est cependant envisageable que ce phénomène soit étroitement lié au niveau d'hypoxie rencontré par les cellules T.

## 2. Hypoxie et métastases

Comme nous l'avons vu précédemment, la dissémination métastatique est un processus complexe, nécessitant de nombreuses étapes : processus d'EMT, intravasation, extravasation, formation d'une niche prémétastatique, métastase à distance (Figure 25). L'hétérogénéité tumorale et l'environnement hypoxique sont des facteurs clés dans ce processus de dissémination métastatique. En effet, il a été montré cliniquement que HIF1 et HIF2 étaient surexprimés à la fois dans les tumeurs primaires et les métastases. Il a été montré une association entre l'expression de HIF et l'apparition de métastases dans de nombreux cancers, que ce soit celui du sein, de la prostate ou de l'œsophage par exemple [224, 225]. En sachant que 90% des décès associés au cancer sont liés à la dissémination métastatique, il a été mis en évidence que l'expression de HIF est corrélée dans de nombreux cancers à une forte mortalité [226]. Enfin des arguments expérimentaux viennent appuyer ce lien puisque la surexpression de HIF dans des cellules tumorales augmente significativement la dissémination métastatique de ces cellules et à l'inverse une inhibition de son expression abolit la formation de métastases à distance [227, 228].

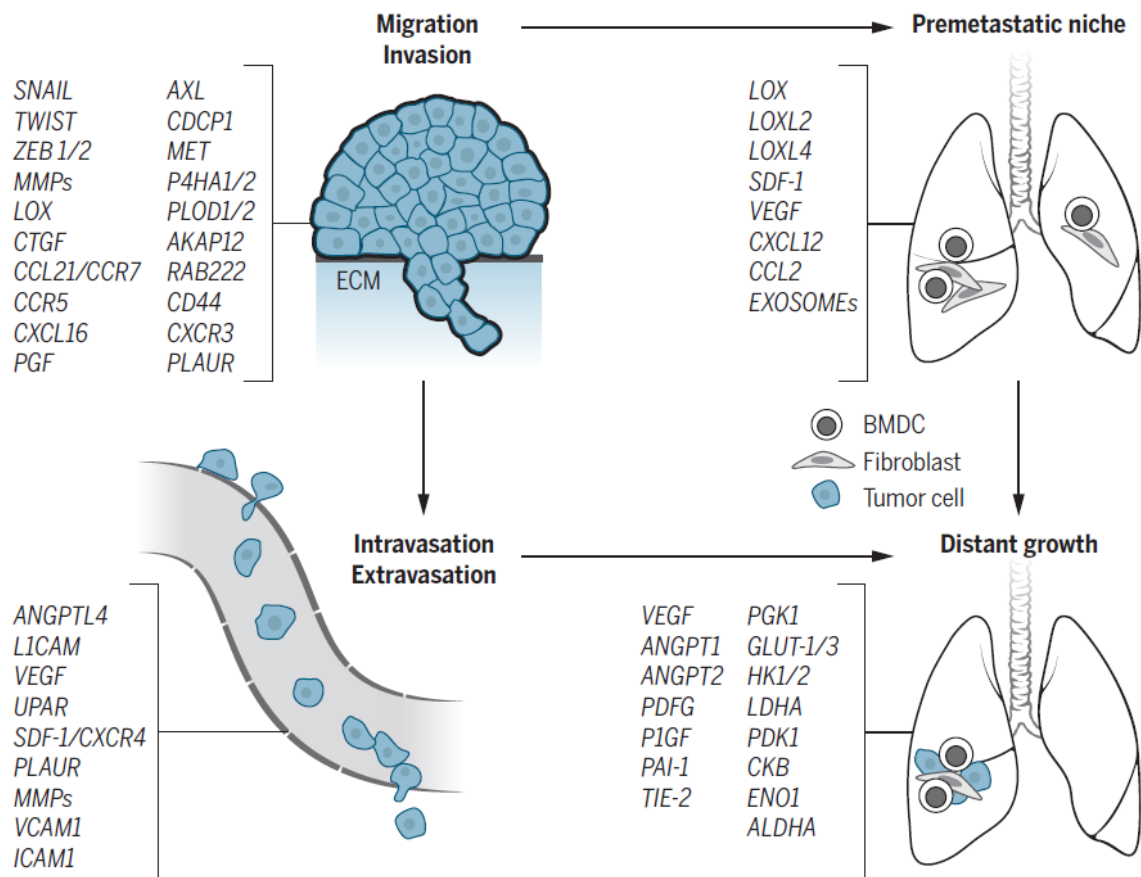
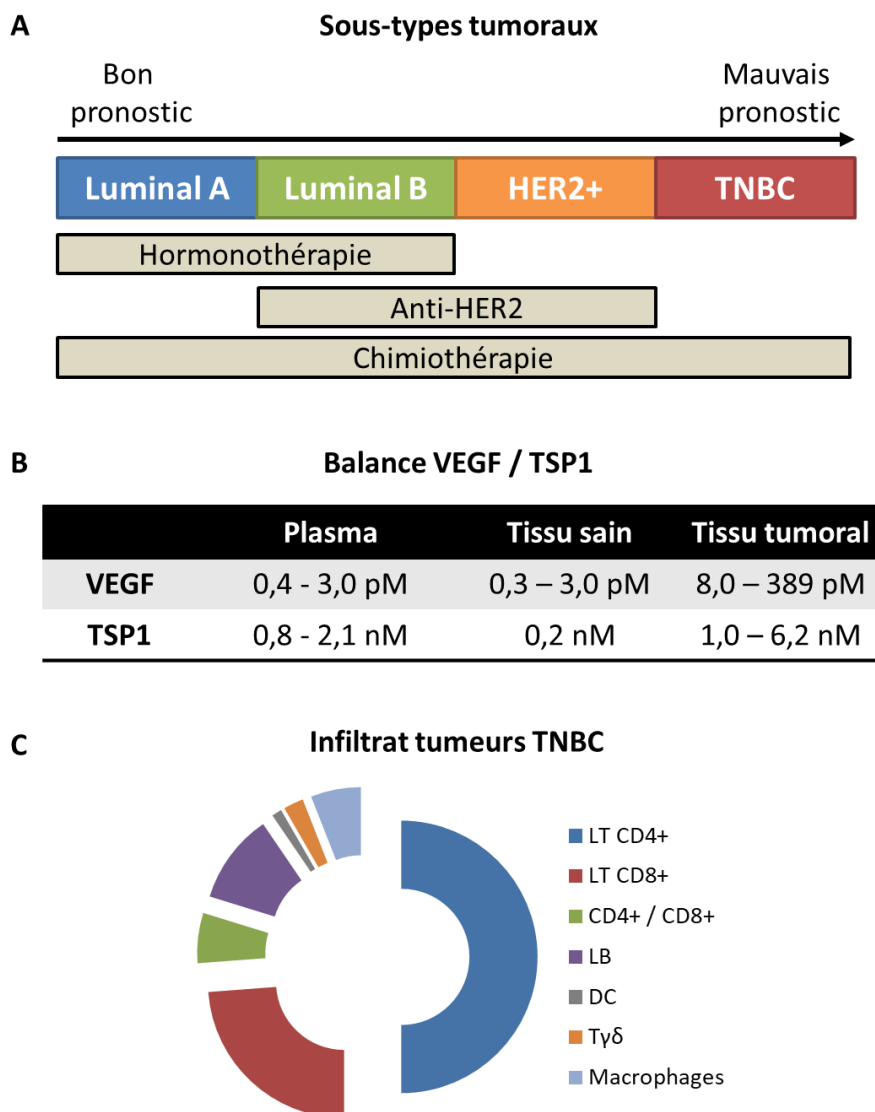


Figure 25 : Gènes régulés par HIF au cours du processus métastatique [229].

## VI. Vers une nouvelle perspective thérapeutique dans les cancers du sein triples négatifs?

Nous venons de voir que de nombreux traitements sont disponibles dans le cancer du sein. Cependant tous les types de tumeurs ne sont pas éligibles aux différentes thérapies d'où la nécessité de la classification de ces tumeurs. Au regard des traitements et de la classification tumorale, on se rend rapidement compte que l'arsenal médical pour les tumeurs TNBC est restreint, et que ces tumeurs présentent également le pronostic de survie le plus sombre. De plus, comme décrit précédemment, ce mauvais pronostic dans les cancers est généralement associé à une dissémination métastatique (Figure 26 A).



**Figure 26 : 3 raisons pour tenter une nouvelle approche thérapeutique des TNBC :**  
**A)** impact de la classification tumorale des cancers du sein sur le pronostic de la maladie [144]. **B)** Parallèle de la concentration en VEGF et en TSP1 dans différents compartiments [230]. **C)** Description de l'infiltrat leucocytaires des tumeurs TNBC [231].

Force est de constater que le modèle proposé initialement sur le switch angiogénique, présent au cours de la vascularisation tumorale, prenait en compte majoritairement l'augmentation des pro-angiogéniques pour expliquer le phénomène et le déséquilibre de cette balance. Il ne faut cependant pas occulter l'augmentation parallèle des anti-angiogéniques et notamment de la TSP1 (Thrombospondine-1) au sein même des tumeurs (Figure 26 B) même si, au niveau de la tumeur angiogénique, cette augmentation ne contrebalance pas les effets angiogènes.

L'utilisation des anti-angiogéniques dans le cancer du sein ne présentant pas de résultats probants, ne serait-ce pas intéressant d'envisager une approche différente?

Est-ce que prendre le contre-pied de ces thérapies en inhibant cette fois-ci un anti-angiogénique endogène pourrait avoir un impact thérapeutique intéressant sur la normalisation vasculaire?

C'est ce que nous nous proposons d'étudier ici avec l'inhibition de la TSP1 dans un contexte tumoral.

Enfin, il est à noter que les tumeurs TNBC présentent un infiltrat lymphocytaire important mais pourtant, les tentatives actuelles d'immunothérapies sont très décevantes (Figure 26 C). Est-ce qu'une éventuelle amélioration de la vascularisation des tumeurs TNBC pourrait dans le futur permettre une réactivation du système immunitaire déjà présent ? Et pourquoi pas des effets synergiques avec les immunothérapies déjà existantes également en échec dans le cancer du sein ?

C'est dans cette optique que s'inscrit mon projet de thèse et je vais tenter d'apporter un début de réponse à ces questions lors du travail expérimental. Mais avant d'entrer dans le vif du sujet, détaillons plus précisément ce qu'est la Thrombospondine-1.

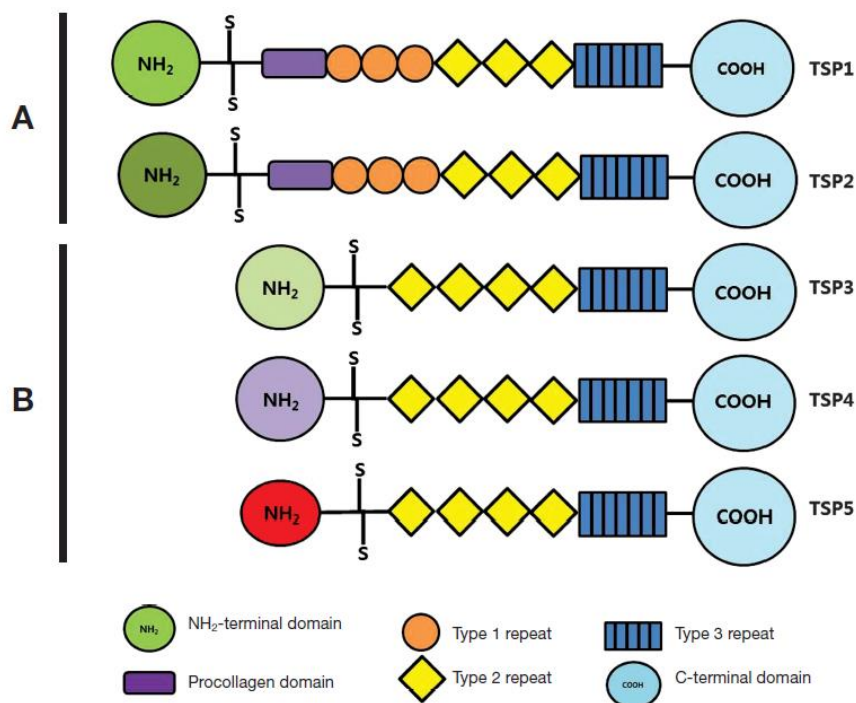
# VII. La Thrombospondine-1, une nouvelle cible thérapeutique dans les cancers du sein triple négatifs ?

## 1. Généralités

### 1.1 Structure et interactome

C'est en 1971 que la glycoprotéine Thrombospondine-1 est découverte par Baenziger à la surface des plaquettes activées par la thrombine dont elle tire son nom [232].

On retrouve plusieurs membres dans la famille des Thrombospondines, répartis en 2 groupes, A et B, prenant en compte leurs caractéristiques structurales différentes. La TSP1 et TSP2 forment le groupe A ayant pour caractéristique commune d'être des homotrimères de 450kDa. La TSP3, TSP4 et TSP5 sont quant à eux des homopentamères formant le groupe B (Figure 27) [233].



**Figure 27 :** Structures et domaines de la Thrombospondine humaine. Les thrombospondines sont une famille de cinq glycoprotéines extracellulaires qui sont composées de plusieurs motifs structuraux bien définis. Les cinq membres contiennent les répétitions de type 2, les répétitions de type 3 et un domaine C-terminal. [234]

Les thrombospondines du groupe A possèdent, contrairement à celles du groupe B, des répétitions dites de type I (TSR : Thrombospondin type I repeats) ainsi qu'un domaine d'homologie au procollagène. Il est à noter que l'expression de TSP1 et TSP2 est ubiquiste contrairement à TSP3, TSP4, et TSP5 qui ne sont exprimées uniquement dans certains tissus [235, 236].



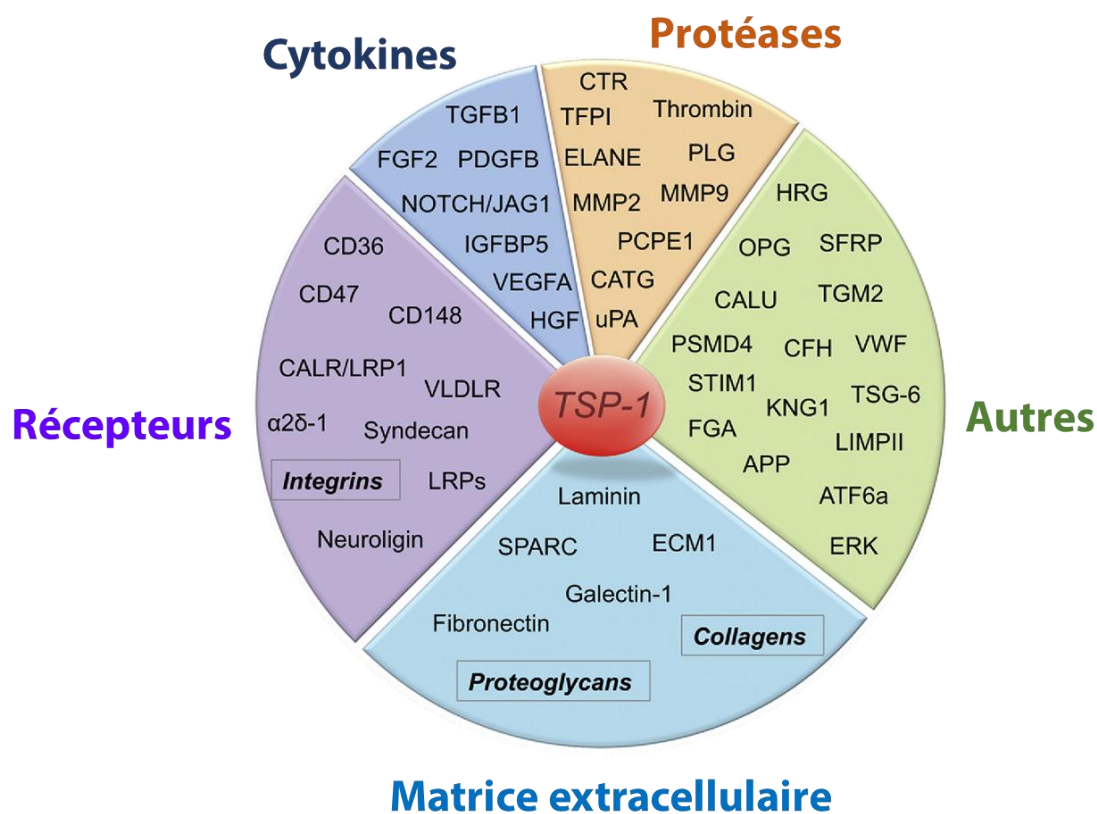


Figure 28 : Interactome de la TSP1 d'après Resovi, A., et al. (2014). Matrix Biol

TSP1 est capable d'interagir avec de très nombreuses molécules présentes à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire (Figure 28). Concernant la matrice extracellulaire, on y retrouve par exemple différents types de collagènes et la fibronectine avec lesquels TSP1 interagit au niveau de son domaine N-terminal, ce qui peut expliquer d'ailleurs sa forte concentration dans la matrice extracellulaire [237].

La TSP1 dispose également de 3 TSRs. C'est au niveau de l'une d'entre elle que la TSP1, et uniquement elle, va être capable de fixer le TGFβ latent. Cette interaction va permettre l'activation du TGFβ en le libérant de LAP, sa protéine associée [238]. Les répétitions de type I vont également permettre à la TSP1 d'interagir avec le CD36 des cellules endothéliales permettant ses activités anti-angiogéniques [239].

Concernant ses répétitions de type III, celles-ci sont capables de lier les intégrines α11β3 et αvβ3 ainsi que de fixer le calcium. Ces répétitions ont également été montrées comme étant impliquées dans l'adhésion et la prolifération cellulaire. Enfin, le domaine C terminal interagit, entre autres, avec le récepteur CD47, les intégrines β3 et β6 ainsi que des protéoglycans impliqués dans l'adhésion cellulaire [240].

## 1.2. Régulations de la TSP1

Codé par le gène *THBS1*, la TSP1, du fait de ces nombreuses interactions et de ses propriétés anti-angiogéniques, est un gène hautement régulé et conservé au sein des espèces. En effet, Lawler montre en 1991 qu'il existe 95% d'homologie entre la séquence d'acides aminés chez l'Homme et celle observée chez la souris [241]. Concernant la régulation de TSP1, on l'observe à différents niveaux, aussi bien génique, qu'épigénétique ou même post-transcriptionnelle et traductionnelle. Il a été montré une diminution de l'expression de TSP1 suite à une perte d'un allèle dans un contexte tumoral [242]. Le gène *THBS1* peut également être la cible de modifications épigénétiques via la méthylation d'îlots CpG de son promoteur ou la modification de la méthylation des histones également associés au promoteur. Ces modifications épigénétiques conduisent toutes les deux à une diminution de la transcription de *THBS1* [243, 244]. Des régulations transcriptionnelles et traductionnelles ont été observées comme la stabilisation de l'ARN messager TSP1 dans les cellules endothéliales hypoxiques, expression plus tard décrite comme dépendante de HIF1 $\alpha$  dans les cellules musculaires lisses [245, 246]. Enfin, le messenger de TSP1 peut être régulé négativement par des micro-ARN (miR-487b) ou stabilisé par des protéines de liaison aux ARNm (ARE I ou HuR) tous agissant au niveau de la région 3' non traduite (3'UTR) [247-249].

## 1.3 Rôles physiologiques

La TSP1 est sécrétée par de nombreuses cellules. Cependant les plus fortes concentrations sont retrouvées au niveau des plaquettes, et c'est d'ailleurs lors de l'étude de l'agrégation plaquettaire que cette protéine a été découverte. La TSP1 joue en effet un rôle important dans la formation de thrombus en favorisant l'agrégation plaquettaire *via* l'inhibition de la dégradation du von Wilbraun Factor (VWF) [250]. La régulation de la formation des thrombus sanguins est une mécanique complexe, TSP1 va à la fois agir sur le CD36 et le CD47 des plaquettes afin de favoriser les thromboses [251-253]. C'est d'ailleurs un axe de recherche important dans les thérapies liées aux thromboses veineuses et aux crises vaso-occlusives drépanocytaires [254].

Il a également été démontré dans de nombreux types cellulaires normaux et tumoraux que TSP1 joue un rôle majeur dans l'adhésion/dé-adhésion des cellules et donc dans la migration cellulaire dans son ensemble.

En effet, TSP1 augmente sensiblement l'adhésion de cellules de mélanome et du cancer du sein par exemple [255, 256]. Du côté des types cellulaires normaux, les kératinocytes, les cellules fibroblastiques et musculaires voient leur adhésion améliorée grâce à TSP1 [257-259]. De façon tout à fait intéressante TSP1 augmente l'adhésion préférentielle des LT-CD4<sup>+</sup> à la MEC *via*

l'interaction avec l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  [260]. Enfin, TSP1 va favoriser la dé-adhésion notamment des cellules endothéliales à la MEC [261].

## 1.4. TSP1 et angiogénèse

C'est le rôle physiologique de la TSP1 le plus important de cette protéine et il fut caractérisé pour la première fois par Good en 1990 travaillant sur des modèle d'angiogénèse rétinienne chez le rat [262]. Les propriétés anti-angiogéniques de la TSP1 sont essentiellement médiées par les répétitions de type I qu'elle contient [263].

Pour ce faire TSP1 est notamment capable de séquestrer des molécules comme le VEGF ou le FGF2 afin d'empêcher la stimulation de la prolifération des cellules endothéliales [264, 265]. Comme nous l'avons vu précédemment, en favorisant la dé-adhésion des cellules endothéliales à la MEC, TSP1 est une nouvelle fois capable d'inhiber la mise en place de la vascularisation [261]. Concernant ses rôles directs de ses activités anti-angiogéniques, la TSP1 est capable d'induire l'apoptose des cellules endothéliales *via* le CD36 présent à la surface de celles-ci. On constate alors une inhibition de la signalisation pro-survie induite par le VEGF sur les cellules endothéliales et, en parallèle, le déclenchement d'une cascade moléculaire conduisant à une apoptose dépendante des caspases de ces cellules [266, 267].

Enfin, la liaison de la TSP1 avec le CD47 situé sur les cellules endothéliales rompt l'interaction CD47/VEGFR-2 inhibant la signalisation pro-survie du VEGF [268]. Mais cela induit également une inhibition de la signalisation du NO régulateur important de la perfusion des tissus [269].

## 2. TSP1 et immunité

### 2.1 TSP1 et CD47

CD47 est une protéine transmembranaire appartenant à la superfamille des immunoglobulines (IgV). Son expression est ubiquitaire et permanente sur les cellules de tous les tissus. On retrouve également une expression très importante sur les leucocytes, les plaquettes sanguines et les hématies. Le CD47 est capable d'interagir avec la TSP1 mais également avec SIRP- $\alpha$  et  $\gamma$  (Signal Inhibitory Regulatory Protein) et différentes intégrines. Le CD47 étant le « don't eat me signal », une surexpression par les cellules tumorales a pour conséquence d'inhiber la phagocytose de celles-ci par les macrophages [270].

Une liaison TSP1-CD47 conduit à une mort cellulaire programmée : il a en effet été mis en évidence l'induction d'une mort cellulaire caspase indépendante des cellules B issues de patients

atteints de leucémie lymphoïde chronique à cellules B [271]. Ces observations ont été élargies à des lymphocytes T activés et à une lignée cellulaire T Jurkat [272]. Lors de ces différents travaux il est intéressant de noter qu'il s'agit à chaque fois de cellules lymphocytaires activées qui subissent l'effet délétère de cette liaison. Dans notre contexte tumoral nous pouvons envisager que limiter cet engagement TSP1-CD47 en inhibant la TSP1 peut conduire à une diminution de la mortalité des TILs activés et donc encourager une réponse anti-tumorale efficace.

Concernant la réponse immunitaire innée, il a été montré que la liaison de la TSP1 endogène sécrétée par les Cellules Dendritiques humaines (DCs) au CD47 inhibait la maturation de celle-ci. Il a également été montré une diminution de la synthèse de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-12, le TNF- $\alpha$ , GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) [273, 274]. L'engagement du CD47 sur les monocytes conduit également à une diminution de la sécrétion d'IL-12 [275].

D'un point de vue de la réponse adaptative, L'équipe du Dr Miller a mis en évidence en 2013 que la fixation de la TSP1 sur le CD47 inhibe l'activation lymphocytaire [276]. Par ailleurs, la signalisation induite par CD47 régule l'activité immunosuppressive du VEGF dans les lymphocytes T [268] et leur activation dépendante du TCR [277]. Il a également été montré que l'engagement du CD47 sur des LT humains naïfs inhibait la différenciation en Th1 en conditions polarisantes. Ces données sont confirmées en conditions non polarisantes puisque ces mêmes cellules activées deviennent anergiques et voient l'expression d'IL-2 et d'IL-2R fortement diminuées [275, 278]. Une fois de plus, ces données peuvent nous laisser penser qu'une stratégie d'inhibition de la TSP1 peut influencer positivement une évolution vers une réponse lymphocytaire T spécifique et efficace.

## 2.2. TSP1 et CD36

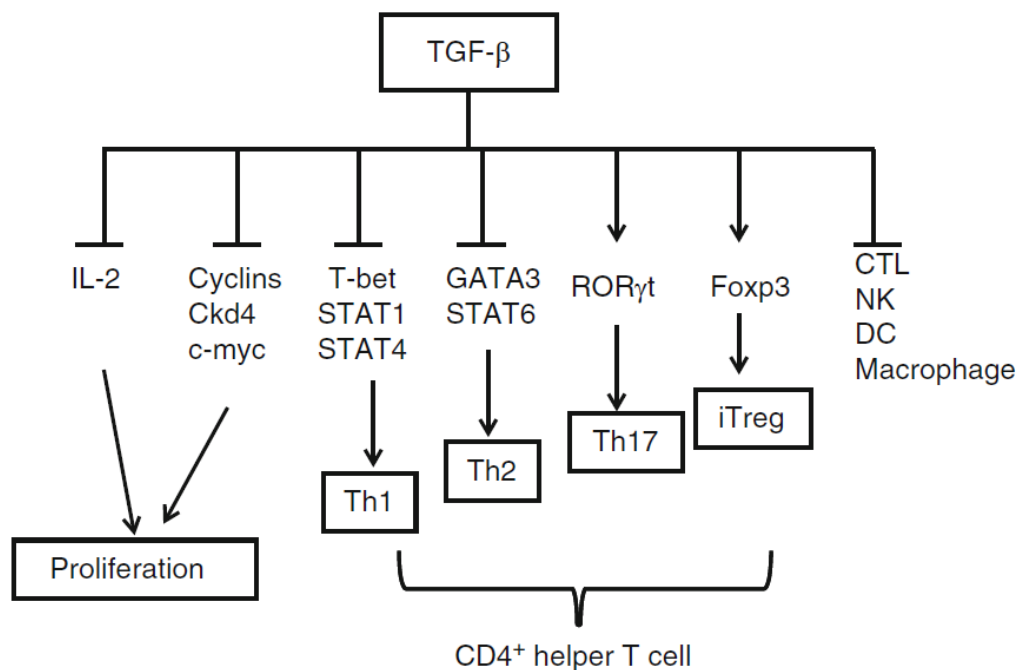
Les premiers travaux sur CD36 et inflammation ont mis en évidence la capacité des macrophages à capter les LDL oxydées *via* ce récepteur [279]. De plus, comme tous les scavengers receptor, le CD36 est capable de reconnaître une séquence moléculaire spécifique qui peut par exemple être présente sur des pathogènes comme des bactéries Gram (-) ou Gram (+) [280]. TSP1 pourrait donc entrer en concurrence avec cette reconnaissance et ainsi diminuer la réponse de l'immunité innée.

## 2.3 TSP1 et TGF $\beta$

Comme discuté précédemment la TSP1 est l'activateur majeur du TGF $\beta$ . Les effets immunosuppresseurs du TGF $\beta$  actif sont bien établis, en particulier dans les tumeurs de haut grade. Le TGF $\beta$  sous sa forme active est notamment responsable d'une diminution de la

maturation des cellules dendritiques, d'une diminution de l'activation des lymphocytes et également de celle de la cytotoxicité de cellules Natural Killer (NK) (Figure 29) [281]. Prenons le temps de détailler ses effets :

- **Impact sur les Th1** : Le TGF- $\beta$  est un suppresseur majeur de la différenciation des lymphocytes T effecteurs vers le profil Th1. En effet le TGF- $\beta$  actif est capable d'inhiber la production de T-bet, facteur de transcription indispensable à l'engagement des cellules vers une différenciation Th1 [282, 283]. Le TGF- $\beta$  entraîne également la diminution de l'expression d'IL-12R $\beta$ 2 conduisant à une moins bonne réponse à l'IL12 présente dans le microenvironnement. De même, le TGF- $\beta$  conduit à l'inhibition de la production d'INF $\gamma$  par les cellules NK ce qui inhibe de façon indirect la différenciation des lymphocytes T en Th1 [284].



- **Figure 29 : synthèse des effets du TGF- $\beta$  sur le système immunitaire [91].**

- **Impact sur les Th2** : Il a également été largement démontré l'impact négatif du TGF- $\beta$  sur la différenciation des lymphocytes en Th2. En effet le TGF- $\beta$  va une nouvelle fois agir en inhibant un facteur clé de la différenciation Th2 qu'est GATA3 [285, 286]. Ainsi, TGF- $\beta$  induit Sox4 qui se fixe directement sur GATA3 inhibant ses activités transcriptionnelles [287].
- **Impact sur les Treg** : Le TGF- $\beta$  contribue à la suppression de la réponse par les LT-CD8<sup>+</sup> en favorisant l'apparition de LTreg Foxp3<sup>+</sup> [288]. Dans un contexte tumoral, le TGF- $\beta$  va

fortement impacter les Treg induits. En effet en combinaison avec l'IL2, le TGF- $\beta$  va favoriser la conversion des LT-CD4<sup>+</sup> naïfs en Treg en induisant l'expression de Foxp3 au sein de ceux-ci. Cette expression de Foxp3 intervient après l'engagement du TCR, via Smad3, induit par le TGF- $\beta$ , qui interagit directement avec le promoteur du gène Foxp3 [90, 289, 290].

L'impact du TGF- $\beta$  sur l'induction de Foxp3 peut être augmenté en présence d'acide rétinoïque produit par les macrophages et les cellules dendritiques [291]. Ce phénomène se produit notamment au niveau des poumons, des intestins et de la peau [292-294]. Il faut également garder à l'esprit que les LTreg sont des producteurs majeurs de TGF- $\beta$ .

- **Impact sur les LT-CD8<sup>+</sup>** : En plus de jouer un rôle important sur les sous-populations de LT-CD4<sup>+</sup>, le TGF- $\beta$  joue un rôle important dans le contrôle de la réponse des LT-CD8<sup>+</sup>. En effet il a été démontré *in vitro* que le TGF- $\beta$  est capable d'inhiber la prolifération des LT-CD8<sup>+</sup> de façon indépendante de la signalisation Smad3 [295]. De plus le TGF- $\beta$  est capable d'inhiber les fonctions effectrices de ces lymphocytes *via* différents mécanismes (inhibition des perforines, diminution de l'expression d'INF $\gamma$ ...) [296, 297]. Le TGF- $\beta$  est également indispensable dans le contrôle négatif de l'expansion et de l'activation des LT-CD8<sup>+</sup> *in vivo* [298]. La présence de TGF- $\beta$  dans l'environnement induit aussi une diminution de l'expression de T-bet dans les LT-CD8<sup>+</sup> [297]. Le TGF- $\beta$  va également induire une diminution de l'expression de FasL dans ces cellules T [299].
- **Impact sur les cellules dendritiques** : Le TGF- $\beta$  peut moduler la réponse immunitaire adaptative en impactant directement les cellules dendritiques. Il a notamment été démontré que le TGF- $\beta$  pouvait convertir des cellules dendritiques humaines immatures vers un phénotype immunosuppresseur réfractaire aux stimulations. Elles sont alors caractérisées par un phénotype immature [300]. Une exposition précoce des cellules dendritiques au TGF- $\beta$  conduit à l'apparition d'une suppression de l'activation des lymphocytes T contrairement à des cellules dendritiques matures traitées dans les mêmes conditions par du TGF- $\beta$ . Le moment où les DC sont exposées au TGF- $\beta$  au cours de leur différenciation revêt donc un caractère capital pour une bonne maturation des DC et donc une bonne activation du système immunitaire adaptatif [301].  
Le TGF- $\beta$  va également impacter la présentation antigénique, par exemple en diminuant l'expression de CMHII *via* une signalisation Smad3 [302]. Enfin, la présence de TGF- $\beta$  entraîne une inhibition de la production d'IL-12 par les DC et ce même en présence de molécules pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$  ou l'IL-1 [303].

## VIII. Objectif de la thèse

Face aux échecs thérapeutiques observés dans le cancer du sein nous avons choisi d'étudier une stratégie qui, en théorie, permettrait d'améliorer l'oxygénation tumorale. L'utilisation des anti-angiogéniques a permis une étude plus approfondie de la vascularisation tumorale et leurs effets ont toujours été en lien avec l'observation d'une normalisation de la vascularisation intratumorale. En effet, malgré la caractéristique hautement vascularisée des tumeurs, les vaisseaux sanguins tumoraux ne sont que peu fonctionnels. En conséquence, l'utilisation de médicaments anti-angiogéniques a montré une utilité pour la normalisation des vaisseaux. Toutefois, cette approche conduit souvent à un renforcement de l'hypoxie qu'il faut prendre en considération. Nous avons donc fait le choix d'adopter une stratégie inverse en inhibant la Thrombospondine-1 (TSP1) (un anti-angiogénique endogène majeur) afin de normaliser l'angiogenèse tumorale tout en limitant l'hypoxie.

L'objectif principal de la partie expérimentale de ma thèse est d'évaluer si TSP1 est une cible thérapeutique potentielle dans les TNBC.

Dans un premier temps, nous avons réalisé des méta-analyses chez des patientes atteintes de TNBC pour évaluer l'impact pronostique de l'expression de TSP1 dans les biopsies tumorales. De plus, nous avons analysé les signatures géniques enrichies chez les patientes présentant une forte ou une faible expression de TSP1. Certaines de nos observations ont été confirmées par des études d'IHC sur des biopsies de TNBC issues d'une cohorte prospective.

Dans un deuxième temps, nous avons évalué l'impact de la diminution de l'expression de TSP1 par interférence ARN dans un modèle murin de TNBC de fond génétique BALB/c (lignée 4T1). Les conséquences de cette stratégie ont été analysées *in vitro* et *in vivo* chez la souris immunocompétente et immunodéficiente (souris Nude). Ainsi, après greffe orthotopique des cellules tumorales chez la souris, nous avons évalué la croissance de la tumeur primaire et la dissémination métastatique dans les poumons. Nous avons également étudié l'impact de l'interférence ARN de TSP1 sur la vascularisation, l'hypoxie et l'infiltrat immunitaire des tumeurs ainsi que sur la réponse immunitaire systémique. Finalement, nous avons évalué la réponse aux anti-PD-1 chez la souris.

## IX. Résultats

### **Thrombospondin-1 impairs lymphocyte infiltration in tumors and response to anti-PD-1 in triple negative breast cancer**

*Elie MARCHETEAU<sup>1,2,3</sup>, Thomas FARGE<sup>1,3</sup>, Michael PERES<sup>1</sup>, Guillaume LABROUSSE<sup>1</sup>, Julie TENET<sup>1</sup>, Stéphanie DELMAS<sup>2</sup>, Maud CHUSSEAU<sup>2</sup>, Hilary BROOKS<sup>2</sup>, Raphaëlle DUPREZ-PAUMIER<sup>4</sup>, Camille FRANCHET<sup>4</sup>, Florence DALENC<sup>5</sup>, Caroline IMBERT<sup>1</sup>, Justine NOUJAREDE<sup>1,3</sup>, Céline COLACIOS<sup>1,3</sup>, Hervé PRATS<sup>1,3</sup>, Florence CABON<sup>1,2</sup> and Bruno SEGUI<sup>1,2</sup>.*

<sup>1</sup> Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037, Université Toulouse III Paul-Sabatier, ERL 5294 CNRS, 2 avenue Hubert Curien, 31047 Toulouse cedex 1, France.

<sup>2</sup> SeleXel, 1 place Pierre Potier, BP 50624, 31106 Toulouse Cedex 1, France

<sup>3</sup> Université Toulouse III – Paul Sabatier, 31062 Toulouse, France

<sup>4</sup> Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, CHU de Toulouse, France

<sup>5</sup> Institut Claudius Regaud, ICUT-Oncopole Toulouse, France



## Abstract

Tumor angiogenesis promotes cancer cell metastasis and antiangiogenic drugs have been developed for cancer therapy. Herein, we investigated the role of Thrombospondin-1 (TSP1), which is a major endogenous anti-angiogenic molecule, in triple negative breast cancer. We show that high TSP1 expression in tumor samples from TNBC patients is associated with a worse prognosis and gene signatures of epithelial-mesenchymal transition and TGF $\beta$  signaling. At the opposite, gene signatures of IFN $\gamma$  signaling and lymphocyte activation are enriched in tumors expressing TSP1 at low levels. Analysis of TNBC biopsies in a prospective cohort show that TSP1 expression is inversely correlated with the content of CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes (TILs). Next, we show that RNA interference of TSP1 in a mouse TNBC model (4T1) facilitates the vascularization of tumors and lymphocyte infiltration in tumors. Strikingly, TSP1 knockdown dramatically impairs metastatic dissemination of 4T1 to lungs in immunocompetent but not immunodeficient mice. Moreover, TSP1 knockdown sensitizes 4T1 cells to anti-PD-1 therapy. Collectively, TSP1 inhibition may represent an original approach for improving lymphocyte infiltration in tumors and immunotherapy efficacy in TNBC.

## Introduction

Breast cancer is the most frequent type of cancer in women world-wide, among which the triple negative breast cancer (TNBC) is one of the most aggressive subtypes, exhibiting high metastatic properties. Moreover, TNBC are highly resistant to chemo and radiotherapies and no targeted therapies are currently available [1]. Numerous therapeutic strategies, including immunotherapies, which target immune checkpoint inhibitors, show little success for breast cancer. For instance, in the KEYNOTE-086 study, the Pembrolizumab, an anti-PD-1 blocking antibody used in monotherapy in previously treated metastatic TNBC, demonstrated durable antitumor activity in a small subset of patients with a median progression-free survival (PFS) of 2.0 months and a 6-month rate of 14.9% [2]. Similar resistance was demonstrated in TNBC patients with anti-angiogenic therapies, such as Bevacizumab, a blocking antibody targeting VEGF-A, a major pro-angiogenic growth factor [3, 4].

Thrombospondin-1 (TSP1) is a major endogenous anti-angiogenic protein secreted by various cell types, including cancer cells [5]. TSP1 is frequently repressed in the early stages of tumor development, contributing to an increased tumor angiogenesis [6]. Intriguingly, TSP-1 is overexpressed in many tumor types (prostate, pancreas, melanoma, glioblastoma, breast, gallbladder, etc.) at advanced stages [7-9]. Moreover, whereas TSP1 is expressed at very low levels in normal breast, a high TSP1 level is associated with a bad prognosis in breast cancer [10]. Accordingly, TSP1 levels are higher in the plasma of metastatic patients as compared to non-metastatic patients [3, 11, 12]. TSP1 has pleiotropic functions and is considered as the major activator of TGF $\beta$ , a potent immunosuppressive and pro-metastatic cytokine [13-15]. As a matter of fact, papers demonstrated that TSP1 likely modulates immune response and metastasis of cancer cells [8, 16]. To the best of our knowledge, whether TSP1-dependent metastasis process relies on its capacity to modulate immune response remains to be established.

Herein, we investigated the impact of TSP1 expression in tumor biopsies from TNBC patients on both the prognosis and the immune response. We next performed preclinical analyses of the consequence of TSP1 knockdown in the 4T1 mouse TNBC model on the immune response and metastasis, not only in immunocompetent mice but also immunodeficient mice. Finally, we evaluated the consequences of TSP1 knockdown on the response to anti-PD-1 therapy.

## Results

### **TSP1 expression is associated with a poor prognosis in TNBC patients and a low CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in tumors.**

We initially evaluated the impact of TSP1 expression in tumor samples on the prognosis of patients affected with breast cancer. *In silico* analysis that high expression of the gene encoding TSP1 in breast cancers was of a poor prognosis. This phenomenon was more pronounced when we restricted our analysis to the TNBC (Fig. 1A). To get insight into the putative mechanisms associated with TSP1 expression and cancer progression, we performed GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) in 122 tumor samples from the TCGA breast cancer cohort by comparing the gene signatures in tumors expressing either low or high TSP1 levels. Strikingly, “Epithelial Mesenchymal Transition” and “TGF $\beta$  signaling” pathways were significantly enriched in tumors expressing TSP1 at high levels (Fig. 1B and Supplementary Fig. 1A and 1B). At the opposite, low expression of TSP1 was associated with gene signatures of “Lymphocyte activation” and “Interferon gamma response” (Figure 1C and Supplementary Fig 1C and 1D). We next analyzed TSP1 expression and TILs by immunohistochemistry in primary tumor samples from TNBC patients in a prospective cohort. We found an inverse correlation between TSP1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes, including CD8<sup>+</sup> TILs (Figs. 2A and B).

Collectively, the data indicate that TSP1 expression in tumor samples is likely associated with an invasive phenotype and immune escape mechanisms.

### **TSP1 knockdown in 4T1 TNBC mouse model impairs lung metastasis in mice**

To evaluate whether TSP1 plays a role in TNBC progression, we performed experiments on the 4T1 murine breast cancer cell line, which is a unique and well-established TNBC mouse model. 4T1 cell line was stably transfected with a plasmid encoding a control shRNA (4T1 shCTL) or a shRNA targeting TSP1 mRNA (4T1 shTSP1). TSP1 expression was reduced by 70% in 4T1 shTSP1 as compared to 4T1 shCTL (Fig. 3A), with no impact on cell proliferation *in vitro* (Fig. 3B). 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 cells were next orthotopically grafted into the mammary fat pad of immunocompetent mice to monitor tumor progression. Whereas primary tumor growth was not significantly altered, metastatic spread to lung was dramatically reduced by TSP1 knockdown (Fig. 3C-E). Indeed, 66% of Balb/c grafted with the 4T1 shCTL exhibited lung metastasis compared to 23% upon 4T1 shTSP1 graft, as evaluated by counting the number of metastases on the lung (Fig. 3D) or by quantifying lung metastatic load by RT-qPCR (Fig. 3E).

To assess the involvement of the adaptive immune response in the modulation of tumor progression, we performed the same experiments in Nude mice, which lack T cells. The primary

tumour growth (Fig. 3C) as well as the lung metastases (Figs. 3D and E) were enhanced in Nude mice as compared to the immunocompetent mice. Strikingly, TSP1 knockdown did not compromise 4T1 lung metastasis in Nude mice.

Collectively, the data demonstrate that TSP1-dependent 4T1 lung metastasis is a consequence of T cell immune response modulation.

### **TSP1 knockdown in 4T1 TNBC mouse model enhances tumor infiltration by CD8 T cells.**

We next sought to monitor the consequences of TSP1 knockdown on the immune response. We initially performed immunohistochemistry experiments on tumors collected at day 11 post 4T1 shCTL or 4T1 shTSP1 cell graft in immunocompetent mice (Fig. 4A). As expected, TSP1 knockdown in 4T1 tumors significantly increased the number of tumor vessels, as evaluated by CD31 staining (Fig. 4B). This enhanced vascularization was associated with a significant decrease in CAIX positive hypoxic zones, indicating that tumor angiogenesis was more functional upon TSP1 knockdown (Fig. 4B). Interestingly, TSP1 knockdown not only significantly reduced the expression of the active TGF $\beta$ , which is a potent immunosuppressor cytokine, but also increased the content of CD8<sup>+</sup> TILs (Fig. 4B). As a matter of fact, TSP1 knockdown did not significantly enhance the tumor density of high endothelial venules (HEV), which are major gateways for lymphocyte entry in breast tumors (Supplementary Fig. 2) [17].

To further investigate the consequences of TSP1 knockdown on the immune response, we performed flow cytometry analyses of lymphocytes in the tumor bed (Fig. 4C) and tumor-draining lymph nodes (Supplementary Fig. 3B). These experiments confirmed the significant increase of the proportion of CD8<sup>+</sup> T cells in TSP1 knockdown tumors, and showed similar trends for CD4<sup>+</sup> T cells and regulatory T cells (Fig. 4D). Of note, the CD8/CD4 and CD8/CD4 Foxp3 ratios remained unchanged (Fig. 4E and supplementary Fig 3A), likely reflecting a non-selective increase in lymphocyte tumor infiltration upon TSP1 knockdown. The augmentation of TILs in shTSP1 tumors was not associated with significant changes in the proliferation of T cells as evaluated by KI67 staining (Supplementary Fig. 3A). Whereas TSP1 knockdown in 4T1 cells did not alter the T cell content in tumor-draining lymph nodes, it significantly increased the CD8<sup>+</sup> T cells/Tregs ratio (Supplementary Fig. 3B). The latter observation indicates that the effects of TSP1 knockdown in tumor cells on the immune response are unlikely restricted to the primary tumors, enhancing the immune response in tumor draining lymph nodes.

Collectively, the data show that TSP1 knockdown increases functional tumor angiogenesis and the lymphocyte tumor infiltration in a non-selective manner.

### **TSP1 knockdown in 4T1 TNBC mouse model enhances anti-PD-1 therapy efficacy.**

Targeting PD-1 or PD-L1 with blocking monoclonal antibodies has shown objective clinical responses in a small proportion of patients affected with TNBC [2, 18]. Because immunotherapy-induced anti-tumor immune responses depend on the expression of PD-1 and its ligands (i.e., PD-L1/2) [19], we first analyzed the expression of the *PDCD1* (encoding PD-1), *PDCD1LG1* (encoding PD-L1), *PDCD1LG2* (encoding PD-L2) genes in TNBC tumor samples expressing TSP1 at low or high levels. High TSP1 expression was associated with a significant reduction of PD-1 levels. Whereas the expression of PD-L2 was similar in both groups, PD-L1 expression was slightly, yet not significantly, reduced in TNBC tumor samples exhibiting high levels of TSP-1 (Fig. 5A).

We next analyzed the expression of PD-1 on CD8<sup>+</sup> TILs from 4T1 shCTL and shTSP1 tumors in mice (Fig. 5B). Whereas the proportion of PD-1<sup>+</sup> cells among CD8<sup>+</sup> TILs was similar in both groups (Fig. 5C), the proportion of PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs among total cells significantly increased upon TSP1 knockdown (Fig. 5D), likely reflecting the increase of CD8<sup>+</sup> T cell infiltration in 4T1 shTSP1 tumors (as shown in Fig. 4). Moreover, PD-1 expression was significantly augmented on those cells as evaluated by the increase of the Mean Fluorescence Intensity (Fig. 5E). Thus, TSP1 knockdown was associated with a PD-1 expression increase at the cell surface of CD8<sup>+</sup> TILs from 4T1 tumors in mice.

Finally, we investigated the impact of TSP1 knockdown on the anti-PD1 therapy in immunocompetent mice. We found that anti-PD-1 therapy efficacy towards 4T1 tumors was significantly enhanced upon TSP1 knockdown under our experimental conditions (Fig. 5F).

Collectively, the data indicate that silencing TSP1 is associated with an upregulation of PD-1 on CD8<sup>+</sup> TILs and enhances the efficacy of anti-PD-1 therapy in TNBC.

## Discussion

In the present paper, we provide evidence that TSP1, produced by breast cancer cells, not only impairs functional tumor angiogenesis but also likely contributes to immune escape mechanisms and resistance to anti-PD-1 therapy in a well-established TNBC mouse model.

Our analysis of public database in human breast cancer strongly supports this tenet. Indeed, high expression levels of the mRNA encoding TSP1 in tumors is associated with a bad prognosis in TNBC. Of note, high TSP1 levels in plasma are found in patients exhibiting a ganglionic infringement in breast cancer [20]. In 2015, Campone and co-workers showed that high TSP1 expression in tumors is associated with the metastatic relapse of TNBC [9]. Moreover, the expression of TSP1 is increased in the most advanced stages of various cancers including kidney, prostate and pancreas cancers [8, 21]. Thus, considering our own observations and publications from the literature, it is tempting to speculate that TSP1 may constitute a bad-prognosis biomarker in various solid cancers, including TNBC.

Strikingly, high TSP1 expression in tumor samples from TNBC is associated with a gene signature of both EMT and TGF $\beta$  pathways. As a matter of fact, TGF $\beta$  is a potent inducer of the EMT process and contributes to immune escape [22, 23]. At the opposite, gene signatures of lymphocyte activation and INF $\gamma$  pathways are enriched in the TNBC samples expressing low TSP1 levels. Accordingly, we showed by immunohistochemistry on tumor samples from patients affected with TNBC that the infiltration of CD8<sup>+</sup> T cells is statistically increased in tumors having low levels of TSP1. Collectively, our data suggest that TSP1 expression in TNBC contributes to the activation of TGF $\beta$ , EMT process and immune escape mechanisms, in good agreement with the literature in other pathophysiological contexts [15, 16, 24-26].

To clarify the role of TSP1 *in vivo*, we selected the 4T1 TNBC mouse model, which has a strong metastatic potential to the lung upon orthotopic engraftment into the mammary fat pad [27]. Under our experimental conditions, we did not observe any impact of TSP1 knockdown on the primary tumor growth despite a significant increase of the tumor blood vessel density and the consequent decrease of the tumor hypoxia. Thus, the vascular normalization of tumors in this breast cancer model does not lead to an increase of the size of the primary tumors, contrary to the dogma which allowed the development of anti-angiogenics drugs during these last years. However, TSP1 knockdown triggers a dramatic reduction of lung metastases. Strikingly, the TSP1 knockdown effect on metastasis was abolished in immunodeficient mice (i.e., Nude mice). Whereas the TSP1 pro-metastatic role is in line with previous studies on other cancer models [8, 24, 28-30], our last observation strongly suggests that the TSP1 prometastatic effect in our preclinical TNBC model depends on its capacity to inhibit the adaptive immune response.

Our transcriptomic data analysis in human TNBC samples suggests that TSP1 may contribute to the inhibition of the lymphocytic activation. Accordingly, we found in TNBC biopsies a negative correlation between the protein expression of TSP1 and the total TILs (CD3<sup>+</sup>), including CD8<sup>+</sup> TILs. Previous studies show that this type of lymphocyte infiltration in breast cancer, including TNBC, is associated with a good prognosis and a better response to chemotherapies as compared to non-infiltrated tumors [21, 31, 32].

To estimate the role of the TSP1 on the immune response, we studied the lymphocyte infiltration in the primary tumors developed to the immunocompetent mice transplanted with 4T1shCTL or 4T1shTSP1 cells. We noticed a significant increase of the tumor infiltration of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, including Tregs, upon TSP1 knockdown. Of note, the CD8<sup>+</sup> T cells to Tregs remained unchanged, irrespectively of the TSP1 expression level in 4T1 cells. Thus, our results indicate for the first time that the strong expression of TSP1 in TNBC inhibits the lymphocyte infiltration within tumors, in a non-selective selective way. These results are in line with previous studies showing that high contents of CD8<sup>+</sup> TILs in breast cancers are also associated with a high Treg tumor infiltration and a good prognosis [31, 33].

Furthermore, we noticed an augmentation of the PD-1 expression on CD8<sup>+</sup> TILs in 4T1shTSP1 tumors. This increase, observed at day 11 post 4T1 cell engraftment, most likely reflects a better activation, rather than an exhausted phenotype of TILs. Accordingly, the PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILs are KI67<sup>+</sup>, indicating their proliferative capacity. Interestingly, the TSP1 inhibition significantly sensitizes 4T1 tumors to anti-PD-1 therapy. This effect could be due to the increase of the tumor vascularization, allowing a better intratumor diffusion of the anti-PD-1 and/or the increase of the targets in tumors (i.e., CD8<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>TILs), which constitutes a predictive element of the response to anti-PD-1 [34]. In addition, because TGF $\beta$  likely contributes to immune escape mechanisms and resistance to anti-PD-1 [35-37], we can speculate that reducing TGF $\beta$  activation by TSP1 knockdown, as documented in 4T1 tumors, contributes, at least in part, in the enhanced anti-tumor effect of anti-PD-1. Finally, reducing hypoxia upon TSP1 knockdown may facilitate the lymphocyte infiltration in tumors [38] and response to anti-PD-1, as documented with the injection of low-dose anti-angiogenic agents (i.e., apatinib) in a lung cancer mouse model [39].

Collectively, our study is a proof-of-concept that TSP1 may represent a good target in TNBC to enhance both the anti-tumor immune response and therapy efficacy to immune checkpoint inhibitors, such as anti-PD-1.

## Methods

### In silico analysis

Kaplan-Meier plots were generated with Kaplan-Meier Plotter, an online public database using mRNA gene chip expression in 5143 breast cancer samples.

TCGA-BRCA (The Cancer Genome Atlas Research Network, Breast cancer) RNA-seq database was downloaded from TCGA servers with patients' clinical data to perform transcriptomic analysis on TNBC only samples (n=122). Then, patients were classified in function of their TSP1 (THBS1, ENSG00000137801) mRNA expression to segregate Low and High TSP1 patients. We performed gene set enrichment analysis on these two groups using GSEA v2.0 tool developed by the Broad Institute (Subramanian et al, 2005) and curated genes signatures available on their website.

Supplementary references:

- KMPLLOT : An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1809 patients, *Breast Cancer Res Treatment*, 2010 Oct;123(3):725-31
- GSEA : Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 25;102(43):15545-50. Epub 2005 Sep 30.

### Patients

This study was approved by the cancer biological resource center (CRB Cancer) agreement n° I-2014/01 of the Claudius Regaud Institute (ICR), Toulouse, France. 12 patients with primary breast cancer (TNBC) were included in this study between July 2015 and February 2018. Patients who received neoadjuvant or previous chemotherapy were excluded. All patients gave their written informed consent to be included in this study. Clinical characteristics of patients and tumor pathological features were obtained from their medical reports and followed the standard procedures adopted by the ICR.

### Immunohistochemistry

IHC analysis of patient samples was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded sections of the initial tumor biopsies.

Percentage of tumor-infiltrating lymphocytes was realized using morphologic criteria defined by the International TILs Working Group recommendations after haematoxylin and eosin staining [40].



Percentage of CD8<sup>+</sup> cells was evaluated after CD8<sup>+</sup> cells staining, using anti-CD8 antibody (clone SP57, Roche Ventana) revealed with HRP-conjugated secondary antibody and DAB substrate (Optiview DAB IHC Detection Kit, Ventana Medical Systems) for signal generation and counterstaining with haematoxylin and eosin, the samples were dehydrated and mounted onto coverslips.

For TSP1 quantification, samples were incubated for 20min with an anti-TSP1 antibody (Abcam, Ab1823 diluted 1:50) revealed with an HRP-conjugated secondary antibody (Dako, flex kit SM802) for signal generation and counterstaining with haematoxylin and eosin, the samples were dehydrated and mounted onto coverslips.

**Cell lines** 4T1 is a 6-thioguanine resistant cell line selected from the 410.4 tumor without mutagen treatment, was obtained from ATCC and tested to be mycoplasma free. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose supplemented with 10% FBS.

**Cell lines modifications** Lentiviral vectors pLKO.1 expressing non-target shRNA, (Sigma-Aldrich, SHC002,) or shRNA construct targeting TSP1 exon 5 (Sigma-Aldrich, TRCN0000039696). Plasmids were transfected into cells in culture using the TransIT-X2 Dynamic Delivery System (MIRUS BIO). Lentiviral vectors pTRIP (Dharmacon) expressing Luciferase Firefly was produced in HEK293FT cells by the tri-transfection method using calcium phosphate. Lentiviral particles were harvested 72 hours after transfection. For lentiviral transduction,  $5 \times 10^4$  cells were seeded onto 12-well plate and incubated 6 hours with lentivirus in OPTI-MEM.

### **Animal model**

Six-week-old female BALB/cOlaHsd were purchased from Envigo (Gannat, France). Experiments respected institutional guidelines and were approved by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee (CEEA-122). To assess tumor growth, 0.1 million cells expressing luciferase were injected into Balb/C female mammary fat pad. Tumor growth was monitored twice a week using a caliper.

### **Quantification of lung metastasis**

Evaluation of the metastatic load was performed by quantification of luciferase mRNAs in lungs by RT-qPCR and normalized to either Cyclophilin-A. LucF\_F 5'TCTAAAACGGATTACCAGGGATTT,

LucF\_R 5'ACCGGGAGGTAGATGAGATGTG, CycloA\_F 5'GTCAACCCCACCGTGTTCTT,  
CycloA\_R 5'CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT.

### **Immunofluorescence**

For immunofluorescence staining, mice tumor from 4T1shCTL or 4T1shTSP1 cells were collected at day 11 after tumor graft. Tumors were embedded in OCT (Tissue-Tek OCT compound, Sakura), frozen under nitrogen, and cut using a cryostat. Slides were stained with DAPI and the indicated antibodies for immunohistochemistry. CD31 mAb (553370 BD Pharmingen (1/100)), rabbit anti-mouse CAIX mAb (NB100-417 Novus Biological (1/100)), mouse anti-mouse active TGF $\beta$  mAb (MAB1835 R&D (1/200)), rat anti-mouse CD8a mAb (100724 Ebioscience (1/100)) and rat anti-mouse PNA $\beta$  (MECA-79) (553863 BD Pharmingen (1/100)).

### **Mice treatment**

In some experiment, a neutralizing anti-mouse PD-1 antibody was administered i.p. at 0,2 mg per mouse at days 4, 6, 9 and 11 after tumor graft. Anti-PD1 antibody (clone RMP1-14) and isotype control antibodies (clone 2A3) were purchased from BioXcell.

### **Flow Cytometry**

At day 11, mice were sacrificed and tumors were collected and digested with Mouse Tumor Dissociation kit and GentleMacs (Miltenyi). Cells were counted and incubated with anti-CD16/32 blocking antibodies prior to incubation. Cells are directly stained with LIVE/DEAD reactive dye (Invitrogen) and cell surface staining were performed on tumor-infiltrating and draining lymph nodes cells using anti-CD45 (clone 30-F11), anti-Thy-1 (clone 30-H12), anti-CD4 (clone GK1.5), anti-CD8 (clone 53-6.7), anti-PD1 (clone J43). Intracellular staining of Foxp3 (anti-mouse Foxp3 clone FJK-16s) and Ki67 (anti-mouse Ki67 clone B56) was realized with fix perm solution (eBioscience). Cells were analyzed with a BD LSR Fortessa X-20 (BD Biosciences), followed by Flow-jo software analysis.

### **Statistical analysis**

Statistical significance of difference between groups was evaluated by using the Graph-Pad Prism software. Results are expressed as means  $\pm$  SEM or ranges, as appropriate. The Mann-Whitney test was used to compare two groups. Comparison between tumor growth curves have been performed using a two-way ANOVA test. Significance was assumed at  $P < 0.05$ .

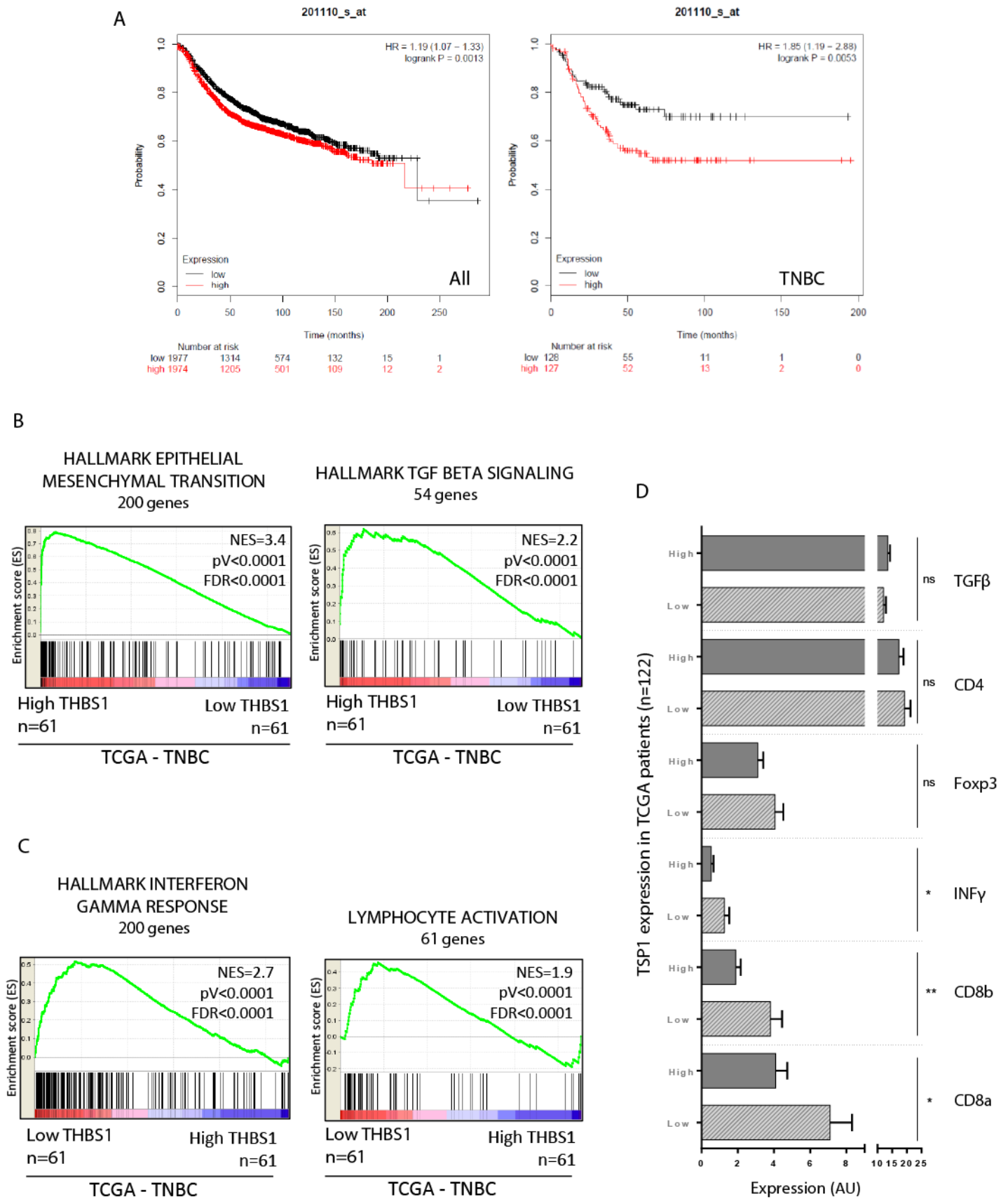
## References

1. Wahba, H.A. and H.A. El-Hadaad, *Current approaches in treatment of triple-negative breast cancer*. *Cancer biology & medicine*, 2015. **12**(2): p. 106-16.
2. Adams, S., et al., *Pembrolizumab Monotherapy for Previously Treated Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: Cohort A of the Phase 2 KEYNOTE-086 Study*. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 2018.
3. Yee, K.O., et al., *The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis*. *Breast cancer research and treatment*, 2009. **114**(1): p. 85-96.
4. Cameron, D., et al., *Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial*. *The Lancet. Oncology*, 2013. **14**(10): p. 933-42.
5. Clezardin, P., et al., *Expression of thrombospondin (TSP1) and its receptors (CD36 and CD51) in normal, hyperplastic, and neoplastic human breast*. *Cancer Research*, 1993. **53**(6): p. 1421-30.
6. Sid, B., et al., *Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth*. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2004. **49**(3): p. 245-58.
7. Daubon, T., et al., *Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development*. *Nature communications*, 2019. **10**(1): p. 1146.
8. Firlej, V., et al., *Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors*. *Cancer Research*, 2011. **71**(24): p. 7649-58.
9. Campone, M., et al., *Prediction of Recurrence and Survival for Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) by a Protein Signature in Tissue Samples*. *Molecular & cellular proteomics : MCP*, 2015. **14**(11): p. 2936-46.
10. Fontana, A., et al., *Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo*. *International journal of cancer*, 2005. **116**(5): p. 686-91.
11. Jimenez, B., et al., *Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1*. *Nature medicine*, 2000. **6**(1): p. 41-8.
12. Stenina-Adognravi, O., *Invoking the power of thrombospondins: regulation of thrombospondins expression*. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 2014. **37**: p. 69-82.
13. Seoane, J. and R.R. Gomis, *TGF-beta Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression*. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2017. **9**(12).
14. Drabsch, Y. and P. ten Dijke, *TGF-beta signalling and its role in cancer progression and metastasis*. *Cancer metastasis reviews*, 2012. **31**(3-4): p. 553-68.

15. Crawford, S.E., et al., *Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo*. Cell, 1998. **93**(7): p. 1159-70.
16. Miller, T.W., et al., *Thrombospondin-1 is a CD47-dependent endogenous inhibitor of hydrogen sulfide signaling in T cell activation*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2013. **32**(6): p. 316-24.
17. Martinet, L., et al., *Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer*. Cancer Research, 2011. **71**(17): p. 5678-87.
18. Adams, S., et al., *Title: Pembrolizumab Monotherapy for Previously Untreated, PD-L1-Positive, Metastatic Triple-Negative Breast Cancer: Cohort B of the Phase 2 KEYNOTE-086 Study*. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology, 2018.
19. Dong, Y., Q. Sun, and X. Zhang, *PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(2): p. 2171-2186.
20. Byrne, G.J., et al., *Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer*. International journal of oncology, 2007. **31**(5): p. 1127-32.
21. Miyashita, M., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study*. Breast cancer research : BCR, 2015. **17**: p. 124.
22. Thomas, D.A. and J. Massague, *TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance*. Cancer cell, 2005. **8**(5): p. 369-80.
23. Pickup, M., S. Novitskiy, and H.L. Moses, *The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment*. Nature reviews. Cancer, 2013. **13**(11): p. 788-99.
24. Jayachandran, A., et al., *Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma*. Oncotarget, 2014. **5**(14): p. 5782-97.
25. Li, Z., et al., *Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation*. Journal of immunology, 2001. **166**(4): p. 2427-36.
26. Tuszynski, G.P., et al., *Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis*. Cancer research, 1987. **47**(15): p. 4130-3.
27. Aslakson, C.J. and F.R. Miller, *Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor*. Cancer Research, 1992. **52**(6): p. 1399-405.
28. Hu, C., et al., *Thrombospondin-1 promotes cell migration, invasion and lung metastasis of osteosarcoma through FAK dependent pathway*. Oncotarget, 2017. **8**(44): p. 75881-75892.

29. McElroy, M.K., et al., *Upregulation of thrombospondin-1 and angiogenesis in an aggressive human pancreatic cancer cell line selected for high metastasis*. *Molecular cancer therapeutics*, 2009. **8**(7): p. 1779-86.
30. Nucera, C., et al., *B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010. **107**(23): p. 10649-54.
31. Yeong, J., et al., *Higher densities of Foxp3(+) regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer*. *Breast cancer research and treatment*, 2017. **163**(1): p. 21-35.
32. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. *Nature reviews. Cancer*, 2012. **12**(4): p. 298-306.
33. Ladoire, S., et al., *Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy*. *Breast cancer research and treatment*, 2011. **125**(1): p. 65-72.
34. Tumeah, P.C., et al., *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance*. *Nature*, 2014. **515**(7528): p. 568-71.
35. Xiong, D., et al., *Immunogenomic Landscape Contributes to Hyperprogressive Disease after Anti-PD-1 Immunotherapy for Cancer*. *iScience*, 2018. **9**: p. 258-277.
36. Mariathasan, S., et al., *TGFbeta attenuates tumour response to PD-L1 blockade by contributing to exclusion of T cells*. *Nature*, 2018. **554**(7693): p. 544-548.
37. Tauriello, D.V.F., et al., *TGFbeta drives immune evasion in genetically reconstituted colon cancer metastasis*. *Nature*, 2018. **554**(7693): p. 538-543.
38. Terry, S., et al., *Role of Hypoxic Stress in Regulating Tumor Immunogenicity, Resistance and Plasticity*. *International journal of molecular sciences*, 2018. **19**(10).
39. Zhao, S., et al., *Low-dose apatinib optimizes tumor microenvironment and potentiates antitumor effect of PD-1/PD-L1 blockade in lung cancer*. *Cancer immunology research*, 2019.
40. Salgado, R., et al., *The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014*. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 2015. **26**(2): p. 259-71.

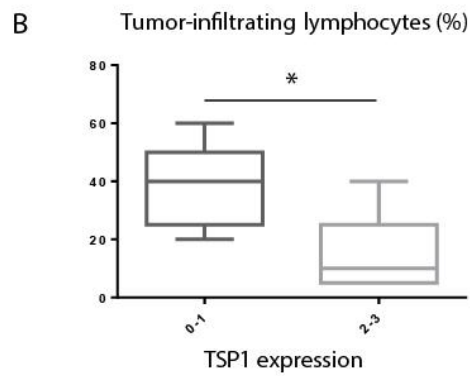
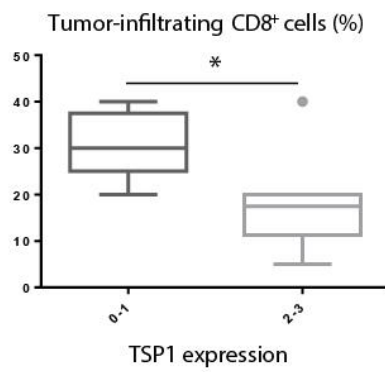
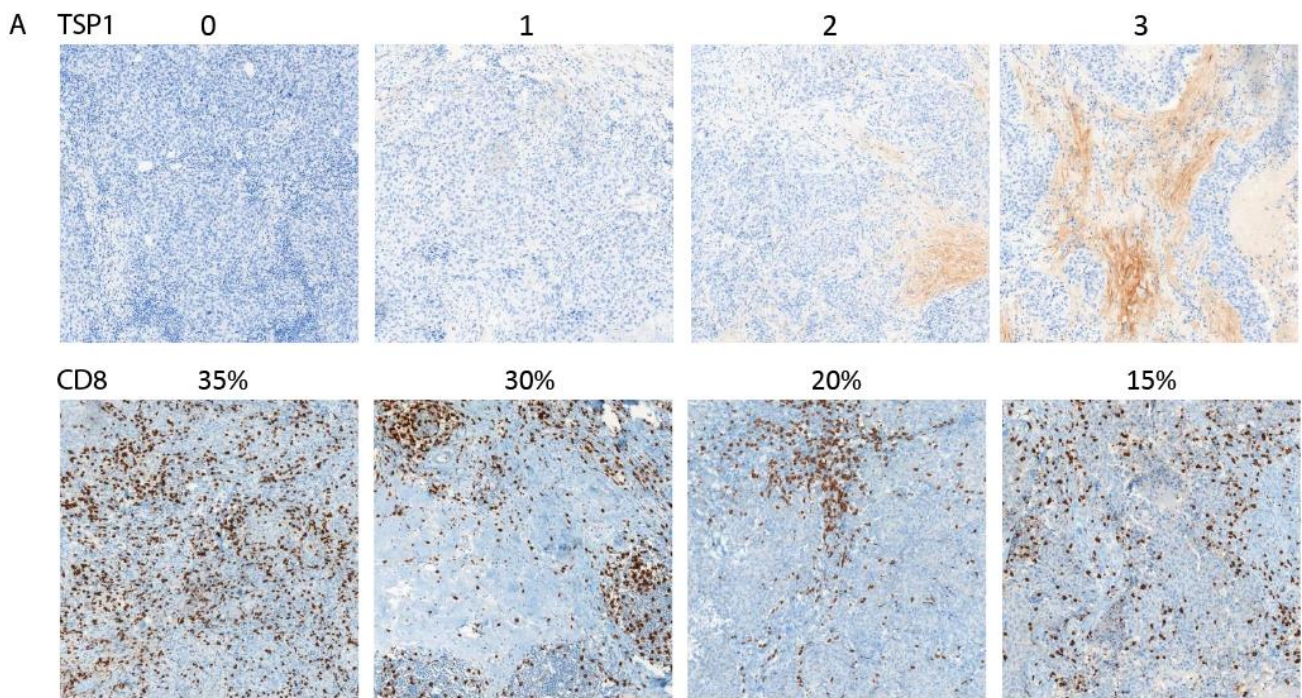
Figure 1:



**Figure 1: Impact of TSP1 on prognostic value in breast cancer.**

**A:** Kaplan-Meier relapse free survival analysis relating TSP1 mRNA levels in 3951 breast cancer patients (left panel) and the same analysis in a cohort of 253 TNBC patients(right panel). Hazard ratios (HR), 95% confidence interval and logrank p are indicated on the graphs. **B:** Gene Set Enrichment Analysis of Hallmark Epithelial Mesenchymal Transition and Hallmark TGF Beta Signaling gene signature was performed from transcriptomes of patients with TNBC cancer that had the highest TSP1 mRNA expression compared with those with the lowest expression in TCGA cohort. Kolmogorov-Smirnov statistical test was applied. **C:** Gene Set Enrichment Analysis of Hallmark Interferon Gamma Response and Lymphocyte Activation gene signature was performed from transcriptomes of patients with TNBC cancer that had the lowest TSP1 mRNA expression compared with those with the highest expression in TCGA cohort. Kolmogorov-Smirnov statistical test was used. **D:** Expression level of genes involved in immune response from transcriptomes of patients with TNBC cancer that had the highest TSP1 mRNA expression compared with those with the lowest expression in TCGA cohort. AU, arbitrary unit. Statistical analysis used non-parametric Mann–Whitney test. Error bars indicates SEM. ns = no statistical difference \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Figure 2:

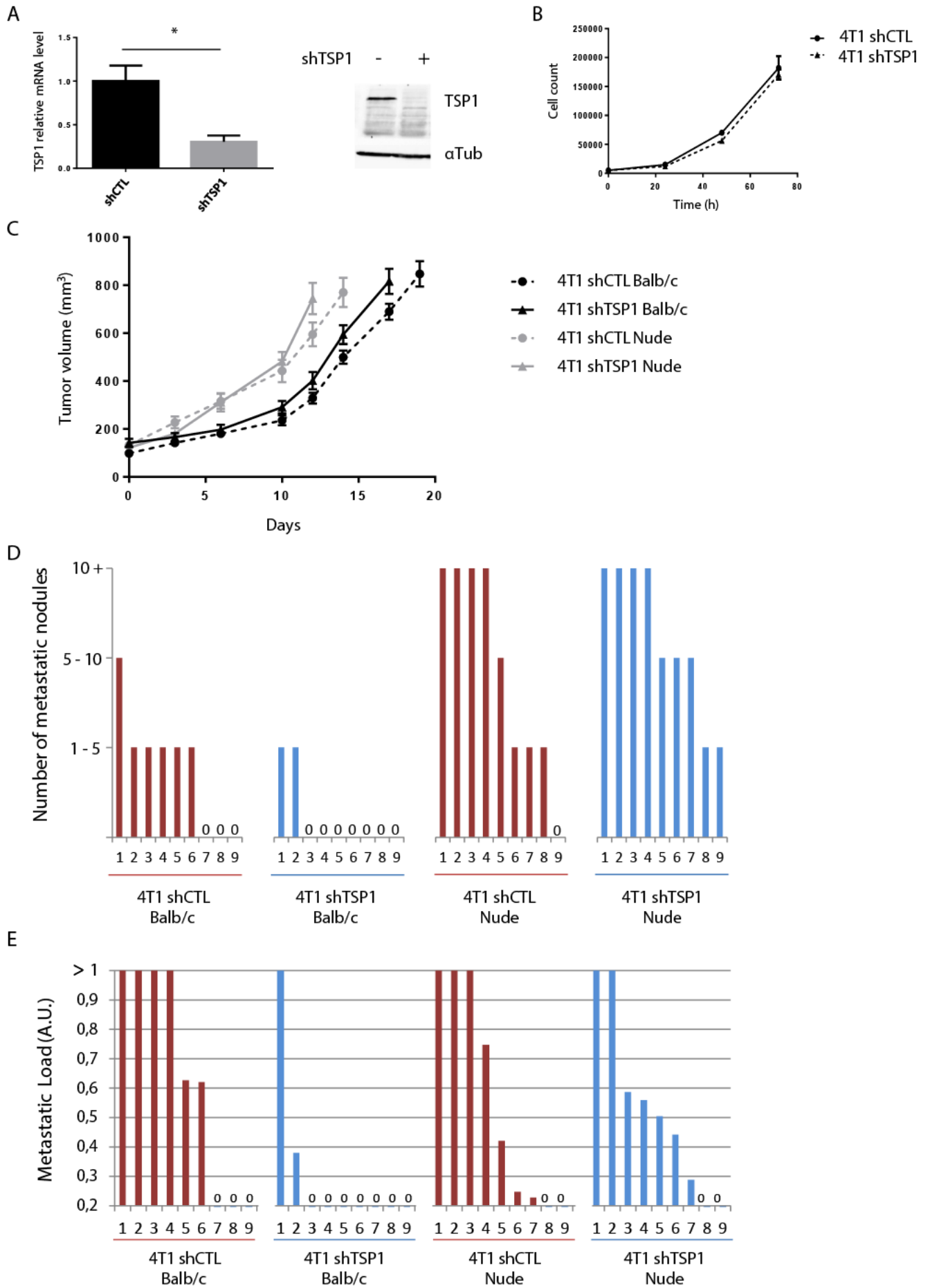




## Figure 2: TSP1 and infiltrating lymphocytes in TNBC breast cancer patients

**A:** A representative illustration of TSP1 immunodetection in TNBC breast tumors for the (first row) and the corresponding immunohistochemical (IHC) staining of CD8<sup>+</sup> infiltration (second row) in TNBC breast cancer. Classification of TSP1 expression and quantification of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> cells was performed on 12 cases of TNBC breast cancer patients. **B:** Evaluation of tumor-infiltration lymphocytes was realized in the same time on this samples by Salgado R method [40] on hematoxylin and eosin (H&E)-stained tumor sections. **A-B** Box indicates median with interquartile range, and whisker length determined by the Tukey's method (n=12). Statistical analysis used non-parametric Mann–Whitney test. \*: p<0,05.

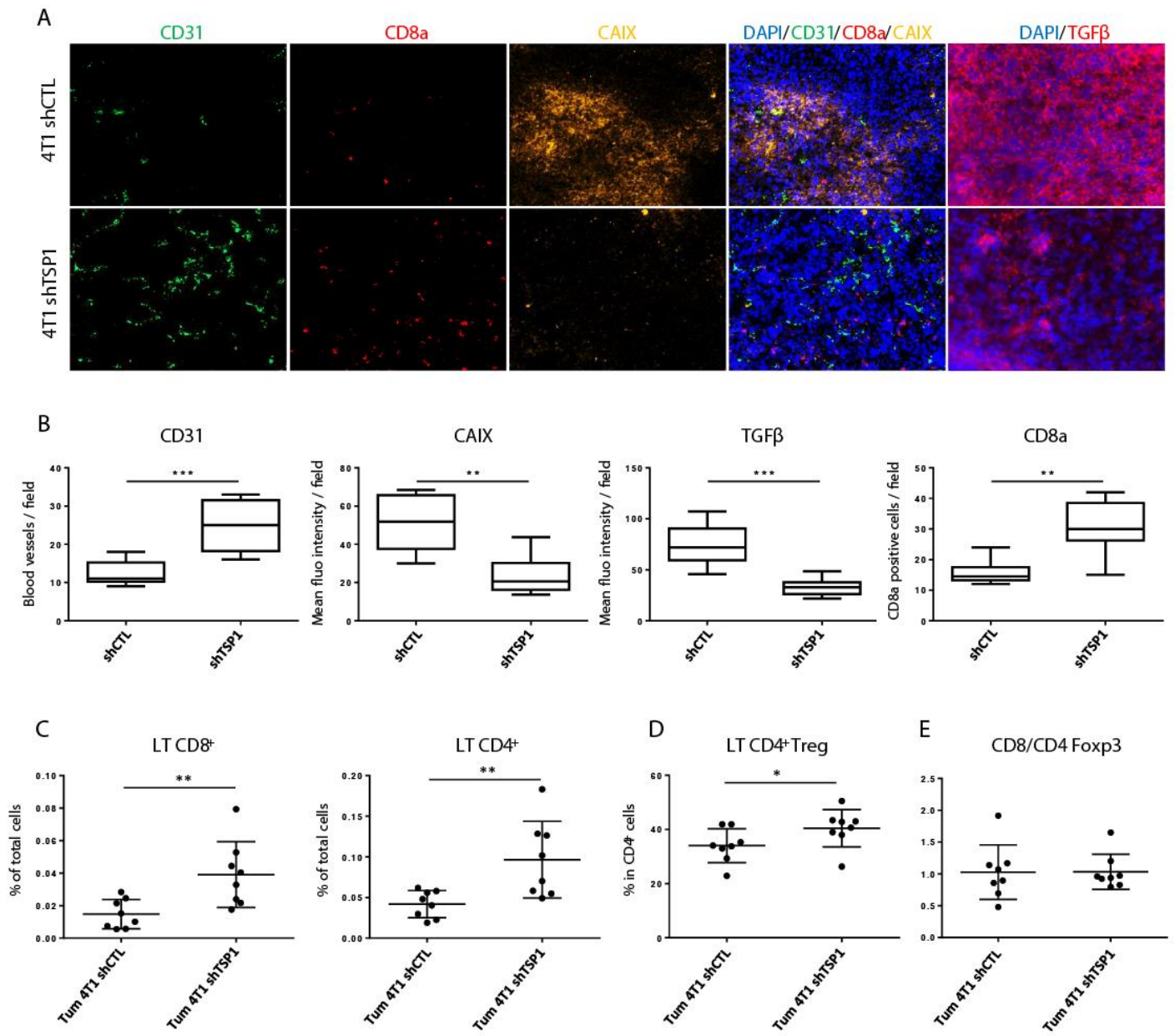
Figure 3:



### Figure 3: Effect of TSP1 knock-down in 4T1 murine model of breast cancer

**A:** TSP1 mRNA level normalized to CyclophilinA level in 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 cells. ((n=6) Statistical analysis used non-parametric Mann–Whitney test. Error bars indicates SEM. \*: p<0,05.). Right panel: Western blot analysis of TSP1 protein level in 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 cells. **B:** Proliferation of 4T1 shCTL versus 4T1 shTSP1 cells (Cell count, mean  $\pm$  SEM, n=3). **C:** Growth of 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 orthotopic tumors over time in Balb-c mice (black) and Nude mice (grey) (mean $\pm$  SEM, n=9 mice per group). **D:** Visual quantification of metastases in lungs collected when primary tumors reach 1000 mm<sup>3</sup> (n=9 mice per group). **E:** Quantification of metastatic load in lungs of individual mice by measurement of luciferase mRNA level normalized to cyclophilin A (n=9 mice per group).

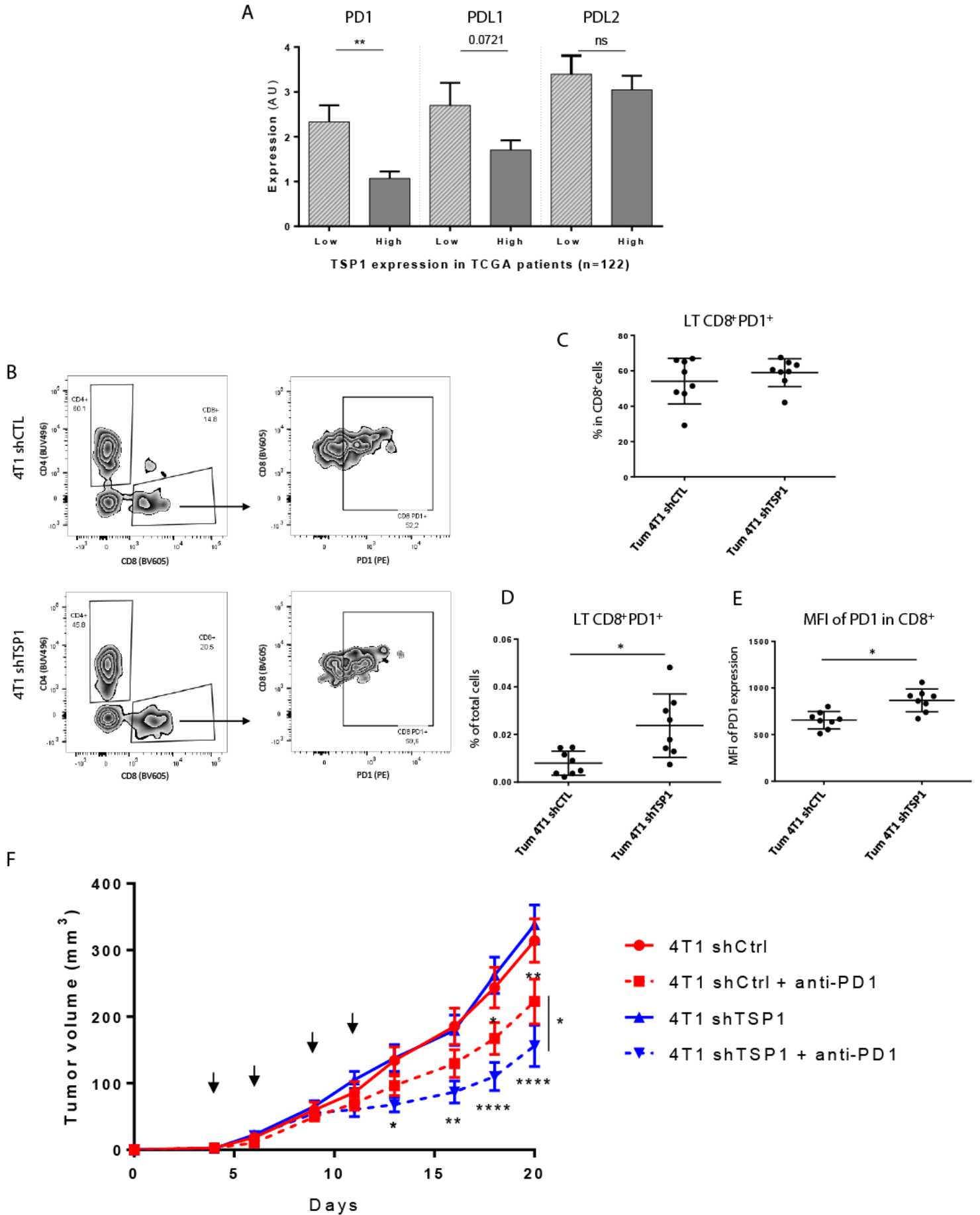
Figure 4:



#### Figure 4: Impact of TSP1 expression on tumor microenvironment

**A:** Immunodetection of CD31, CD8a, CA-IX and active TGF $\beta$  in 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 tumors 11 days after graft in Balb-c mice. **B:** Quantification in 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 tumors of blood vessels, CD8 positive lymphocyte infiltration, CA-IX and active TGF $\beta$  positive area. Box indicates median with interquartile range, and whisker length determined by the Tukey's method. **C:** Percentage of total cells of LT CD8<sup>+</sup> and LT CD4<sup>+</sup> cells in tumors: flow cytometry analysis tumors collected at day 11 using with Live/dead reagents, anti-CD45, anti-Thy1, anti-CD4, anti-Foxp3 and anti-CD8 antibodies. (mean  $\pm$  SEM, n=8 mice per group). **D:** Percentage of LT CD4<sup>+</sup> Treg in LT CD4<sup>+</sup> cells (mean  $\pm$  SEM, n=8 mice per group). **E:** CD8/CD4 Foxp3<sup>+</sup> cells ratio (mean $\pm$  SEM, n=8 mice per group). **B-C-D-E:** Statistical analysis used non-parametric Mann–Whitney test. \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001.

Figure 5:

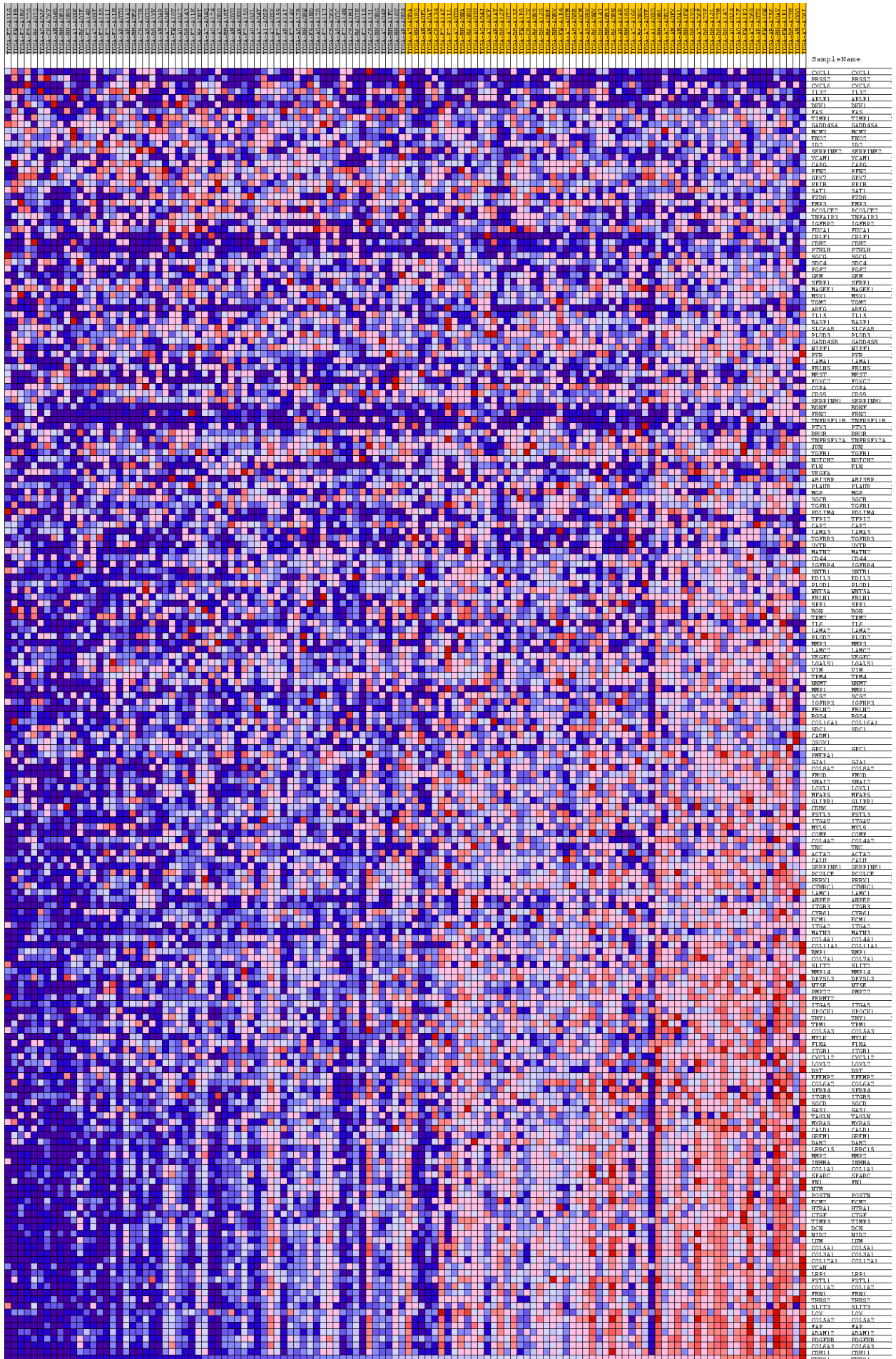


### Figure 5: PD1 expression and PD1 treatment on TSP1 knock-down 4T1 murine model

**A:** Expression levels in TCGA cohort of PD1, PDL1 and PDL2. Gene expression of patients with TNBC that had the highest TSP1 mRNA expression compared with those with the lowest expression (AU, arbitrary unit). Statistical analysis used non-parametric Mann–Whitney test. Error bars indicates SEM, ns = no statistical difference \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ . **B-C-D-E:** Flow cytometry analysis of PD1 expression on LT CD8<sup>+</sup> TILS on 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 11 days old tumors. Percentage in LT CD8<sup>+</sup>, percentage in total cells and MFI expression were represented (mean  $\pm$  SEM, n=8 mice per group). Statistical analysis used non-parametric Mann–Whitney test \*:  $p < 0,05$ . **F:** Tumor volumes (determined with a caliper at the indicated days) of orthotopically injected 4T1 shCTL or 4T1 shTSP1 cells in Balb/c mice. Mice received four injections of anti-PD-1 antibodies (200 $\mu$ g per mouse) at days 4, 6, 9 and 11 (black arrows). Alternatively, mice were injected with isotype control. Data are means  $\pm$  SEM 8 mice per group. A two-way Anova with Tukey multiple comparison test was used and differences were statistically significant (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.0001$ ).

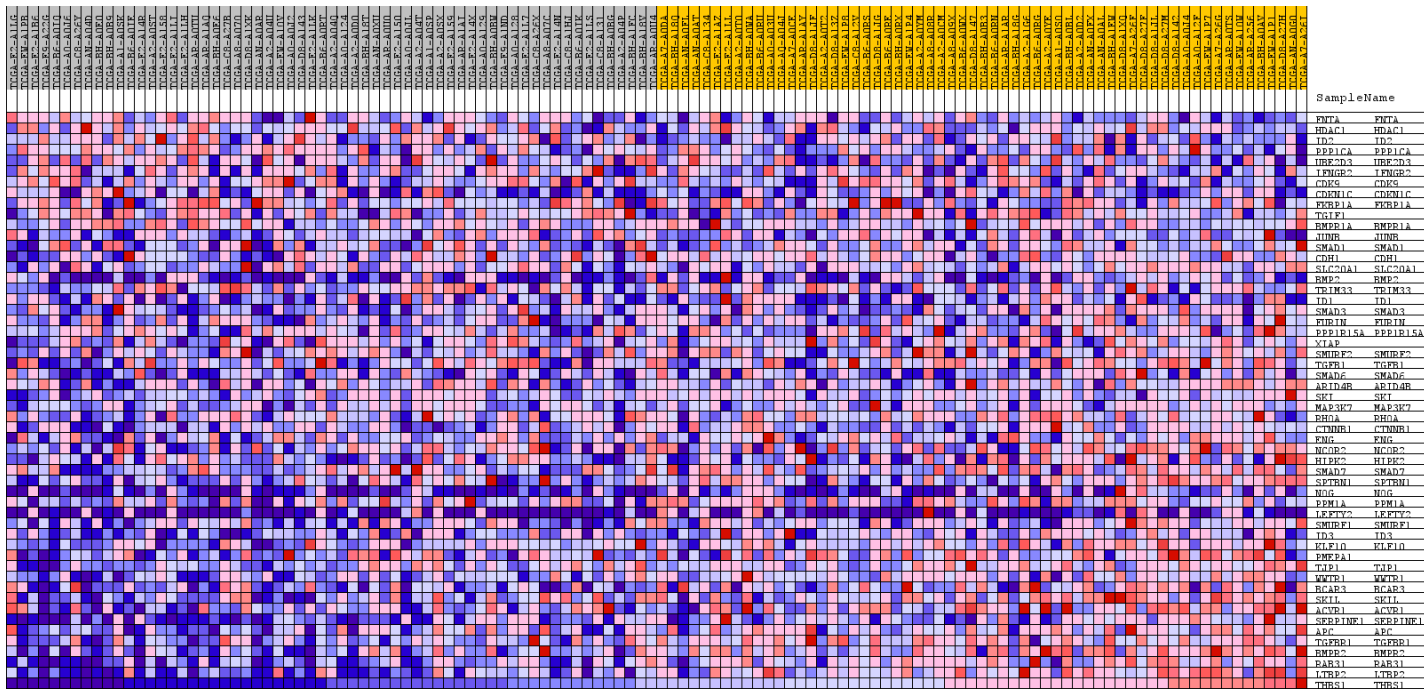
# Supplementary Fig 1:

## A: Epithelial Mesenchymal Transition

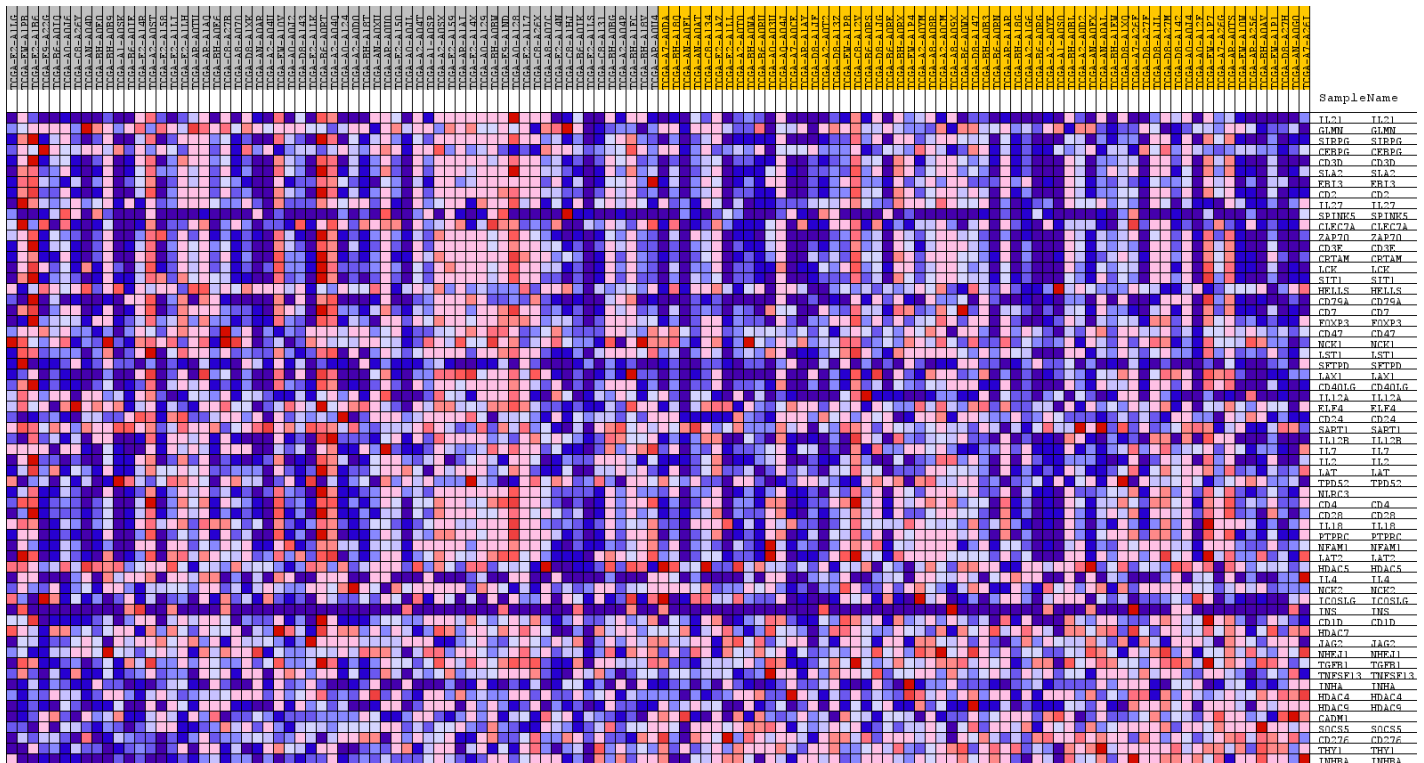




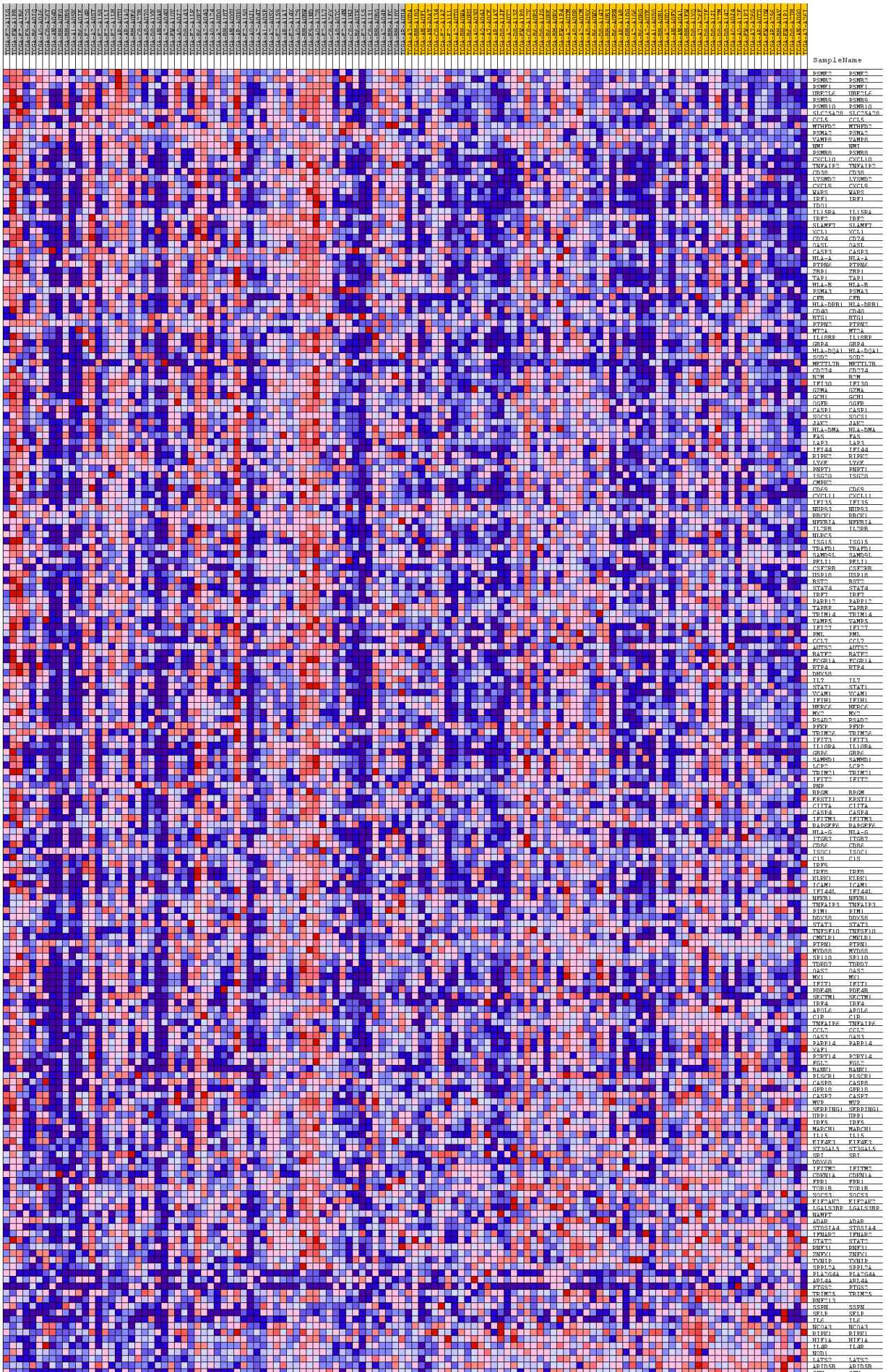
## B: TGF Beta Signaling



## C: Lymphocyte activation



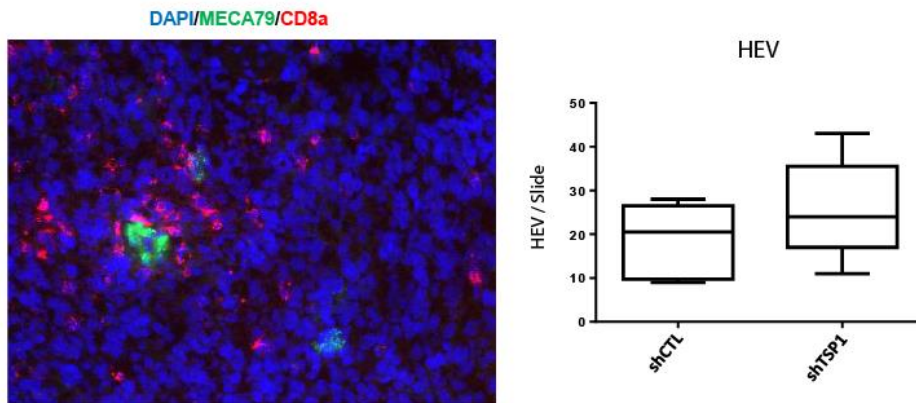
# D: Interferon Gamma Response



**Supplementary figure 1:**

Heat map of gene signatures of epithelial mesenchymal transition (A), TGF $\beta$  signaling (B), lymphocyte activation (C) and hallmark INF $\gamma$  signature (D) performed from transcriptomes of patients with TNBC that had the highest TSP1 mRNA expression (yellow column) compared with those with the lowest expression (grey column) in TCGA cohort.

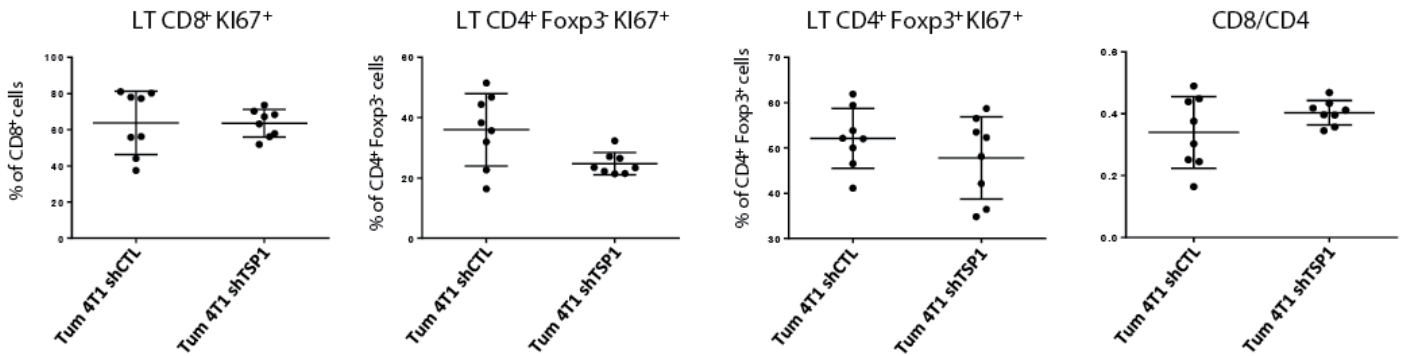
Supplementary figure 2:



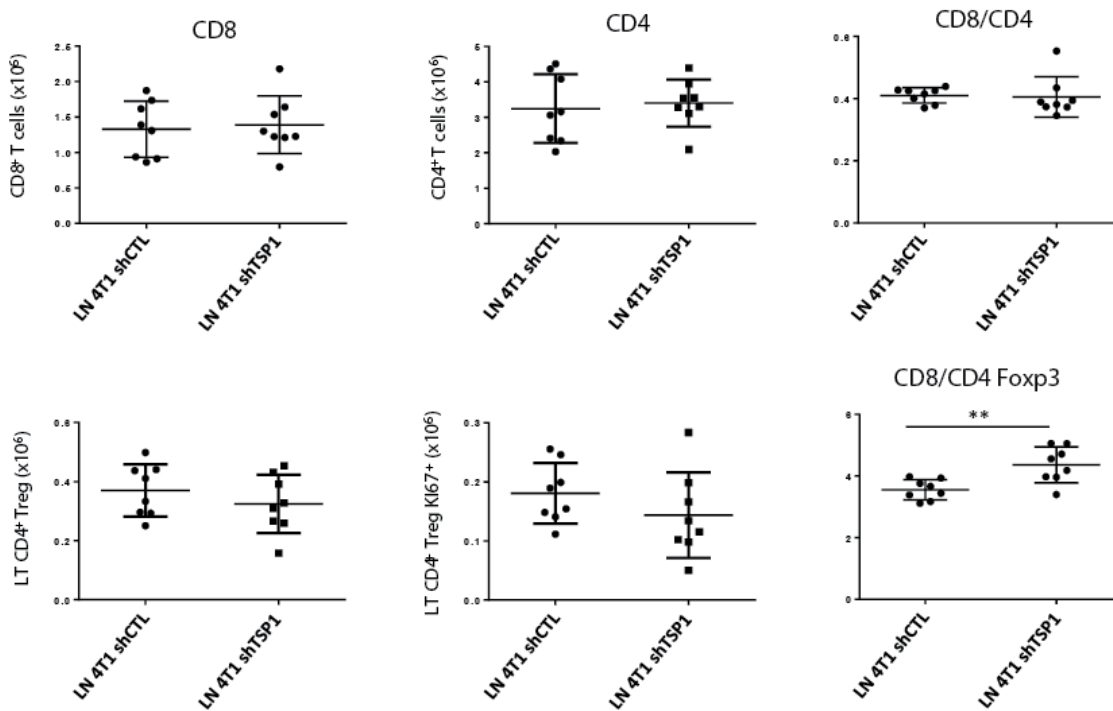
Immunodetection of MECA79 for the quantification of HEV cells in 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 tumors at days 11. Box indicates median with interquartile range, and whisker length determined by the Tukey's method. n=6 tumors per group. No statistical difference was observed with a non-parametric Mann–Whitney test.

### Supplementary figure 3:

#### A Tumor-infiltrating lymphocytes

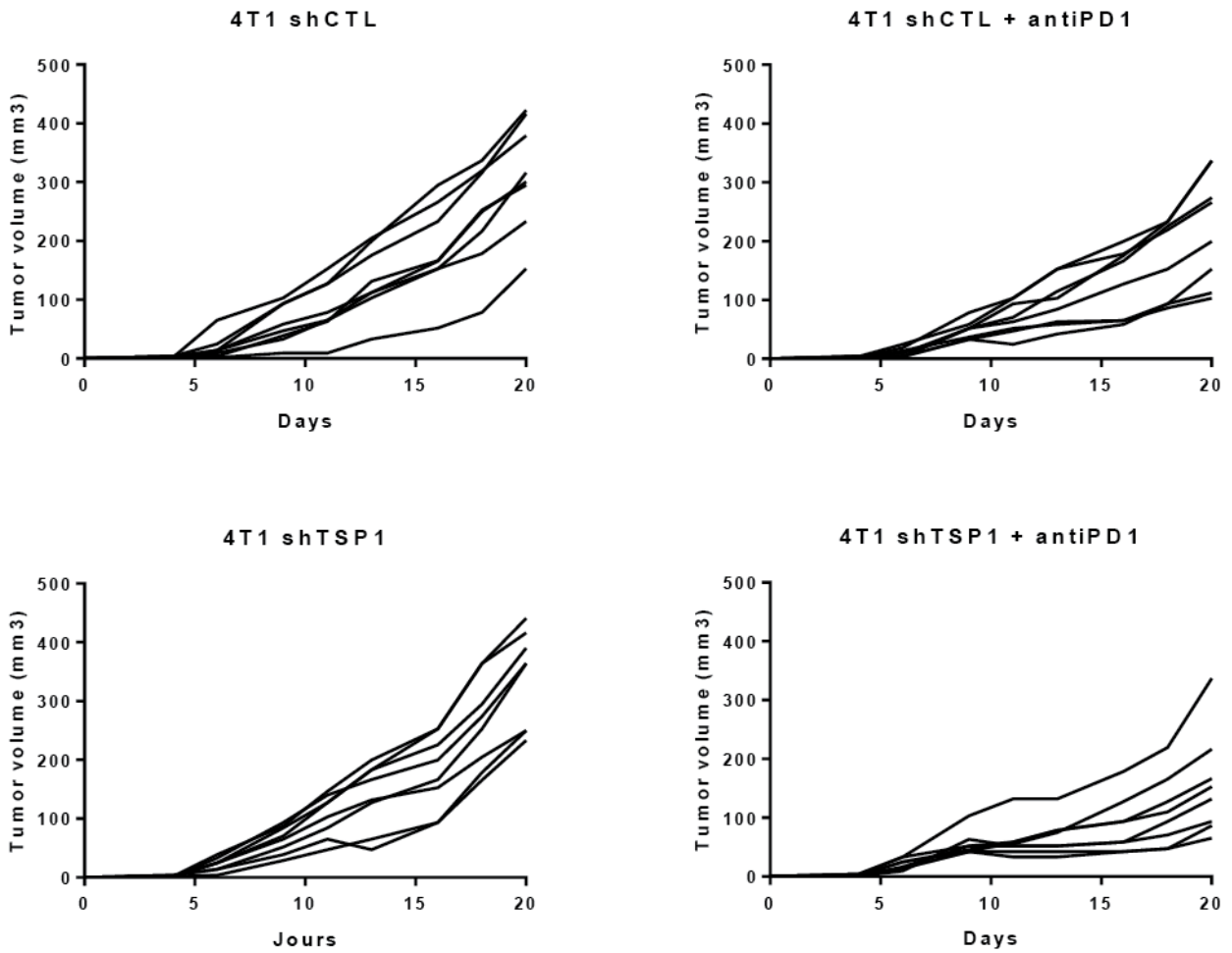


#### B Tumor-Draining Lymph Nodes



**A:** Flow cytometry results of KI67 positive expression in TILs subpopulation and CD8/CD4 ratio in tumors 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1. **B:** Analysis by cytometry of draining lymph node at days 11 (absolute number). **A-B:** Statistical analysis used non-parametric Mann–Whitney test. \*: p<0,05; \*\*: p<0,01 (mean ± SEM, n=8 mice per group).

**Supplementary figure 4:**



Individual curves are depicted for each tumor corresponding to the anti-PD1 treatment on 4T1 shCTL and 4T1 shTSP1 shown in figure 5F.

## X. Discussion et conclusion

L'évolution des connaissances sur le cancer a entraîné un raffinement des thérapies anti-tumorales. La prise de conscience de la nécessité de considérer le microenvironnement tumoral à part entière dans la prise en charge des patients et son étude a généré de nouvelles approches thérapeutiques que ce soit les anti-angiogéniques ou les immunothérapies. La dissémination métastatique reste cependant actuellement la première cause de décès par cancer. Il est donc primordial aujourd'hui de trouver des traitements capables d'impacter directement sur cette capacité intrinsèque de la plupart des cellules tumorales soit directement, en inhibant leurs propriétés migratoires, soit indirectement, en jouant sur la vascularisation tumorale et le microenvironnement.

L'approche choisie pour ce projet est originale et va à l'encontre d'un dogme qui a impacté le développement thérapeutique depuis 2006 et les travaux de Judah Folkman [304, 305]. En effet les travaux de Folkman reposaient sur le postulat que l'inhibition de la formation de la néo-vascularisation induirait une hypoxie induisant la mortalité des cellules cancéreuses. Force est de reconnaître que cette stratégie porteuse de nombreux espoirs n'a malheureusement pas été à la hauteur des espérances.

On constate une amélioration de la survie sans progression dans certains cancers, mais celles-ci n'ont engendré que très peu d'amélioration de la survie globale [30]. C'est par exemple le cas de certains cancers comme le carcinome rénal à cellules claires qui présente une forte dépendance à l'angiogénèse de par la mutation de la protéine von Hippel-Lindau, inhibiteur du facteur de transcription HIF1 $\alpha$  [306].

Ces échecs ont conduit à l'analyse des mécanismes de résistance qui se développent contre ces inhibiteurs. Une des hypothèses avancées pour expliquer ces résistances est que l'hypoxie générée par ces traitements anti-angiogéniques crée un environnement défavorable qui stimule la dissémination métastatique, sélectionne des cellules ayant un métabolisme adapté à l'acidose et à l'hypoxie, notamment des cellules souches tumorales. Depuis 2014, il a été démontré par différentes équipes que l'hypoxie tumorale pouvait induire la prolifération des cellules cancéreuses mais également que cette hypoxie participe à l'agressivité tumorale [307, 308] mais est aussi intrinsèquement liée à la résistance aux traitements, particulièrement pour les radiothérapies pour lesquelles la tension locale en oxygène est requise pour l'efficacité du traitement.

Enfin, l'hypoxie est une des rares caractéristiques communes à l'ensemble des tumeurs solides. De ce fait, des molécules ciblant l'hypoxie ont été développées. Les prodrogues activables en zone hypoxique (HAPs, hypoxia activated prodrugs), malgré un concept très intéressant, n'ont pas donné les résultats espérés [309].

Par ailleurs, la diminution de la perfusion vasculaire (inhérente à la tumeur mais aussi comme conséquence aux traitements antiangiogéniques) limite la biodisponibilité des traitements chimiothérapeutiques et l'infiltration des tumeurs par des cellules du système immunitaire. Cela a fait émerger une nouvelle approche thérapeutique visant à normaliser la vascularisation tumorale plutôt qu'à obtenir le plus fort niveau d'hypoxie possible, comme c'était initialement l'objectif [310].

Cependant cette normalisation reste fidèle à la stratégie consistant à réduire la quantité ou l'activité des angiogènes majeurs. Nous avons choisi d'explorer une autre approche pour normaliser cette vascularisation tumorale. En effet, la dérégularisation de l'angiogenèse tumorale, fait intervenir à la fois une augmentation des angiogènes mais également des anti-angiogènes, même si ces derniers ne contrôlent que de façon limitée l'effet proangiogénique. Parmi ces anti-angiogéniques endogènes, le plus représenté et le plus puissant est certainement la Thrombospondine-1. Véritable plateforme de signalisation, elle possède un interactome très riche lui permettant de jouer un rôle important à des niveaux variés et complémentaires. Ainsi, non seulement, elle impacte le développement vasculaire *via* ses propriétés anti-angiogéniques, mais aussi elle module le microenvironnement tumoral en activant notamment le TGF- $\beta$  et conséquemment les différentes voies de migration, d'infiltration et d'activation immunitaires.

La Thrombospondine-1, qui est fréquemment réprimée aux premiers stades de développement tumoral est surexprimée dans de nombreux types de tumeurs à des stades avancés (prostate, pancréas, mélanome, glioblastome, sein, vésicule biliaire...). Compte tenu de ces observations, mais également au regard du fait qu'il a été montré que l'expression de TSP1 était corrélée à l'invasion ganglionnaire ainsi qu'aux sous-types les plus agressifs de cancers du sein [311, 312], il nous est apparu intéressant de regarder de plus près son impact direct sur différents aspects de la progression tumorale dans les TNBC.

### **Rôle de la TSP1 dans la progression et l'agressivité tumorale :**

L'utilisation de bases de données en ligne comme KMPLOT permet aujourd'hui de mettre à disposition de très nombreuses données normalisées de transcriptomiques issues de microarray ou de RNA Seq. Grâce à cet outil nous avons pu observer, dans le cancer du sein, qu'une forte expression de l'ARNm de la TSP1 est associée à un mauvais pronostic dans ces cancers de stade avancé. Ces données sont confirmées au niveau de l'expression protéique de la TSP1 sur des coupes de tumeurs de patientes. La TSP1 n'est que peu exprimée dans le tissu sain, mais elle est fortement exprimée dans plus de la moitié des cancers du sein et corrèle avec des marqueurs d'agressivité comme l'expression de KI67 ou le grade mitotique ainsi qu'avec la présence de nécrose au sein même de ces tumeurs. De façon intéressante, 90% des tumeurs



primaires et 70% des métastases hépatiques expriment TSP1 alors que le tissu hépatique sain ne l'exprime pas. Ces résultats sont inclus dans l'article en annexe de la thèse, article que je co-signe en 4<sup>ème</sup> auteur.

En accord avec nos observations, dans la littérature, la forte expression de TSP1 est associée aux stades les plus agressifs des cancers du rein, de la prostate ou encore du pancréas [313, 314]. Le dosage de la TSP1 plasmatique montre qu'un taux élevé est associé à une atteinte ganglionnaire dans le cancer du sein [315]. En 2015, l'équipe de Campone associe également la TSP1 à la rechute métastatique des TNBC et propose son utilisation comme marqueur de mauvais pronostic [311]. Au regard de nos propres résultats, mais également de la littérature, l'expression de la TSP1 est donc corrélée à l'agressivité tumorale dans de nombreux cancers, y compris celui du sein.

Dans les TNBC, nous avons également pu mettre en évidence que la forte expression de TSP1 était associée à un mauvais pronostic et à une signature génique en faveur de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et de la signalisation du TGF $\beta$ , puissant inducteur d'EMT [316]. De façon intéressante, il est à noter que les signatures géniques de l'activation lymphocytaire et d'une réponse INF $\gamma$  sont, quant elles, enrichies dans les TNBC exprimant faiblement TSP1. En accord avec nos analyses *in silico*, nous avons mis en évidence sur des coupes de tumeurs de patientes, que l'infiltrat en LT CD8<sup>+</sup> était statistiquement augmenté dans les tumeurs ayant de faibles niveaux de TSP1. L'ensemble de nos données suggère que TSP1 contribue non seulement à l'activation de TGF $\beta$  et à un processus d'EMT, mais aussi à un mécanisme d'immunoéchappement. Ainsi, TSP1 semble une cible intéressante dans un contexte tumoral ; bien que de nombreuses données sur son impact *in vitro* aient été mises en évidence peu d'études se sont intéressées à son impact *in vivo*.

Pour clarifier le rôle de TSP1 *in vivo* il fallait un modèle syngénique et orthotopique de TNBC permettant d'explorer l'effet de TSP1 sur la tumeur et son microenvironnement. Le choix de modèle était très limité et nous avons sélectionné la lignée murine 4T1, un modèle de TNBC de fond génétique BALB/c. Ces cellules présentent une forte expression de la TSP1 et sont métastatiques, contrairement aux 67NR, lignée non métastatique issue de la même tumeur primaire mais exprimant peu la TSP1 (voir Figure supplémentaire 1 dans l'article en annexe).

### **Impact de l'inhibition de la TSP1 sur le développement tumoral :**

Nous avons choisi dans un premier temps d'évaluer l'impact de la TSP1 sur le développement tumoral chez des souris syngéniques BALB/c. Pour cela nous avons greffé des cellules 4T1shTSP1 (cellules knockdown pour TSP1) ou 4T1 ShCTL (cellules contrôles) dans la glande

mammaire de ces souris. Nous n'avons pas observé d'impact sur la croissance de la tumeur primaire, ce qui est cohérent avec nos observations *in vitro* ne montrant pas de différence de prolifération de ces cellules. De façon tout à fait remarquable, nous observons une augmentation significative du nombre de vaisseaux sanguins et une meilleure couverture péricytaire de ceux-ci lorsque la TSP1 est inhibée dans ces tumeurs. Ces vaisseaux plus nombreux sont donc également plus fonctionnels ce que nous avons constaté avec la diminution significative de l'hypoxie intratumorale. Il est intéressant de noter que cette normalisation vasculaire et donc la meilleure oxygénation des tumeurs ne conduit pas nécessairement à une augmentation de la taille de la tumeur primaire dans ce modèle 4T1, contrairement au dogme qui a permis le développement d'anti-angiogènes durant ces dernières années.

### **Impact de l'inhibition de la TSP1 sur la dissémination métastatique :**

Nous avons réalisé la quantification des métastases pulmonaires en évaluant l'expression de la luciférase comme gène rapporteur par RT-qPCR, à la fin du protocole de tumorigenèse primaire. Tandis que nous constatons une dissémination métastatique massive pour la lignée contrôle (4T1shCTL) dans les poumons, la lignée 4T1shTSP1 ne métastase presque pas dans nos conditions expérimentales. Ainsi, l'inhibition de la TSP1 par shRNA entraîne une baisse drastique du nombre d'animaux présentant ce type de dissémination métastatique. La TSP1 est donc pro-métastatique ce qui n'avait jusqu'à présent jamais été démontré dans le cancer du sein. De manière remarquable, nous montrons que l'effet anti-métastatique de l'interférence ARN de la TSP1 est aboli chez les souris immunodéficientes. Ainsi, la dissémination métastatique pulmonaire est comparable pour les lignées 4T1shTSP1 et 4T1shCTL chez les souris Nude. Cette dernière observation suggère fortement que l'effet prométastatique de la TSP1 dépend de sa capacité à inhiber la réponse immunitaire adaptative.

### **Impact de l'inhibition de la TSP1 sur la réponse immunitaire :**

Nos études *in silico* de données de transcriptomique réalisées à partir de bases de données publiques indiquent l'existence d'une signature génique d'activation lymphocytaire dans des biopsies de TNBC exprimant faiblement TSP1. Il est à noter que cette activation lymphocytaire est associée à une réponse interféron gamma signée par 200 gènes chez ces mêmes patientes. A l'opposé, une signature génique de la signalisation TGF $\beta$  est enrichie dans des biopsies de TNBC exprimant fortement TSP1. Ces observations suggèrent que TSP1 joue un rôle important dans l'inhibition de l'activation lymphocytaire, conduisant à la progression tumorale et au phénotype agressif de ce type de cancer. Cette hypothèse est renforcée par nos marquages sur des coupes

de tumeurs TNBC issues de patientes. On constate une corrélation négative entre l'expression protéique de TSP1 et l'infiltrat lymphocytaire total (marquage CD3) mais également avec l'infiltrat tumoral par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. L'étude de Fridman en 2012, montre l'impact pronostique favorable de ce type d'infiltration lymphocytaire dans le cancer du sein [317] tout comme d'autres études focalisées sur les TNBC comme celle de Miyashita en 2015 [318], montrant également une meilleure réponse aux chimiothérapies comparativement aux tumeurs peu infiltrées.

Afin d'évaluer le rôle de la TSP1 sur la réponse immunitaire, nous avons étudié l'infiltrat immunitaire dans les tumeurs primaires développées chez les souris immunocompétentes greffées avec les cellules 4T1shCTL ou les 4T1shTSP1. Nous constatons alors une augmentation significative de l'infiltrat en LT CD8<sup>+</sup>, LT CD4<sup>+</sup> et LT Foxp3<sup>+</sup> lorsque la TSP1 est inhibée. Il est à noter que les ratios CD8/CD4 et CD8/CD4Foxp3 restent constant. Nous mettons ainsi en évidence pour la première fois que la forte expression de la TSP1 dans les TNBC inhibe l'infiltrat total en lymphocytes, et ce de façon globale et non sélective. Ces résultats sont concordants avec des études montrant qu'en plus de l'infiltration en LT CD8<sup>+</sup>, l'infiltration en Treg des cancers du sein peut être également associée à un bon pronostic [319, 320]. Cette augmentation de l'infiltration intratumorale lymphocytaire dans les tumeurs 4T1shTSP1 est corrélée à (i) une augmentation de la vascularisation des tumeurs, qui constitue la porte d'entrée des lymphocytes ; (ii) une diminution de l'hypoxie et du TGFβ actif, qui inhibent la réponse immunitaire intratumorale. De plus nous observons au niveau des ganglions drainants la tumeur, une amélioration significative du ratio CD8/CD4Foxp3 en faveur des LTCD8 dans les 4T1shTSP1. Il est donc intéressant de noter que nous observons une augmentation de la réponse immunitaire dans les ganglions locaux régionaux chez les souris greffées avec les 4T1shTSP1, suggérant que l'inhibition intratumorale de TSP1 peut inhiber en partie la réponse immunitaire systémique.

Nous avons constaté une augmentation de l'expression de PD-1 sur les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> intratumoraux dans les tumeurs 4T1shTSP1. Cette augmentation, observée à J11, reflète vraisemblablement une activation lymphocytaire accrue, plutôt qu'un phénomène d'épuisement lymphocytaire. En accord avec ce postulat, les TIL CD8<sup>+</sup> sont KI67<sup>+</sup>, indiquant leur capacité proliférative. De manière remarquable, l'interférence ARN de TSP1 permet de sensibiliser significativement les tumeurs 4T1 aux anti-PD-1. Cet effet pourrait être lié à l'augmentation de la vascularisation des tumeurs permettant une meilleure perfusion intratumorale des anti-PD-1. De plus, l'augmentation des cibles dans les tumeurs (i.e., TILs CD8<sup>+</sup> PD-1<sup>+</sup>) constitue un élément prédictif de la réponse aux anti-PD-1 [321]. Au regard des résultats décevants observés lors d'utilisation des anti-PD1 dans le cancer du sein, ce résultat s'avère tout à fait encourageant. Il serait intéressant de mieux caractériser les différentes populations lymphocytaires observées au sein même de ces tumeurs. Nous pourrions alors considérer leurs niveaux d'activation et d'exhaustion mais également l'existence potentielle d'une réponse anti-tumorale spécifique. Ces

approches nous permettraient de définir au mieux les éventuelles associations thérapeutiques, que ce soit avec l'utilisation d'autres immune checkpoint inhibiteurs ou même l'utilisation d'un protocole de vaccination.

### **Perspectives thérapeutiques de l'inhibition de TSP1 :**

Deux approches pharmacologiques visant à stimuler les activités anti-angiogéniques de la TSP1 ont été développées :

- ABT-510 est une molécule thérapeutique, un nonapeptide analogue de la TSP1, et plus particulièrement de sa liaison au CD36, qui a été l'objet de recherche en tant que traitement potentiel contre le cancer. Après une phase I peu concluante, une phase II a vu le jour en 2007 pour le traitement de cancer métastatique. Cet essai clinique a été arrêté prématurément car seulement trois des vingt-et-un patients ont atteint le critère principal de survie sans progression à 18 semaines. Ces trois patients n'ont pas progressé pendant 21, 34 et 42 semaines [322-324].
- TAX2 lui se comporte comme antagoniste sélectif de l'interaction TSP1:CD47. CD47 est largement rapportée comme étant impliquée dans la progression tumorale et la mise en place d'une résistance aux traitements chimiothérapeutiques. L'utilisation de TAX2 a permis de mettre en évidence une meilleure liaison de la TSP-1 au récepteur CD36, inhibant en conséquence la voie de signalisation associée au VEGF et au VEGFR2. Des résultats obtenus chez la souris C57Bl/6 révèlent que des administrations intrapéritonéales du peptide TAX2 perturbent fortement le réseau vasculaire associé à la tumeur et induisent une importante nécrose tumorale entraînant l'effondrement de la tumeur dans un modèle de mélanome [325-327].

Enfin, dans un article paru il y a quelques jours dans Nature Communications [328], les auteurs mettent en évidence (i) que l'inhibition de TSP1 dans un modèle de glioblastome entraîne une diminution significative de l'invasion et de la croissance tumorale, (ii) confirment également les résultats délétères parfois observés lors de l'utilisation d'un anti-angiogénique sur l'invasion tumorale dans le glioblastome, celle-ci découlant entre autre de l'expression de molécules pro-invasives suite à l'induction de HIF-1 $\alpha$  [329, 330], (iii) que le TGF $\beta$  induit directement l'expression de TSP1 via Smad3. Enfin, ils démontrent que l'utilisation d'une stratégie inhibant la TSP1 par shRNA ou l'utilisation de l'antagoniste TAX2, en association avec le Bevacizumab permet d'améliorer l'inhibition de l'invasion et ainsi prolonger la survie des souris greffées.

Ces dernières études suggèrent que TSP1 pourrait être une cible de choix dans le développement de molécules thérapeutiques visant à inhiber son expression ou bloquer son action. Le développement d'un siRNA ciblant la TSP1 est toujours en cours au sein de SeleXel et cette approche a déjà été utilisée avec succès dans le cancer de la prostate [313].

Une telle stratégie aurait très certainement des impacts sur le microenvironnement et notamment directement l'immunité anti-tumorale. Nous avons en effet pu voir que la liaison de la TSP1 au CD47 sur les cellules dendritiques humaines impactait leur différenciation [273, 274]. Il est probable que notre stratégie de siRNA TSP1 in vivo permette donc de favoriser l'engagement Th1 à la fois en facilitant la maturation des cellules dendritiques mais également en influant sur la concentration en IL-12 dans le microenvironnement.

De plus nos résultats montrant le bénéfice de l'interférence ARN de TSP-1 sur (i) la normalisation de la vascularisation intra-tumorale, (ii) la diminution de l'hypoxie, (iii) l'augmentation de l'infiltrat intratumoral par les cellules immunitaires, nous confortent sur l'intérêt d'une telle stratégie. De plus, le potentiel thérapeutique de l'inhibition de la TSP1 est aussi illustré en association avec d'autres molécules anticancéreuses déjà sur le marché.

➤ Potentiel d'association avec les anthracyclines :

Le modèle murin que nous avons utilisé, à savoir le modèle 4T1 est cependant connu pour être peu sensible à différents traitements aujourd'hui couramment utilisés en thérapie anti-cancéreuse. Dans l'article en annexe, l'administration chez la souris de la doxorubicine, une anthracycline utilisée dans le traitement du cancer du sein, n'a pas d'effet sur la tumorigenèse primaire et les métastases pulmonaires des cellules 4T1shCTL. A contrario, les tumeurs primaires et les métastases des 4T1shTSP1 sont plus sensibles à la doxorubicine (voir Figure 2H de l'article en annexe). Ce processus pourrait être lié à une meilleure diffusion de la doxorubicine dans la tumeur étant donné la normalisation de l'angiogenèse tumorale dans un contexte d'inhibition de la TSP1. De plus, il est raisonnable d'envisager que la capacité des anthracyclines à induire une mort immunogène joue un rôle dans cette réponse anti-tumorale. Nous citerons ici les signaux « eat me », comme l'exposition pré-apoptotique sur la membrane plasmique de la calréticuline, ou la libération dans l'environnement extracellulaire de molécules immunogènes comme la protéine HMGB1 (high mobility group B1) ou l'ATP [331, 332]. Cette mort immunogène s'avère alors d'autant plus efficace que l'infiltration en cellules immunes est importante, permettant ainsi une meilleure réponse immunitaire de l'hôte contre sa propre tumeur ; c'est également un objectif des traitements anticancéreux.

➤ Vers l'association avec des immunothérapies :

Nous avons également montré que l'inhibition de la TSP1 dans les cellules tumorales permettait une amélioration de l'efficacité d'un traitement anti-PD1. Nous savons que les thérapies utilisant des immunothérapies seules ne présentent que des succès limités et ne sont que peu efficaces dans le cancer du sein. Des études récentes ont mis en évidence que l'association d'anti-PD1 à la chimiothérapie (avec utilisation d'anthracyclines) permet une réponse globale de 90% chez des patients avec un cancer TNBC (KEYNOTE 173) [333]. Une autre étude qui prévoit de comparer l'efficacité d'une chimiothérapie avec un anti-PD-1 par rapport à une chimiothérapie seule devrait débuter prochainement (KEYNOTE-522) [334]. Comme nous l'avons vu précédemment, ce type de stratégie s'appuie sur l'utilisation de chimiothérapie pour induire une réponse immunitaire et des immunothérapies pour pallier à l'immunosuppression induite dans le microenvironnement des cancers du sein. L'ensemble de ces résultats permet de penser que l'inhibition de la TSP1 permettrait d'ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques en association avec ces molécules déjà approuvées et éprouvées.

➤ Perspectives d'association avec les thérapies anti-angiogéniques :

Comme nous avons pu le voir, dans un contexte tumoral, la balance des pro-angiogéniques et anti-angiogéniques endogènes est fortement dérégulée. L'utilisation des inhibiteurs du VEGF ou de sa voie de signalisation sont désormais utilisés afin d'obtenir une normalisation vasculaire bénéfique dans le traitement anti-tumoral.

Notamment par mes travaux antérieurs à cette thèse, nous avons également mis en évidence que le VEGF était très clairement un acteur clé dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale. Les effets immunosuppresseurs du VEGF dépendent de (i) la diminution de l'expression des molécules ICAM-1 et ICAM-2 par les cellules endothéliales, limitant l'infiltration lymphocytaire, (ii) l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques, (iii) l'exhaustion des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ou encore (iv) l'induction et la prolifération de lymphocytes T régulateurs [167, 173, 174, 176]. De plus nous avons également montré un effet additif lors de l'utilisation de l'anti-PD1 en combinaison avec un anti-VEGFA [176].

Une normalisation vasculaire durable, associant une réduction simultanée des facteurs pro- et anti-angiogéniques, devrait ralentir la croissance des tumeurs primaires, inhiber la dissémination métastatique et rétablir l'immunité antitumorale. Il serait donc intéressant d'associer l'inhibition de la TSP1 à l'inhibition du VEGF, d'en constater dans un premier temps les effets sur la vascularisation tumorale, la dissémination métastatique et l'infiltrat lymphocytaire, puis, dans un second temps, l'associer aux immunothérapies.

D'autres perspectives d'association thérapeutiques peuvent évidemment être envisagées. A titre d'exemple, des associations sont envisageables avec de la vaccination anti-tumorale (afin de stimuler une réponse cytotoxique CD8<sup>+</sup> spécifique de la tumeur) ou de la radiothérapie (augmentant, entre autres, l'expression d'ICAM-1) [335, 336].

Pour conclure, les thérapies anti-cancéreuses de demain devront nécessairement passer par des associations de molécules thérapeutiques. En effet la complexité des tumeurs, leur hétérogénéité, la diversité de leur localisation et d'expression génique, mais également la part importante du microenvironnement tumoral sont autant d'arguments pour aborder le traitement de cette pathologie sous différents aspects. Il y a fort à parier que les plus grands succès thérapeutiques à venir auront lieu grâce aux associations de molécules anti-tumorales d'hier, d'aujourd'hui et de demain.

D'un point de vue personnel, ce projet m'a permis d'aborder un autre aspect de l'angiogenèse, d'apporter mes connaissances à l'entreprise SeleXel mais également mon aide sur les projets au sein de l'équipe INSERM. J'ai notamment contribué à montrer dans le modèle 4T1 chez la souris les effets bénéfiques de l'association des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (anti-PD-1 ou anti-CTLA-4) avec les anti-TNF (Bertrand et al, 2017) ou une stratégie d'interférence ARN de la sphingosine kinase 1, une enzyme du métabolisme sphingolipidique (Imbert et al., en révision).

J'ai bien sûr appris énormément durant ces années dans différents domaines que je ne maîtrisais pas. Cette expérience aura été pour moi l'occasion de me conforter dans mon envie de poursuivre dans le domaine du développement de molécules thérapeutiques et plus particulièrement en cancérologie.

## XI. Références

1. Rothschild, B.M., et al., *Epidemiologic study of tumors in dinosaurs*. Die Naturwissenschaften, 2003. **90**(11): p. 495-500.
2. Schultz, M., et al., *Oldest known case of metastasizing prostate carcinoma diagnosed in the skeleton of a 2,700-year-old Scythian king from Arzhan (Siberia, Russia)*. Int J Cancer, 4 octobre 2007.
3. Faguet, G.B., *A brief history of cancer: age-old milestones underlying our current knowledge database*. International journal of cancer, 2015. **136**(9): p. 2022-36.
4. Récamier, J.-C.-A., *Recherches sur le traitement du cancer par la compression méthodique simple ou combinée, et sur l'histoire générale de la même maladie, suivies de notes 1° sur les forces et la dynamétrie vitales, 2° sur l'inflammation et l'état fébrile* 1829.
5. I, B., *The modifying influence of dichloro-ethyl sulphide on the induction of tumours in mice by tar*. The Journal of pathology and bacteriology, 1929.
6. Ferlay J, S.I., Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C et al., *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11*. 2013.
7. Plummer, M., et al., *Global burden of cancers attributable to infections in 2012: a synthetic analysis*. The Lancet. Global health, 2016. **4**(9): p. e609-16.
8. *Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015*. Lancet, 2016. **388**(10053): p. 1659-1724.
9. Stewart BW, W.C., *World cancer report 2014*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.
10. Binder-Foucard, F., et al., *Cancer incidence and mortality in France over the 1980-2012 period: solid tumors*. Revue d'épidémiologie et de sante publique, 2014. **62**(2): p. 95-108.
11. Belot, A., et al., *Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005*. Revue d'épidémiologie et de sante publique, 2008. **56**(3): p. 159-75.
12. O'Connell, J.B., M.A. Maggard, and C.Y. Ko, *Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging*. Journal of the National Cancer Institute, 2004. **96**(19): p. 1420-5.
13. Shope, R.E. and E.W. Hurst, *Infectious Papillomatosis of Rabbits : With a Note on the Histopathology*. The Journal of experimental medicine, 1933. **58**(5): p. 607-24.



14. Rous, P. and J.W. Beard, *The Progression to Carcinoma of Virus-Induced Rabbit Papillomas (Shope)*. The Journal of experimental medicine, 1935. **62**(4): p. 523-48.
15. Renan, M.J., *How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data*. Molecular carcinogenesis, 1993. **7**(3): p. 139-46.
16. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
17. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
18. Nguyen, L.V., et al., *Cancer stem cells: an evolving concept*. Nature reviews. Cancer, 2012. **12**(2): p. 133-43.
19. Clarke, M.F., et al., *Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells*. Cancer research, 2006. **66**(19): p. 9339-44.
20. Paget, S., *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. Cancer metastasis reviews, 1989. **8**(2): p. 98-101.
21. Bissell, M.J. and W.C. Hines, *Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression*. Nature medicine, 2011. **17**(3): p. 320-9.
22. Pein, M. and T. Oskarsson, *Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches*. American journal of physiology. Cell physiology, 2015. **309**(10): p. C627-38.
23. Kessenbrock, K., V. Plaks, and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment*. Cell, 2010. **141**(1): p. 52-67.
24. Insua-Rodriguez, J. and T. Oskarsson, *The extracellular matrix in breast cancer*. Advanced drug delivery reviews, 2016. **97**: p. 41-55.
25. Murphy-Ullrich, J.E. and E.H. Sage, *Revisiting the matricellular concept*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2014. **37**: p. 1-14.
26. Tuck, A.B. and A.F. Chambers, *The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2001. **6**(4): p. 419-29.
27. Yee, K.O., et al., *The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis*. Breast cancer research and treatment, 2009. **114**(1): p. 85-96.
28. Schedin, P., *Pregnancy-associated breast cancer and metastasis*. Nature reviews. Cancer, 2006. **6**(4): p. 281-91.
29. Duffy, M.J., et al., *Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis*. Breast cancer research : BCR, 2000. **2**(4): p. 252-7.

30. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 298-307.
31. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. The New England journal of medicine, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
32. Elliott, B.E., et al., *Capacity of adipose tissue to promote growth and metastasis of a murine mammary carcinoma: effect of estrogen and progesterone*. International journal of cancer, 1992. **51**(3): p. 416-24.
33. Dirat, B., et al., *Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion*. Cancer research, 2011. **71**(7): p. 2455-65.
34. Hanahan, D. and L.M. Coussens, *Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment*. Cancer cell, 2012. **21**(3): p. 309-22.
35. Calle, E.E. and M.J. Thun, *Obesity and cancer*. Oncogene, 2004. **23**(38): p. 6365-78.
36. Orimo, A., et al., *Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion*. Cell, 2005. **121**(3): p. 335-48.
37. Polanska, U.M. and A. Orimo, *Carcinoma-associated fibroblasts: non-neoplastic tumour-promoting mesenchymal cells*. Journal of cellular physiology, 2013. **228**(8): p. 1651-7.
38. Chang, Y.C., et al., *Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures*. Journal of periodontal research, 2002. **37**(3): p. 196-203.
39. Kalluri, R., *The biology and function of fibroblasts in cancer*. Nature reviews. Cancer, 2016. **16**(9): p. 582-98.
40. Guo, X., et al., *Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(28): p. 19864-71.
41. Togo, S., et al., *Carcinoma-associated fibroblasts are a promising therapeutic target*. Cancers, 2013. **5**(1): p. 149-69.
42. Stover, D.G., B. Bierie, and H.L. Moses, *A delicate balance: TGF-beta and the tumor microenvironment*. Journal of cellular biochemistry, 2007. **101**(4): p. 851-61.
43. Gupta, G.P. and J. Massague, *Cancer metastasis: building a framework*. Cell, 2006. **127**(4): p. 679-95.
44. Braun, S. and B. Naume, *Circulating and disseminated tumor cells*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2005. **23**(8): p. 1623-6.

45. Kaufmann, S.H., *Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff*. Nature immunology, 2008. **9**(7): p. 705-12.
46. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nature reviews. Immunology, 2008. **8**(12): p. 958-69.
47. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nature reviews. Immunology, 2003. **3**(1): p. 23-35.
48. Leyva-Illades, D., et al., *Cholangiocarcinoma pathogenesis: Role of the tumor microenvironment*. Translational gastrointestinal cancer, 2012. **1**(1): p. 71-80.
49. O'Sullivan, T., et al., *Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity*. The Journal of experimental medicine, 2012. **209**(10): p. 1869-82.
50. Galdiero, M.R., et al., *Tumor associated macrophages and neutrophils in tumor progression*. Journal of cellular physiology, 2013. **228**(7): p. 1404-12.
51. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
52. Gasser, S. and D.H. Raulet, *Activation and self-tolerance of natural killer cells*. Immunological reviews, 2006. **214**: p. 130-42.
53. Fauriat, C., et al., *Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition*. Blood, 2010. **115**(11): p. 2167-76.
54. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
55. Dalod, M., et al., *Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming*. The EMBO journal, 2014. **33**(10): p. 1104-16.
56. Liu, J.K., *Anti-cancer vaccines - a one-hit wonder?* The Yale journal of biology and medicine, 2014. **87**(4): p. 481-9.
57. Snanoudj, R., et al., *The blockade of T-cell co-stimulation as a therapeutic stratagem for immunosuppression: Focus on belatacept*. Biologics : targets & therapy, 2007. **1**(3): p. 203-13.
58. Golstein, P. and G.M. Griffiths, *An early history of T cell-mediated cytotoxicity*. Nature reviews. Immunology, 2018. **18**(8): p. 527-535.
59. Pellegrini, M., et al., *Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(24): p. 14175-80.

60. Benchetrit, F., et al., [*Cytotoxic T lymphocytes: role in immunosurveillance and in immunotherapy*]. *Bulletin du cancer*, 2003. **90**(8-9): p. 677-85.
61. Huang, Y., et al., *CD4+ and CD8+ T cells have opposing roles in breast cancer progression and outcome*. *Oncotarget*, 2015. **6**(19): p. 17462-78.
62. Coy, J., et al., *PD-1 expression by canine T cells and functional effects of PD-1 blockade*. *Veterinary and comparative oncology*, 2017. **15**(4): p. 1487-1502.
63. Galon, J., W.H. Fridman, and F. Pages, *The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: a novel perspective*. *Cancer Research*, 2007. **67**(5): p. 1883-6.
64. Raez, L.E., et al., *Induction of CD8 T-cell-Ifn-gamma response and positive clinical outcome after immunization with gene-modified allogeneic tumor cells in advanced non-small-cell lung carcinoma*. *Cancer gene therapy*, 2003. **10**(11): p. 850-8.
65. Sandoval, F., et al., *Mucosal imprinting of vaccine-induced CD8(+) T cells is crucial to inhibit the growth of mucosal tumors*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(172): p. 172ra20.
66. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. *Journal of immunology*, 1986. **136**(7): p. 2348-57.
67. Golubovskaya, V. and L. Wu, *Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy*. *Cancers*, 2016. **8**(3).
68. Veldhoen, M., et al., *Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset*. *Nature immunology*, 2008. **9**(12): p. 1341-6.
69. Xu, L., et al., *Cutting edge: regulatory T cells induce CD4+CD25-Foxp3- T cells or are self-induced to become Th17 cells in the absence of exogenous TGF-beta*. *Journal of immunology*, 2007. **178**(11): p. 6725-9.
70. Bending, D., et al., *Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice*. *The Journal of clinical investigation*, 2009. **119**(3): p. 565-72.
71. Lee, Y.K., et al., *Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage*. *Immunity*, 2009. **30**(1): p. 92-107.
72. Kaplan, M.H., M.M. Hufford, and M.R. Olson, *The development and in vivo function of T helper 9 cells*. *Nature reviews. Immunology*, 2015. **15**(5): p. 295-307.
73. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R.A. Kastelein, *The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses*. *Immunity*, 2003. **19**(5): p. 641-4.
74. Trinchieri, G. and A. Sher, *Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence*. *Nature reviews. Immunology*, 2007. **7**(3): p. 179-90.

75. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annual review of immunology, 2003. **21**: p. 685-711.
76. Afkarian, M., et al., *T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells*. Nature immunology, 2002. **3**(6): p. 549-57.
77. Lugo-Villarino, G., et al., *T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(13): p. 7749-54.
78. Lazarevic, V., et al., *T-bet represses T(H)17 differentiation by preventing Runx1-mediated activation of the gene encoding RORgammat*. Nature immunology, 2011. **12**(1): p. 96-104.
79. Oestreich, K.J., A.C. Huang, and A.S. Weinmann, *The lineage-defining factors T-bet and Bcl-6 collaborate to regulate Th1 gene expression patterns*. The Journal of experimental medicine, 2011. **208**(5): p. 1001-13.
80. Corthay, A., et al., *Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells*. Immunity, 2005. **22**(3): p. 371-83.
81. Kim, H.P., J. Imbert, and W.J. Leonard, *Both integrated and differential regulation of components of the IL-2/IL-2 receptor system*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2006. **17**(5): p. 349-66.
82. Gattinoni, L., et al., *Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(6): p. 1616-26.
83. Williams, M.A., A.J. Tzgnik, and M.J. Bevan, *Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells*. Nature, 2006. **441**(7095): p. 890-3.
84. Zhu, J., et al., *Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion*. Journal of immunology, 2001. **166**(12): p. 7276-81.
85. Zhu, J., et al., *GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors*. Cell research, 2006. **16**(1): p. 3-10.
86. Glimcher, L.H. and K.M. Murphy, *Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up*. Genes & development, 2000. **14**(14): p. 1693-711.
87. Del Prete, G., *Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy*. Allergy, 1992. **47**(5): p. 450-5.
88. Sokol, C.L., et al., *Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response*. Nature immunology, 2009. **10**(7): p. 713-20.

89. White, A.M. and D.C. Wraith, *Tr1-Like T Cells - An Enigmatic Regulatory T Cell Lineage*. *Frontiers in immunology*, 2016. **7**: p. 355.
90. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. *The Journal of experimental medicine*, 2003. **198**(12): p. 1875-86.
91. Yoshimura, A. and G. Muto, *TGF-beta function in immune suppression*. *Current topics in microbiology and immunology*, 2011. **350**: p. 127-47.
92. Yagi, H., et al., *Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells*. *International immunology*, 2004. **16**(11): p. 1643-56.
93. Fontenot, J.D., M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky, *Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells*. *Nature immunology*, 2003. **4**(4): p. 330-6.
94. Palomares, O., et al., *Regulatory T cells and immune regulation of allergic diseases: roles of IL-10 and TGF-beta*. *Genes and immunity*, 2014. **15**(8): p. 511-20.
95. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease*. *Immunological reviews*, 2006. **212**: p. 8-27.
96. Asseman, C., et al., *An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation*. *The Journal of experimental medicine*, 1999. **190**(7): p. 995-1004.
97. Jutel, M. and C.A. Akdis, *T-cell regulatory mechanisms in specific immunotherapy*. *Chemical immunology and allergy*, 2008. **94**: p. 158-77.
98. Wolf, D., et al., *Treg(s) in Cancer: Friends or Foe?* *Journal of cellular physiology*, 2015. **230**(11): p. 2598-605.
99. Baecher-Allan, C. and D.A. Hafler, *Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease*. *Immunological reviews*, 2006. **212**: p. 203-16.
100. Ha, T.Y., *The role of regulatory T cells in cancer*. *Immune network*, 2009. **9**(6): p. 209-35.
101. Sallusto, F., et al., *Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*. *Nature*, 1999. **401**(6754): p. 708-12.
102. Wherry, E.J., et al., *Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets*. *Nature immunology*, 2003. **4**(3): p. 225-34.
103. Nizard, M., et al., *Induction of resident memory T cells enhances the efficacy of cancer vaccine*. *Nature communications*, 2017. **8**: p. 15221.
104. Nizard, M., H. Roussel, and E. Tartour, *Resident Memory T Cells as Surrogate Markers of the Efficacy of Cancer Vaccines*. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 2016. **22**(3): p. 530-2.

105. Nizard, M., et al., *Mucosal vaccines: novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites*. Human vaccines & immunotherapeutics, 2014. **10**(8): p. 2175-87.
106. Shankaran, V., et al., *IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity*. Nature, 2001. **410**(6832): p. 1107-11.
107. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. Nature immunology, 2002. **3**(11): p. 991-8.
108. Gatti, R.A. and R.A. Good, *Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review*. Cancer, 1971. **28**(1): p. 89-98.
109. Birkeland, S.A., et al., *Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986*. International journal of cancer, 1995. **60**(2): p. 183-9.
110. Penn, I., *Sarcomas in organ allograft recipients*. Transplantation, 1995. **60**(12): p. 1485-91.
111. Mahmoud, S., et al., *CD8(+) T lymphocytes infiltrating breast cancer: A promising new prognostic marker?* Oncoimmunology, 2012. **1**(3): p. 364-365.
112. Clemente, C.G., et al., *Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma*. Cancer, 1996. **77**(7): p. 1303-10.
113. Oble, D.A., et al., *Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human melanoma*. Cancer immunity, 2009. **9**: p. 3.
114. Pages, F., et al., *Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer*. The New England journal of medicine, 2005. **353**(25): p. 2654-66.
115. Schreiber, R.D., L.J. Old, and M.J. Smyth, *Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion*. Science, 2011. **331**(6024): p. 1565-70.
116. Dunn, G.P., L.J. Old, and R.D. Schreiber, *The three Es of cancer immunoediting*. Annual review of immunology, 2004. **22**: p. 329-60.
117. Vicari, A.P. and C. Caux, *Chemokines in cancer*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2002. **13**(2): p. 143-54.
118. Loeb, L.A., K.R. Loeb, and J.P. Anderson, *Multiple mutations and cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(3): p. 776-81.
119. Spranger, S., *Mechanisms of tumor escape in the context of the T-cell-inflamed and the non-T-cell-inflamed tumor microenvironment*. International immunology, 2016. **28**(8): p. 383-91.
120. Garrido, F., F. Ruiz-Cabello, and N. Aptsiauri, *Rejection versus escape: the tumor MHC dilemma*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2017. **66**(2): p. 259-271.

121. Schwartz, R.H., *T cell anergy*. Annual review of immunology, 2003. **21**: p. 305-34.
122. Crespo, J., et al., *T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment*. Current opinion in immunology, 2013. **25**(2): p. 214-21.
123. Davoodzadeh Gholami, M., et al., *Exhaustion of T lymphocytes in the tumor microenvironment: Significance and effective mechanisms*. Cellular immunology, 2017. **322**: p. 1-14.
124. Wherry, E.J., et al., *Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment*. Journal of virology, 2003. **77**(8): p. 4911-27.
125. Catakovic, K., et al., *T cell exhaustion: from pathophysiological basics to tumor immunotherapy*. Cell communication and signaling : CCS, 2017. **15**(1): p. 1.
126. Blackburn, S.D., et al., *Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection*. Nature immunology, 2009. **10**(1): p. 29-37.
127. Das, M., C. Zhu, and V.K. Kuchroo, *Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity*. Immunological reviews, 2017. **276**(1): p. 97-111.
128. Sakuishi, K., et al., *Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity*. The Journal of experimental medicine, 2010. **207**(10): p. 2187-94.
129. Ishida, Y., et al., *Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death*. The EMBO journal, 1992. **11**(11): p. 3887-95.
130. Francisco, L.M., P.T. Sage, and A.H. Sharpe, *The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity*. Immunological reviews, 2010. **236**: p. 219-42.
131. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nature medicine, 2002. **8**(8): p. 793-800.
132. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(19): p. 12293-7.
133. Bardhan, K., T. Anagnostou, and V.A. Boussiotis, *The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation*. Frontiers in immunology, 2016. **7**: p. 550.
134. O'Donnell, J.S., et al., *Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition*. Cancer treatment reviews, 2017. **52**: p. 71-81.
135. Sharma, P. and J.P. Allison, *The future of immune checkpoint therapy*. Science, 2015. **348**(6230): p. 56-61.



136. Restifo, N.P., M.J. Smyth, and A. Snyder, *Acquired resistance to immunotherapy and future challenges*. Nature reviews. Cancer, 2016. **16**(2): p. 121-6.
137. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer*. The New England journal of medicine, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
138. INCA. *Dépistage du cancer du sein : orienter vos patientes en fonction de leur niveau de risque*. 2017; Available from: <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Depistage-du-cancer-du-sein/Orienter-vos-patientes>.
139. Giuliano, A.E., et al., *Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual*. CA: a cancer journal for clinicians, 2017. **67**(4): p. 290-303.
140. Uehiro, N., et al., *Validation study of the UICC TNM classification of malignant tumors, seventh edition, in breast cancer*. Breast cancer, 2014. **21**(6): p. 748-53.
141. Gnant, M., N. Harbeck, and C. Thomssen, *St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion*. Breast care, 2011. **6**(2): p. 136-141.
142. Gong, Y., et al., *Impact of molecular subtypes on metastatic breast cancer patients: a SEER population-based study*. Scientific reports, 2017. **7**: p. 45411.
143. Tang, Y., et al., *Classification, Treatment Strategy, and Associated Drug Resistance in Breast Cancer*. Clinical breast cancer, 2016. **16**(5): p. 335-343.
144. Dai, X., et al., *Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping*. Journal of Cancer, 2017. **8**(16): p. 3131-3141.
145. Ohaegbulam, K.C., et al., *Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway*. Trends in molecular medicine, 2015. **21**(1): p. 24-33.
146. Nizard, M., et al., *Immunotherapy of HPV-associated head and neck cancer: Critical parameters*. Oncoimmunology, 2013. **2**(6): p. e24534.
147. Mittendorf, E.A. and G.E. Peoples, *Injecting Hope--A Review of Breast Cancer Vaccines*. Oncology, 2016. **30**(5): p. 475-81, 485.
148. Byrd, T.T., et al., *TEM8/ANTXR1-Specific CAR T Cells as a Targeted Therapy for Triple-Negative Breast Cancer*. Cancer research, 2018. **78**(2): p. 489-500.
149. Ott, P.A., F.S. Hodi, and C. Robert, *CTLA-4 and PD-1/PD-L1 blockade: new immunotherapeutic modalities with durable clinical benefit in melanoma patients*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2013. **19**(19): p. 5300-9.
150. Rugo, H.S., et al., *Safety and Antitumor Activity of Pembrolizumab in Patients with Estrogen Receptor-Positive/Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Negative*

*Advanced Breast Cancer*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2018. **24**(12): p. 2804-2811.

151. Adams, S., et al., *Phase 2 study of pembrolizumab (pembro) monotherapy for previously treated metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): KEYNOTE-086 cohort A*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(15\_suppl): p. 1008-1008.
152. Adams, S., et al., *Phase 2 study of pembrolizumab as first-line therapy for PD-L1–positive metastatic triple-negative breast cancer (mTNBC): Preliminary data from KEYNOTE-086 cohort B*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(15\_suppl): p. 1088-1088.
153. Butte, M.J., et al., *Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses*. Immunity, 2007. **27**(1): p. 111-22.
154. Rollins, M.R. and R.M. Gibbons Johnson, *CD80 Expressed by CD8(+) T Cells Contributes to PD-L1-Induced Apoptosis of Activated CD8(+) T Cells*. Journal of immunology research, 2017. **2017**: p. 7659462.
155. Dirix, L.Y., 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 research and treatment, 2018. **167**(3): p. 671-686.
156. Allen, E., et al., *Combined antiangiogenic and anti-PD-L1 therapy stimulates tumor immunity through HEV formation*. Science translational medicine, 2017. **9**(385).
157. Swaika, A., W.A. Hammond, and R.W. Joseph, *Current state of anti-PD-L1 and anti-PD-1 agents in cancer therapy*. Molecular immunology, 2015. **67**(2 Pt A): p. 4-17.
158. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. The New England journal of medicine, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
159. Hida, K., et al., *Contribution of Tumor Endothelial Cells in Cancer Progression*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(5).
160. Gotink, K.J. and H.M. Verheul, *Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action?* Angiogenesis, 2010. **13**(1): p. 1-14.
161. Jain, R.K., *Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy*. Nature medicine, 2001. **7**(9): p. 987-9.
162. Vasudev, N.S. and A.R. Reynolds, *Anti-angiogenic therapy for cancer: current progress, unresolved questions and future directions*. Angiogenesis, 2014. **17**(3): p. 471-94.
163. Hurwitz, H., *Integrating the anti-VEGF-A humanized monoclonal antibody bevacizumab with chemotherapy in advanced colorectal cancer*. Clinical colorectal cancer, 2004. **4** **Suppl 2**: p. S62-8.

164. Coutelle, O., et al., *Dual targeting of Angiopoetin-2 and VEGF potentiates effective vascular normalisation without inducing empty basement membrane sleeves in xenograft tumours*. British journal of cancer, 2015. **112**(3): p. 495-503.
165. Arjaans, M., et al., *VEGF pathway targeting agents, vessel normalization and tumor drug uptake: from bench to bedside*. Oncotarget, 2016. **7**(16): p. 21247-58.
166. Mpekris, F., et al., *Role of vascular normalization in benefit from metronomic chemotherapy*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2017. **114**(8): p. 1994-1999.
167. Tromp, S.C., et al., *Tumor angiogenesis factors reduce leukocyte adhesion in vivo*. International immunology, 2000. **12**(5): p. 671-6.
168. Shrimali, R.K., et al., *Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer*. Cancer research, 2010. **70**(15): p. 6171-80.
169. Gabrilovich, D.I., et al., *Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells*. Nature medicine, 1996. **2**(10): p. 1096-103.
170. Gabrilovich, D.I., et al., *Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 1999. **5**(10): p. 2963-70.
171. Huang, Y., et al., *Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF*. Blood, 2007. **110**(2): p. 624-31.
172. Cao, M., et al., *Kinase inhibitor Sorafenib modulates immunosuppressive cell populations in a murine liver cancer model*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2011. **91**(4): p. 598-608.
173. Terme, M., et al., *Modulation of immunity by antiangiogenic molecules in cancer*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 492920.
174. Terme, M., et al., *VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer*. Cancer Res, 2013. **73**(2): p. 539-49.
175. Voron, T., et al., *Control of the immune response by pro-angiogenic factors*. Front Oncol, 2014. **4**: p. 70.
176. Voron, T., et al., *VEGF-A modulates expression of inhibitory checkpoints on CD8+ T cells in tumors*. J Exp Med, 2015. **212**(2): p. 139-48.
177. Miles, D.W., et al., *Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-*

- negative metastatic breast cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2010. **28**(20): p. 3239-47.
178. Gray, R., et al., *Independent review of E2100: a phase III trial of bevacizumab plus paclitaxel versus paclitaxel in women with metastatic breast cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2009. **27**(30): p. 4966-72.
  179. Robert, N.J., et al., *RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2011. **29**(10): p. 1252-60.
  180. Brufsky, A.M., et al., *RIBBON-2: a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating the efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy for second-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2011. **29**(32): p. 4286-93.
  181. Miller, K.D., et al., *Randomized phase III trial of capecitabine compared with bevacizumab plus capecitabine in patients with previously treated metastatic breast cancer*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2005. **23**(4): p. 792-9.
  182. von Minckwitz, G., et al., *Bevacizumab plus chemotherapy versus chemotherapy alone as second-line treatment for patients with HER2-negative locally recurrent or metastatic breast cancer after first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy (TANIA): an open-label, randomised phase 3 trial*. The Lancet. Oncology, 2014. **15**(11): p. 1269-78.
  183. Bertucci, F., et al., *Bevacizumab plus neoadjuvant chemotherapy in patients with HER2-negative inflammatory breast cancer (BEVERLY-1): a multicentre, single-arm, phase 2 study*. The Lancet. Oncology, 2016. **17**(5): p. 600-11.
  184. Cameron, D., et al., *Adjuvant bevacizumab-containing therapy in triple-negative breast cancer (BEATRICE): primary results of a randomised, phase 3 trial*. The Lancet. Oncology, 2013. **14**(10): p. 933-42.
  185. Aalders, K.C., et al., *Anti-angiogenic treatment in breast cancer: Facts, successes, failures and future perspectives*. Cancer treatment reviews, 2017. **53**: p. 98-110.
  186. Labiano, S., A. Palazon, and I. Melero, *Immune response regulation in the tumor microenvironment by hypoxia*. Seminars in oncology, 2015. **42**(3): p. 378-86.
  187. Young, A., et al., *Targeting cancer-derived adenosine: new therapeutic approaches*. Cancer discovery, 2014. **4**(8): p. 879-88.
  188. Chouaib, S., V. Umansky, and C. Kieda, *The role of hypoxia in shaping the recruitment of proangiogenic and immunosuppressive cells in the tumor microenvironment*. Contemporary oncology, 2018. **22**(1A): p. 7-13.

189. Taylor, C.T. and S.P. Colgan, *Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches*. Nature reviews. Immunology, 2017. **17**(12): p. 774-785.
190. Semenza, G.L., *Targeting HIF-1 for cancer therapy*. Nature reviews. Cancer, 2003. **3**(10): p. 721-32.
191. Azimi, I., *The interplay between HIF-1 and calcium signalling in cancer*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2018. **97**: p. 73-77.
192. Jelkmann, W., *Regulation of erythropoietin production*. The Journal of physiology, 2011. **589**(Pt 6): p. 1251-8.
193. Wenger, R.H., *Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression*. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2002. **16**(10): p. 1151-62.
194. Corcoran, S.E. and L.A. O'Neill, *HIF1alpha and metabolic reprogramming in inflammation*. The Journal of clinical investigation, 2016. **126**(10): p. 3699-3707.
195. Loftus, R.M. and D.K. Finlay, *Immunometabolism: Cellular Metabolism Turns Immune Regulator*. The Journal of biological chemistry, 2016. **291**(1): p. 1-10.
196. O'Neill, L.A., R.J. Kishton, and J. Rathmell, *A guide to immunometabolism for immunologists*. Nature reviews. Immunology, 2016. **16**(9): p. 553-65.
197. Donnelly, R.P. and D.K. Finlay, *Glucose, glycolysis and lymphocyte responses*. Molecular immunology, 2015. **68**(2 Pt C): p. 513-9.
198. Schioppa, T., et al., *Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia*. The Journal of experimental medicine, 2003. **198**(9): p. 1391-402.
199. Bosco, M.C., et al., *Hypoxia inhibits the expression of the CCR5 chemokine receptor in macrophages*. Cellular immunology, 2004. **228**(1): p. 1-7.
200. Lin, N. and M.C. Simon, *Hypoxia-inducible factors: key regulators of myeloid cells during inflammation*. The Journal of clinical investigation, 2016. **126**(10): p. 3661-3671.
201. Sakamoto, T. and M. Seiki, *A membrane protease regulates energy production in macrophages by activating hypoxia-inducible factor-1 via a non-proteolytic mechanism*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(39): p. 29951-64.
202. Galvan-Pena, S. and L.A. O'Neill, *Metabolic reprogramming in macrophage polarization*. Frontiers in immunology, 2014. **5**: p. 420.
203. Casazza, A., et al., *Impeding macrophage entry into hypoxic tumor areas by Sema3A/Nrp1 signaling blockade inhibits angiogenesis and restores antitumor immunity*. Cancer cell, 2013. **24**(6): p. 695-709.

204. Naldini, A., et al., *Hypoxia affects dendritic cell survival: role of the hypoxia-inducible factor-1alpha and lipopolysaccharide*. Journal of cellular physiology, 2012. **227**(2): p. 587-95.
205. Kohler, T., et al., *Influence of hypoxia-inducible factor 1alpha on dendritic cell differentiation and migration*. European journal of immunology, 2012. **42**(5): p. 1226-36.
206. Bosco, M.C. and L. Varesio, *Dendritic cell reprogramming by the hypoxic environment*. Immunobiology, 2012. **217**(12): p. 1241-9.
207. Jantsch, J., et al., *Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function*. Journal of immunology, 2008. **180**(7): p. 4697-705.
208. Raber, P., A.C. Ochoa, and P.C. Rodriguez, *Metabolism of L-arginine by myeloid-derived suppressor cells in cancer: mechanisms of T cell suppression and therapeutic perspectives*. Immunological investigations, 2012. **41**(6-7): p. 614-34.
209. Ostrand-Rosenberg, S., *Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity*. Cancer immunology, immunotherapy : CII, 2010. **59**(10): p. 1593-600.
210. Pickup, M., S. Novitskiy, and H.L. Moses, *The roles of TGFbeta in the tumour microenvironment*. Nature reviews. Cancer, 2013. **13**(11): p. 788-99.
211. Parker, K.H., D.W. Beury, and S. Ostrand-Rosenberg, *Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment*. Advances in cancer research, 2015. **128**: p. 95-139.
212. Neumann, A.K., et al., *Hypoxia inducible factor 1 alpha regulates T cell receptor signal transduction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. **102**(47): p. 17071-6.
213. Eltzschig, H.K. and P. Carmeliet, *Hypoxia and inflammation*. The New England journal of medicine, 2011. **364**(7): p. 656-65.
214. Semenza, G.L., *Oxygen homeostasis*. Wiley interdisciplinary reviews. Systems biology and medicine, 2010. **2**(3): p. 336-361.
215. Palazon, A., et al., *HIF transcription factors, inflammation, and immunity*. Immunity, 2014. **41**(4): p. 518-28.
216. Ohta, A., et al., *In vivo T cell activation in lymphoid tissues is inhibited in the oxygen-poor microenvironment*. Frontiers in immunology, 2011. **2**: p. 27.
217. Hatfield, S.M., et al., *Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation*. Science translational medicine, 2015. **7**(277): p. 277ra30.
218. Marten, N.W., et al., *Kinetics of virus-specific CD8+ -T-cell expansion and trafficking following central nervous system infection*. Journal of virology, 2003. **77**(4): p. 2775-8.

219. Doedens, A.L., et al., *Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen*. Nature immunology, 2013. **14**(11): p. 1173-82.
220. Nakamura, H., et al., *TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells*. Journal of immunology, 2005. **174**(12): p. 7592-9.
221. Wang, R., et al., *The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation*. Immunity, 2011. **35**(6): p. 871-82.
222. Shi, L.Z., et al., *HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells*. The Journal of experimental medicine, 2011. **208**(7): p. 1367-76.
223. Gubser, P.M., et al., *Rapid effector function of memory CD8+ T cells requires an immediate-early glycolytic switch*. Nature immunology, 2013. **14**(10): p. 1064-72.
224. Ping, W., et al., *Clinicopathological and prognostic significance of hypoxia-inducible factor-1alpha in esophageal squamous cell carcinoma: a meta-analysis*. Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine, 2014. **35**(5): p. 4401-9.
225. Wang, H.X., et al., *HIF-2alpha as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival*. Genetics and molecular research : GMR, 2014. **13**(2): p. 2817-26.
226. Semenza, G.L., *Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics*. Oncogene, 2010. **29**(5): p. 625-34.
227. Yang, M.H., et al., *Direct regulation of TWIST by HIF-1alpha promotes metastasis*. Nature cell biology, 2008. **10**(3): p. 295-305.
228. Hiraga, T., et al., *Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer*. Cancer research, 2007. **67**(9): p. 4157-63.
229. Rankin, E.B. and A.J. Giaccia, *Hypoxic control of metastasis*. Science, 2016. **352**(6282): p. 175-80.
230. Li, D. and S.D. Finley, *The impact of tumor receptor heterogeneity on the response to anti-angiogenic cancer treatment*. Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro, 2018. **10**(4): p. 253-269.
231. Ruffell, B., et al., *Leukocyte composition of human breast cancer*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(8): p. 2796-801.
232. Baenziger, N.L., G.N. Brodie, and P.W. Majerus, *A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1971. **68**(1): p. 240-3.

233. Adams, J.C. and J. Lawler, *The thrombospondins*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2004. **36**(6): p. 961-8.
234. Jeong, G.-B., *Thrombospondin-1 and Inhibition of Tumor Growth*. Korean Journal of Physical Anthropology, 2015. **28**(4), **175**.
235. Iruela-Arispe, M.L., et al., *Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats*. Circulation, 1999. **100**(13): p. 1423-31.
236. Wight, T.N., et al., *Light microscopic immunolocalization of thrombospondin in human tissues*. The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society, 1985. **33**(4): p. 295-302.
237. Hellewell, A.L., et al., *Modulation of the extracellular matrix patterning of thrombospondins by actin dynamics and thrombospondin oligomer state*. Bioscience reports, 2015. **35**(3).
238. Mirochnik, Y., A. Kwiatek, and O.V. Volpert, *Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments*. Current drug targets, 2008. **9**(10): p. 851-62.
239. Asch, A.S., et al., *Isolation of the thrombospondin membrane receptor*. The Journal of clinical investigation, 1987. **79**(4): p. 1054-61.
240. Mawby, W.J., et al., *Isolation and characterization of CD47 glycoprotein: a multispinning membrane protein which is the same as integrin-associated protein (IAP) and the ovarian tumour marker OA3*. The Biochemical journal, 1994. **304** ( Pt 2): p. 525-30.
241. Lawler, J., et al., *Characterization of the murine thrombospondin gene*. Genomics, 1991. **11**(3): p. 587-600.
242. Bleuel, K., et al., *Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(5): p. 2065-70.
243. Lindner, D.J., et al., *Thrombospondin-1 expression in melanoma is blocked by methylation and targeted reversal by 5-Aza-deoxycytidine suppresses angiogenesis*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2013. **32**(2): p. 123-32.
244. Michaud-Levesque, J. and S. Richard, *Thrombospondin-1 is a transcriptional repression target of PRMT6*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(32): p. 21338-46.
245. Phelan, M.W., et al., *Hypoxia increases thrombospondin-1 transcript and protein in cultured endothelial cells*. The Journal of laboratory and clinical medicine, 1998. **132**(6): p. 519-29.
246. Osada-Oka, M., et al., *Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha-dependent expression of thrombospondin-1*. Journal of cellular biochemistry, 2008. **104**(5): p. 1918-26.



247. Feng, N., et al., *miR-487b promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation, migration, invasion and tube formation through regulating THBS1*. Neuroscience letters, 2015. **591**: p. 1-7.
248. McGray, A.J., et al., *Regulation of thrombospondin-1 expression through AU-rich elements in the 3'UTR of the mRNA*. Cellular & molecular biology letters, 2011. **16**(1): p. 55-68.
249. Gubin, M.M., et al., *Overexpression of the RNA binding protein HuR impairs tumor growth in triple negative breast cancer associated with deficient angiogenesis*. Cell cycle, 2010. **9**(16): p. 3337-46.
250. Prakash, P., P.P. Kulkarni, and A.K. Chauhan, *Thrombospondin 1 requires von Willebrand factor to modulate arterial thrombosis in mice*. Blood, 2015. **125**(2): p. 399-406.
251. Kuijpers, M.J., et al., *Supporting roles of platelet thrombospondin-1 and CD36 in thrombus formation on collagen*. Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology, 2014. **34**(6): p. 1187-92.
252. Ridnour, L.A., et al., *Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer*. Nitric oxide : biology and chemistry, 2008. **19**(2): p. 73-6.
253. Isenberg, J.S., et al., *Gene silencing of CD47 and antibody ligation of thrombospondin-1 enhance ischemic tissue survival in a porcine model: implications for human disease*. Annals of surgery, 2008. **247**(5): p. 860-8.
254. Camus, S.M., et al., *Erythrocyte microparticles can induce kidney vaso-occlusions in a murine model of sickle cell disease*. Blood, 2012. **120**(25): p. 5050-8.
255. Chandrasekaran, S., et al., *Pro-adhesive and chemotactic activities of thrombospondin-1 for breast carcinoma cells are mediated by alpha3beta1 integrin and regulated by insulin-like growth factor-1 and CD98*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(16): p. 11408-16.
256. Ginsburg, V. and D.D. Roberts, *Glycoconjugates and cell adhesion: the adhesive proteins laminin, thrombospondin and von Willebrand's factor bind specifically to sulfated glycolipids*. Biochimie, 1988. **70**(11): p. 1651-9.
257. Varani, J., et al., *Thrombospondin-induced adhesion of human keratinocytes*. The Journal of clinical investigation, 1988. **81**(5): p. 1537-44.
258. Tuszynski, G.P., et al., *Role of thrombospondin in hemostasis and cell adhesion*. Seminars in thrombosis and hemostasis, 1987. **13**(3): p. 361-8.
259. Tuszynski, G.P., et al., *Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis*. Cancer research, 1987. **47**(15): p. 4130-3.
260. Yabkowitz, R., et al., *Activated T-cell adhesion to thrombospondin is mediated by the alpha 4 beta 1 (VLA-4) and alpha 5 beta 1 (VLA-5) integrins*. Journal of immunology, 1993. **151**(1): p. 149-58.

261. Murphy-Ullrich, J.E. and M. Hook, *Thrombospondin modulates focal adhesions in endothelial cells*. The Journal of cell biology, 1989. **109**(3): p. 1309-19.
262. Good, D.J., et al., *A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(17): p. 6624-8.
263. Tolsma, S.S., et al., *Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity*. The Journal of cell biology, 1993. **122**(2): p. 497-511.
264. Gupta, K., et al., *Binding and displacement of vascular endothelial growth factor (VEGF) by thrombospondin: Effect on human microvascular endothelial cell proliferation and angiogenesis*. Angiogenesis, 1999. **3**(2): p. 147-158.
265. Taraboletti, G., et al., *The 140-kilodalton antiangiogenic fragment of thrombospondin-1 binds to basic fibroblast growth factor*. Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research, 1997. **8**(4): p. 471-9.
266. Ren, B., et al., *A double hit to kill tumor and endothelial cells by TRAIL and antiangiogenic 3TSR*. Cancer research, 2009. **69**(9): p. 3856-65.
267. Ren, B., et al., *Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1*. Biochimica et biophysica acta, 2006. **1765**(2): p. 178-88.
268. Kaur, S., et al., *CD47 Signaling Regulates the Immunosuppressive Activity of VEGF in T Cells*. Journal of immunology, 2014. **193**(8): p. 3914-3924.
269. Bauer, E.M., et al., *Thrombospondin-1 supports blood pressure by limiting eNOS activation and endothelial-dependent vasorelaxation*. Cardiovascular research, 2010. **88**(3): p. 471-81.
270. Barclay, A.N. and T.K. Van den Berg, *The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) and CD47: structure, function, and therapeutic target*. Annual review of immunology, 2014. **32**: p. 25-50.
271. Mateo, V., et al., *CD47 ligation induces caspase-independent cell death in chronic lymphocytic leukemia*. Nature medicine, 1999. **5**(11): p. 1277-84.
272. Mateo, V., et al., *Mechanisms of CD47-induced caspase-independent cell death in normal and leukemic cells: link between phosphatidylserine exposure and cytoskeleton organization*. Blood, 2002. **100**(8): p. 2882-90.
273. Doyen, V., et al., *Thrombospondin 1 is an autocrine negative regulator of human dendritic cell activation*. The Journal of experimental medicine, 2003. **198**(8): p. 1277-83.

274. Johansson, U. and M. Londei, *Ligation of CD47 during monocyte differentiation into dendritic cells results in reduced capacity for interleukin-12 production*. Scandinavian journal of immunology, 2004. **59**(1): p. 50-7.
275. Armant, M., et al., *CD47 ligation selectively downregulates human interleukin 12 production*. The Journal of experimental medicine, 1999. **190**(8): p. 1175-82.
276. Miller, T.W., et al., *Thrombospondin-1 is a CD47-dependent endogenous inhibitor of hydrogen sulfide signaling in T cell activation*. Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology, 2013. **32**(6): p. 316-24.
277. Li, Z., et al., *Thrombospondin-1 inhibits TCR-mediated T lymphocyte early activation*. Journal of immunology, 2001. **166**(4): p. 2427-36.
278. Avice, M.N., et al., *CD47 ligation selectively inhibits the development of human naive T cells into Th1 effectors*. Journal of immunology, 2000. **165**(8): p. 4624-31.
279. Endemann, G., et al., *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. The Journal of biological chemistry, 1993. **268**(16): p. 11811-6.
280. Baranova, I.N., et al., *Role of human CD36 in bacterial recognition, phagocytosis, and pathogen-induced JNK-mediated signaling*. Journal of immunology, 2008. **181**(10): p. 7147-56.
281. Bierie, B. and H.L. Moses, *TGF beta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer*. Nature Reviews Cancer, 2006. **6**(7): p. 506-520.
282. O'Garra, A., L. Gabrysova, and H. Spits, *Quantitative events determine the differentiation and function of helper T cells*. Nature immunology, 2011. **12**(4): p. 288-94.
283. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Advances in immunology, 2007. **96**: p. 41-101.
284. Laouar, Y., et al., *Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma*. Nature immunology, 2005. **6**(6): p. 600-7.
285. Gorelik, L., P.E. Fields, and R.A. Flavell, *Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression*. Journal of immunology, 2000. **165**(9): p. 4773-7.
286. Heath, V.L., et al., *TGF-beta1 down-regulates Th2 development and results in decreased IL-4-induced STAT6 activation and GATA-3 expression*. European journal of immunology, 2000. **30**(9): p. 2639-49.
287. Kuwahara, M., et al., *The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF-beta and suppresses T(H)2 differentiation*. Nature immunology, 2012. **13**(8): p. 778-86.

288. Josefowicz, S.Z., L.F. Lu, and A.Y. Rudensky, *Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function*. Annual review of immunology, 2012. **30**: p. 531-64.
289. Zheng, S.G., et al., *IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells*. Journal of immunology, 2007. **178**(4): p. 2018-27.
290. Zheng, Y., et al., *Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate*. Nature, 2010. **463**(7282): p. 808-12.
291. Benson, M.J., et al., *All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation*. The Journal of experimental medicine, 2007. **204**(8): p. 1765-74.
292. Coombes, J.L., et al., *A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism*. The Journal of experimental medicine, 2007. **204**(8): p. 1757-64.
293. Coleman, M.M., et al., *Alveolar macrophages contribute to respiratory tolerance by inducing FoxP3 expression in naive T cells*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 2013. **48**(6): p. 773-80.
294. Guilliams, M., et al., *Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells*. Blood, 2010. **115**(10): p. 1958-68.
295. McKarns, S.C. and R.H. Schwartz, *Distinct effects of TGF-beta 1 on CD4+ and CD8+ T cell survival, division, and IL-2 production: a role for T cell intrinsic Smad3*. Journal of immunology, 2005. **174**(4): p. 2071-83.
296. Bonig, H., et al., *Transforming growth factor-beta1 suppresses interleukin-15-mediated interferon-gamma production in human T lymphocytes*. Scandinavian journal of immunology, 1999. **50**(6): p. 612-8.
297. Ahmadzadeh, M. and S.A. Rosenberg, *TGF-beta 1 attenuates the acquisition and expression of effector function by tumor antigen-specific human memory CD8 T cells*. Journal of immunology, 2005. **174**(9): p. 5215-23.
298. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. Annual review of immunology, 2006. **24**: p. 99-146.
299. Genestier, L., et al., *Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc*. The Journal of experimental medicine, 1999. **189**(2): p. 231-9.
300. Adnan, E., et al., *Human tolerogenic dendritic cells generated with protein kinase C inhibitor are optimal for functional regulatory T cell induction - A comparative study*. Clinical immunology, 2016. **173**: p. 96-108.

301. Esebanmen, G.E. and W.H.R. Langridge, *The role of TGF-beta signaling in dendritic cell tolerance*. Immunologic research, 2017. **65**(5): p. 987-994.
302. Dong, Y., et al., *The Smad3 protein is involved in TGF-beta inhibition of class II transactivator and class II MHC expression*. Journal of immunology, 2001. **167**(1): p. 311-9.
303. Geissmann, F., et al., *TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells*. Journal of immunology, 1999. **162**(8): p. 4567-75.
304. Folkman, J., *Angiogenesis*. Annual review of medicine, 2006. **57**: p. 1-18.
305. Folkman, J., *Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action*. Experimental cell research, 2006. **312**(5): p. 594-607.
306. Jayson, G.C., et al., *Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions*. Lancet, 2016. **388**(10043): p. 518-29.
307. Terraneo, L., et al., *In vivo hyperoxia induces hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression in LNCaP tumors without affecting the tumor growth rate*. The international journal of biochemistry & cell biology, 2014. **51**: p. 65-74.
308. McDonald, P.C., S.C. Chafe, and S. Dedhar, *Overcoming Hypoxia-Mediated Tumor Progression: Combinatorial Approaches Targeting pH Regulation, Angiogenesis and Immune Dysfunction*. Frontiers in cell and developmental biology, 2016. **4**: p. 27.
309. Ahn, G.O. and M. Brown, *Targeting tumors with hypoxia-activated cytotoxins*. Frontiers in bioscience : a journal and virtual library, 2007. **12**: p. 3483-501.
310. Jain, R.K., *Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia*. Cancer cell, 2014. **26**(5): p. 605-22.
311. Campone, M., et al., *Prediction of Recurrence and Survival for Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) by a Protein Signature in Tissue Samples*. Molecular & cellular proteomics : MCP, 2015. **14**(11): p. 2936-46.
312. Horiguchi, H., et al., *Thrombospondin-1 is highly expressed in desmoplastic components of invasive ductal carcinoma of the breast and associated with lymph node metastasis*. The journal of medical investigation : JMI, 2013. **60**(1-2): p. 91-6.
313. Firlej, V., et al., *Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors*. Cancer Research, 2011. **71**(24): p. 7649-58.
314. Veliceasa, D., et al., *Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma*. The FEBS journal, 2007. **274**(24): p. 6365-77.
315. Byrne, G.J., et al., *Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer*. International journal of oncology, 2007. **31**(5): p. 1127-32.

316. Xu, J., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition*. Cell research, 2009. **19**(2): p. 156-72.
317. Fridman, W.H., et al., *The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome*. Nature reviews. Cancer, 2012. **12**(4): p. 298-306.
318. Miyashita, M., et al., *Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study*. Breast cancer research : BCR, 2015. **17**: p. 124.
319. Yeong, J., et al., *Higher densities of Foxp3(+) regulatory T cells are associated with better prognosis in triple-negative breast cancer*. Breast cancer research and treatment, 2017. **163**(1): p. 21-35.
320. Ladoire, S., et al., *Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy*. Breast cancer research and treatment, 2011. **125**(1): p. 65-72.
321. Tumeh, P.C., et al., *PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance*. Nature, 2014. **515**(7528): p. 568-71.
322. Sahara, A.I., et al., *Prospective study of thrombospondin-1 mimetic peptides, ABT-510 and ABT-898, in dogs with soft tissue sarcoma*. Journal of veterinary internal medicine, 2012. **26**(5): p. 1169-76.
323. Puneekar, S., et al., *Thrombospondin 1 and its mimetic peptide ABT-510 decrease angiogenesis and inflammation in a murine model of inflammatory bowel disease*. Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology, 2008. **75**(1): p. 9-21.
324. Markovic, S.N., et al., *A phase II study of ABT-510 (thrombospondin-1 analog) for the treatment of metastatic melanoma*. American journal of clinical oncology, 2007. **30**(3): p. 303-9.
325. Jeanne, A., L. Martiny, and S. Dedieu, *Thrombospondin-targeting TAX2 peptide impairs tumor growth in preclinical mouse models of childhood neuroblastoma*. Pediatric research, 2017. **81**(3): p. 480-488.
326. Jeanne, A., et al., *Matricellular TSP-1 as a target of interest for impeding melanoma spreading: towards a therapeutic use for TAX2 peptide*. Clinical & experimental metastasis, 2016. **33**(7): p. 637-49.
327. Jeanne, A., et al., *Identification of TAX2 peptide as a new unpredicted anti-cancer agent*. Oncotarget, 2015. **6**(20): p. 17981-8000.
328. Daubon, T., et al., *Deciphering the complex role of thrombospondin-1 in glioblastoma development*. Nature communications, 2019. **10**(1): p. 1146.

329. Keunen, O., et al., *Anti-VEGF treatment reduces blood supply and increases tumor cell invasion in glioblastoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011. **108**(9): p. 3749-54.
330. Piao, Y., et al., *Acquired resistance to anti-VEGF therapy in glioblastoma is associated with a mesenchymal transition*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2013. **19**(16): p. 4392-403.
331. Lake, R.A. and R.G. van der Most, *A better way for a cancer cell to die*. The New England journal of medicine, 2006. **354**(23): p. 2503-4.
332. Obeid, M., et al., *Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death*. Nature medicine, 2007. **13**(1): p. 54-61.
333. Schmid, P., et al., *Pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) as neoadjuvant treatment for triple negative breast cancer (TNBC): Preliminary results from KEYNOTE-173*. Journal of Clinical Oncology, 2017. **35**(15\_suppl): p. 556-556.
334. Schmid, P., et al., *KEYNOTE-522: Phase III study of pembrolizumab (pembro) + chemotherapy (chemo) vs placebo + chemo as neoadjuvant therapy followed by pembro vs placebo as adjuvant therapy for triple-negative breast cancer (TNBC)*. Journal of Clinical Oncology, 2018. **36**(15\_suppl): p. TPS602-TPS602.
335. Mondini, M., et al., *Synergy of Radiotherapy and a Cancer Vaccine for the Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer*. Molecular cancer therapeutics, 2015. **14**(6): p. 1336-45.
336. Rodriguez-Ruiz, M.E., et al., *Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule Are Induced by Ionizing Radiation on Lymphatic Endothelium*. International journal of radiation oncology, biology, physics, 2017. **97**(2): p. 389-400.





## XII. Annexe

Article : Silencing antiangiogenic Thrombospondin-1 in high grade breast cancer reduces hypoxia and inhibits metastasis.

Guillaume Labrousse\*<sup>1</sup>, Julie Tenet\*<sup>1,5</sup>, Jessica Nakhlé\*<sup>1,2</sup>, Elie Marcheteau<sup>2</sup>, Maud Chusseau<sup>2</sup>, Raouia Ben Naya<sup>1</sup>, Raphaëlle Duprez-Paumier<sup>3</sup>, Stephanie Delmas<sup>2</sup>, Amélie Lusque<sup>4</sup>, Thomas Filleron<sup>4</sup>, Anne-Françoise Tilkin-Mariame<sup>1</sup>, Odile Mondésert<sup>5</sup>, Claudiu T. Supuran<sup>6</sup>, Christian Touriol<sup>1</sup>, Hilary Brooks<sup>2</sup>, Valérie Lobjois<sup>5</sup>, Hervé Prats<sup>1</sup>, and Florence Cabon<sup>1,2§</sup>.

<sup>1</sup> Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037, Université Toulouse III Paul-Sabatier, ERL 5294 CNRS, 2 avenue Hubert Curien, 31047 Toulouse cedex 1, France

<sup>2</sup> SeleXel, 1 place Pierre Potier, BP 50624, 31106 Toulouse Cedex 1, France

<sup>3</sup> Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, CHU de Toulouse, France

<sup>4</sup> Institut Claudius Regaud, ICUT-Oncopole Toulouse, France

<sup>5</sup> ITAV, Université de Toulouse, CNRS, UPS, F-31106 Toulouse, France

<sup>6</sup> University of Florence, Neurofarba Department, Firenze, Italy

\* Equal contribution

§ Corresponding author: Florence Cabon

Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037, 2 avenue Hubert Curien, 31047 Toulouse cedex 1, France

Tel: +33 974 76 29 23

florence.cabon@inserm.fr

The authors have declared that no conflict of interest exists.

### Abstract

Using transcriptomic and histologic clinical analysis we found the expression of Thrombospondin-1 (TSP1), a potent endogenous inhibitor of angiogenesis and activator of latent TGF $\beta$ , associated with markers of aggressiveness, metastasis and a reduced survival in high grade breast cancers.

We edited *THBS1* gene in 4T1 metastatic breast tumor cells to specifically knock-out the capacity of TSP1 to activate TGF $\beta$  while maintaining TSP1 expression and all other TSP1 functions. This gene editing effectively impaired cell migration, but migration was restored in hypoxia, and these

cells efficiently metastasized from primary, hypoxic, tumors in immune-compromised mice. In contrast, when the antiangiogenic activity of TSP1 was knocked-out mutating its CD36 binding site, although cells migrated efficiently, they did not metastasize from the resultant well-vascularized primary tumors.

Altogether, silencing TSP1 normalized tumor vascularization, reduced hypoxia, enhanced chemotherapeutic efficacy, and robustly inhibited metastatic dissemination without enhancing the growth of tumors that were already adapted to hypoxia. Molecular dissection of TSP1 features demonstrates that its prometastatic effects are enhanced by its capacity to activate TGF $\beta$ , but that the major driver of metastasis relies in its antiangiogenic activity.

## Introduction

Breast cancer is the most common malignant disease in western women. Of the deaths attributed to cancer, 90% are due to metastasis, and treatments that prevent or cure metastasis remain elusive. Emerging data indicate that hypoxia and the extracellular matrix might have crucial roles in metastasis<sup>1</sup>.

Thrombospondin-1 (TSP1) is a large - 450kDa - multidomain extracellular matrix protein secreted by a number of normal and tumor cell types. TSP1 binds to several cell surface receptors, and interacts with extracellular proteins, modifying their bioavailability and activity. In so doing, TSP1 regulates a wide variety of biological functions, notably cell adhesion and de-adhesion, migration, inflammation, inhibition of angiogenesis, and activation of latent TGF $\beta$ <sup>2,3</sup>. TGF $\beta$  is secreted in an inactive form, bound to a Latency Associated Peptide (LAP) that impairs its binding to TGF $\beta$  receptors. A short exposed linear peptide sequence in TSP1 type I repeats, KRFLK, binds to a LSKL sequence in the LAP to release the active TGF $\beta$ <sup>4</sup>. Some of TSP1 effects are thus superimposable to that of TGF $\beta$ <sup>5</sup>. TSP1 is also a potent antiangiogenic protein; its binding to CD36 on endothelial cells activates the SRC kinase p59fyn, the subsequent p38MAPK cascade, leading to caspase 3 activation and endothelial cell apoptosis, causing reduced vascularization, thus increasing hypoxia<sup>6</sup>.

It has been widely demonstrated that TSP1 inhibits the initial stages of tumor development in a normal tissue. This is illustrated by the accelerated growth of tumors in TSP1 knock-out mice<sup>7</sup>, and by the fact that several oncogenes repress its expression<sup>8</sup>. This inhibitory effect is mostly attributed to TSP1 capacity to retard or inhibit the angiogenic switch needed for initial tumor development. In addition, its capacity to activate TGF $\beta$  also contributes to impair carcinoma initiation, as in normal tissues this cytokine inhibits epithelial cell cycle progression and promotes apoptosis<sup>9</sup>.

However, in patients, a high TSP1 level in primary breast tumors, inversely correlated with microvessel blood density, was found associated with a reduction of progression-free survival in lymph node-positive tumors<sup>10</sup>, and several authors reported an increased level of circulating TSP1 in plasma of patients with breast cancer as compared to controls, and a still higher level when tumors had metastasized<sup>11, 12, 13, 14</sup>, suggesting that TSP1 could stimulate metastasis. Hypoxia, which triggers apoptosis in tumors, is also suspected to foster metastatic dissemination and resistance to chemotherapy, radiotherapy and immunotherapy<sup>15, 16</sup>. The antiangiogenic potency of TSP1 might thus be ambivalent, as for its capacity to activate TGF $\beta$  which in malignant cells promotes epithelial to mesenchymal transition (EMT), and is linked with increased tumor progression, higher cell motility, cancer invasiveness, and metastasis<sup>9</sup>.

In this study we used gene editing to dissect how two key functions of TSP1, namely its capacity to activate TGF $\beta$ , and its antiangiogenic effect through CD36 binding, could affect metastasis in tumors having already acquired metastatic capacities.

## Results

### **TSP1 expression in clinical tumors is associated with markers of aggressiveness and with metastasis.**

Using an online survival analysis tool that combines results from 35 independent microarray studies, totaling 5143 breast tumor samples (www.kmplot.com<sup>17</sup>), we analyzed the prognostic value of TSP1 mRNA expression. TSP1 mRNA level was of no prognostic value in a cohort of 500 patients of whom all clinical data are available, and of whom the prevalences are similar to actual Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) based US prevalence numbers (Fig. 1A). This was also the case in grade I or grade II tumors. In contrast, a high TSP1 mRNA level was significantly associated with a reduced relapse-free survival (RFS), Distant Metastasis-free Survival (DMFS), and Overall Survival (OS) in grade III tumors (Fig. 1A and Table 1). We confirmed this association at the protein level by analyzing TSP1 expression in 144 clinical breast tumor samples (Fig. 1B, Table S1). TSP1 protein level was low in normal breast tissues, but high in 57% of tumor samples, and significantly associated with markers of aggressiveness such as a high mitotic grade or Ki67 expression, and with the presence of necrosis (Fig. 1C).

We also analyzed TSP1 expression in breast tumors from patients with confirmed liver metastases. TSP1 was expressed in 28 out of 31 (90.3%) of these tumors, and in 17 out of 24 (71%) liver biopsies available from the same patients (Table 2, Table S2). In liver biopsies, TSP1 was expressed by metastatic cells but not by hepatocytes (Fig. 1D). These clinical data show that TSP1 expression in breast tumors is correlated with markers of aggressiveness and metastasis,

but they do not establish if TSP1 expression is a consequence or a driver of tumor progression. To address this question, we used a rodent breast tumor model.

**TSP1 silencing decreases hypoxia in primary tumors, improves efficacy of associated chemotherapy, and inhibits metastatic dissemination.**

In agreement with our clinical data, we found that in several aggressive or metastatic breast cancer cell lines of human and mouse origin, the TSP1 level was higher than in less aggressive cell lines (Fig. S1A). TSP1 is a potent activator of TGF $\beta$ , with potential effects on the immune system, and we thus selected for this study the 4T1 syngeneic model of TNBC breast cancer. In immune competent BALB/c mice, 4T1 tumors spontaneously develop lung metastases from primary tumors implanted into the mammary fat pad<sup>18</sup>.

In 4T1 cells expressing a luciferase reporter, we first knocked-down TSP1 expression by stable expression of a construct coding for a shRNA targeting a sequence located in TSP1 exon 5 (4T1shT cells). As compared to 4T1shC cells, which express an empty construct, TSP1 mRNA level was reduced by about 70% (Fig. S2A), along with TSP1 protein (Fig. S2B and S3G), with no modification of cell proliferation (Fig. S2C).

We engrafted 4T1shC (TSP1-high) and 4T1shT (TSP1-low) cells into the mammary fat pad of female syngeneic BALB/c mice. Intriguingly, the tumor take and growth rate were not statistically different between the two groups (Fig. S2D), although the density of CD31-positive vessels in 4T1shT tumors was increased 2.5 fold as compared to control tumors (Fig. 2A and 2B), confirming that TSP1 still inhibits angiogenesis in these tumors. The pericyte coverage, calculated as the percentage of vessels positive for both  $\alpha$ -SMA and CD31, was also significantly increased in 4T1shT tumors (Fig. 2A and 2C). A small increase of Lyve1-positive lymph vessel density was observed in 4T1shT tumors but did not reach statistical significance (Fig. 2D). Hypoxia was strongly reduced in 4T1shT tumors as compared to controls (Fig. 2A and 2E). Accordingly, Carbonic Anhydrase-IX (CA-IX), a prototypic hypoxia-induced gene, was frequently expressed in the close vicinity of vessels in 4T1shC tumors, indicating inefficient delivery of oxygen, while expressed only at a distance from the normalized vessels in 4T1shT tumors (Fig. 2A). Met was found increased in 4T1 tumors depleted in pericytes, and associated with an increased metastasis (Cooke et al., 2012). Accordingly, the reduced hypoxia and increased pericyte coverage in TSP1-silenced 4T1 tumors were associated with a sustained inhibition of Met expression, and also with a reduced activation of TGF $\beta$  (Fig. 2A).

Most importantly, in lungs of mice bearing TSP1-low 4T1shT tumors, the size and number of metastases (Fig. 2F), and the total metastatic load, assessed by luciferase mRNA content (Fig.

2G), were highly reduced as compared to controls (4T1shC), establishing that TSP1 strongly contributes to metastatic dissemination.

The increased vascularization and reduced hypoxia in TSP1-low tumors should also have the benefit of improved drug delivery. To test this hypothesis, we treated mice bearing established tumors twice weekly for 2 weeks with low doses of Doxorubicin (0.75 and 1.5 mg/kg). While these doses of Doxorubicin were insufficient to inhibit the growth of control tumors (Fig. 2H), and affected similarly 4T1shC and 4T1shT cells *in vitro* (Fig. S2D), they efficiently inhibited the development of 4T1shT tumors, by 36% and 59% respectively (Fig 2H). Blood vessels density (Fig. S2F) and pericyte coverage (Fig. S2G) were also increased in 4T1shT tumors in doxorubicin-treated mice, confirming that the vasculature in TSP1 knocked-down tumors (Fig. 2A, 2B, 2C, 2E) is functional, remains functional in mice treated with doxorubicin, and can be exploited clinically to enhance the effect of chemotherapies. The highest dose of doxorubicin tested (1.5 mg/kg) completely impaired metastasis from TSP1-low tumors while it had no effect on that of control tumors (Fig. 2J).

### **TSP1 increases migration, invasion, and extravasation.**

Having confirmed the pro-metastatic role of TSP1 in metastatic breast cancer, we set about trying to elucidate the mechanisms involved. To study the role of TSP1 on cell-cell and cell-matrix interactions independently of its antiangiogenic property, we prepared 3D mammospheres from 4T1shC and 4T1shT cells. By Scanning Electron Microscopy at day 6, cells appeared elongated and connected to each other on the surface of 4T1shC mammospheres, but round and loosely attached to each other in 4T1shT mammospheres (Fig. 3A).

The marked alteration of cell to cell contact in 3D structure by TSP1 inhibition is evocative of differences in cell tension, adhesion, and stiffness, phenotypes associated with breast tumor aggressiveness and invasion<sup>19</sup>. Indeed, when embedded in matrigel, 4T1shC mammospheres were able to invade the matrigel, while 4T1shT ones were poorly able to do so (Fig. 3B and 3C). The expression of TSP1 mRNA was strongly repressed in 4T1shT mammospheres. The mRNA levels of TSP2 and TGF $\beta$ 2 were very low both in 4T1shC and 4T1shT mammospheres. The mRNA levels of TSP1 receptors CD36 and CD47, of integrins  $\alpha$ 5,  $\alpha$ V,  $\beta$ 1,  $\beta$ 3, and of TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 3, TGF $\beta$ R1 and TGF $\beta$ R2 were not significantly modified by TSP1 silencing (Fig. S3A).

During the initial process of selection of 4T1 cells, a non-metastatic clone, 67NR, was isolated from the same primary tumor<sup>18</sup>. In transwell assays, 4T1 cells, which express higher TSP1 mRNA and protein levels than 67NR cells (Fig. 3D and Fig. S3B), migrated more efficiently than non-metastatic 67NR (Fig 3E). We further studied if modulating TSP1 expression level affected cell migration. In transwell assays, 4T1 cell migration and invasion were significantly reduced as compared to control cells by silencing TSP1, either transiently, transfecting a TSP1-siRNA<sup>20</sup> (Fig.

3F, S3C, S3D), or stably, using two TSP1-shRNA constructs targeting respectively the coding (4T1shT cells), or the 3' untranslated region of TSP1 (4T1shT3' cells, Fig. S3F and S3G) (Fig. 3F and 3G). Transfection into 4T1shT3' of a TSP1 expression vector lacking the 3' UTR of TSP1 effectively rescued cell migration (Fig. 3G). Repressing TSP1 expression also inhibited extravasation into lungs when cells were injected into the tail vein of mice (Fig 3H). Similarly, silencing TSP1 in human MDA-MB-231 cells (Fig. S3I and S3J) reduced migration (Fig. S3K), and extravasation to lungs (Fig. S3L). Silencing TSP1 thus impaired migration, invasion, and extravasation.

Conversely, migration of 67NR cells was stimulated when TSP1 expression was increased by activating the endogenous *THBS1* gene transcription using a CRISPR transcriptional activation strategy (Fig. S3M and S3N) with two different guide RNAs (Fig. 3I). The high migration capacity of 4T1 cells could still be further increased by transfection of a TSP1-expression vector (Fig. 3J). Increasing or decreasing TSP1 expression level in 4T1, 67NR or MDA-MB231 cells had no effect on cell proliferation (Fig.S2C, S3E, S3O-S3Q).

### **Cell autonomous expression of TSP1 is required for metastasis**

We next asked if in heterogeneous tumors, migration and metastasis of TSP1-low cells could be rescued by TSP1 secreted by TSP1-high tumor cells. We mixed in a 1:1 ratio TSP1-high (4T1shC) and TSP1-low (4T1shT) cells tagged with reporter genes, and prepared mammospheres that were embedded in matrigel. Invasion (Fig. 4A) and extravasation in the lungs (Fig. 4B) of TSP1-low cells appeared stimulated, but not fully restored, when they were mixed with TSP1-high cells. Altogether, among 16 mice bearing 4T1shT tumors in experiments depicted in Fig. 2G and in Fig. 2K in the absence of doxycycline treatment, 5 mice developed lung metastases (31%). When mice were grafted in the mammary fat pad with a 1:1 mix of 4T1shC and 4T1shT cells, only 2 out of 14 (14%) developed metastases where 4T1shT cells were detected (Fig 4C). Therefore the presence of TSP1-high cells in tumors does not appear to stimulate metastasis of TSP1-low cells, supporting a cell autonomous effect of TSP1 on metastasis. Because TGF $\beta$  is a known trigger of cell migration, and also of immune suppression, we further evaluated the importance of TSP1-dependent activation of TGF $\beta$  in 4T1 cells and tumors.

### **Genetic dissection of a multifunctional protein via gene editing**

To further analyze the mechanisms by which TSP1 could drive migration *in vitro* and metastasis *in vivo*, we knocked-out in 4T1 cells expressing a luciferase reporter, two of TSP1 key properties: its capacity to activate the latent TGF $\beta$ , and its antiangiogenic ability, predominantly mediated by its capacity to bind CD36 on endothelial cells. We used genome editing so as to maintain the endogenous TSP1 gene regulation. The TSP1 sequences in type I repeats required for TGF $\beta$

activation (KRFK), or binding to CD36 (CSVGVTRIR), were mutated using a CRISPR-Cas9-directed knock-in strategy (Fig. S4A). Mutations in resulting cells, noted respectively 4T1ko $\beta$  and in 4T1ko36, were confirmed by genome sequencing. TSP1 expression levels and proliferation rates in 4T1ko $\beta$  and 4T1ko36 cells were close to that of parental 4T1 cells (Fig. S4B and S4C). Effective functional knock-out of the targeted properties were confirmed by the absence of activation of a SMAD-reporter transfected into 4T1ko $\beta$  cells (Fig. S4D), and by the absence of inhibition of HUVEC tube formation by medium conditioned by 4T1ko36 cells (Fig. S4E).

#### **4T1 cell migration and extravasation are dependent on TGF $\beta$ activation by TSP1**

Impairing TSP1 binding to CD36 did not affect the capacity of 4T1ko36 cells to migrate and to extravasate to the lungs, whereas these features were strongly downregulated in 4T1ko $\beta$  cells, and restored by treating cells with recombinant TGF $\beta$  (Fig. 4D-4F). Migration of 4T1 cells was also further stimulated by addition of recombinant, active, TGF $\beta$  (Fig. 4E). In transwell assay, when 4T1ko $\beta$  cells were mixed (1:1) with either 4T1ko36 or 4T1 cells, 4T1ko $\beta$  cell migration was strongly fostered, while 4T1shT cells failed to produce such stimulatory effects (Fig. 4G). These results demonstrate that 4T1 cell migration is highly dependent on TSP1-activated TGF $\beta$ , and also underline that the highly reduced metastatic capacity of TSP1-low cells, even in the presence of TSP1-high cells (Fig. 4C), are not explained by a reduced capacity of cell migration.

#### **TSP1-dependent activation of TGF $\beta$ is not required for metastasis.**

To further elucidate the mechanism driving metastasis of 4T1 cells, we engrafted 4T1ko $\beta$  cells into the mammary fat pad of immune competent mice. 4T1ko $\beta$  tumors started to develop in 7 out of 7 implanted animals but regressed after a week (Fig 5A), and the remaining tumors could not be analyzed further due to their small size. This phenotype was evocative of a TGF $\beta$ -dependent immune suppressive effect. Indeed, in immune-compromised mice, the size and growth rate of 4T1ko $\beta$  tumors were comparable to that of 4T1 and 4T1ko36 tumors (Fig. 5B). In contrast with 4T1shT tumors where active TGF $\beta$  was only partly reduced (Fig. 2A), only a weak TSP1-independent activation of TGF $\beta$  occurred in 4T1ko $\beta$  tumors (Fig. 5C), where blood vessel density, hypoxia and CA-IX expression were comparable to that of control tumors (Fig 5C, 5D and 5E).

In BALB/c mice, 4T1ko $\beta$  tumors did not metastasize to the lungs (Fig 5F), but the small size of primary tumors precluded proper interpretation of this result. Unexpectedly, while 4T1ko $\beta$  cells poorly migrate and extravasate, in Nude mice they metastasized from orthotopic breast tumors to the lungs as efficiently as parental 4T1 cells (Fig. 5G), indicating that 4T1ko $\beta$  cells acquired in primary tumors the capacity to migrate, and did so independently of TGF $\beta$  activation (Fig. 5C). We hypothesized that hypoxia in tumors could stimulate migration, and indeed, in migration assays, hypoxia restored 4T1ko $\beta$  cell migration, and stimulated that of 4T1 and 4T1ko36 cells (Fig. 5H).

Interestingly, we observed that hypoxia, which as expected increased expression of Carbonic Anhydrase IX (CA-IX) and Glut1 genes, also stimulated TSP1 expression (Fig. 5I) and secretion (Fig. 5J). Confirming a previous report<sup>21</sup>, we also observed that treatment with recombinant active TGF $\beta$  induced TSP1 expression in 4T1 cells (Fig. 5K). It thus appears that while TSP1 increases hypoxia and activates TGF $\beta$ , hypoxia and TGF $\beta$  in turn both induce TSP1 expression in a self-amplifying positive-feedback loop that stimulates cell migration and metastasis.

CA-IX is a hypoxia inducible protein that regulates intra- and extracellular pH under hypoxic conditions. CA-IX is also a potent stimulator of cell migration and its silencing in breast tumor cells strongly inhibits metastasis<sup>22</sup>. In 4T1shC and 4T1shT mammospheres, Ca-IX expression was increased in the hypoxic core of 4T1shC mammospheres, and this expression was reduced in 4T1shT mammospheres (Fig. 5L, arrow heads). However surprisingly, in normoxic conditions, in 4T1shC, but not 4T1shT mammospheres, CA-IX was also expressed on the outer cell layer, suggesting CA-IX implication in cell migration (Fig. 5L, arrows). In transwell assays, SLC111, a specific CA-IX inhibitor<sup>23</sup> impaired migration of 4T1 and 4T1shT cells in normoxia as in hypoxia (Fig. 5M), confirming that CA-IX is a potent trigger of cell migration. These results support the hypothesis that CA-IX is an important driver of cell migration in hypoxic tumors, even in the absence of active TGF $\beta$ .

### **Knocking-out TSP1 antiangiogenic activity normalizes vasculature, impairs metastasis, and increases chemotherapeutic efficacy.**

The tumor growth of 4T1ko36 cells grafted into the mammary fat pad of immune competent (Fig 5A) or Nude mice (Fig. 5B) was not different from that of parental cells. But in sharp contrast with 4T1ko $\beta$  tumors, despite their large size, and the fact that 4T1ko36 cells migrate and extravasate efficiently (Fig. 4D and 4F), 4T1ko36 tumors did not metastasize to the lungs in immune competent BALB/c, and only very poorly in nude mice (Fig. 5F and 5G).

The blood vessel density, pericyte coverage and tumor perfusion, assessed by the diffusion of injected Hoechst dye, (Fig 5C, 5D, 5E, 5N, 5O, 5Q), were all significantly increased in 4T1ko36 tumors, while hypoxia and CA-IX expression were markedly reduced as compared to control tumors (Fig 5C, 5N and 5R). An increased immune response in 4T1ko36 could also contribute to suppress metastasis from 4T1ko36 tumors but this is unlikely as the density of tumor infiltrating lymphocytes was not significantly increased in 4T1ko36 tumors as compared to controls (Fig. 5N and 5S).

As observed in 4T1shT tumors, low doses of doxorubicin that were inefficient on control tumors, produced a chemotherapeutic effect in 4T1ko36 tumors (Fig. 5T).



## Discussion

Since Judah Folkman first demonstrated the importance of vasculature in the development of cancers, it has been widely demonstrated that the onset of a tumor requires an angiogenic switch, combining an overexpression of proangiogenic factors and a concomitant reduction in antiangiogenic ones, TSP1 being at the first place. TSP1 expression is repressed by several oncogenes such as Ras, Jun, WT1, and Myc, and induced by the tumor suppressor P53<sup>8</sup>. Accordingly, in several TSP1 knock-out mouse models, where the absence of TSP1 both in tumor cells and in the stroma facilitates the angiogenic switch, the growth of primary tumors was enhanced<sup>7, 24</sup>. Overexpression of TSP1 in experimental tumors, or treatment with ABT-510, a TSP1-derived heptapeptide mimicking its antiangiogenic activity, showed antitumor effects in several tumor models<sup>25</sup>. However, ABT510 failed to demonstrate a clinical benefit in patients<sup>26, 27</sup>, likely because tumors adapt to hypoxia and develop resistance to TSP1 antiangiogenic effects, as shown in preclinical models<sup>10, 28, 29</sup>.

TSP1 is overexpressed in high grade clinical tumors, including melanoma<sup>30</sup>, prostate<sup>20</sup>, thyroid<sup>31</sup>, pancreatic carcinomas<sup>32</sup> and breast cancers<sup>10, 33</sup>, where we found here its expression associated with a high mitotic index, necrosis, and a reduced RFS, DMFS, and OS. TSP1 was recently found expressed by tumor cells in 74% of breast tumors with axillary lymph node invasion<sup>34</sup>, and several clinical studies associated TSP1 expression with increased breast tumor metastasis<sup>11, 14, 32</sup>. Accordingly, in paired samples of primary breast tumors and liver metastases, we found TSP1 expressed both by tumor and metastatic cells. These apparently opposed effects of TSP1, limiting angiogenic switch during tumor onset, but associated with metastasis in high grade tumors, might result from inactivating mutations. However, analysis of mutations in a TCGA data set of 1051 breast tumors showed only 0.4% alteration of the *THBS1* gene<sup>35</sup>, suggesting that TSP1 functions are not lost in tumors. In addition, we found in the present study that the TSP1 capacities to inhibit angiogenesis and to activate latent TGF $\beta$  were both maintained in metastatic breast tumor cells. Counter intuitively for a protein that increases hypoxia through its antiangiogenic effect, the 5' untranslated region of TSP1 mRNA contains an IRES that allows its translation in stress conditions<sup>36</sup>, and hypoxia was reported to induce TSP1 in a number of normal and cancer cells<sup>17, 45, 46, 47, 48</sup>. We found here that this was also the case in aggressive breast cancer cells, where both TGF $\beta$  and hypoxia induced TSP1 expression, creating a self-amplifying positive-feedback loop that likely maintains, and can even increase TSP1 expression during tumor progression.

As compared to experiments where TSP1 was overexpressed in tumor cells, few studies only analyzed the effects of TSP1 inhibition. Using gene knock-out, shRNAs, siRNAs, or antibodies

targeting TSP1, these studies respectively showed that inhibition of TSP1 reduced breast metastasis<sup>7</sup>, limited extravasation of melanoma cells to lungs<sup>37</sup>, impaired prostate tumor growth<sup>20</sup>, or induced infiltration of lymphocytes, regression of tumor, and inhibition of metastasis of melanoma cells<sup>38</sup>. All these treatment modalities inhibit TSP1 both in tumor and in stromal cells, thus not allowing deciphering the specific role of TSP1 produced by tumor cells. In the present study, we show that the selective inhibition of TSP1 in tumor cells only, increased blood vessel density and pericyte coverage, decreased hypoxia, TGF $\beta$  activation, CA-IX and Met expressions, and very markedly impaired metastasis, producing an inverse image of the effects triggered by the antiangiogenic drug Sunitinib in the same tumor model<sup>39</sup>.

Because TSP1 is a secreted protein, we asked whether its secretion by TSP1-high tumor cells in heterogeneous tumors could foster metastasis of TSP1-low cells. When a large number cells were coinjected in the tail vein, likely leading to the formation of micro-emboli in lung capillaries, extravasation of TSP1-low cells was stimulated when cells were co-injected with TSP1-high cells. In contrast, the presence of TSP1-high cells in tumors developing in the mammary fat pad did not stimulate the metastatic dissemination of TSP1-low cells. Circulating tumor cells in patients are more frequently found as single cells than associated with other tumor cells, forming micro-emboli<sup>40</sup>. Our data thus suggest that to metastasize, TSP1-low cells must remain in the close vicinity of TSP1-high cells all along the process, and that TSP1-high cells metastasize in a cell autonomous manner.

TSP1-induced cell motility and immune suppression have been proposed as the major effects underlying proinvasive or prometastatic effects of TSP1<sup>7, 37, 38</sup>. Indeed, it is well documented that TGF $\beta$  exerts suppressor effects in normal cells and early carcinomas, but promotes invasion, immune suppression, and metastasis when tumors progress<sup>9, 38, 41, 42</sup>.

Our results show that, at least in 4T1 cells and tumors, interaction with TSP1 is the major process leading to latent TGF $\beta$  activation: while maintaining all other TSP1 properties and regulation of its expression, mutation in the *THBS1* gene of the short sequence required for TGF $\beta$  activation resulted in a massive inhibition of TGF $\beta$  signaling in 4T1ko $\beta$  cells and tumors. Migration of 4T1ko $\beta$  cells was strongly reduced as compared to 4T1 cells, and restored in a dose-dependent manner by addition of recombinant TGF $\beta$ , or by mixing 4T1ko $\beta$  cells with 4T1 or 4T1ko36 cells in migration assays. Altogether, these results underpin the importance of TSP1-activated TGF $\beta$  in cell migration and extravasation. It was therefore unexpected that despite their poor capacity to migrate and extravasate, 4T1ko $\beta$  cells retained the ability to metastasize in nude mice. 4T1ko $\beta$  tumors in nude mice were hypoxic, suggesting that a hypoxia-dependent trigger of metastasis could be involved. Indeed, hypoxia restored cell migration of 4T1ko $\beta$  cells. Hypoxia strongly induces CA-IX, a promoter of cell survival which contributes to maintain intracellular pH, also

known to stimulate cell migration, invasion and metastasis<sup>22, 43, 44, 45</sup>. Treating 4T1ko $\beta$  cells with a Ca-IX specific inhibitor currently in clinical trial<sup>23</sup> impaired the restoration of cell migration in hypoxia. These results place CA-IX as a cell autonomous, TGF $\beta$ -independent trigger of migration, notably in hypoxic conditions.

The level of TSP1 in 4T1shT cells is knocked-down by about 60% as compared to 4T1 cells. This TSP1 level is close to that in 67NR cells, which like 4T1shT cells, develop tumors but do not metastasize. Interestingly, 4T1ko $\beta$  cells, where TGF $\beta$  activation by TSP1 is knocked-out, started developing in immune competent mice but these tumors regressed after a few days, while they grew as well as control tumors in nude mice, evocative of a TGF $\beta$ -dependent suppression of an adaptive immune response. The amount of active TGF $\beta$  in TSP1 knocked-down 4T1shT tumors thus appears sufficient to suppress the adaptive immune response *in vivo*, allowing tumor growth. Further studies are needed to characterize the mechanisms underlying this phenotype.

While the antiangiogenic effects of TSP1 are widely considered to inhibit tumor growth, the prominent result of our study is that the invalidation of the CD36-dependent antiangiogenic activity of TSP1 massively impaired metastasis of 4T1ko36 tumors, in nude mice as in immune competent animals. One could fear that improving oxygen delivery might foster tumor development, but the tumor take and growth rate of 4T1shT and 4T1ko36 tumors were comparable to that of parental 4T1 tumors, indicating that the growth of tumors that are already adapted to hypoxia is no longer limited by the lack of oxygen.

Accumulating clinical and experimental data indicate that hypoxia, which is associated with a pejorative prognosis in numerous tumors, helps selecting cells resistant to chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy<sup>15, 46</sup>, and might foster tumor progression and metastasis<sup>39, 47, 48, 49, 50</sup>. R. Jain proposed that angiogenesis inhibitors could open a transient therapeutic window improving drug delivery<sup>51</sup>, but a recent clinical trial in breast cancer showed that low-dose, short-course Sunitinib prior to chemotherapy in breast cancer patients did not improve pathological complete response rate, while it increased chemotherapy dose delays<sup>52</sup>, and a meta-analysis of randomized clinical trials in metastatic breast cancers concluded that combining inhibitors of angiogenesis with chemotherapy did not statistically improve PFS and OS as compared to chemotherapy alone<sup>53</sup>.

Altogether, our study shows that in high grade tumors, TSP1 expression, and its association with markers of aggressiveness, is not incidental, as its inhibition reduced migration, extravasation, and metastasis. These effects are at least in part dependent on the capacity of TSP1 to activate TGF $\beta$ . However, in line with a recent hypothesis stating that the development of novel hypoxia-alleviating

agents to normalize vasculature in the long term might increase overall survival<sup>54</sup>, our results demonstrate that the major effect produced by TSP1 inhibition is to increase in the long term blood vessel density and functionality, reducing hypoxia and CA-IX-induced migration, increasing tumor perfusion, efficacy of associated chemotherapies, and importantly, producing a major inhibition of metastatic dissemination, thus offering new therapeutic opportunities.

## Methods

**Reagents** used and providers are indicated in supplementary Table S3.

**Cell lines** were from ATCC and tested to be mycoplasma free. T47D, MDAMB453, BT549, MDA-MB-231, MDA-MB-435, 67NR, 4T1 and mWnt were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose. MCF7, ZR751, BT474 cells were maintained in RPMI and SKBR3 in McCoy's 5A medium. All media were supplemented with 10% FCS. HUVEC (Promocell) were grown in endothelial cell growth medium 2 (Promocell). DNA or siRNA were transfected into cells in culture using the TransIT-X2 Dynamic Delivery System (MIRUS BIO). When indicated cells were grown in an incubator with 1% oxygen to create hypoxic conditions.

**Migration assay:** Migration was measured using a transwell assay as described<sup>20</sup>. As indicated, SLC111, a specific CA-IX inhibitor, was added (40 mM) in the cell culture medium during migration assays. When indicated, before migration assays, cells were fluorescently labelled with CMFDA or CMTMR cell tracker dyes, 5 $\mu$ M in serum-free medium.

**Tube formation assay:** 24-well plates were coated with 250  $\mu$ l of Growth Factor-Reduced Matrigel (BD Biosciences) and allowed to polymerize at 37°C for 30 min. HUVECs (Promocell, C-12203) were added at a density of 30000 cells/ml in endothelial culture medium (PromoCell, C-22111) containing 0.5% FBS, FGF2 (10 ng/ml) and VEGF (0.5 ng/ml) supplemented with 5% of cell-conditioned medium or control medium as indicated. After 24h at 37°C, pictures were taken and the number of branching points quantified using ImageJ.

**Quantification of TGF $\beta$  activation:** TGF $\beta$  activation assay was performed by transfecting a GFP-reporter plasmid (Qiagen) designed to monitor the activation of the SMAD2/3 complex in cultured cells. When indicated, cell culture medium was supplemented 24h before transfection with 2 to 20 $\mu$ g/ml of recombinant TGF $\beta$  (R&D Systems). GFP expression was quantified by fluorimetry (Tristar apparatus, Berthold). In tumors, TGF $\beta$  was detected by immunohistochemistry using an antibody (R&D MAB 1835) that binds to mature, active TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, and TGF $\beta$ 3 forms.

**Preparation of mammospheres:** 67NR and 4T1 were seeded (3000 cells/100µl/well) in cell-repellent surface 96-round bottom well plates (Greiner, Cellstar) in DMEM 10% FBS. Plates were centrifuged (600g, 6min) and placed in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Size variation between mammospheres was less than 10%. Medium replenishment was performed by half every 6 days. Cell density was evaluated on cryosections counting DAPI-stained cells on the 100µm outer margin.

**Scanning electron microscopy** was performed with the M.E.B. ESEM Quanta 250 FEG on 6-days old mammospheres fixed in glutaraldehyde.

**Mammosphere invasion assay:** To study invasion, cell culture medium (100µl) from 5-days old mammospheres was replaced by Matrigel. Once Matrigel was solidified, 100µl of culture medium was added on top, and mammospheres were incubated for 3 days.

**Western blot Analysis, and immunohistochemistry** on 5µm cryosections of mammospheres fixed in formalin were performed using standard protocols<sup>20</sup>. Antibodies and corresponding usage are listed in Supplementary Table S4.

**Quantitative real-time PCR:** Total RNA was extracted using Tri-reagent (Sigma-Aldrich). Total RNA (50-100 ng) was retro-transcribed with RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using SYBR Premix Ex Taq (Takara) in a StepOnePlus System (ThermoFisher Scientific). Primer sequences are listed in Supplementary Table S5.

**Cell lines modifications:** Lentiviral vectors pLKO.1 expressing non-target shRNA, (Sigma-Aldrich, SHC002,) or shRNA construct targeting TSP1 exon 5 (Sigma-Aldrich, TRCN0000039696), or TSP1 3' untranslated region (Sigma-Aldrich TRCN0000109545), and lentiviral vectors pTRIP (Dharmacon) expressing Luciferase Firefly, H2B-GFP or H2B-mCherry were produced in HEK293FT cells by the tri-transfection method using calcium phosphate. Lentiviral particles were harvested 72 hours after transfection. For lentiviral transduction,  $5 \times 10^4$  cells were seeded onto 12-well plate and incubated 6 hours with lentivirus in OPTI-MEM.

**TSP1 overexpression:** Mouse TSP1 cDNA was amplified by PCR with PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara Clontech, R045A) and cloned into the MCS region of a mammalian expression plasmid downstream of a CMV promoter that was then transfected into cells.

**Construction of sgRNA expression plasmids for TSP-1 activation:** Target sites within the -250bp upstream transcription start site of TSP1 gene were identified using the online CRISPR design tool (crispr.mit.edu) as described<sup>55</sup>. Pairs of DNA oligonucleotides encoding corresponding sgRNA were annealed together and ligated into BbsI-digested plasmid pAC154-dual-dCas9VP160

and transfected into cells along with a nuclease-dead Cas9 activator system pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression (Addgene, 48240) as described<sup>56</sup>. Quantitative real-time PCR was used to validate efficient transcriptional activation of TSP1 48 h after transfection.

Targets of sgRNA were as follows:

G1: 5'-GGGAGACTCCGATCCCGCAC-3'

G7: 5'-CCAGGGCTCCTGTGCGGGAT-3'

**TSP1 knock-in (genome editing):** Genome editing was performed in 4T1 cells using both TALEN (Addgene, 1000000034) as described<sup>57</sup> and CRISPR/Cas9 nickase systems (Addgene, 42335) as described<sup>58</sup>. Briefly, the first allele of *thbs1* was impaired by TALEN induced homologous recombination of puromycin resistance gene upstream of the TSP1 ATG. The second allele of *thbs1* was then modified by deletion of the genomic region ranging from exon 7 to 21 with 2 couples of CRISPR-nickase, then repaired with a donor matrix containing TSP1 cDNA bearing mutations in frame with a P2A-hygromycin resistance cassette (Fig S4B). Recombination events were selected growing cells in medium containing puromycin and hygromycin. Isolated clones were characterized by PCR on genomic DNA.

## In vivo experiments

### Mouse Models

Animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee (CEEA-122) and were performed in accordance with the institutional and national guidelines and regulations. To assess tumor growth, 0.1 million cells expressing luciferase were injected into Balb/C female mammary fat pad. Tumor volumes were measured with a caliper using the formula  $V = \pi/6 \times D \times d^2$  where d is the minor tumor axis and D is the major tumor axis. Tumor take was assessed when tumors reached 150 mm<sup>3</sup> (set as day 1). For extravasation experiments, 1 million cells were injected into the tail vein of Balb/C mice, and after 2 days, mice were sacrificed and lungs collected. When stated mice received twice weekly intraperitoneal injections of doxorubicin (Sigma), 0.75 or 1.5mg/kg, diluted in saline.

**Assessment of hypoxia and perfusion in tumors:** To visualize hypoxic regions, mice bearing tumors received an IV injection of pimonidazole 60mg/kg 30 minutes before sacrifice. Pimonidazole adducts, which form with thiol-containing proteins in hypoxic conditions (pO<sub>2</sub> ≤ 10 mm Hg), were revealed using a fluorescein-coupled antibody as indicated by the manufacturer (Hypoxyprobe) and stained areas quantified.

To assess tumor perfusion, mice were injected 30 min before sacrifice with Hoechst (15mg/kg) injected 30 minutes and 2 minutes before sacrifice.

**Detection and quantification of lung metastasis:** To visualize metastases in lungs of mice bearing tumors expressing a luciferase reporter, mice were injected i.p. with 200 mg/kg of d-luciferin (PerkinElmer) 20min before sacrifice. Lungs were dissected and imaged using an IVIS spectrum system (Caliper Life Science). Images were acquired and analyzed using the LivingImage 4.3 software. Quantification of luciferase expression was then performed on pieces of frozen lung tissue (about 100mg) which were homogenized with an automated tissue homogenizer (Precellys evolution) in 300µl of Passive Lysis Buffer (Promega, E1531) and centrifuged (13,000xg, 5 min, 4°C). Bioluminescent signal generated by the luciferase activity was quantified in a microplate reader (Berthold, Tristar2) adding 50µl of detection buffer (Promega, E1500) to 50µl of tissue lysate in opaque 96-well microplates. Results, expressed in Relative Luminometric Units (RLU) were normalized by the protein content in tissue homogenate and by the specific luciferase activity (RLU/mg protein) of each cell line measured in cells the day of their injection into mice. Alternatively, evaluation of the metastatic load was performed by quantification of luciferase, GFP, or mCherry mRNAs in lungs by RT-qPCR and normalized to either Cyclophilin-A or H2B.

## Clinical studies

**Breast cancer patients** were recruited for biopsy at the Institut Claudius Regaud, Toulouse, France after approval by the institutional review board and informed consent. **Tissue microarrays** (TMAs) were constructed from 1.50 mm cores of formalin-fixed paraffin-embedded breast carcinoma (3 spots/patient).

**TSP1 immunodetection:** Sections from formalin-fixed paraffin-embedded clinical samples were incubated for 20min in anti-TSP1 antibody (Abcam, Ab1823 diluted 1:50) revealed with an HRP-conjugated secondary antibody (Dako, flex kit SM802).

**Scoring** was performed on full sections for all samples. No or weak TSP1 expression was graded as low TSP1 level and moderate or strong TSP1 expression was graded as high TSP1 level.

## Statistical analysis

Data are represented as mean  $\pm$  SEM. Two-sided Student t-tests were used for the comparison between two mean values. When appropriate, categorical variables were summarized through frequency and percentage. Comparisons between groups were performed using the chi-square test or the Fisher's exact test for categorical data. All reported p-values were two-sided. For all statistical tests, differences were considered significant at the 5% level. Statistical analysis was conducted using STATA version 13.0 software.

## Author contribution

GL, JT, JN, MC, EM, RBN, SD, AL, AFTM, OM, CT, HB conducted the experiments; SC developed the CA-IX inhibitor, TF, RDP, AL analyzed clinical data and performed statistical analysis, GL, JT, JN, VL, HP and FC designed and analyzed the experiments; FC wrote the paper.

## Acknowledgments

We acknowledge CREFRE and CRCT core facilities for their help. Supporting fellowships: Ligue Nationale contre le cancer and ARC to GL, INCA to RBN. Supporting grants: ANR (Prostirna) to FC, ARC to FC, INCA to HP, Fondation de l'Avenir to FC.

## References

1. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* **14**, 430-439 (2014).
2. Rusnati M, Urbinati C, Bonifacio S, Presta M, Taraboletti G. Thrombospondin-1 as a Paradigm for the Development of Antiangiogenic Agents Endowed with Multiple Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals* **3**, 1241-1278 (2010).
3. Murphy-Ullrich JE, Sage EH. Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biology*, (2014).
4. Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency- associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **274**, 13586-13593 (1999).
5. Crawford SE, *et al.* Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* **93**, 1159-1170 (1998).
6. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* **6**, 41-48 (2000).
7. Yee KO, Connolly CM, Duquette M, Kazerounian S, Washington R, Lawler J. The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* **114**, 85-96 (2009).
8. Stenina-Adognravi O. Invoking the power of thrombospondins: Regulation of thrombospondins expression. *Matrix Biology* **37**, 69-82 (2014).
9. Zarzynska JM. Two faces of TGF-beta1 in breast cancer. *Mediators Inflamm* **2014**, 141747 (2014).



10. Fontana A, *et al.* Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *International Journal of Cancer* **116**, 686-691 (2005).
11. Byrne GJ, *et al.* Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer. *Int J Oncol* **31**, 1127-1132 (2007).
12. Nathan FE, *et al.* Plasma thrombospondin levels in patients with gynecologic malignancies. *Cancer* **73**, 2853-2858 (1994).
13. Pectasides D, *et al.* Expression of angiogenic markers in the peripheral blood of docetaxel-treated advanced breast cancer patients: A Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) study. *Oncol Rep* **27**, 216-224 (2012).
14. Suh EJ, *et al.* Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Exp Mol Med* **44**, 36-44 (2012).
15. Chouaib S, Noman MZ, Kosmatopoulos K, Curran MA. Hypoxic stress: obstacles and opportunities for innovative immunotherapy of cancer. *Oncogene* **36**, 439-445 (2017).
16. Mountzios G, Pentheroudakis G, Carmeliet P. Bevacizumab and micrometastases: Revisiting the preclinical and clinical rollercoaster. *Pharmacology & Therapeutics* **141**, 117-124 (2014).
17. Gyorffy B, *et al.* An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* **123**, 725-731 (2010).
18. Aslakson CJ, Miller FR. Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor. *Cancer research* **52**, 1399-1405 (1992).
19. Wei SC, *et al.* Matrix stiffness drives epithelial-mesenchymal transition and tumour metastasis through a TWIST1-G3BP2 mechanotransduction pathway. *Nat Cell Biol* **17**, 678-688 (2015).
20. Firlej V, *et al.* Thrombospondin-1 Triggers Cell Migration and Development of Advanced Prostate Tumors. *Cancer research* **71**, 7649-7658 (2011).
21. Ranganathan P, *et al.* Expression profiling of genes regulated by TGF-beta: Differential regulation in normal and tumour cells. *BMC Genomics* **8**, 1-19 (2007).

22. Lou Y, *et al.* Targeting Tumor Hypoxia: Suppression of Breast Tumor Growth and Metastasis by Novel Carbonic Anhydrase IX Inhibitors. *Cancer research* **71**, 3364-3376 (2011).
23. Supuran CT. Advances in structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Expert Opinion on Drug Discovery* **12**, 61-88 (2017).
24. Lopez-Dee ZP, *et al.* Thrombospondin-1 in a Murine Model of Colorectal Carcinogenesis. *PLoS ONE* **10**, e0139918 (2015).
25. Henkin J, Volpert OV. Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert Opin Ther Targets* **15**, 1369-1386 (2011).
26. Baker LH, *et al.* Randomized, Phase II Study of the Thrombospondin-1-Mimetic Angiogenesis Inhibitor ABT-510 in Patients With Advanced Soft Tissue Sarcoma. *J Clin Oncol* **26**, 5583-5588 (2008).
27. Markovic SN, *et al.* A phase II study of ABT-510 (thrombospondin-1 analog) for the treatment of metastatic melanoma. *Am J Clin Oncol* **30**, 303-309 (2007).
28. Colombel M, *et al.* Androgens repress the expression of the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 in normal and neoplastic prostate. *Cancer Res* **65**, 300-308 (2005).
29. Filleur S, *et al.* In vivo mechanisms by which tumors producing thrombospondin 1 bypass its inhibitory effects. *Genes Dev* **15**, 1373-1382. (2001).
30. Jayachandran A, *et al.* Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. *Oncotarget* **5**, 5782-5797 (2014).
31. Nucera C, *et al.* B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 10649-10654 (2010).
32. Okada K, *et al.* Stromal thrombospondin-1 expression is a prognostic indicator and a new marker of invasiveness in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. *Biomed Res* **31**, 13-19 (2010).
33. Campone M, *et al.* Prediction of Recurrence and Survival for Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) by a Protein Signature in Tissue Samples. *Mol Cell Proteomics* **14**, 2936-2946 (2015).
34. Horiguchi H, Yamagata S, Rong Qian Z, Kagawa S, Sakashita N. Thrombospondin-1 is highly expressed in desmoplastic components of invasive ductal carcinoma of the breast and associated with lymph node metastasis. *J Med Invest* **60**, 91-96 (2013).

35. Pereira B, *et al.* The somatic mutation profiles of 2,433 breast cancers refines their genomic and transcriptomic landscapes. *Nature Communications* **7**, 11479 (2016).
36. Laklai H, *et al.* Thrombospondin-1 is a critical effector of oncosuppressive activity of sst2 somatostatin receptor on pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 17769-17774 (2009).
37. Borsotti P, *et al.* Thrombospondin-1 is part of a Slug-independent motility and metastatic program in cutaneous melanoma, in association with VEGFR-1 and FGF-2. *Pigment Cell Melanoma Res*, (2014).
38. Kudo-Saito C, Shirako H, Takeuchi T, Kawakami Y. Cancer Metastasis Is Accelerated through Immunosuppression during Snail-Induced EMT of Cancer Cells. *Cancer Cell* **15**, 195-206 (2009).
39. Cooke Vesselina G, *et al.* Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway. *Cancer Cell* **21**, 66-81 (2012).
40. Molnar B, Ladanyi A, Tanko L, Sréter L, Tulassay Z. Circulating Tumor Cell Clusters in the Peripheral Blood of Colorectal Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* **7**, 4080-4085 (2001).
41. Du B, Shim JS. Targeting Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) to Overcome Drug Resistance in Cancer. *Molecules* **21**, (2016).
42. Pickup M, Novitskiy S, Moses HL. The roles of TGF[ $\beta$ ] in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* **13**, 788-799 (2013).
43. Lock FE, *et al.* Targeting carbonic anhydrase IX depletes breast cancer stem cells within the hypoxic niche. *Oncogene* **32**, 5210-5219 (2013).
44. Gieling RG, *et al.* Antimetastatic Effect of Sulfamate Carbonic Anhydrase IX Inhibitors in Breast Carcinoma Xenografts. *Journal of Medicinal Chemistry* **55**, 5591-5600 (2012).
45. Ward C, *et al.* Evaluation of carbonic anhydrase IX as a therapeutic target for inhibition of breast cancer invasion and metastasis using a series of in vitro breast cancer models. *Oncotarget* **6**, 24856-24870 (2015).
46. O'Reilly EA, *et al.* The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clinical* **3**, 257-275 (2015).
47. Ebos JML, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell* **15**, 232-239 (2009).

48. Pàez-Ribes M, *et al.* Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* **15**, 220-231 (2009).
49. Maione F, *et al.* Semaphorin 3A overcomes cancer hypoxia and metastatic dissemination induced by antiangiogenic treatment in mice. *J Clin Invest* **122**, 1832-1848 (2012).
50. Yin T, He S, Ye T, Shen G, Wan Y, Wang Y. Antiangiogenic Therapy Using Sunitinib Combined with Rapamycin Retards Tumor Growth But Promotes Metastasis. *Translational Oncology* **7**, 221-229 (2014).
51. Jain RK. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* **307**, 58-62 (2005).
52. Wong AL, *et al.* Phase Ib/II randomized, open-label study of doxorubicin and cyclophosphamide with or without low-dose, short-course sunitinib in the pre-operative treatment of breast cancer. *Oncotarget*, (2016).
53. Wang Z, *et al.* Multitargeted antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors combined to chemotherapy in metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* **70**, 531-538 (2014).
54. Jain Rakesh K. Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia. *Cancer Cell* **26**, 605-622 (2014).
55. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols* **8**, 2281-2308 (2013).
56. Cheng AW, *et al.* Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Research* **23**, 1163-1171 (2013).
57. Ding Q, *et al.* A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell stem cell* **12**, 238-251 (2013).
58. Cong L, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823 (2013).

## Tables and Figures

Table1: Prognostic value of TSP1 mRNA expression

grade		HR [95% CI]	Logrank p	median survival in months*	
SEER cohort				Low TSP1 exp. cohort	High TSP1 exp. Cohort
<b>RFS</b>	SEER cohort	1.03 [0.77-1.38]	0.85	229	217
<b>RFS</b>	1	1.15 [0.69-1.94]	0.59	140	137
<b>RFS</b>	2	0.94 [0.74-1.19]	0.58	184	185
<b>RFS</b>	3	<b>1.37 [1.1-1.71]</b>	<b>0.0045</b>	<b>38.57*</b>	<b>28.09*</b>
<b>OS</b>	3	<b>1.51 [1.08-2.11]</b>	<b>0.015</b>	<b>205.64</b>	<b>173.72</b>
<b>DMFS</b>	3	<b>1.59 [1.12-2.26]</b>	<b>0.0094</b>	<b>85.48*</b>	<b>39.65*</b>

RFS: relapse-free survival; OS: Overall survival; DMFS: Distant Metastasis-free survival.

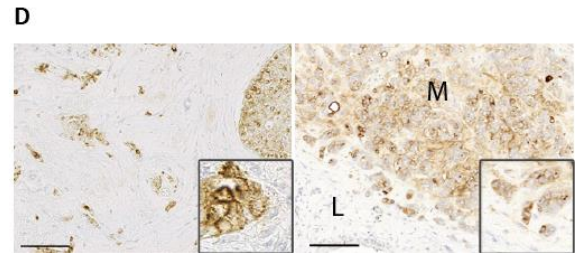
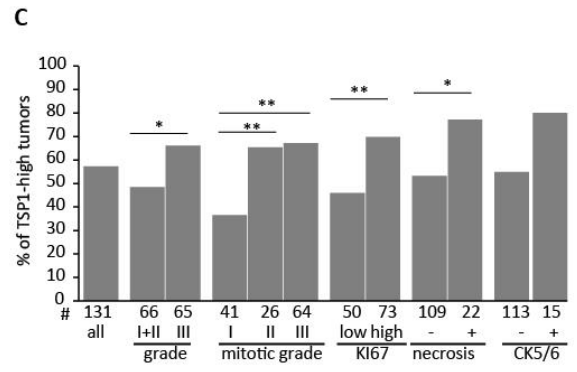
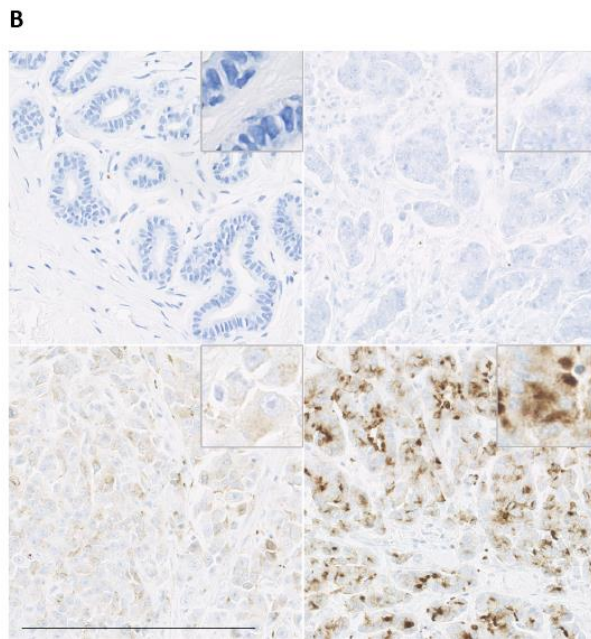
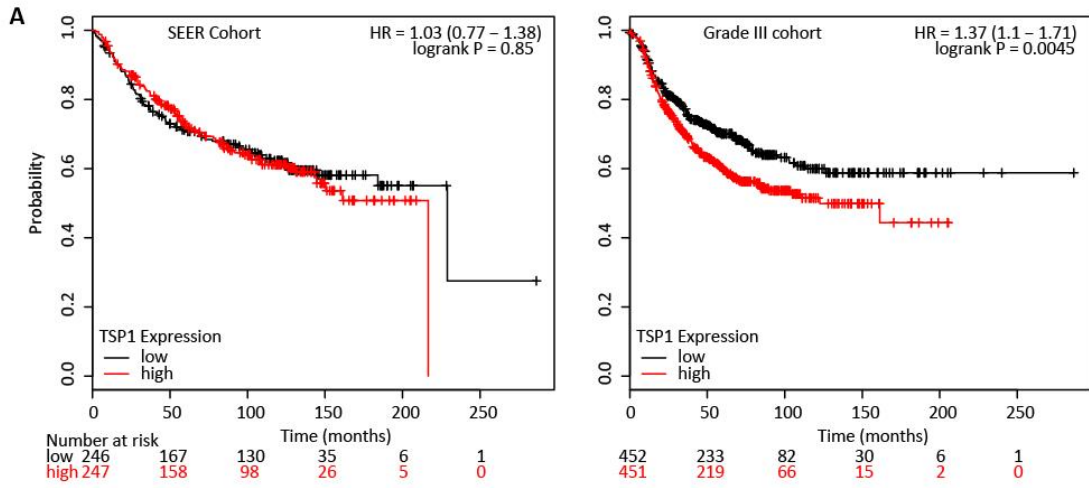
\* When median survival value cannot be computed in the two compared cohorts, upper quartile survival values are shown.

Table 2: TSP1 expression in paired samples of breast tumor/liver metastases.

Primary tumor	N (% tumors)	Liver metastases	N
TSP1 low	3 (9.7%)	TSP1 low	2
		TSP1 high	1
TSP1 high	28 (90.3%)	TSP1 low	5
		TSP1 high	16
		Not available	7

TSP1 expression in 31 tumors from patients with confirmed liver metastases and in 24 available paired liver biopsies was detected by immunohistochemistry and graded as low, or high.

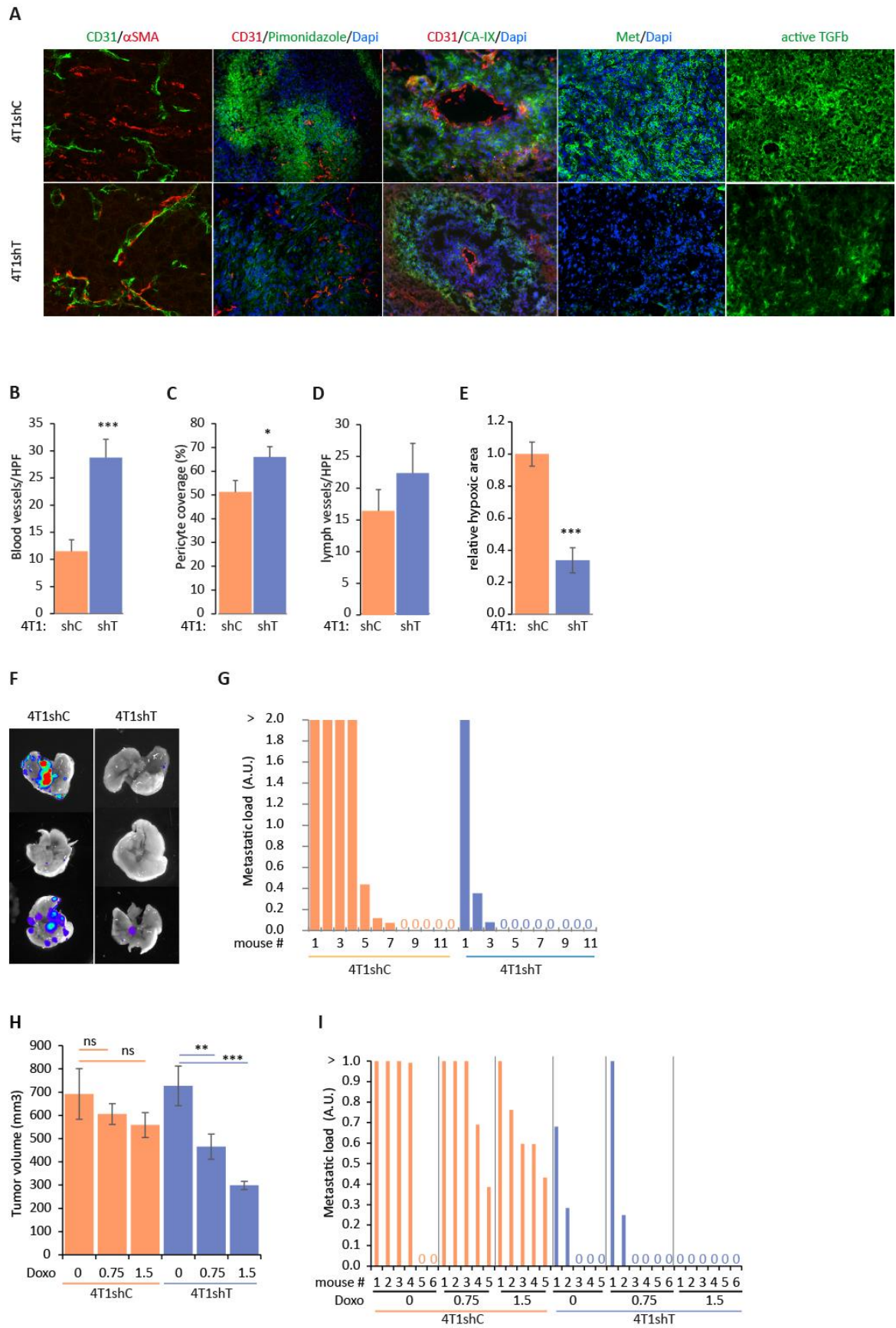
Labrousse et al., Figure 1



**Fig. 1: Prognostic value of TSP1 and expression in breast cancers.**

**A:** Kaplan-Meier survival analysis relating TSP1 mRNA levels and relapse-free survival in (left panel) a cohort of 500 breast cancer patients with prevalences similar to actual Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) based US prevalence numbers and clinical features ; right panel: patients with grade III breast cancer. Hazard ratios (HR), 95% confidence interval and logrank p are indicated on the graphs. **B:** TSP1 immunodetection in normal breast (upper left, negative) and invasive mammary carcinomas scored negative (upper right), low (lower left) or high (lower right). **C:** Percentage of tumors with high TSP1 expression in the indicated subsets of breast tumors. CK5/6: cytokeratine 5 or 6 positive tumors. Number of tumors in each subgroup is indicated. \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ . **D:** Representative images of TSP1 expression in paired clinical samples of primary breast tumors (left panel) and liver metastases (right panel, L: Liver, M: metastase). Bar: 200 $\mu$ m.

Labrousse et al., Figure 2



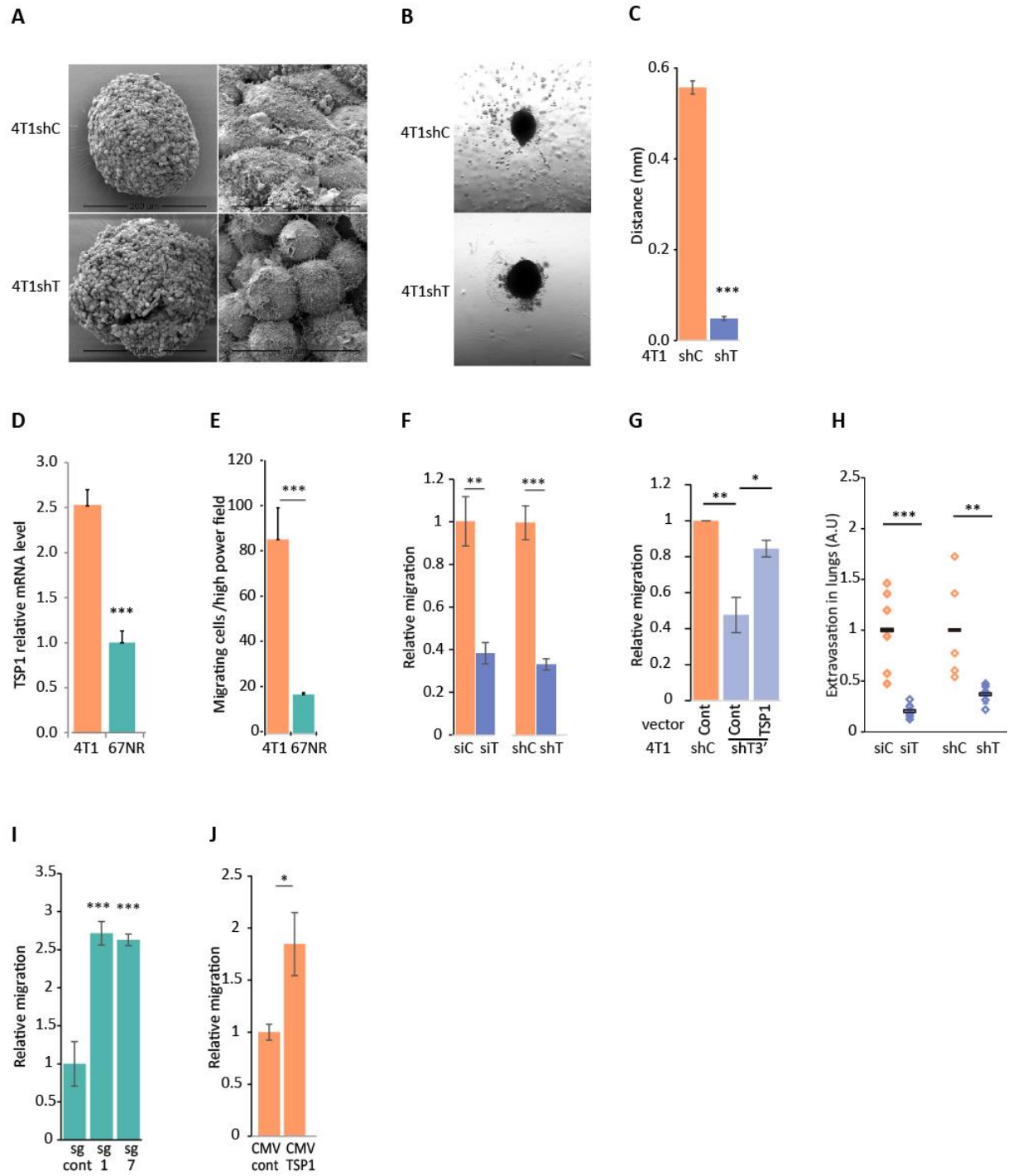


**Fig. 2: Effect of TSP1 knock-down on tumor vascularization, hypoxia, efficacy of chemotherapy, and metastasis.**

**A:** Immunodetection in 4T1shC and 4T1shT tumors of CD31 and  $\alpha$ SMA (x40); CD31 and pimonidazole adducts (x20); CD31 and CA-IX (x40); c-Met (x20); Active TGF $\beta$  (x20). Dapi was used to counterstain nuclei. **B-E:** Quantification in tumors (mean  $\pm$  SEM n $\geq$ 7 tumors /group) of **B:** CD31 positive vessels; **C:** pericyte coverage, calculated as the percentage of  $\alpha$ SMA/CD31 positive vessels over total CD31 positive vessels; **D:** Lymph vessels, positive for CD31 and Lyve1. **E:** Surfaces positive for pimonidazole adducts, area in 4T1shC tumors set to 1 (mean  $\pm$  SEM, n=10 tumors/group). **F-G:** Lung metastases in mice bearing orthotopic 4T1shC or 4T1shT tumors **F:** visualization of luciferase activity in dissected lungs from 3 representative mice/group. **G:** Metastatic load in lungs. Reporter mRNA values in lung homogenates, normalized to cyclophilin A mRNA are indicated for each individual mouse; Values over 2 (arbitrary units) are indicated as 2.

**H:** Volumes at sacrifice on day 11 of 4T1shC or 4T1shT tumors in mice treated on days 1, 4 and 8 with an intraperitoneal injection of saline, or Doxorubicin at 0.75 mg/kg, or 1.5 mg/kg as indicated (mean  $\pm$  SEM, n = 6 mice/group). **I:** Lung metastatic load at sacrifice in mice from experiment depicted in I. Quantification was performed as in G. Values above 1 (arbitrary units) are shown as 1. In all panels, \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.

Labrousse et al. Figure 3



**Fig.3: Effect of TSP1 knock-down on 3D cell interactions, migration, invasion, and extravasation.**

**A:** Scanning Electron Microscopy of 4T1shC and 4T1shT mammospheres after 6 days in culture. Scale bars: left panels 200 $\mu$ m, right panels: 20 $\mu$ m.

**B-C:** 4T1shC and 4T1shT mammospheres grown for 3 days in culture were embedded for 3 additional days in matrigel to monitor cell invasion. **B:** Representative image of mammospheres (10X) **C:** distance (mm) covered by cells (mean  $\pm$  SEM, n=10 cells /mammosphere, 10 independent mammospheres). **D:** TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A level (arbitrary units) in 4T1 and 67NR cells. **E:** Migration of  $2 \times 10^5$  67NR or 4T1 cells in a transwell assay. Results are expressed as the number of cells per field (mean  $\pm$  SEM, n=3 independent experiments).

**F:** Migration of 4T1 cells transfected with TSP1-siRNA (noted siT) or a control-siRNA (noted siC), and migration of 4T1shC or 4T1shC cells (mean  $\pm$  SEM, n=3 independent experiments, value in control condition set to 1).

**G:** Migration of 4T1shC, 4T1shT3' and 4T1shT3' cells transfected with a control plasmid or a plasmid coding for TSP1 as indicated (mean  $\pm$  SEM, n=3 independent experiments, value in control condition set to 1).

**H:** Extravasation into lungs of 1 million 4T1-luciferase cells silenced for TSP1 transiently (TSP1-siRNA, siT), or stably (TSP1-shRNA, shT), and their respective controls (siC, shC), two days after injection of cells in the tail vein. Luciferase activity is corrected for protein content and specific activity of luciferase in each cell population measured before injection. Results are normalized to the mean of their respective control set to 1 (mean  $\pm$  SEM, n>= 6 mice per group). Black lines indicate mean values.

**I:** 67NR cells were transfected with a plasmid coding for dCas9-VP160 and two independent guide sgRNAs to activate endogenous TSP1 transcription. Migration was measured 24h after transfection (mean  $\pm$  SEM, n=3, control condition set to 1).

**J:** Migration of 4T1 cells 24h after transfection of cells with a TSP1 expression plasmid or empty vector (mean  $\pm$  SEM, n=3, control condition set to 1).

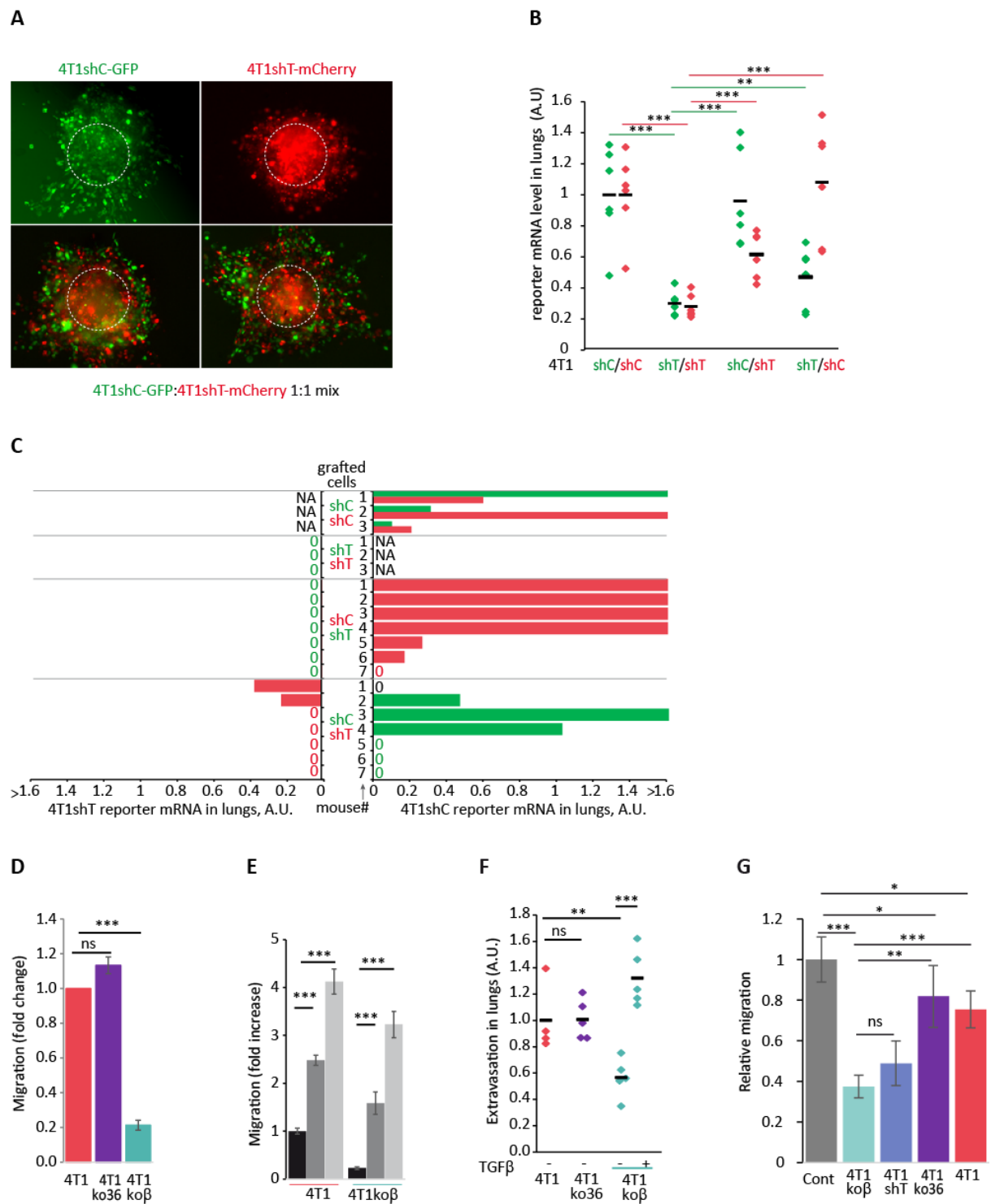


Fig. 4: Cell autonomous effect of TSP1 on metastasis

**A:** Mammospheres from 4T1shC-GFP (Top left panel), 4T1shT-mCherry (Top right panel) or a 1:1 mix of these cells (bottom panels) grown for 3 days in culture were embedded for 3 days in matrigel and imaged by epi-fluorescence(x20).

**B:** Mixes (1:1) of 4T1shC and 4T1shT cells, tagged with H2B-GFP (green) or H2B-mCherry (red) reporter genes as indicated were injected into the tail vein (6 to 7 mice/group). Lungs were collected 2 days later. Reporter mRNA value in lungs, normalized to H2B mRNA is indicated for each individual mouse. Black lines indicate mean values.

**C:** Mixes (1:1) of 4T1shC and 4T1shT cells, tagged with H2B-GFP (green) or H2B-mCherry (red) reporter genes as indicated were implanted into mouse mammary fat pad. Lungs were collected 30 days later. Reporter mRNA value in lungs, normalized to H2B mRNA is indicated for each individual mouse, left panel: of 4T1shT reporter, right panel: 4T1shC reporter. Values over 1.6 (arbitrary units) are indicated as 1.6.

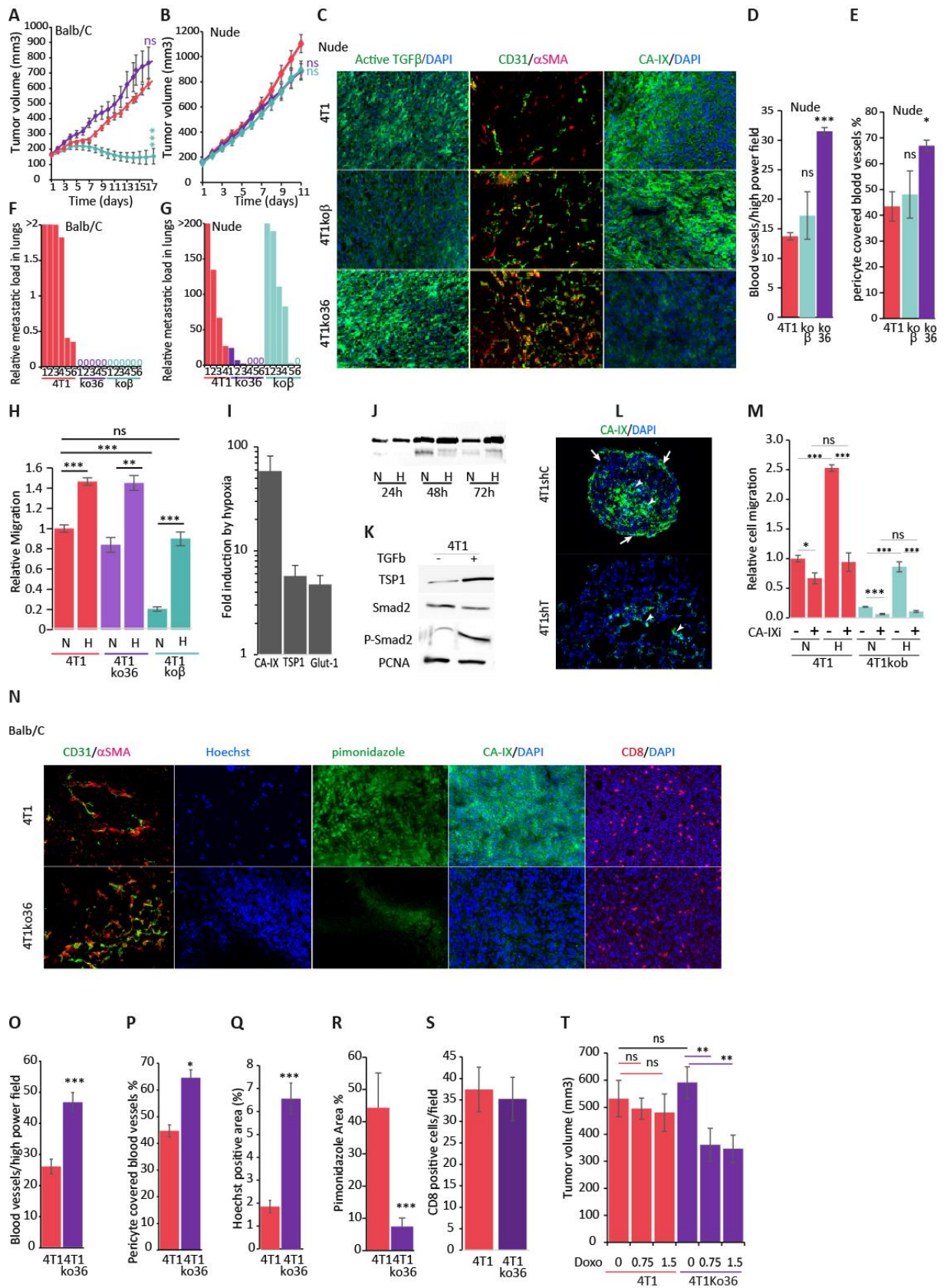
**D:** Compared migration capacity of 4T1, 4T1ko36 and 4T1ko $\beta$  cells in a transwell assay (mean  $\pm$  SEM, n=3 independent experiments, control condition (4T1) set to 1).

**E:** Stimulation of migration of 4T1 and 4T1ko $\beta$  cells by recombinant TGF $\beta$ . Black bars: no TGF $\beta$ ; grey bars: cells were grown for 24h in the presence of TGF $\beta$  (5 ng/ml) and migration assay was performed in the absence (dark grey) or presence (light grey) of TGF $\beta$  (5ng/ml) (mean  $\pm$  SEM, 4T1h cells in control medium set to 1).

**F:** Cells were grown in control medium in the absence (-) or presence (+) of TGF $\beta$  (5ng/ml) before injection ( $1 \times 10^6$  cells) into mouse tail vein. Luciferase mRNA level, corrected for cyclophilin-A mRNA level and specific luciferase expression in each cell line was measured in lungs 48h later. Individual, and mean (black line) values are indicated (arbitrary units).

**G:** Migration of 4T1ko $\beta$  cells, fluorescently labelled with cell tracker, mixed (1:1) with 4T1, 4T1ko36, or 4T1ko $\beta$  cells (mean  $\pm$  SEM, control condition (4T1) set to 1).

In all panels, \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; \*\*\*: p<0.001.



**Fig. 5: Effect of knocking-out TSP1-induced TGF $\beta$  activation or CD36-dependent TSP1 antiangiogenic activity.**

**A-B:** Growth of 4T1 (red), 4T1ko $\beta$  (green), 4T1ko36 (purple) orthotopic tumors over time in **A:** BALB/c mice, **B:** Nude mice.

**C:** Immunodetection in 4T1, 4T1ko36, and 4T1ko $\beta$  tumors grown in nude mice of active TGF $\beta$  (left panel), CD31 and  $\alpha$ SMA (middle panel); CA-IX (right panel).

**D-E:** Quantification in 4T1, 4T1ko36, and 4T1ko $\beta$  tumors in nude of: **D:** CD31 positive blood vessels; **E:** percentage of pericyte covered (CD31 and  $\alpha$ SMA positive) blood vessels;

**F-G:** Quantification of metastatic load in lungs of individual mice by measurement of luciferase mRNA level normalized to cyclophilin A (arbitrary units). **F:** BALB/c mice, values over 2 are indicated as 2; **G:** Nude mice, values over 200 are indicated as 200.

**H:** Migration of 4T1, 4T1Ko36 and 4T1ko $\beta$  cells in normoxia (N) or hypoxia (H). Cells were grown for 48h in hypoxia or normoxia which were maintained throughout migration assay. Results (mean $\pm$  SEM, n=3) are expressed as the number of migrating cells, compared to the mean number of 4T1 cells migrating in normoxia set to 1.

**I:** Fold induction of CA-IX, TSP1, and Glut-1 mRNA levels, normalized by cyclophilin-A mRNA level, in 4T1 cells grown for 48h in hypoxia as compared to control cells in normoxia (Mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments each performed in triplicate).

**J:** Western blot analysis of TSP1 protein in supernatant of 4T1 cells grown for 24, 48 or 72h in normoxia (N) or hypoxia (H).

**K:** 4T1 cells were grown for 24h with recombinant TGF $\beta$  (20 ng/ml). TSP1, total SMAD2, and phosphorylated Smad2 were analyzed by western blotting on cell homogenates. PCNA was used as a loading control.

**L:** Immunodetection of CA-IX in sections of 4T1shC and 4T1shT mammospheres. DAPI was used to counterstain nuclei. Arrows indicate CA-IX labelling on the outer surface of mammospheres. Arrow head show CA-IX expression in hypoxic core of mammospheres.

**M:** Migration of 4T1, and 4T1ko $\beta$  cells in normoxia (N) or hypoxia (H) in the presence or absence of the CA-IX inhibitor SLC1001 (mean  $\pm$  SEM, n=3, migration of 4T1 cells in control conditions set to 1)

**N:** In 4T1 and 4T1ko36 tumors grown in BALB/c mice, immunodetection of CD31 and  $\alpha$ SMA; Visualization of tumor perfusion by diffusion of Hoechst dye injected before sacrifice; Visualization

of tumor hypoxia by immunodetection of adducts of pimonidazole injected before sacrifice; immunodetection of CA-IX; Immunodetection of CD8-positive lymphocyte infiltration.

**O-R:** Quantification in 4T1 and 4T1ko36 tumors in BALB/c mice of: **O:** CD31 positive blood vessels; **P:** percentage of pericyte covered (CD31 and  $\alpha$ SMA positive) blood vessels; **Q:** percentage of Hoechst-positive area; **R:** Relative pimonidazole adducts positive area, area in 4T1 tumors set to 1.

**S:** Quantification of CD8 positive cells /microscopic field in 4T1 and 4T1ko36 tumors in BalB/C mice.

**T:** 4T1shC cells (orange) and 4T1ko36 cells (purple) were grafted into mouse mammary fat pad of Balb/C mice. Once tumor growth was ascertained, mice were randomized and received twice weekly an intraperitoneal injection of vehicle (diamonds) or doxorubicin 0.75 mg/kg (triangles) or 1.5 mg/kg (open circles). This experiment was performed at the same time as the experiment shown in Fig 2H, and the 4T1shC controls are shared with this experiment.

In all panels, ns=No statistical difference; \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ; \*\*\*:  $p<0.001$ .



## Supplementary tables and figures

**Supplementary table 1:** characteristics of tumors in TMA (Fig. 1D and 1E).

<b>factor</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Age (Y)</b>	144	
median [range] : 59.0 [29.0-86.0]		
<= 60 Years	79	54.9
>60 years	65	45.1
<b>Stage</b>	142	
1	79	55.6
2	57	40.1
3	5	3.5
4	1	0.7
<b>Histology</b>	144	
Ductal carcinoma	107	74.3
Lobular Carcinoma	20	13.9
Other	17	11.8
<b>Grade</b>	144	
I	18	12.5
II	55	38.2
III	71	49.3
<b>Mitotic grade</b>	144	
1	46	31.9
2	29	20.1
3	69	47.9
<b>KI67</b>	134	
<20%	57	42.5
>=20%	77	57.5
<b>Vascular embolus</b>	144	
no	95	66.0
yes	49	34.0
<b>Lymph node</b>	140	
0	67	47.9
1-3	42	30.0
>3	31	22.1
<b>Hormonal status</b>	144	
ER+	121	84.0
PR+	102	70.8
<b>Subtype</b>	136	
Luminal A	46	33.8
Luminal B	58	42.6
HER2+	15	11.0
TNBC	17	12.5
<b>EGFR</b>	141	
0	123	87.2

	>0	18	12.8
<b>CK5/6</b>		141	
	0	124	87.9
	>0	17	12.1
<b>Necrosis</b>		144	
	no	122	84.7
	yes	22	15.3
<b>Fibrosis</b>		143	
	no	89	62.2
	yes	54	37.8

**Supplementary table 2:** Characteristics of metastatic breast tumors analyzed (Fig. 1F, Table 1).

<b>Factor</b>		<b>N</b>	<b>%</b>
<b>grade</b>	I	1	3.2
	II	17	54.8
	III	13	41.9
<b>hormonal status</b>	ER+ PR+ HER2-	12	38.7
	ER+ PR- HER2-	9	29.0
	ER+ PR+ HER2+	1	3.2
	ER+ PR- HER2+	1	3.2
	ER+ PR-	1	3.2
	HER2+	1	3.2
	Basal	4	12.9
	NA	2	6.5
<b>lymph node</b>	N0	6	19.4
	N+	13	41.9
	NA	12	38.7
<b>Histology</b>	DC + mucinous	1	3.2
	DC	23	74.2
	DC + CLI	2	6.5
	CLI	5	16.1

**Supplementary Table 3:** reagents used.

Product/Kit	Provider	Reference
Recombinant Mouse TGF- $\beta$ 1	R&D Systems	7666-MB-005/CF
TGF $\beta$ Signal Reporter Assay Kit (GFP)	QIAGEN	CCS-017G
TransIT-X2 Dynamic Delivery System	MIRUS BIO	MIR-6000-US
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	P8340
Growth Factor-Reduced Matrigel	BD Biosciences	356230
Hoechst	Sigma-Aldrich	B2261
D-luciferin	PerkinElmer	122 796
Doxorubicin	Sigma	D1515
SLC-111	C.T. Supuran's lab	
CellTracker™ Green CMFDA	Molecular Probes	C2925
CellTracker™ Orange CMTMR	Molecular Probes	C2927

**Supplementary table 4:** Antibodies used

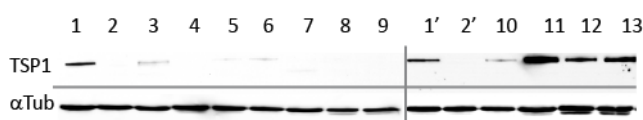
Antigen	Provider	Reference	dilution IHC	dilution WB	Species
TSP1	Abcam	Ab1823		1/100	mouse
TSP1	Thermo Scientific	MA5-11330	1/50		mouse
Phospho-Smad2	Cell Signaling	3101		1/1000	rabbit
Smad2/3	Cell Signaling	3102		1/1000	rabbit
$\alpha$ Tubulin	Sigma-aldrich	T6199		1/1000	mouse
c-Met	Cell Signaling	8198	1/100		Rabbit
Vimentin	Abcam	ab16700	1/100		Rabbit
CD31	BD Pharmingen	553370	1/100		Rat
CAIX	Novus Biologicals	NB100-417	1/100		Rabbit
$\alpha$ SMA	Sigma-aldrich	C6198	1/200		Mouse
Active TGF $\beta$	R&D	MAB1835	1/200		Mouse
Hydroxyprobe	HPI	TM1 Plus Kit			

**Supplementary table 5:** primers used in qPCR reactions

Target	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')
TSP1	GCTGCAGAATGTGAGGTTTGTC	TGTCCTGCAGCGTGGTCAC
LUCF	CTCACTGAGACTACATCAGC	TCCAGATCCACAACCTTCGC
GFP	CAAGATCCGCCACAACATCG	ATGTGATCGCGCTTCTCGTT
mCherry	CTGAAGGGCGAGATCAAGCA	TAGTCCTCGTTGTGGGAGGT

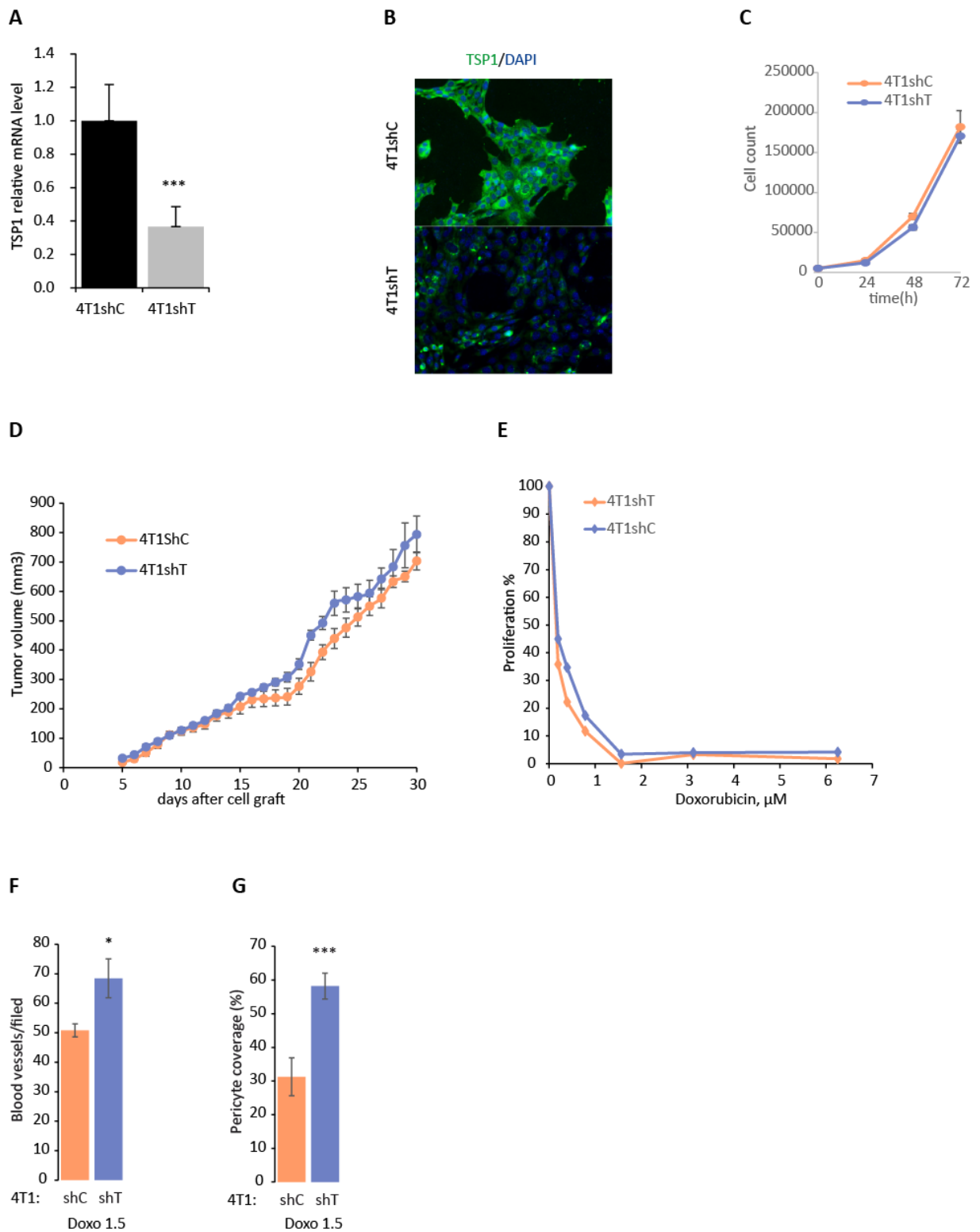
Labrousse et al., Supplementary figure 1

**A**



**S1A:** western blot detection of TSP1 in cellular homogenates of non metastatic (lanes 3 to 9) or metastatic (lanes 10 to 13) mammary cell lines from mouse (lanes 1, 2, 3, and 10) or human origin (other lanes). Alpha tubulin was used as a loading control. Vertical line indicates 2 different blots. To compare expositions, samples 1 and 2 were loaded on the second blot (noted 1' and 2'). 1 and 1': 4T1; 2 and 2': 4T1shT cells, expressing a TSP1-shRNA; 3: 67NR; 4: T47D; 5: MCF7; 6: ZR75; 7: MDA-MB-453; 8: SKBR3; 9: BT474; 10: mWnt; 11: BT549; 12: MBA-MB-231; 13: MDA-MB-435.

Labrousse et al., Supplementary figure 2



**S2A:** TSP1 mRNA level normalized to Cyclophilin A level in 4T1shC and 4T1shT cells (mean $\pm$ SEM, n=3 independent experiments).

**S2B:** TSP1 expression by indirect immunofluorescence in 4T1shC and 4T1shT cells.

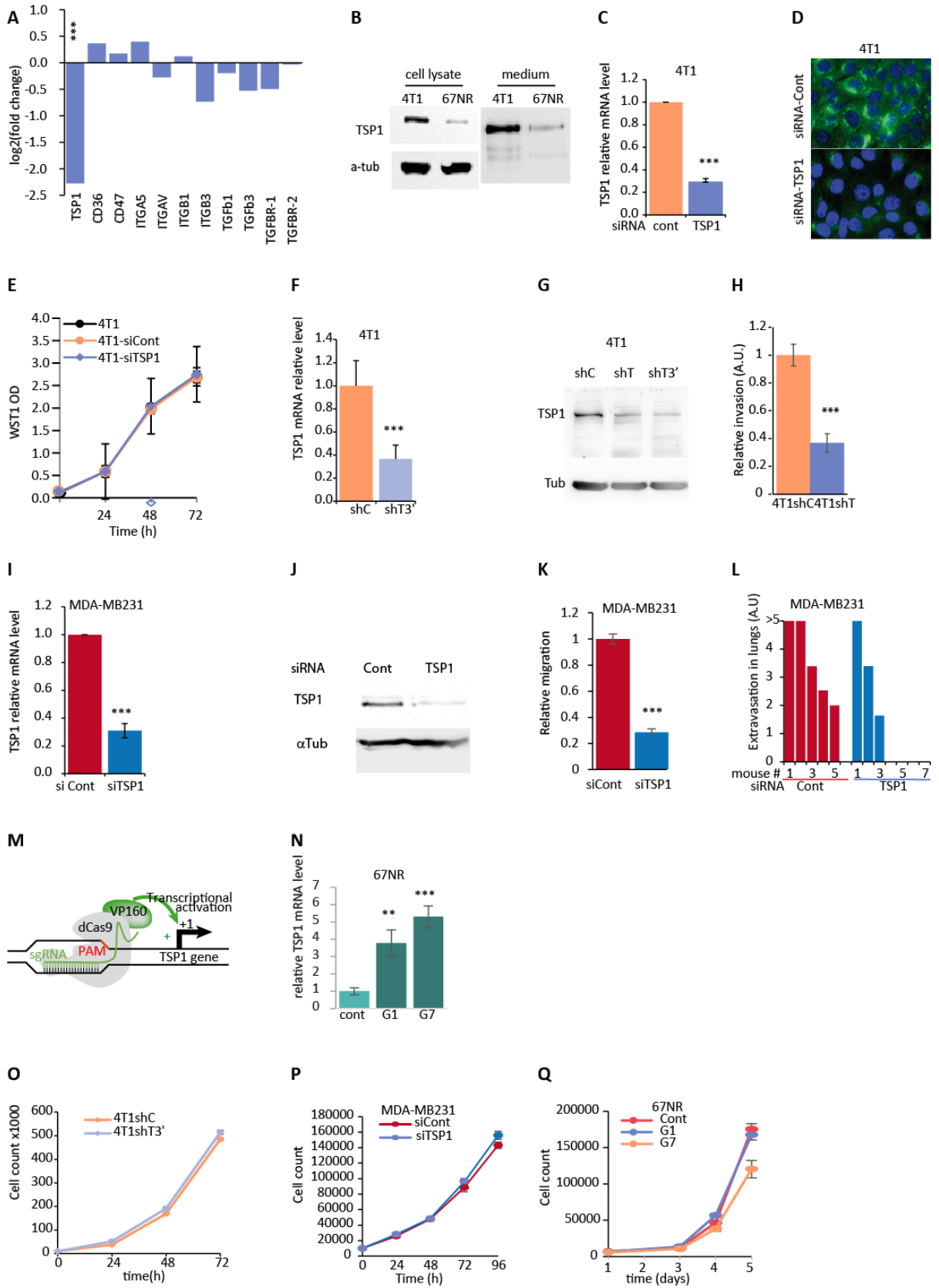
**S2C:** Proliferation over time of 4T1shC and 4T1shT (Cell count, mean $\pm$  SEM, n=3).

**S2D:** Volume overtime of 4T1shC and 4T1shT tumors in the mouse mammary fat pad (mean $\pm$  SEM, n $\geq$ 11 mice/group).

**S2E:** 4T1shC and 4T1shT cells metabolic activity, assessed by a MTT assay, after 2 days of treatment with increasing doses of Doxorubicin (0.2  $\mu$ M to 6.3  $\mu$ M). Values are expressed as compared to untreated cells set to 100% ((mean $\pm$  SEM, n=3).

**S2F-G:** Quantification in 4T1shC and 4T1shT tumors in mice treated twice weekly with doxorubicin 1.5 mg/kg of **F:** CD31 positive blood vessels; **G:** percentage of pericyte covered (CD31 and  $\alpha$ SMA positive) blood vessels.

Labrousse et al., Supplementary figure 3



**S3A:** Comparison of TSP1 and indicated genes of interest in 4T1shC and 4T1shT mammospheres. Results are expressed as log<sub>2</sub> of fold change in mRNA level, normalized to cyclophilin A mRNA level (mean of 4 independent experiments). TSP2 and TGFβ<sub>2</sub> mRNA level were very low. Changes are not statistically significant, but for TSP1 (p<0.001).

**S3B:** TSP1 protein content by western blot analysis in cell homogenates and corresponding conditioned medium of 67NR and 4T1 cells. Beta tubulin was used as a loading control.

**S3C, S3D:** TSP1 mRNA level normalized to cyclophilin A level (S2B, mean± SEM, n=3 independent experiments) and TSP1 protein (S2C) in 4T1 cells 48h after transfection with TSP1-siRNA.

**S3E:** proliferation of 4T1 cells non-transfected, and after transfection with control- or TSP1-siRNA (mean± SEM, n=3).

**S3F:** TSP1 mRNA relative level normalized to Cyclophilin A level in 4T1shC and 4T1shT3' cells (mean± SEM, n=3 independent experiments).

**S3G:** Western blot analysis of TSP1 protein level in 4T1shC, 4T1shT, and 4T1shT3'cells. Tubulin was used as a loading control.

**S3H:** Invasion through matrigel of 4T1shC and 4T1shC cells measured in a Transwell assay (mean± SEM, n=3 independent experiments).

**S3I:** TSP1 mRNA level normalized to cyclophilin A level in MDAMB-231 cells 48h after transfection with TSP1-siRNA (mean± SEM, n=3 independent experiments).

**S3J:** Western blot analysis of TSP1 expression in MDA-MB-231 cells 48h after transfection with TSP1-siRNA. Alpha tubulin was used as a loading control.

**S3K:** Migration of MDA-MB-231 cells transfected with TSP1-siRNA (siTSP1) or a control-siRNA (siCont), mean ± SEM, n=3 independent experiments, control condition set to 1.

**S3L:** Extravasation into lungs of 1 million MDAMB231 cells transfected with Control- or TSP1-siRNA two days after injection of cells in the tail vein. Each bar represents in an individual mouse the Human HPRT mRNA level, normalized to cyclophilin-A mRNA level (arbitrary units). Values over 5 are indicated as 5.

**S3M:** Activation of the endogenous TSP1 gene in 67NR cells. Single stranded guide RNAs (sgRNA) matching sequences in the TSP1 promoter were designed and cotransfected with a plasmid coding for a mutated Cas9 fused to 10 repeats of VP16 (VP160) to transactivate TSP1 promoter (mean± SEM, n=3 independent experiments).



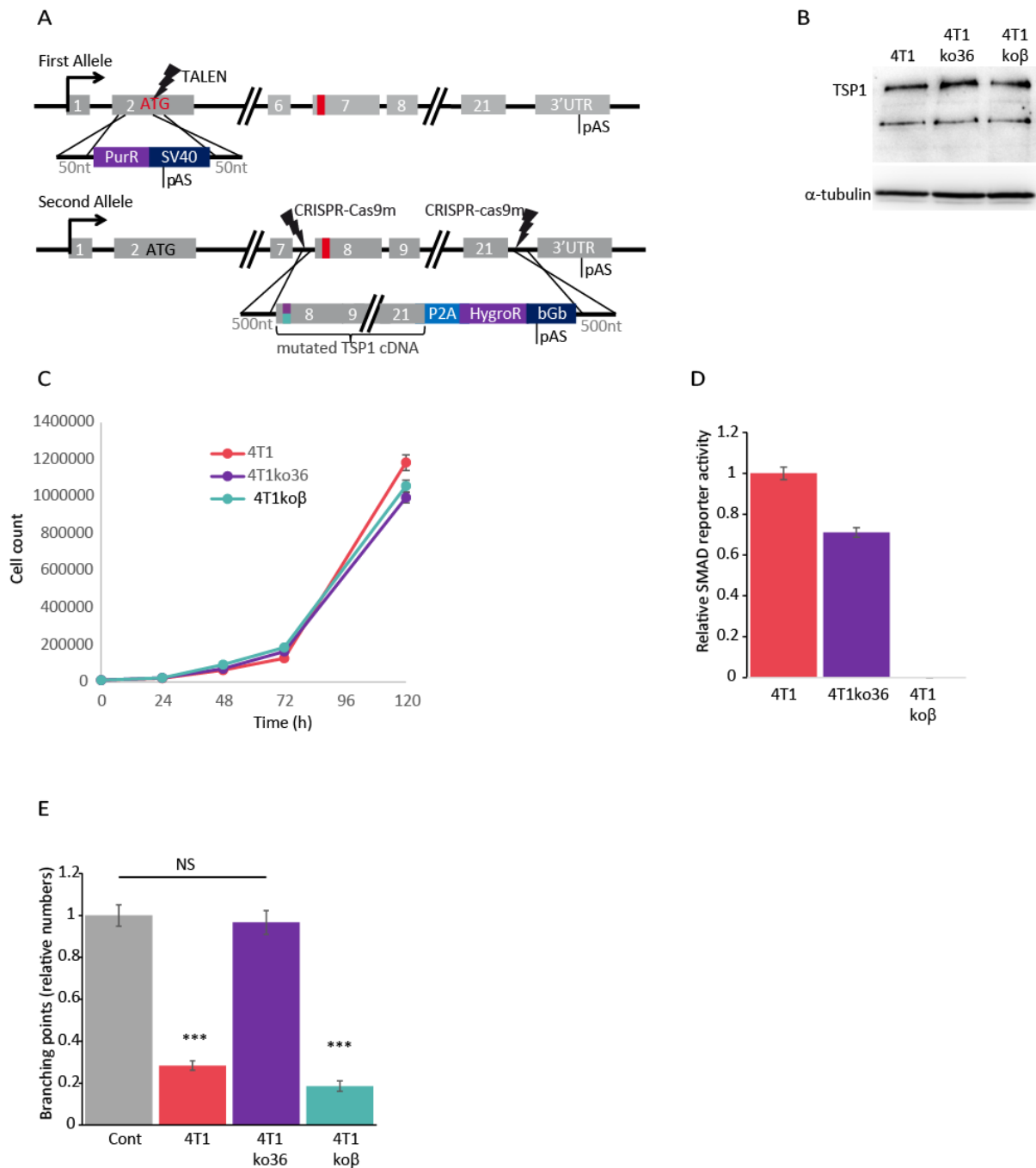
**S3N:** TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A was measured 16-24h after transfection of control (cont) or 2 different TSP1 promoter-directed sgRNA, G1 and G7 (mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments, values expressed as fold change over mock control).

**S3O:** Proliferation of 4T1shC and 4T1shT3' cells (Cell count x1000, mean $\pm$  SEM, n=3).

**S3P:** Proliferation of MDA-MB-231 cells transfected with control- or TSP1-siRNA (Cell count, mean $\pm$  SEM, n=3).

**S3Q:** Proliferation of 67NR cells transfected with the indicated TSP1-promoter specific guide RNAs and a plasmid coding for a nuclease-dead Cas9 activator (Cell count, mean $\pm$  SEM, n=3).

Labrousse et al., Supplementary figure 4



**S4A:** Knock-in strategy used to mutate TSP1 endogenous gene. To invalidate the first TSP1 allele, 4T1 cells were transfected with constructs coding for 2 TALENs flanking the TSP1 ATG and with a PCR product containing a Puromycin resistant sequence followed by a poly adenylation site and flanked by TSP1 homology sequences.

To mutate the second TSP1 allele, cells were transfected with plasmids coding for CRISPR-cas9m with nickase activity, RNA guides homologous to sequences in introns 7 and 21, and a TSP1cDNA

encompassing exons 8-21 followed in 3' by sequences coding peptide 2A (P2A), hygromycin resistance and a poly adenylation signal, flanked by sequences homologous to introns 7 and 21. This cDNA was mutated either in the CD36 binding site or in the TGF $\beta$ -activating site in the first TSP1 type I repeat. Cells were grown in the presence of puromycin and hygromycin TSP1 in resistant clones was sequenced to confirm mutation.

**S4B:** Western blot analysis of TSP1 expression in 4T1, 4T1ko36 and 4T1ko $\beta$  cells. Alpha tubulin was used as a loading control.

**S4C:** Proliferation of 4T1, 4T1ko36 and 4T1ko $\beta$  cells in culture (Cell count, mean $\pm$  SEM, n=3).

**S4D:** 4T1, 4T1ko36 and 4T1ko $\beta$  cells were transfected with a Smad2-GFP reporter and GFP expression quantified 48h later in a fluorimeter (Tristar, Berthold) (arbitrary units mean $\pm$  SEM, n=3 independent experiments, fluorescence in 4T1 cells set to 1).

**S4E:** HUVEC cells were grown for 24 h in control medium or in medium containing 5% of conditioned medium from 4T1, 4T1ko36 or 4T1ko $\beta$  cells. The number of branching points in HUVEC tubular network was quantified (mean  $\pm$  SEM, n=3).