

# THESE DE DOCTORAT

L'UNIVERSITE DE NANTES  
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 605

*Biologie Santé*

Spécialité : « Immunothérapie – Oncologie nucléaire »

Par

**Justine PERRIN**

**Impact de la radiothérapie interne vectorisée alpha sur le  
microenvironnement tumoral**

Thèse présentée et soutenue à Nantes, le 07/07/2021

Unité de recherche : U1232

U1232

## Rapporteurs avant soutenance :

Eric Tartour                    Professeur, Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris  
Alexandre Detappe        Professeur, Université de Strasbourg, Strasbourg

## Composition du Jury :

Présidente :     Françoise Kraeber Bodéré    Professeur, CHU Médecine nucléaire Hotel Dieu Nantes  
Examineurs : Emmanuel Donadieu     Directeur de recherche, Institut Cochin, Paris  
                         Claire Vanpouille Box        Assistant professor, Weill Corner medicine, New York

Dir. de thèse : Yannick Guilloux            Professeur, Université de Nantes  
Co-encadrant de thèse : Joëlle Gaschet    Maître de conférence, Université de Nantes

*« Le jardin sec Ryoan-ji, à Kyoto, me fait penser à une allégorie de la science. En fait c'est un jardin dans lequel il y a 15 pierres. Ça peut paraître bizarre d'aimer passer du temps à regarder ces pierres, mais d'où qu'on soit pour le regarder, où qu'on se mette sur les esplanades, on n'en verra jamais au plus que 14. Des fois, on n'en voit que 13 ou même moins, mais en tout cas on ne voit jamais les 15. Et donc, quand on fait une expérimentation, une étude observationnelle ou n'importe quel dispositif de science, on voit peut être au mieux, si on l'a bien faite, 14 pierres mais, on ne sait pas s'il y en a 15 ou 256. Il faut rester modeste. »*

*Dominique Costagliola*

## Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements :

A Monsieur le Professeur Alexandre Detappe et Monsieur le Professeur Eric TARTOUR, pour l'honneur qu'ils m'ont fait d'être mes rapporteurs de thèse.

A Madame la Docteur Claire Vanpouille Box, Madame la Professeure Françoise Kraeber Bodéré et Monsieur le Docteur Emmanuel Donnadiou, pour avoir accepté de participer en tant qu'examinatrice et examinateur à ce jury de thèse.

J'ai eu la chance de réaliser ces travaux de thèse dans l'équipe 13, qui m'a formé depuis mon master 1 jusqu'à aujourd'hui. Je tiens donc particulièrement à remercier Madame la Professeure Françoise Kraeber Bodéré et Monsieur le Professeur Michel Chérel, pour m'avoir accueilli dans votre équipe. Michel, merci pour toutes ces conversations, scientifiques ou non, même celles qui s'éternisaient bien après l'heure à laquelle j'avais prévu de partir. Je me rappellerai qu'on peut passer d'une discussion sur le suivi des lymphocytes T à ce regard terrifiant d'une lionne dont la photo t'avait marqué, de ton enthousiasme, de ton engagement.

A Monsieur le Professeur Yannick Guilloux, mon directeur de thèse, dont les cours sur l'immunologie m'ont passionné, et qui m'a offert l'opportunité d'être formé au métier de la recherche. Merci pour ton écoute, pour ton esprit toujours ouvert aux idées nouvelles, pour m'avoir laissé tester et proposer tant de choses. Je ne pensais pas quand je commençais cette thèse que j'aurai autant de liberté dans mon sujet de recherche. Merci pour ta confiance en moi, et pour ta grande pédagogie.

A Madame la Docteure Joëlle Gaschet, ma co-encadrante de thèse, pour ton sens critique acéré et tes remarques toujours pertinentes. Tu m'as appris à avoir un œil critique sur mes résultats, à pousser mes analyses. Merci également à toi et à Yannick pour toute votre aide lors de mes manip, même lorsqu'il fallait commencer des journées en écrasant des tumeurs... Merci également de m'avoir formé au travail avec le bismuth, et de m'avoir initié à cette maestra de travail d'équipe qu'est l'injection du bismuth à des souris !

Je souhaiterai également exprimer ma gratitude envers toutes les personnes de l'équipe 13, anciennes ou nouvelles, qui ont façonné ma thèse et ma façon de voir la recherche :

A Mathilde Allard, pour ton œil critique sur les résultats d'épuisement des lymphocytes T, et pour ces discussions quasi-philosophiques sur ce vaste sujet. Merci pour tes connaissances, ton implication et ta bonne humeur.

A Latifa Rbah-Vidal, pour ta bienveillance extrême. Merci pour tes blagues, ta gentillesse, tes histoires, ta vision de la recherche et bien sûr, ta recette ancestrale de préparation de la semoule. Promis, je l'appliquerai !

A Marie Mougin-Degraef pour la synthèse des liposomes et toute son aide et conseils pour la partie tracking.

A François Guérard, pour ton aide précieuse sur les marquages du Zirconium. Merci pour cette (brève) introduction à la chimie, tes conseils avisés et ta patience.

A Pascal Aumond, pour m'avoir formé au jour le jour lors de mon stage de master 2. Tu m'as appris la rigueur scientifique nécessaire à ce travail de recherche, et sans cela compiler tous les résultats de cette thèse aurait été impossible. Mais je ne peux pas réduire ces mois de stages à cela, merci aussi pour tes histoires, tes origamis, tes conversations.

A Sébastien Gouard, ou papy Gouard pour les intimes, le véritable couteau suisse du laboratoire. Merci pour ta patience, pour toutes les réponses à mes questions, même lorsqu'elles amenaient de nouvelles questions. Merci pour ta pédagogie, ton œil critique et ton aide si précieuse pour toutes les manipulations en radioactivité. Surtout, merci d'avoir cru en moi lors de mes premières injections au bismuth aux souris, je suis enfin entrée dans la grande compétition des injections iv ! Merci également pour toutes tes blagues, tes histoires de papy Gouard, etc...

A Séverine Marionneau-Lambot, pour tes compétences en expérimentation animale. Merci pour ton soutien, ta présence rassurante lors de mes entraînements et injection en intraveineuse, que je n'aurai peut-être pas réussi sans toi en binôme. Grâce à ton calme et ta bonne humeur, j'étais toujours sereine quand tu étais mon binôme pour les expérimentations animales.

A Marisa Capitaio, ma partenaire de thèse et amie. Je ne sais pas à quoi aurai ressemblé ces quatre années sans toi, mais une chose est sûre ; j'aurai beaucoup moins ri ! Merci pour toute ton aide lors des manipulations, ton soutien sans faille, ta présence. Je garde le souvenir nos pauses sketch du midi, nos apéritifs, nos discussions musique donnant lieu à des playlists très hétéroclites, toutes nos blagues, et toutes tes citations !

A Laurent Navarro, mon chimiste référent en terme de chimie click. Merci pour tout ce temps passé à m'aider à mettre au point ces chromatographies, à m'avoir brièvement initié à l'HPLC et aidé à mieux comprendre la chimie click. J'étais ravie que tu sois avec moi pour mon premier congrès, pour m'aider à dé-stresser et passer un bon bout de soirée à philosopher et refaire le monde ! J'espère que tu te plais en Belgique.

A Marion Berdal, qui m'a devancé pour soutenir sa thèse et est partie rejoindre la filière Belge. Merci pour tes blagues uniques en leur genre, pour nos soirées à la Fabrik, et aussi pour toutes nos discussions sur Harry Potter. Merci de m'avoir tenu compagnie lors de mes brèves soirées Zirconium. Enfin, heureusement que tu étais là pour prendre la relève de Laurent pour mes questions de chimie, pour ta patience et ta pédagogie pour m'expliquer les mécanismes obscurs de la chimie click, afin que je comprenne mieux ce qui se passait à la surface de mes cellules.

A Cassandra Métivier, que je suis fière d'avoir, au moins un peu, aidé à former au métier de la recherche. Merci pour ton aide lors des manipulations, pour ta bonne humeur, pour m'avoir fait découvrir des artistes musicaux. J'étais ravie de passer mes deux dernières années au labo avec toi, et j'espère que ta thèse se déroulera sans encombre malgré les circonstances sanitaires. Merci encore pour toutes ses discussions à la pause-café, scientifiques ou non, et j'espère que l'on se retrouvera en festival cet été !

A Benjamin Le Crom, notre électron libre, poète et physicien qui nous a fait découvrir un aperçu des méandres de la physique. Tu as été d'une extrême pédagogie avec la pauvre biologiste que je suis, allergique aux équations mathématiques, et c'était un vrai plaisir de découvrir le sujet du dual tracer avec toi. Tu es quelqu'un de passionné et je suis sûre que tu sauras toujours passionner tes futurs interlocuteurs, comme tu l'as fait pour nous. Je te souhaite bon courage dans ta nouvelle profession !

A Ludovic LeSaux. Je dois me rappeler de ne pas te faire trop de compliments, pour ne pas trop trancher avec d'habitude. Je serai donc brève ; merci pour toutes ces soirées que tu as organisé, j'ai hâte

que l'on puisse tous retourner au Berthom ensemble ! Merci aussi pour nos parties de Gartic Phones, nos débats, pour les crêpes faites maison...

A Mathilde Ligeour, pour sa bonne humeur et ses délicieux gâteaux fait avec amour ! Je me rappellerai des cookies, des brownies...

A Clémence Maingenneau, dont il faut saluer l'initiative de la mise en place de ces goûters, qui nous a permis parfois de profiter de ces merveilleux gâteaux...

Plus globalement, je voudrais remercier toutes les personnes de l'équipe 13, avec lesquelles j'ai interagit, et qui m'ont permis de travailler dans une bonne ambiance : Romain, Anne-Lyse, Sophie, Vincent, Alexandre, Catherine, Patricia, Antoine, Alain, Jeff, François... C'était un plaisir de travailler dans une équipe aussi hétéroclite, avec autant de points de vue différents.

Je souhaite également remercier le personnel de la plateforme de microscopie MicropiCell, notamment Steven Nedellec et Philippe Hulin pour toute leur aide en microscopie confocale. Sans vous, réaliser ces expériences sur tranches entières aurait été impossible. Merci de votre pédagogie, vos formations, votre bonne humeur.

Merci à toutes ces personnes qui m'ont formé pendant ces quatre années, les personnels de la plateforme de cytométrie en flux qui étaient toujours présents pour répondre à mes questions, Sylvia pour ton aide avec les animaux.

Je souhaiterais remercier tous mes amis, et tout particulièrement Pierre, Sarah et Quentin, car nos soirées jeux de sociétés ont été une vraie bouffée d'air frais pendant la période de rédaction. Merci pour tous ses fous rires et ces longues soirées.

Merci à David, pour avoir partagé mon quotidien, s'être autant inquiété pour moi et pour m'avoir soutenu pendant les montagnes russes qu'ont été cette rédaction de thèse. Merci pour ton soutien indéfectible.

Mes remerciements vont enfin à ma famille, à ma sœur Marine, mon beau-frère préféré Cédric et mes deux neveux. Merci à mes parents, Mireille et Régis. Vous m'avez soutenu et m'avez toujours encouragé pendant mes longues études, et j'espère que vous êtes fiers de moi.

## Table des matières

<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>8</b>
<b>Table des Figures</b> .....	<b>10</b>
<b>Table des Tableaux</b> .....	<b>11</b>
<b>Introduction bibliographique</b> .....	<b>12</b>
<b>Le Cancer</b> .....	<b>12</b>
Historique.....	12
Traitements historiques .....	13
Échecs des traitements historiques .....	15
<b>Microenvironnement tumoral</b> .....	<b>16</b>
Rôle du système immunitaire dans l'oncogénèse.....	16
Acteurs cellulaires .....	17
Cellules cancéreuses .....	17
Cellules Immunitaires .....	21
Cellules non immunitaires.....	26
<b>Immunothérapies</b> .....	<b>30</b>
Les différentes immunothérapies.....	30
Vaccination thérapeutique .....	31
Transfert de cellules effectrices .....	34
Lever l'inhibition du système immunitaire.....	36
Succès et échecs des transferts adoptifs de lymphocytes T.....	39
Tumeur liquides.....	39
Tumeurs solides.....	39
<b>Radiothérapie interne vectorisée</b> .....	<b>41</b>
Intérêt et principe général.....	41
Les différents émetteurs .....	43
Impact sur le microenvironnement tumoral .....	44
Les effets sur les cellules tumorales .....	44
Les effets sur le stroma tumoral.....	46
Les effets sur les cellules immunitaires du TME.....	47
Association thérapeutique .....	49
Chimiothérapie .....	49
Augmenter l'accumulation du second traitement au site tumoral .....	50
Greffe de moelle osseuse.....	51
<b>Objectifs de thèse</b> .....	<b>52</b>
<b>Partie microenvironnement tumoral</b> .....	<b>53</b>
<b>Préambule : description du modèle</b> .....	<b>53</b>
<b>Matériel et méthodes</b> .....	<b>55</b>
I - Culture des cellules tumorales.....	55
II - Expérimentation animale .....	55
III - Radiothérapie interne vectorisée .....	55
IV - Culture des LT OT-1 et injection.....	56
V - Test de cytotoxicité .....	56
VI - Analyse par cytométrie en flux .....	56
VII - Marquage par immunofluorescence des tumeurs congelées .....	57
VIII - Analyse de la motilité ex vivo des LT OT-1.....	57
IX - Analyse Immunohistochimique.....	58

a) Marquage des tranches de tumeurs.....	58
b) Analyse QuPath .....	59
X - Analyse de l'expression des cytokines et chimiokines .....	59
a) Extraction des ARN tumoraux.....	59
b) Reverse transcription.....	59
c) Analyse de l'expression des cytokines et chimiokines par RT-qPCR.....	61
<b>Résultats .....</b>	<b>62</b>
I – Plan de traitement et prélèvements.....	62
II –Effet anti-tumoral de la RIV- $\alpha$ sur le TME.....	62
a) L'expression du CMH .....	62
b) Déplétion des lymphocytes endogènes.....	65
c) Infiltrat de LT OT-1 .....	67
d) Motilité et distribution des LT OT-1 .....	69
e) Expression de chimiokines et cytokines.....	73
Conclusion .....	74
III –Réponse tumorale suite aux traitements .....	74
a) Phénotype épuisé/différencié des LT OT-1 .....	74
b) Expression de PD-L1 par tumeur.....	76
Conclusion .....	77
<b>Discussion.....</b>	<b>78</b>
<b>Partie Suivi cellulaire.....</b>	<b>84</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>85</b>
I - Marquage liposomes .....	85
II - Marquage Zirconium .....	86
a) Préparation du complexe [89Zr]tétraoxinate de zirconium(IV) .....	86
b) Marquage des LT OT-1 : .....	87
III - Marquage en chimie click.....	87
IV - Test fonctionnels <i>in vitro</i> .....	88
V - Suivi <i>in vivo</i> .....	88
<b>Résultats .....</b>	<b>89</b>
I – Les liposomes .....	89
a) Principe.....	89
b) <i>In vitro</i> : optimisation du marquage.....	89
c) <i>In vitro</i> : fonction des LT OT-1.....	90
d) Suivi <i>in vivo</i> des LT OT-1.....	91
II – Marquage direct au Zirconium-89 .....	94
a) Synthèse du zirconium(oxine) <sub>4</sub> .....	94
b) Marquage <i>in vitro</i> .....	94
III – La Chimie click .....	96
a) Principe.....	96
b) <i>In vitro</i> : optimisation du marquage .....	97
c) <i>In vitro</i> : fonction .....	102
d) Suivi <i>in vivo</i> des LT OT-1.....	102
IV - Ciblage <i>in vivo</i> .....	107
a) Principe.....	107
b) Sélection de la cible .....	107
c) Conclusion .....	112
<b>Discussion.....</b>	<b>113</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>116</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>135</b>

<b>Annexe I : Profil UPLC du 9E7.4 .....</b>	<b>135</b>
<b>Annexe II : Article en cours de soumission .....</b>	<b>136</b>
<b>Annexe III : Article Radiothérapie interne vectorisée alpha anti PD-L1 .....</b>	<b>154</b>
<b>Annexe IV : Combinaison thérapeutique RIV-a anti PD-L1 et LT CD8 PD-1 KO (accepté, Oncolmmunology, 2021) .....</b>	<b>170</b>
<b>Annexe V : Review sur le suivi cellulaire .....</b>	<b>188</b>

## Liste des abréviations

<b>5-FU :</b>	5-fluoroacile
<b>ADCP :</b>	Phagocytose Médiée par les Anticorps
<b>AR :</b>	Récepteur aux Androgènes
<b>BCMA :</b>	Antigène de Maturation des Cellules B
<b>CAFs :</b>	Fibroblastes Associés au Cancer
<b>CAR :</b>	Récepteur Antigène Chimérique
<b>CD :</b>	Cellules Dendritiques
<b>CEA :</b>	Antigène Carcino-Embryonnaire
<b>CMH :</b>	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
<b>CPA :</b>	Cellules Présentatrices d’Antigènes
<b>CSH :</b>	Cellules Souches Hématopoïétiques
<b>CTL :</b>	Lymphocytes T CD8 Cytotoxiques
<b>DAMPs :</b>	Danger Associated Molecular Patterns
<b>DHT :</b>	Dihydrotestostérone
<b>FDA :</b>	Food and Drug Administration
<b>HIF1-a :</b>	Hypoxia Inducible Factor 1 alpha
<b>HLA :</b>	Human Leukocyte Antigen
<b>HMGB1 :</b>	High Motility Group Box
<b>HRE :</b>	Hypoxia Response Element
<b>hK2 :</b>	Human Kallikrein Related peptidase 2
<b>LB :</b>	Lymphocytes B
<b>LT :</b>	Lymphocytes T
<b>LTregs :</b>	Lymphocytes T régulateurs
<b>MAGE-3 :</b>	Melanoma-Associated Antigen 3
<b>MCA :</b>	3-méthylcholanthrène
<b>MEC :</b>	Matrice Extracellulaire
<b>MMP :</b>	Métalloprotéases
<b>MOPP :</b>	Moutard azotée, Vincristine, Prednisone et Procarbazine
<b>NIS :</b>	Sodium Iodide Symporteur
<b>NK :</b>	Natural Killer
<b>NO :</b>	espèces réactives de l’azote
<b>NY-ESO-1 :</b>	New York Oesophageal Squamous cell carcinoma 1
<b>PAMPs :</b>	Pathogen Associated Molecular Patterns

<b>PARPi :</b>	Poly(adenosinediphosphate–ribose) polymeraseinhibitors
<b>PCI :</b>	Point de Contrôle Immunitaires
<b>PD-1 :</b>	Programmed Cell Death Protein 1
<b>PD-L1 :</b>	Programmed Death Ligand 1
<b>PSMA :</b>	Antigène Membranaire Spécifique de la Prostate
<b>RI :</b>	Réponse immunitaire
<b>RIV :</b>	Radiothérapie Interne Vectorisée
<b>ROS :</b>	espèces réactives de l’oxygène
<b>SI :</b>	Système Immunitaire
<b>TCR :</b>	T cell Receptor
<b>TEP :</b>	Tomographie par Emission de Positron
<b>TILs :</b>	Lymphocytes Infiltrant la Tumeur
<b>TLR :</b>	Toll Like Receptor
<b>TME :</b>	Microenvironnement Tumoral
<b>TNE :</b>	Tumeur Neuro-Endocrine
<b>TPTE :</b>	Transmembrane Phosphatase with Tensin Homology
<b>TRAIL :</b>	TNF-Related Apoptosis-Induced Ligand
<b>VAMP :</b>	Vicristine, Améthoptérine, Mercaptopurine et Prednisone
<b>VEGF :</b>	Vascular Endothelium Growth Factor

## Table des Figures

Figure 1: Mécanismes de résistance des cellules tumorales	20
Figure 2 : Rôle pro-tumoral des macrophages.	22
Figure 3: Impact du microenvironnement tumoral sur les LT CD8.	24
Figure 4: Rôle des LT CD4 dans le TME suivant leur phénotype.	26
Figure 5: Modification de la MEC par les myofibroblastes.	27
Figure 6 : Le cercle vicieux de l'hypoxie.	29
Figure 7: Réponse immunitaire et Immunothérapies.	30
Figure 8 : Stratégies de vaccination thérapeutique	33
Figure 9: Apport d'effecteurs de la Réponse Immunitaire	35
Figure 10 : Levée des points de contrôles.	38
Figure 11 : Différents types de radioéléments utilisés en Radiothérapie Interne Vectorisée	43
Figure 12 : Schéma récapitulatif des effets de la RIV- $\alpha$ sur le microenvironnement tumoral.	48
Figure 13 : Transfert adoptif de lymphocytes T (ACT) et RIV-a	53
Figure 14: Contrôle des cellules tumorales et des thérapies.	54
Figure 15 : Schéma expérimental de l'analyse de la motilité des LT OT-1 sur les tranches de tumeur.	58
Figure 16 : Schéma thérapeutique et plan de prélèvement des tumeurs	62
Figure 17 : Expression d' H-2Kb par les cellules tumorales.	64
Figure 18 : Infiltrat de LT CD4 régulateurs.	66
Figure 19 : Infiltrat de LT CD8 endogènes.	67
Figure 20 : Infiltrat de LT OT-1 au site tumoral.	68
Figure 21 : Etude de la motilité des LT OT-1 ex vivo.	69
Figure 22 : Évolution de la motilité des LT OT-1 ex vivo.	71
Figure 23: Analyse de la répartition des LT CD8 dans les tranches de tumeurs.	72
Figure 24 : Expression de cytokines au niveau du site tumoral.	73
Figure 25: Phénotype des LT OT-1 infiltrant la tumeur	75
Figure 26 : Expression de PD-L1 par les cellules tumorales.	76
Figure 27: Proposition de mécanisme d'action de la RIV-a et ACT sur le TME.	81
Figure 28: Schéma extrait de la revue « Cell tracking in cancer immunotherapy »	84
Figure 29: Synthèse du Zirconium(oxine) <sub>4</sub> à partir du Zirconium(oxalate) <sub>4</sub> .	86
Figure 30: Intensité et toxicité du marquage avec des liposomes.	89
Figure 31: Stabilité du marquage in vitro.	90
Figure 32: Test de cytotoxicité des LT OT-1 marqués avec des liposomes.	91
Figure 33: Chronologie des injections et prélèvements pour analyse ex vivo des LT OT-1 marqués avec des liposomes	92
Figure 34 : Suivi in vivo des LT OT-1 marqués avec les liposomes.	93
Figure 35: Efficacité du marquage des LT OT-1 au zirconium-89.	95
Figure 36 : Comparaison de la prolifération des LT après radiomarquage avec du zirconium-89	95
Figure 37: Principe de la chimie click appliquée au suivi in vivo des LT OT-1.	96
Figure 38: Toxicité des sucres modifiés par une fonction azide et marquage avec le DBCO fluorescent.	98
Figure 39: Toxicité de la choline-azide et marquage avec le DBCO fluorescent.	100
Figure 40: Stabilité du marquage en chimie click in vitro avec du mannose-azide et de la choline-azide des LT OT-1.	101
Figure 41: Test de cytotoxicité des LT OT-1 marqués avec la chimie click.	102
Figure 42: Plan des injections et prélèvements pour le suivi in vivo après marquage en chimie click	103
Figure 43: Analyse par cytométrie en flux des LT OT-1 révélés in vivo avec le DBCO fluorescent.	104
Figure 44 : Analyse par cytométrie en flux des LT OT-1 révélés ex vivo avec le DBCO fluorescent.	106
Figure 45: Analyse des marqueurs CD25, CD69 et CD38 in vitro et in vivo sur les LT-OT-1.	108
Figure 46: Niveau d'expression de CD25, CD69 et CD38 dans les différents prélèvements au cours du temps.	109
Figure 47 : Analyse des marqueurs Tim3, CXCR6 et CXCR3 in vitro et in vivo sur les LT-OT-1	110
Figure 48 : Niveau d'expression de Tim3, CXCR6 et CXCR3 dans les différents prélèvements au cours du temps.	112

## Table des Tableaux

<i>Tableau I : Nom et propriétés des principaux émetteurs alpha étudiés en clinique</i>	44
<i>Tableau II : Résumé des panels utilisés en cytométrie de flux.</i>	57
<i>Tableau III : Récapitulatif des caractéristiques des échantillons d'ARN obtenus à partir des tumeurs.</i>	60
<i>Tableau IV : Résumé des amorces sens et anti sens utilisées pour les dosages par qPCR (Sigma)</i>	61
<i>Tableau V : Rapport molaire de chaque formulation de liposomes</i>	85
<i>Tableau VI : Anticorps utilisés pour le suivi in vivo des LT OT-1.</i>	88

## Introduction bibliographique

### Le Cancer

#### Historique

Un des cas les plus anciens de cancer fut diagnostiqué à partir d'un squelette retrouvé à Vienne, en Autriche, et daté d'il y a 4000 ans avant JC. Plusieurs tombes furent exhumées de 1924 à 1930, mais ce n'est qu'en 1990 qu'Eugen Strouhal et Herbert Kritscher analysèrent les ossements et publièrent leurs résultats (Strouhal and Kritscher, 1990). Parmi les 5 squelettes exhumés de la tombe, ils étudièrent celui d'une femme dont plusieurs os présentaient des perforations. Les premières hypothèses détaillaient la possibilité que ces trous soient liés à des insectes ou à une dégradation naturelle des os. Néanmoins, plusieurs éléments permettent d'éliminer ces deux possibilités :

- L'absence de trous similaires dans les autres squelettes enterrés dans la même tombe
- La présence de ces trous est restreinte à certains os de ce squelette, principalement les vertèbres, côtes, crâne et scapula. Leur absence sur les radius, humérus et fémur ne correspond pas à une dégradation naturelle ou liée à un insecte.
- La taille des trous, qui n'est pas homogène et varie de 0,5 à 3 mm.
- Les radiographies ont également révélé, au niveau du crâne, la présence de lésions internes, qui n'atteignent pas la partie corticale des os, prouvant qu'au moins une partie de ces lésions étaient présentes pré-mortem et dues à une maladie.

Suite à l'analyse des lésions, leur répartition et l'âge estimé de l'individu à la mort, les auteurs ont conclu que le diagnostic le plus probable est le Myélome Multiple, une tumeur osseuse primaire.

Peu d'études similaires à ce premier cas existent ; des lésions osseuses diagnostiquées comme étant d'origine cancéreuse sont rarement observées dans les squelettes exhumés (Binder *et al.*, 2014). Si les cancers osseux primaires sont rares, les métastases osseuses de carcinomes sont plus fréquentes. Par conséquent, leur absence dans la majorité des squelettes étudiés laisse à penser qu'il y avait peu de cancers dans l'antiquité. Ce concept rejoint la théorie de la transition épidémiologique, énoncée par le Pr Omran en 1971 (Omran, 1971). Cette théorie propose une vision de l'évolution des populations liées à l'évolution des différentes maladies. 3 grandes transitions épidémiologiques ont donc été proposées :

- La première transition s'est effectuée lors du développement de l'agriculture, impliquant la formation de cités et la sédentarisation des populations. L'augmentation de la proximité des individus entre eux et avec les élevages d'animaux, associé à la diminution de la diversité alimentaire a déclenché la propagation des maladies infectieuses. La première phase est nommée par Omran comme « l'âge des épidémies et de la famine », et est caractérisée par une espérance de vie courte (de 20 à 30 ans) et de nombreuses épidémies de maladies infectieuses.
- En Europe, la deuxième transition est située aux alentours du 19<sup>ème</sup> siècle, et est concomitante à l'amélioration de l'hygiène, de la nutrition et de progrès en santé publique permettant la prévention de nombreuses maladies infectieuses. La qualité de vie a donc augmenté afin d'atteindre une espérance de vie entre 30 à 50 ans, et correspond à une phase de déclin des épidémies.
- La troisième transition, plus récente, mène à « l'âge des maladies dégénératives et créées par l'homme ». La diminution de la mortalité liée aux progrès médicaux permet une augmentation de l'espérance de vie au-delà de 50 ans, faisant apparaître les maladies dégénératives.

L'augmentation de l'espérance de vie, la pollution de l'environnement et les comportements à risque mènent à l'augmentation de la mortalité liée à des maladies telles que le cancer.

Si cette théorie fut par la suite critiquée et revisitée, notamment la troisième phase qui ne prend pas en compte la résurgence des maladies infectieuses résistantes lors du 20<sup>ème</sup> siècle (Gaylin and Kates, 1997; McKeown, 2009), les premières et deuxièmes phases semblent corrélées avec le fait que la mortalité liée au cancer était historiquement faible, et que son augmentation est récente. Ceci s'explique principalement par l'augmentation de l'espérance de vie. En effet, les cancers résultent de mutations dans l'ADN des cellules, pouvant engendrer une transformation maligne. Si la probabilité que ces lésions de l'ADN mènent à une transformation cancéreuse est faible, l'augmentation de l'espérance de vie augmente le risque de voir apparaître de telles mutations dans un organisme au cours d'une vie (Di Lonardo, Nasi and Pulciani, 2015).

### Traitements historiques

Les traces écrites les plus anciennes rapportant des traitements de tumeurs proviennent d'un papyrus d'origine égyptienne, appelé « The Edwin Smith surgical papyrus », un document daté de 2500 à 3000 avant JC (Johnson, 1948). Il relate 48 cas de différentes blessures pouvant être traitées, ou non, par des traitements chirurgicaux, pharmacologiques ou magiques. Notamment, le cas n°45 décrit des tumeurs du sein palpables, non liées à une blessure, décrites comme « protubérantes, répandues et en absence de fièvre ». Si certaines autres lésions semblant s'apparenter à des tumeurs sont décrites comme pouvant être retirées par chirurgie dans ce papyrus, ce cas précis est noté comme n'ayant pas de traitement possible, signifiant que la chirurgie serait alors inutile.

Cette notion de tumeur, qui n'est parfois pas opérable, est également retrouvée dans la Grèce antique. Hippocrate décrit plusieurs types de cancers, dont certains ne bénéficieraient pas d'une chirurgie (Faguet, 2015). Pour certains cas, une résurgence de la maladie est observée même après exérèse de la tumeur et cicatrisation des plaies. Bien que les techniques chirurgicales de l'époque entraînent de fréquentes et nombreuses complications, rendant parfois le traitement plus toxique que la pathologie elle-même, cette observation reste intéressante. En effet, dans certains cas où la chirurgie ne provoque pas le décès du patient, il avait déjà été observé à l'époque que le cancer pouvait ressurgir.

Cette notion ancienne de résurgence du cancer après chirurgie mènera, des siècles plus tard, au développement de méthodes chirurgicales plus radicales. En 1889, William Steward Halsted, un des pionniers de la chirurgie, mettra au point lors d'un séjour à Baltimore une méthode de mastectomie radicale dans le cas du cancer du sein (Osborne, 2007). Basée sur les travaux de William Sampson Handley, cette méthode consiste à retirer l'intégralité du sein, muscles pectoraux et ganglions compris, afin de prévenir les rechutes. Cette technique lui permettra d'abaisser le taux de résurgence du cancer du sein à 6%.

A la même époque, Stephen Paget, un autre chirurgien, s'inspire des observations de Fuchs, un médecin ophtalmologiste autrichien, sur les mélanomes métastatiques : ce dernier décrit que les cellules métastatiques retrouvées dans les capillaires de la rétine se développent moins que celles retrouvées dans le foie ou la rate (Fuchs, 1882). Stephen Paget pose alors la question de la localisation des foyers cancéreux secondaires, en posant l'hypothèse que les organes dans lesquels ils se développent sont soit liés au hasard, soit sont pré-disposés au développement d'un cancer. L'analyse par Stephen Paget des résultats de 735 autopsies de femmes décédées des suites d'un cancer du sein montre que 241 cas présentent des métastases hépatiques, contre 18 cas présentant des métastases spléniques. Or, ces deux

organes sont irrigués de manière similaire (Paget, 1889). Cette prédisposition au développement de métastases dans certains organes, qui était également dépendante du type de cancer initial, le mènera à énoncer sa théorie du « seed and soil » (« la graine et la terre »). Celle-ci postule que chaque type de cellule cancéreuse (« graine ») se disséminera dans l'organisme pour se développer de manière préférentielle dans un organe donné (« terre »). La présence de ces métastases nécessite donc le développement d'autres thérapies que la chirurgie, qui ne peut pas traiter les cellules circulantes.

Le second traitement du cancer verra le jour peu de temps après l'élaboration de cette théorie, en 1896, lors de la découverte des rayons X par Wilhelm Röntgen, à qui fut adressé le premier prix Nobel de physique en 1901. Ses radiations furent rapidement utilisées pour traiter le cancer, notamment grâce à la découverte de la radioactivité naturelle, qui valut un prix Nobel de Physique à Marie Skłodowska Curie, Pierre Curie et Henri Becquerel. Les premiers cancers traités furent des cancers de la peau, étant donné la faible pénétration des rayons dans les tissus : le premier patient atteint de mélanome guéri suite au traitement fut présenté par Tage Sjoergen, après chirurgie suivie de rayons X (Kuřakowski, 2011).

Si certains cas de cancers de la peau ont pu être ainsi guéris, les mécanismes d'action du traitement restaient inconnus. L'étude des rayons X mena dans les années 1930 à la découverte de leurs mécanismes d'action, générant des lésions dans l'ADN de manière directe ou indirecte, et permettra d'adapter cette thérapie (Gianfaldoni *et al.*, 2017). L'administration de doses fractionnées a permis de mieux contrôler le cancer tout en diminuant les effets secondaires des rayons, et les années 1930-1950 virent le développement des tubes de rayons X, ainsi que de la brachythérapie basée sur le radium. Cependant ces traitements restent locaux. S'ils peuvent détruire les cellules résiduelles dans les tissus, notamment après chirurgie, ils ne permettent toujours pas de traiter les cellules disséminées.

De tels traitements, injectés par voie systémique, ne verront le jour dans les années 1940. Le développement de molécules chimiques détruisant les cellules cancéreuses fut principalement limité par l'absence de modèles animaux qui auraient pu permettre de tester de nombreuses molécules avant de passer en clinique (DeVita and Chu, 2008). En effet, le premier modèle de tumeur transplantée date de 1910, et fut mis au point par George Clowes, au Roswell Park Memorial Institute. Le premier traitement systémique du cancer ayant bénéficié de cette avancée technologique fut le gaz moutarde. Suite à des observations de leucopénies importantes chez des soldats exposés à ce gaz toxique durant la première guerre mondiale (Krumbhaar and Krumbhaar, 1987), deux pharmacologistes, Alfred Gilman et Louis Goodman, analysèrent sa composition. L'un de ces composés, la moutarde azotée, fut testée par injection intraveineuse sur un modèle murin de lymphome. Après avoir observé des régressions tumorales dans ce modèle pré-clinique, ils réussirent à convaincre Gustaf Lindskog, un chirurgien thoracique, de l'administrer à un patient atteint d'un lymphome non hodgkinien. Les résultats furent publiés en 1946, attestant d'une rémission de la maladie (Faguet, 2015). En 1949, la moutarde azotée devint le premier agent chimiothérapeutique approuvé par la FDA (Food and Drug Administration, USA).

A la même époque, il est observé par Sidney Farber que l'administration d'acide folique aux patients atteints de leucémie, afin de traiter leur anémie, engendre une accélération de la pathologie. Le développement d'antagonistes de l'acide folique, notamment le méthotrexate, permettra d'obtenir également des rémissions chez les enfants atteints de leucémie (Farber *et al.*, 1948). Plus tard, Min Chiu Li et ses collaborateurs l'utiliseront pour traiter des choriocarcinomes au stade métastatique, permettant également d'obtenir des rémissions (Galmarini, Galmarini and Galmarini, 2012).

Néanmoins, les rémissions obtenues restent de courte durée, et les chimiothérapies induisent de nombreux effets secondaires délétères. En 1965, Skipper propose alors une théorie selon laquelle une dose donnée de chimiothérapie induit la mort d'un pourcentage fixe des cellules tumorales, peu importe

le nombre de cellules cancéreuses présentes au départ (Skipper, 1965). Cette notion est illustrée par l'injection de  $10^2$  à  $10^6$  cellules leucémiques à des animaux traités avec une dose fixe de chimiothérapie. Si le nombre absolu de cellules survivantes à l'issue du traitement varie, le pourcentage de cellules tuées est similaire entre ces différentes conditions. Ce pourcentage fixe de cellules tuées est lié à l'impact de la dilution des cellules tumorales dans l'organisme sur l'efficacité du traitement. Plus le nombre de cellules tumorales est faible, plus la probabilité pour une molécule de chimiothérapie de les rencontrer est faible. A l'inverse, lorsque le nombre de cellules tumorales circulantes est élevé, la probabilité de les rencontrer et de les tuer est plus élevée.

Les auteurs donnent ainsi l'exemple théorique d'une drogue permettant de tuer 99,99% des cellules tumorales : son administration à un animal présentant  $10^6$  cellules tumorales entraînerait en moyenne la survie de 100 cellules, qui pourront à nouveau proliférer. Si la même dose est administrée à un animal ne présentant que  $10^4$  cellules tumorales, le nombre moyen de cellules survivantes est de 0,1. Statistiquement, cela se traduira par des animaux présentant à l'issue du traitement soit 1 cellule tumorale, qui pourra à nouveau proliférer, ou 0 cellule tumorale, menant à la guérison de la pathologie.

Cette théorie met en lumière deux points cruciaux pour l'efficacité des chimiothérapies :

- Moins il y a de cellules cancéreuses lors du traitement, plus il y a de chance statistiquement pour que le nombre de cellules survivantes soit égal à 0 cellules. Cette notion mènera plus tard à l'utilisation de la chimiothérapie comme adjuvant, en complément de la chirurgie et des rayons X.
- Si chaque chimiothérapeutique induit la mort d'un pourcentage fixe de cellules, il est nécessaire de combiner différentes molécules ayant des effets différents, afin de diminuer le pourcentage de cellules survivantes. Les premiers essais combinant différents chimiothérapeutiques (essai cliniques VAMP et MOPP), ont ainsi permis d'obtenir un pourcentage de rémission de 60% (DeVita and Chu, 2008; Galmarini, Galmarini and Galmarini, 2012).

### Échecs des traitements historiques

La combinaison de ces traitements ne permet néanmoins toujours pas de guérir tous les cancers. Les découvertes en biologie cellulaire et moléculaire, à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle, ont alors mis en évidence les différents processus menant à la transformation maligne des cellules. La découverte des oncogènes et des différentes voies de signalisation cellulaire impliquées dans la prolifération, l'apoptose, la migration ont permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires. La synthèse de nouvelles molécules capables de cibler ces différentes voies a mené au développement de thérapies dites ciblées. Contrairement aux chimiothérapeutiques, qui affectent toutes les cellules en cours de prolifération, ces thérapies ciblent des molécules surexprimées ou mutées dans les cellules cancéreuses, visant ainsi à réduire considérablement les effets toxiques sur les tissus sains.

Ces traitements ciblés peuvent être classés de la façon suivante (Falzone, Salomone and Libra, 2018):

- Les anticorps monoclonaux, développés à partir de la méthode des hybridomes. Le premier à avoir été approuvé en clinique pour un usage anti-cancéreux est le Rituximab en 1997 (Lu *et al.*, 2020), un anticorps chimérisé ciblant l'antigène CD20 dans le cas de lymphomes non Hodgkinien. Il fut suivi par le Trastuzumab, un anticorps anti-HER2 humanisé approuvé en 1998 pour le traitement du cancer du sein. Outre le blocage de ce récepteur impliqué dans la croissance des cellules tumorales, l'anticorps peut induire la lyse des cellules par l'activation du système du

complément ou l'ADCC (Cytotoxicité à médiation Cellulaire Dépendante des Anticorps). Les anticorps bloquants peuvent également agir sur l'angiogénèse, afin d'empêcher le développement de vaisseaux permettant l'apport de nutriments à la tumeur. Le Bevacuzimab, par exemple, se lie au VEGF, le principal facteur de croissance impliqué dans l'angiogénèse, afin de le neutraliser.

- Les inhibiteurs de sérine/thréonine ou tyrosine Kinase. De nombreuses voies de signalisation liées à la prolifération présentent des mutations de protéines dans le cas de cellules cancéreuses. Parmi les voies de signalisation les plus fréquemment mutées, les voies des kinases MAP et PI3/Akt/mTOR ont fournis plusieurs cibles de thérapies ciblées. Les kinases de ces voies ont ainsi pu être ciblées par des inhibiteurs, afin de diminuer la prolifération des cellules cancéreuses ou vasculaires.
- Les Immunothérapies, ayant pour objectif de développer ou de délivrer une réponse immunitaire anti-tumorale. Cette catégorie de traitement ciblé est détaillée dans une partie à suivre.

Ces différentes thérapies peuvent avoir pour cible les cellules tumorales, mais également d'autres éléments composant la tumeur. Le ciblage de l'angiogénèse par les anticorps bloquants, ou le développement d'une réponse immunitaire grâce aux immunothérapies, par exemple, mettent en lumière la notion que les cellules tumorales ne sont pas les seules cibles potentielles sur lesquelles les traitements anti-cancéreux peuvent agir. Une tumeur est un écosystème complexe, composé d'agents cellulaires, matriciels et moléculaires, qui sont détournés au profit de la croissance tumorale. Les traitements doivent donc prendre en compte ces différents éléments du microenvironnement tumoral.

## Microenvironnement tumoral

### Rôle du système immunitaire dans l'oncogénèse

En 1957, quand la communauté scientifique s'accorde à dire que le système immunitaire n'a pas de rôle à jouer dans le développement de la tumeur, Richmond T Prehn et Joan M Main soulèvent la possibilité d'une immunité permettant de protéger les souris d'un développement tumoral. Pour cela, ils induisent à l'aide de MCA (3-méthylcholantène) des tumeurs chez les souris, qui une fois développées seront excisées par chirurgie et transférées chez des souris autologues « hôtes ». Après excision de leur première tumeur, les souris subissent un second transfert des tumeurs provenant des souris « hôtes ». Comparée à des souris contrôles, n'ayant jamais été exposées à cette tumeur, ces souris bénéficient d'une protection vis-à-vis de la seconde greffe tumorale (Prehn and Main, 1957).

Cette étude fut l'une des premières à mettre en évidence la présence d'une possible réponse immunitaire (RI) face au cancer. L'avènement des modèles murins immunodéficients et la compréhension plus précise des mécanismes immunitaires permettront de mettre en évidence le rôle de nombreuses molécules et cellules immunitaires dans le développement tumoral (Dunn, Old and Schreiber, 2004). Notamment, l'inactivation du gène RAG-2, permettant le réarrangement des récepteurs des lymphocytes T et B (LT et LB), fournira un modèle murin déficient en immunité adaptative, car ne possédant ni LT, LB, et des cellules NK (Natural Killer) présentant des déficiences de prolifération (Shinkai *et al.*, 1992). Le développement plus rapide chez ces souris de tumeurs induites par le MCA, ainsi que l'apparition de tumeurs spontanées fournira la preuve indiscutable du rôle du système immunitaire dans la prévention du développement tumoral.

D'autres preuves du rôle de la RI dans le rejet des tumeurs viendront étayer cette théorie, notamment l'augmentation de l'incidence de cancers chez les patients immunodéprimés, que cette immunodépression soit génétique, héréditaire ou acquise (Corthay, 2014; Mayor *et al.*, 2018). De plus, les analyses de biopsies révéleront que de nombreuses tumeurs sont infiltrées par des cellules effectrices du système immunitaire (SI), démontrant même une corrélation entre le pronostic et cet infiltrat dans certains types de tumeurs (Fridman *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2017).

Le SI est donc à même de reconnaître et de déclencher une réponse face à une cellule cancéreuse, la réponse étant similaire à celle observée lors d'une infection virale (type Th1). Le déclenchement de cette RI anti-cancéreuse nécessite deux principaux facteurs : des antigènes tumoraux présentés par des molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité), et des signaux de dangers (DAMPs) afin d'aider la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Dans le cas de cancers, les signaux de dangers sont relargués ou exprimés à la surface cellulaire suite aux dommages tissulaires générés par la prolifération anarchique des cellules tumorales. Une liste détaillée des antigènes est répertoriée sur le site <https://caped.icp.ucl.ac.be/Peptide/list>. Ils peuvent être regroupés en quatre catégories (Chen and Mellman, 2017):

- Antigènes de différenciation : antigènes tissulaires surexprimés par rapport à leur niveau d'expression basale
- Néoépitope : antigènes résultants des mutations génétiques des cellules cancéreuses, ayant entraînés au niveau protéique l'apparition de nouveaux épitopes
- Antigènes viraux : dans le cas de cancers provoqués par une infection virale, reconnaissance des antigènes du virus
- Antigènes de la lignée germinale : antigènes exprimés de manière physiologique uniquement par les cellules de lignées germinales, et réexprimés par les cellules cancéreuses

Cette réponse immunitaire contraint les cellules tumorales à s'adapter, et contribue à la mise en place d'un microenvironnement tumoral (TME). Les principaux acteurs de ce TME vont être détaillés dans la partie suivante.

## Acteurs cellulaires

### Cellules cancéreuses

Les cellules tumorales pouvant être reconnues et détruites par les cellules immunitaires, une sélection de clones peu immunogènes et résistants à la lyse s'opère donc au cours du développement tumoral. En effet les cellules cancéreuses sont caractérisées, entre autres, par un taux de mutation élevé et une prolifération anarchique non contrôlée. Si les cellules les plus immunogènes pourront être reconnues et lysées par le SI, ce phénomène va engendrer progressivement une sélection des clones tumoraux : les cellules possédant des mécanismes d'échappement au SI vont survivre et proliférer. Ce mécanisme est connu sous le nom d'Immunoediting (Teng, Kershaw and Smyth, 2013; O'Donnell, Teng and Smyth, 2019).

Différentes stratégies d'échappement au SI existent. Dans un premier temps, les cellules tumorales vont pouvoir agir sur l'initiation de la réponse immunitaire. Celle-ci nécessite la maturation des CPA, par la captation d'antigènes tumoraux et de signaux de dangers. Dans le cas d'une RI efficace, les cellules tumorales ont une mort cellulaire immunogénique (Kroemer *et al.*, 2013; Inoue and Tani, 2014). Les protéines chaperonnes telles que la calréticuline, les HSP (Heat Shock Protein) 70 et 90, ainsi que la

phosphatidylsérine sont exprimées à la face externe de la membrane cellulaire, envoyant un signal « eat me » aux cellules phagocytaires (Garg *et al.*, 2014). De plus, les cellules vont sécréter des signaux chimioattractants ou « find me » pour les CPA, tels que l'ATP, l'UTP ou CX3CL1 (Pitt, Kroemer and Zitvogel, 2017). La captation de DAMPs et d'antigènes tumoraux par les CPA ainsi attirées sur le site tumoral permettra leur activation, maturation et le déclenchement d'une RI anti-tumorale (Figure 1a).

Afin d'échapper à ce processus, les cellules tumorales peuvent mourir par apoptose. Ce second procédé de mort cellulaire survient fréquemment dans l'organisme, et fait partie de l'homéostasie cellulaire. L'apoptose permet aux cellules de mourir et d'être phagocytées sans déclencher de RI, et évite ainsi des réactions auto-immunes. Dans le cadre du développement tumoral, il a été observé que les cellules cancéreuses mourant par apoptose empêchaient ainsi le développement d'une RI (Gregory and Pound, 2011). L'importance primordiale des DAMPs, en particulier HMGB1 (High Motility Group Box), dans l'induction d'une réponse immunitaire a alors été mise en valeur dans de nombreuses études (Apetoh *et al.*, 2007; Green *et al.*, 2009; Pitt, Kroemer and Zitvogel, 2017). Une étude de Kazama et collaborateurs (Kazama *et al.*, 2008) a notamment démontré que les cellules mourant par apoptose et nécrose relarguent la même quantité d'HMGB1. Cependant, l'apoptose induit une production de ROS oxydant HMGB1, inhibant ainsi sa fonction de DAMP. Les cellules dendritiques (CD) ayant ingéré ces cellules apoptotiques induisent par la suite une réponse toléro-gène.

Une seconde étude a démontré que, même si les CD activaient les lymphocytes T CD8 suite à la phagocytose de cellules apoptotiques, la RI induite est déficiente (Griffith *et al.*, 2007). En effet les CD sont alors incapables d'induire une réponse de type CD4 auxiliaires (Figure 1b), et cette absence se traduit par une sécrétion de TRAIL (TNF-related apoptosis-induced ligand) accrue par les LT CD8 activés lors de leur rencontre avec leur antigène cible, entraînant à son tour la mort cellulaire des LT CD8 (Janssen *et al.*, 2005). Néanmoins, ségréger la mort immunogène à la nécrose et la mort toléro-gène à l'apoptose serait réducteur ; il a déjà été observé, dans certains cas, l'induction d'une réponse immunitaire efficace induite par des cellules apoptotiques (Zitvogel, Kepp and Kroemer, 2010).

Dans le cas du déclenchement d'une réponse immunitaire anti-tumorale, les principaux effecteurs sont les LT CD8 cytotoxiques. La lyse des cellules tumorales nécessite alors la liaison du TCR des LT CD8 à un complexe CMH/peptide à la surface des cellules tumorales (Figure 1c). La forte prolifération des cellules tumorales n'est pas sans conséquences sur leur physiologie. Elle induit un stress mitotique et protéique, conduisant à une accumulation de protéines favorisant la surexpression d'antigènes. Associés aux nombreuses mutations du génome, favorisant l'apparition de néoantigènes tumoraux, ces deux mécanismes peuvent fournir des peptides pouvant être chargés sur les molécules de CMH, reconnus puis ciblés par une réponse immunitaire (Seelige, Searles and Bui, 2018). Les cellules tumorales ont donc développé plusieurs mécanismes de résistance face à la lyse médiée par les lymphocytes. Ainsi, il est fréquemment observé chez les cellules cancéreuses une diminution, voire une extinction de l'expression globale du CMH, afin de ne pas présenter ces antigènes tumoraux (Garrido and Aptsiauri, 2019; O'Donnell, Teng and Smyth, 2019). De plus, les mutations faisant apparaître des antigènes de faible affinité pour les molécules du CMH sont sélectionnées lors de la cancérogénèse.

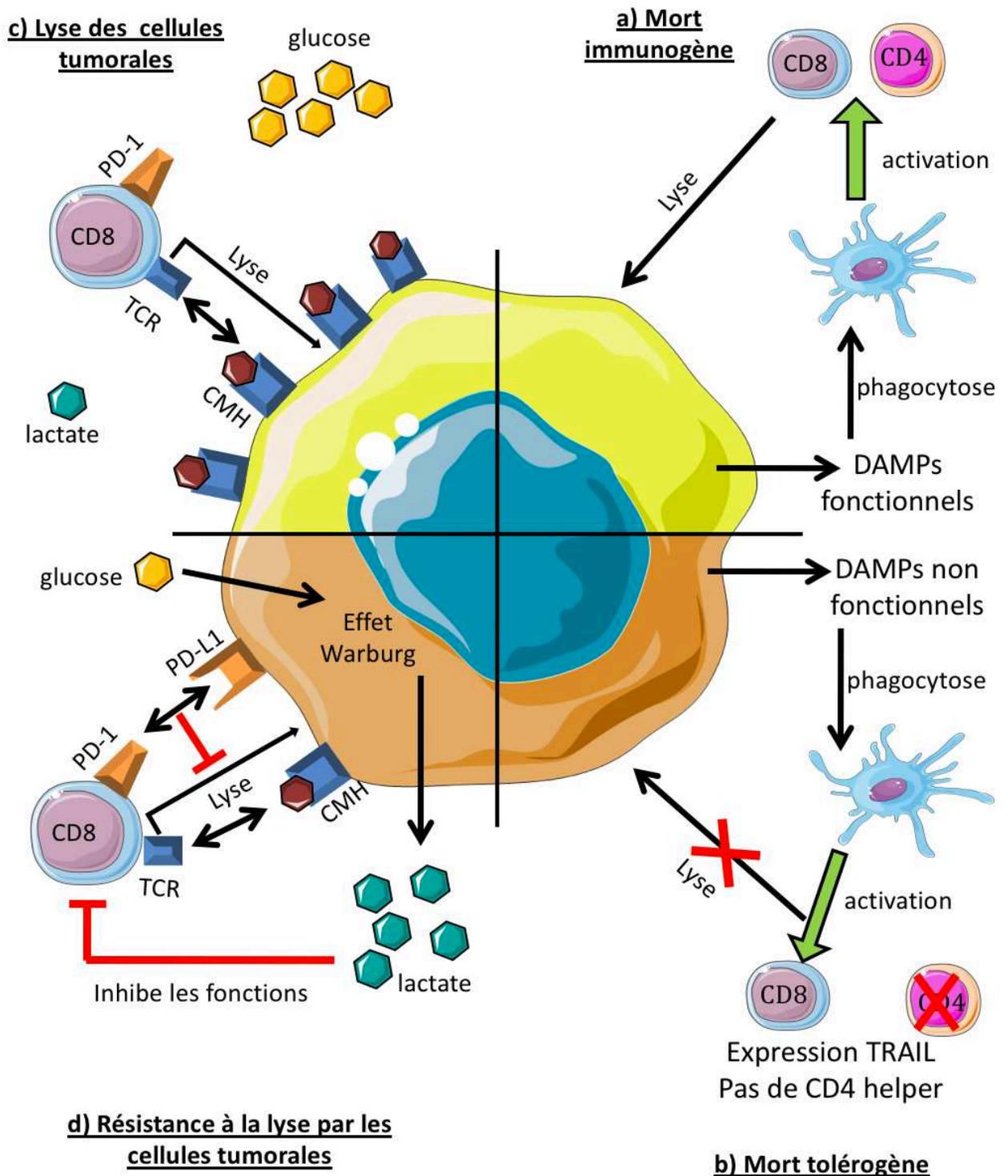
En plus de cette diminution de la présentation d'antigènes tumoraux, les cellules tumorales peuvent exprimer à leur surface des points de contrôles immunitaires (PCI), dont PD-L1 fait partie des plus décrits dans la littérature (Figure 1d). Cette molécule se lie à PD-1, exprimé à la surface des LT CD8 activés, et inhibe leur activité cytotoxique. De manière physiologique, PD-L1 peut être exprimé par les cellules afin d'éviter les réponses auto-immunes. Néanmoins, les cellules tumorales peuvent augmenter leur expression de PD-L1 par différentes voies de signalisation, généralement impliquées dans la prolifération

et la survie cellulaire (Kalantari Khandani, Ghahremanloo and Hashemy, 2020). Notamment, la liaison de l'IFN $\gamma$  à son récepteur active la voie des kinases janus, conduisant à l'activation des facteurs de transcription de la famille STAT, permettant d'augmenter l'expression de PD-L1 (Garcia-Diaz *et al.*, 2017).

Au niveau métabolique, la prolifération des cellules tumorales exige d'elles un remodelage afin de subvenir à leurs besoins, dans un environnement souvent appauvri en oxygène. Ce remodelage est connu sous le nom d'effet Warburg (Warburg, 1925; Moreno-Sánchez *et al.*, 2007; Jones and Bianchi, 2015), bien décrit et retrouvé dans de nombreux cancers. Il est caractérisé par une forte consommation de glucose utilisé pour la glycolyse anaérobie, qui mène à une forte production de lactate, éventuellement relargué dans le microenvironnement tumoral (Feng *et al.*, 2018). L'effet Warburg induit donc une augmentation du lactate en même temps qu'une déprivation de glucose dans le TME (Figure 1d).

Les lymphocytes activés qui prolifèrent utilisent un mécanisme similaire à l'effet Warburg (Michalek and Rathmell, 2010; Sugiura and Rathmell, 2018) ; ils présentent une forte consommation de glucose et utilisent également la glycolyse anaérobie, impliquant une synthèse de lactate qui doit être évacuée dans le TME. Or, l'environnement tumoral ne leur fournit pas le glucose dont ils ont besoin. De plus, l'export de lactate en dehors du cytoplasme des lymphocytes est freiné par la forte concentration en acide lactique dans le TME. Ce dernier s'accumule donc dans le cytosol des lymphocytes ainsi que dans le TME, entraînant une toxicité lymphocytaire responsable d'une baisse de leur activité cytotoxique et de leur synthèse de cytokines (Fischer *et al.*, 2007; Brand *et al.*, 2016).

A l'inverse, les lymphocytes T CD4 régulateurs, une population immunitaire immunosuppressive, sont adaptés à ce TME car ils utilisent le lactate comme carburant. De plus, ils empruntent principalement la phosphorylation oxydative pour pourvoir à leurs besoins métaboliques, une voie métabolique peu consommatrice de glucose (Angelin *et al.*, 2017; Comito *et al.*, 2019). Le TME favorise ainsi les populations immunorégulatrices, tout en empêchant les autres populations immunitaires d'exercer leur activité cytotoxique.



*Figure 1: Mécanismes de résistance des cellules tumorales*

Mort cellulaire : a) les cellules tumorales peuvent mourir de manière immunogénique, induisant une réponse immunitaire, ou b) par apoptose, induisant une réponse tolérogène. Résistance à la lyse : c) mécanisme de reconnaissance et de lyse des cellules tumorales, et d) leur stratégie de résistance.

## Cellules Immunitaires

Une des premières populations présentes sur les sites tumoraux sont les macrophages. Leur rôle est de phagocyter les débris et cellules apoptotiques. En cas d'infection virale ou bactérienne, les macrophages se polarisent afin de participer à la réponse immunitaire. Ils peuvent alors présenter des phénotypes très hétérogènes en fonction des signaux présents dans leur environnement, et deux phénotypes « extrêmes » sont décrits (Henze and Mazzone, 2016):

- Les macrophages de phénotype « M1 », induit par l'IFN $\gamma$  et les composants bactériens, avec un rôle pro-inflammatoire et anti-tumoral,
- Les macrophages de phénotype « M2 », induit par l'hypoxie, l'IL-4 et l'IL-13, avec un rôle anti-inflammatoire et angiogénique.

Les premiers rapports semblent indiquer que les macrophages de type M1 peuvent avoir un rôle dans la destruction des cellules tumorales, de par leur activité de phagocytose médiée par les anticorps ou ADCP (Tay, Wiehe and Pollara, 2019), la production de molécules toxiques telles que les espèces réactives de l'oxygène ou de l'azote (respectivement ROS et NO), et la production de cytokines immunostimulantes telles que l'IL-12 (Chang, Liao and Kuo, 2001; Murdoch, Giannoudis and Lewis, 2004; Henze and Mazzone, 2016). Cependant la plupart des études s'accordent sur le phénotype M2 majoritaire des macrophages présents sur le site tumoral, qui est associé à un mauvais pronostic en clinique (Yang *et al.*, 2018). Le TME est donc capable de recruter et accumuler les macrophages sur le site tumoral, avant d'orienter leur phénotype vers un profil M2 afin de servir la croissance de la tumeur.

Lors de la progression tumorale, les macrophages sont attirés dans les zones hypoxiques par un gradient de chimiokines (Figure 2a). Les principales sont le CSF-1, CCL-2, CCL-5 et les DAMPs produits par les cellules tumorales, fibroblastes et macrophages eux-mêmes (Murdoch, Giannoudis and Lewis, 2004; Mantovani *et al.*, 2017). Une fois localisés dans les zones hypoxiques, les macrophages s'y accumulent sans pouvoir en échapper : en effet leur motilité est dépendante de la quantité d'oxygène présente dans les tissus (Figure 2b).

Les cytokines présentes dans le TME et les conditions d'hypoxie induisent alors un phénotype M2 chez les macrophages (Imtiyaz *et al.*, 2010; Pinto *et al.*, 2017). Ce phénotype se traduit par une activité angiogénique, principalement déclenchée par les conditions d'hypoxie induisant l'activation du facteur de transcription HIF1- $\alpha$  (HypoxiaInducible factor 1 alpha), menant à une sécrétion de VEGF participant à la néovascularisation tumorale (Laoui *et al.*, 2014; Huber *et al.*, 2016; Wenes *et al.*, 2016). À cette activité angiogénique s'ajoute la sécrétion de métalloprotéases (Figure 2c), permettant une dégradation et un remodelage de la matrice extracellulaire (MEC), ainsi que la sécrétion de chimiokines favorisant le caractère invasif des cellules tumorales (Figure 2d), telle que CCL-18 (Condeelis and Pollard, 2006; Pinto *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2018). Ces différents rôles dans l'angiogenèse et l'invasion se traduisent *in vivo* par l'apparition de métastases. En effet de nombreux modèles murins inhibant le recrutement de macrophages sur le site tumoral primaire démontrent une diminution significative du nombre de métastases (Mazzieri *et al.*, 2011; Binnemars-Postma *et al.*, 2018; Zhu *et al.*, 2019).

Outre leur rôle dans l'invasion tumorale, les macrophages exercent une activité immunosuppressive vis-à-vis des LT CD8 cytotoxiques (Figure 2e) ; par l'expression de PD-L1 à leur surface et la sécrétion de cytokines immunorégulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$  (Allavena *et al.*, 2008; Mantovani *et al.*, 2017). De plus, il a été rapporté qu'ils pouvaient sécréter les chimiokines CCL17 et CCL22, permettant l'infiltrat de LT régulateurs (Henze and Mazzone, 2016).

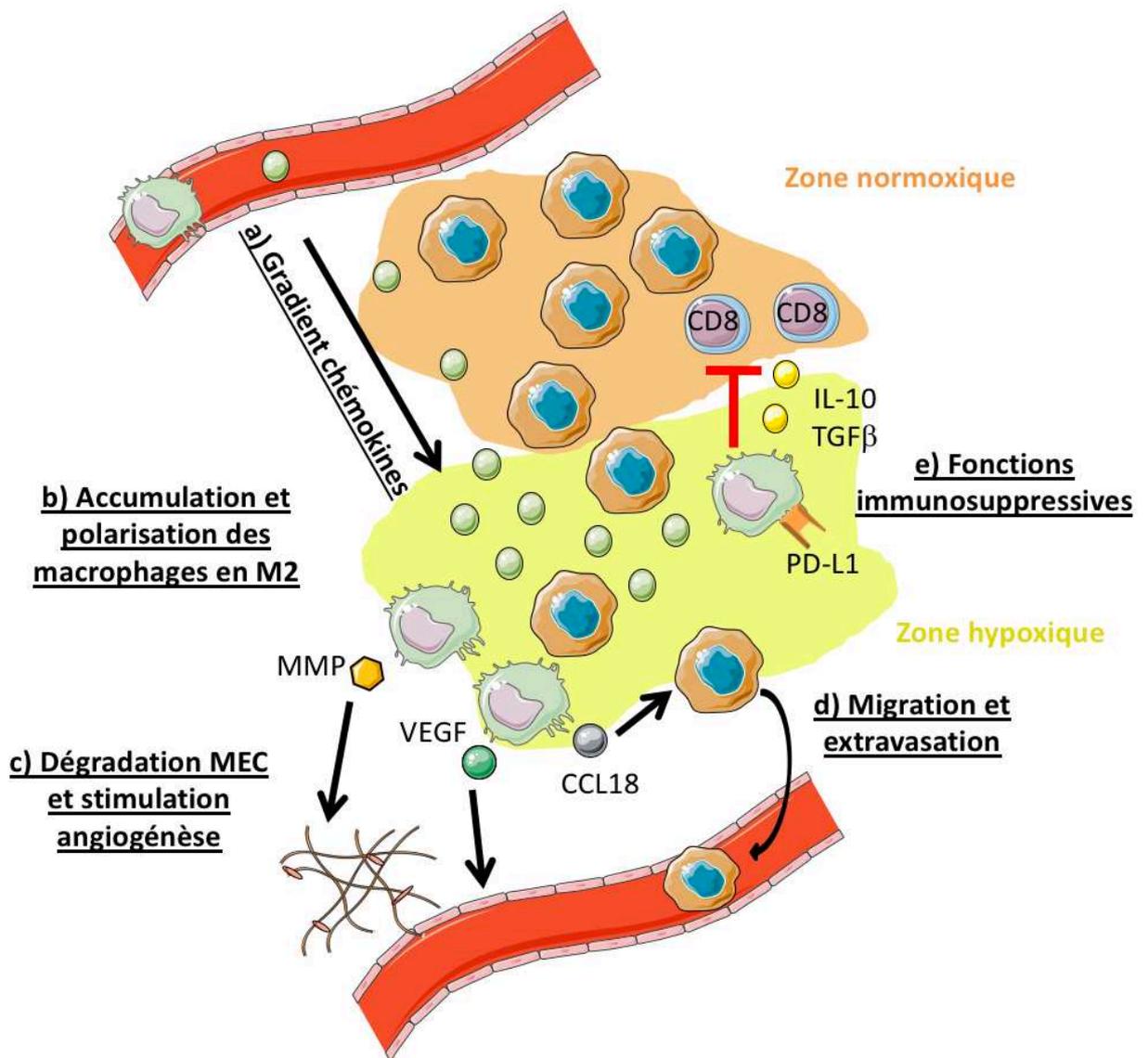


Figure 2 : Rôle pro-tumoral des macrophages.

a) Accumulation de macrophages dans les zones hypoxiques par la sécrétion de chimiokines, puis b) polarisation en phénotype M2. Les macrophages exercent alors une activité pro invasive (c,d) et immunosuppressive (e).

Une autre population du système immunitaire inné pouvant jouer un rôle dans le contrôle des tumeurs est la population des cellules NK. Capables de reconnaître les cellules tumorales ayant perdu l'expression des molécules du CMH ou exprimant des ligands de stress, elles semblent impliquées dans la prévention de certains cancers tels que les lymphomes B (Street *et al.*, 2004). Néanmoins, elles restent peu étudiées et peu présentes dans le TME. Les cellules tumorales disposent de mécanismes de résistance à la lyse par les cellules NK, par la sécrétion de cytokines immunorégulatrices et la diminution de l'expression de ligands activateurs à leur surface (Vitale *et al.*, 2014; López-Soto *et al.*, 2017).

Il n'existe pas à l'heure actuelle de corrélation entre l'infiltrat de cellules NK au niveau de la tumeur primaire et le pronostic des patients, néanmoins elles jouent un rôle important dans la prévention de métastases (López-Soto *et al.*, 2017). À l'exception d'un potentiel rôle pro-angiogénique étudié dans des tumeurs pulmonaires (Bruno *et al.*, 2013), les cellules NK ne semblent pas pouvoir être détournées afin de promouvoir la croissance tumorale comme cela est observé avec les macrophages.

Outre les cellules NK, les principaux effecteurs à même de lyser les cellules tumorales sont les lymphocytes T CD8 cytotoxiques. Une fois activés dans les organes lymphoïdes secondaires, ils prolifèrent et migrent jusqu'au site tumoral où ils reconnaissent et lysent les cellules malignes présentant les complexes CMH/peptides (Figure 3a). Des lymphocytes T CD8 sont observés dans de très nombreuses tumeurs solides, et ils sont reconnus comme étant un facteur primordial de bon pronostic et de réponse aux traitements dans de nombreux cancers (Barnes and Amir, 2017; de Ruiter *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2018; Stovgaard *et al.*, 2018; Chatzopoulos *et al.*, 2019; Linette and Carreno, 2019). Les tumeurs ainsi fortement infiltrées par des LT CD8 fonctionnels sont considérées comme présentant un TME « chaud ».

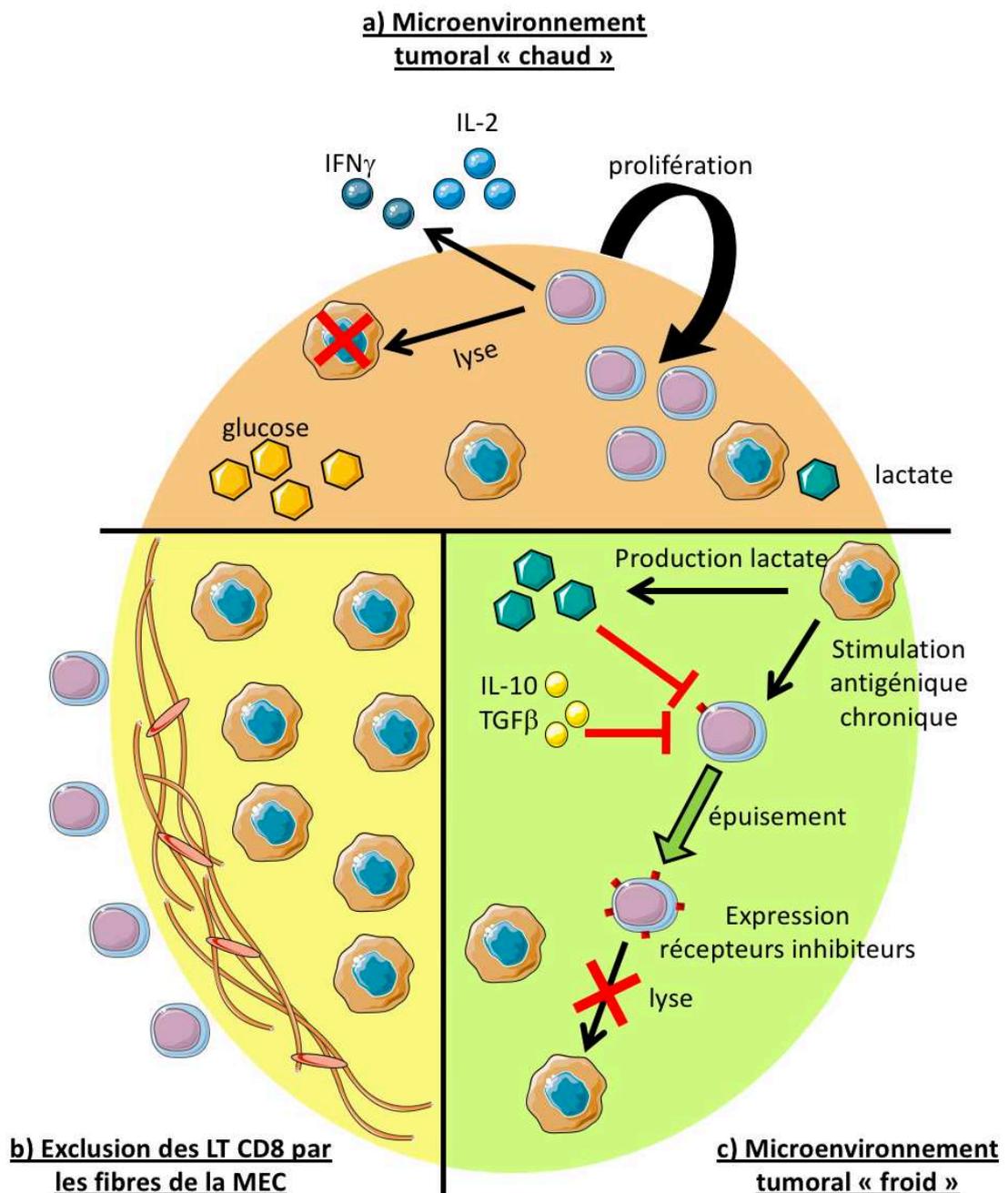
Néanmoins, et malgré les infiltrats fréquents de TILs (Lymphocytes Infiltrant la Tumeur) CD8, l'échappement tumoral persiste, signe que des mécanismes de résistances existent. Les principales fonctions lytiques des LT CD8 nécessitant un contact avec les cellules tumorales, une première stratégie d'échappement consiste à exclure les LT CD8 de la tumeur. Leur migration vers la tumeur peut être complètement inhibée (Evans *et al.*, 2015; Spranger, Bao and Gajewski, 2015; Koyama *et al.*, 2016; Peng *et al.*, 2016), auquel cas on parle de désert immunologique : aucun LT CD8 n'est observé dans la tumeur.

Il peut également être observé une exclusion des LT CD8 des îlots tumoraux, les ségrégeant dans le stroma (Figure 3b), à la périphérie des zones tumorales. Dans des biopsies de cancers du poumon, des structures composées de fibres de collagènes sont observées entourant les îlots tumoraux (Salmon *et al.*, 2012), empêchant le passage des LT. Cette ségrégation peut également être médiée par l'expression de protéines par les tumeurs, par exemple les sémaphorines. Ces protéines transmembranaires ou solubles induisent des changements dans le cytosquelette. Notamment, SEMA4D est décrite comme exprimée par de nombreuses cellules tumorales murines et humaines, et corrélée à un mauvais pronostic (Evans *et al.*, 2015). Son expression à la bordure invasive des tumeurs inhibe l'infiltrat de LT CD8, et l'utilisation d'anticorps bloquants permet de le restaurer. Enfin, la migration des LT CD8 étant fortement dépendante du taux d'oxygène, il a été observé dans un modèle de mélanome que les LT CD8 étaient principalement localisés autour des vaisseaux (Manaster *et al.*, 2019). Si les LT CD8 parviennent néanmoins à pénétrer la tumeur, ils se heurtent à un TME souvent immunosuppresseur et multifactoriel, que l'on appelle microenvironnement « froid » (Figure 3c) :

- L'expression du ligand de PD-1, PD-L1, à la surface des cellules tumorales envoie un signal inhibiteur aux LT CD8 et empêche leur activité cytotoxique malgré la reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR. Depuis, de nombreux autres points de contrôles immunitaires sont décrits (Braun *et al.*, 2021), tels que Lag3, Tim3, et peuvent être ciblés par des anticorps bloquants.
- La présence de cytokines immunorégulatrices, notamment l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , qui vont inhiber les fonctions cytotoxiques des TILs (Chow and Luster, 2014), et l'absence de cytokines telles que l'IL-2 et l'IL-12, freine leur prolifération.
- L'accumulation de lactate et l'acidification du milieu dans le TME a également des effets toxiques sur les LT CD8, empêchant leur sécrétion de cytokines et la lyse des cellules tumorales (Sugiura and Rathmell, 2018).

Outre les conditions immunosuppresseuses dans lesquelles se retrouvent les lymphocytes une fois dans le TME, la stimulation constante des LT CD8 et le contexte inflammatoire va les mener à un phénotype épuisé. En effet, une réponse immunitaire classique est contrôlée dans le temps et en intensité. Cependant les lésions cancéreuses sont décrites comme des « blessures qui ne guérissent pas » (Hui and Chen, 2015). La stimulation prolongée des LT CD8 mène alors à ce phénotype épuisé, retrouvé dans plusieurs types de tumeurs et métastases (Baitsch *et al.*, 2011; Zelle-Rieser *et al.*, 2016). Ce

phénotype fut dans un premier temps caractérisé dans le cas d'infections chroniques, avec notamment l'expression constante et élevée du facteur de transcription clef TOX dans les LT CD8 de patients (Khan *et al.*, 2019). L'expression de TOX induit une reprogrammation des LT CD8 en lymphocytes épuisés, caractérisés par l'expression de plusieurs marqueurs de surface tels que PD-1, Lag-3, Tim-3, 2B4 (Yang *et al.*, 2017; Ma *et al.*, 2019; Im and Ha, 2020). La co-expression de ces différents marqueurs corrèlent avec le stade d'épuisement des lymphocytes, qui se traduit par des fonctions réduites : absence de sécrétion de cytokines comme l'IL-2 et l'IFN $\gamma$ , absence de prolifération et une fonction cytotoxique réduite (Kim *et al.*, 2020).



**Figure 3: Impact du microenvironnement tumoral sur les LT CD8.**

a) TME « chaud » ; les LT CD8 prolifèrent, sécrètent des cytokines et lysent les cellules tumorales. b) exclusion des LT CD8 de la tumeur, absence de lyse des cellules tumorales. c) TME « froid » ; les LT CD8 stimulés de manière chronique sont exposés à des concentrations élevées en lactate et cytokines immunorégulatrices, induisant leur phénotype épuisé.

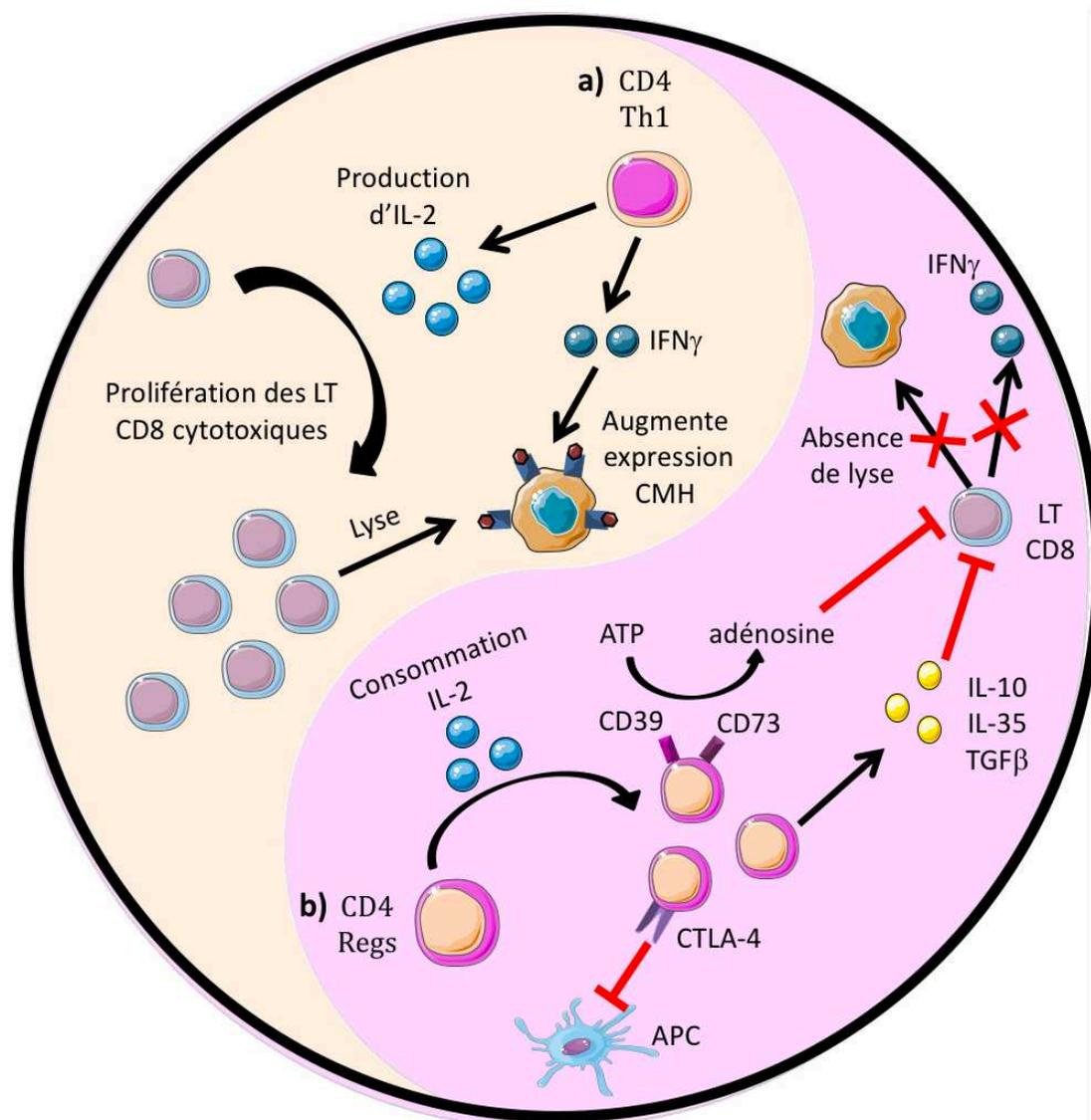
Enfin, une réponse immunitaire ne peut être efficace sans l'aide de LT CD4, dont le rôle est d'orienter et d'aider la RI. En effet, après leur activation par les cellules dendritiques et en présence d'IL-12 et d'IFN $\gamma$ , les LT CD4 activés peuvent adopter un profil de type Th1, orientant ainsi la réponse immunitaire anti-tumorale (Figure 4a). Leur rôle principal consiste alors en la sécrétion de cytokines, telles que le TNF- $\alpha$ , l'IFN $\gamma$  et l'IL-2 (Zander *et al.*, 2019; Oh *et al.*, 2020), nécessaires à l'activité cytotoxique des LT CD8. Néanmoins, et contrairement à ce qui est observé pour les LT CD8, une déplétion des LT CD4 dans des modèles pré-cliniques n'accélère pas la croissance des tumeurs, impliquant un rôle plus nuancé dans le contrôle de la croissance tumorale (Jarnicki *et al.*, 2006).

Ceci est dû à la présence de LT CD4 régulateurs (LT CD4 regs), présents de manière physiologique afin de réprimer des potentielles réponses auto-immunes. Les LT CD4 regs se développent dans le thymus suite à une forte stimulation de leur TCR reconnaissant un antigène du soi. Celle-ci engendre l'expression du récepteur de forte affinité pour l'IL-2 composée des chaînes  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  et  $\gamma$ . L'activation de cette voie de signalisation aboutit à l'expression du facteur de transcription Foxp3, induisant alors un phénotype immunosuppresseur (Takeuchi and Nishikawa, 2016). Dans le cas du développement de tumeurs, la nécrose des cellules tumorales provoque un relargage important d'antigènes du soi. Les cellules dendritiques immatures présentes sur les sites tumoraux sont alors à même d'activer les LT CD4regs, par la présentation de ces antigènes et l'expression de TGF- $\beta$ , induisant leur expansion (Ghiringhelli *et al.*, 2005; Togashi, Shitara and Nishikawa, 2019).

Le rôle des LT CD4 regs a tout d'abord été mis en évidence par leur déplétion à l'aide d'un anticorps anti-CD25 (Onizuka *et al.*, 1999; Shimizu, Yamazaki and Sakaguchi, 1999), entraînant un rejet des tumeurs par les animaux. Leur présence dans les tumeurs a ensuite été corrélée à un mauvais pronostic dans de nombreux cancers, solides comme liquides. Dans le cas de cancers du sein, un rapport CD8/CD4 reg plus élevé a été observé chez les patientes exemptes de métastases (Solis-Castillo *et al.*, 2020). Une étude menée sur des patients atteints de lymphome a mis en évidence une proportion de CD4 regs plus élevée chez ceux nouvellement diagnostiqués, comparés à ceux en rémission (Dehghani *et al.*, 2020).

Les LT CD4 regs exercent de plusieurs façons leur activité immunorégulatrice (Figure 4b) :

- L'expression de la chaîne  $\alpha$  du récepteur de forte affinité pour l'IL-2, permet leur prolifération et la consommation d'IL-2, qui n'est alors plus disponible pour la prolifération des LT CD8 cytotoxiques (Togashi, Shitara and Nishikawa, 2019).
- L'expression de CTLA-4, induite par le facteur de transcription (FT) Foxp3, inhibe l'activité des cellules présentatrices d'antigène (Wing *et al.*, 2008)
- La sécrétion de cytokines immunosuppressives : IL-10 et TGF- $\beta$ , qui répriment les fonctions cytotoxiques des LT CD8 (Jarnicki *et al.*, 2006), et l'IL-35 qui induit un phénotype épuisé chez les LT CD8 (Turnis *et al.*, 2016). Une diminution de l'expression d'IFN $\gamma$  et de perforine par les LT CD8 est ainsi observée dans le TME (Trzonkowski *et al.*, 2004).
- La conversion de l'ATP extracellulaire en adénosine, par l'action de deux enzymes exprimées à la membrane des LT CD4 regs : CD39 et CD73 (Deaglio *et al.*, 2007). L'adénosine ainsi produite se lie au récepteur purinergique A2AR des LT CD8, et inhibe leur activation, prolifération et activité cytotoxique (Bono *et al.*, 2015; de Oliveira Bravo, Carvalho and Saldanha-Araujo, 2016).



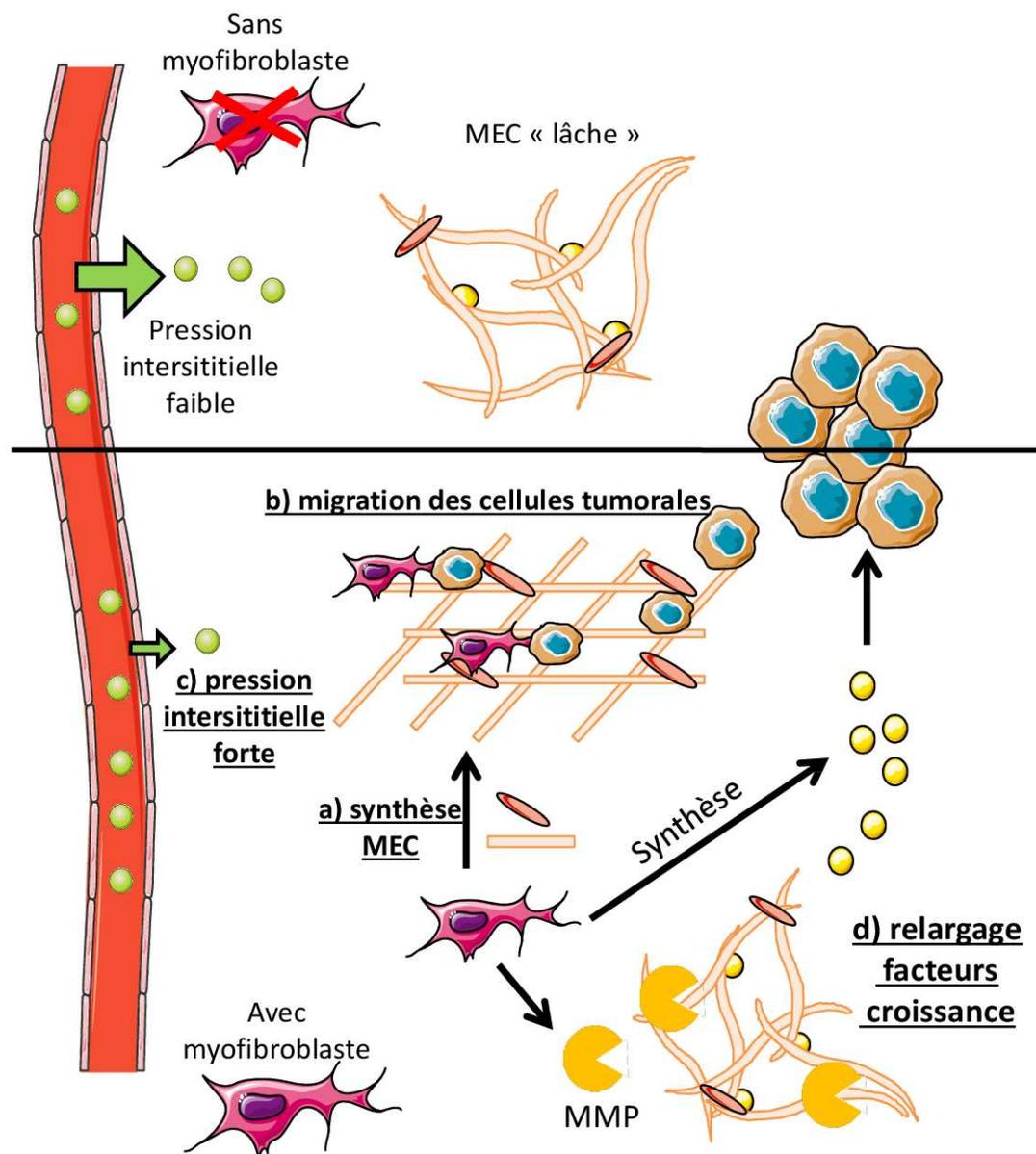
**Figure 4: Rôle des LT CD4 dans le TME suivant leur phénotype.**

*a) Rôle anti-tumoral des LT CD4 Th1, sécrétant des cytokines permettant la prolifération des LT CD8 et l'expression de complexes CMH/peptide b) Rôle pro-tumoral des LT CD4 régulateurs, entrant en compétition avec les LT CD8 pour la consommation d'IL-2 et relargant des molécules inhibant la réponse LT CD8.*

### Cellules non immunitaires

Outre les cellules du système immunitaire, les cellules composant la matrice extracellulaire (MEC) jouent également un rôle prépondérant dans le développement de la tumeur. Les fibroblastes sont les principales cellules responsables de la synthèse des composants de la MEC. Dans le cas de blessures, leur rôle est de participer à la fermeture des tissus et leur réparation, ainsi qu'à la sécrétion de facteurs permettant le recrutement des plaquettes. Dans le cas de tumeurs, les fibroblastes acquièrent un phénotype de myofibroblaste, caractérisé par leur perte d'expression de CD34 et le gain de plusieurs marqueurs, notamment  $\alpha$ SMA (Barth *et al.*, 2002; Roife, Fleming and Gomer, 2020). Ce changement de phénotype est retrouvé dans plusieurs types de cancers, avec une corrélation entre l'expression de ces nouveaux marqueurs par les fibroblastes et leur localisation intratumorale (Chauhan *et al.*, 2003).

Ce changement de phénotype a un impact crucial sur le microenvironnement tumoral des carcinomes. Les fibroblastes associés au cancer (ou CAFs) participent à l'inflammation des tissus par la sécrétion de cytokines telles que le TGF- $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$  ou IL-23 (Xiong, 2015). De plus, la sécrétion d'acide hyaluronique permet le recrutement de macrophages à la tumeur (Kobayashi *et al.*, 2010). Cependant, le principal impact des fibroblastes sur le microenvironnement tumoral se porte sur la matrice extracellulaire. La production élevée de collagène de type I, fibronectine, laminine et métalloprotéases (MMP) va favoriser la rigidité de la MEC (Figure 5a), fournir un réseau pour la migration des cellules tumorales (Figure 5b), et augmenter la pression interstitielle dans le tissu (Figure 5c). Le ciblage des CAFs a donc permis dans une étude de Loeffler *et al.*, d'abaisser cette pression interstitielle. Une meilleure accumulation de chimiothérapie sur le site tumoral a ainsi amélioré l'efficacité thérapeutique (Loeffler *et al.*, 2009).



*Figure 5: Modification de la MEC par les myofibroblastes.*

a) Synthèse de composants de la MEC, formant un réseau rigide permettant b) la migration des cellules tumorales et c) augmentant la pression interstitielle. d) les facteurs de croissances tumoraux sont soit produits directement par les fibroblastes, soit relargués de la MEC suite à la production de métalloprotéases.

Les fibroblastes jouent également un rôle dans la formation de métastases, par la production de facteurs de croissance pro-tumoraux (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , HGF). Les MMP produites par les CAFs peuvent également, après dégradation de la MEC (Figure 5d), permettre le relargage de ces facteurs de croissance (Roife, Fleming and Gomer, 2020). La sécrétion de VEGF et la dégradation de la MEC participent également à la formation de métastases, du fait de leur effet pro-angiogénique (Hartlapp *et al.*, 2001). Enfin, une étude *in vitro* a également démontré que les CAFs pouvaient exercer un effet de traction sur les cellules tumorales, par des jonctions hétérodimériques de cadhérine, favorisant ainsi leur migration (Labernadie *et al.*, 2017).

Les fibroblastes participent à un des mécanismes cruciaux du développement tumoral : l'angiogénèse. Celle-ci nécessite la sécrétion de facteurs de croissance angiogéniques, qui peuvent être produits par de nombreuses cellules du microenvironnement tumoral, telles que les fibroblastes, macrophages, Lymphocytes T régulateurs (LTregs), mais également par les cellules tumorales elles-mêmes. La production de ces facteurs, dans ce cas-ci, est déclenchée par l'hypoxie.

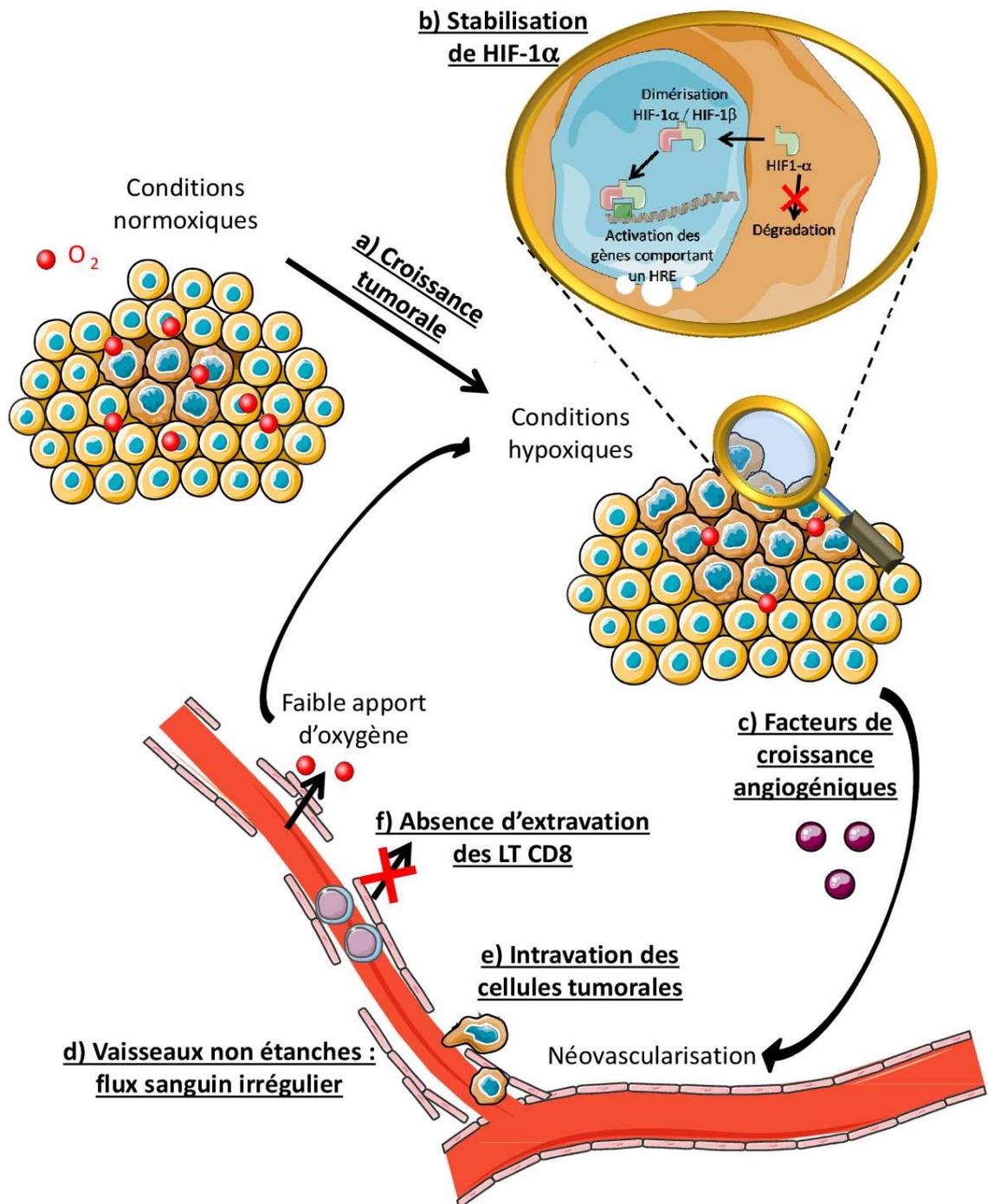
En effet, la prolifération rapide des cellules tumorales provoque une forte consommation d'oxygène afin de soutenir leur métabolisme, et entraîne la génération de zones hypoxiques (Figure 6a) (Palma, Biziato and Petrova, 2017). Le facteur de transcription HIF1- $\alpha$ , présent dans le cytoplasme mais rapidement ubiquitinilé et dégradé dans les conditions normoxiques, est stabilisé en conditions hypoxiques (De Sanctis *et al.*, 2018). Il migre alors vers le noyau (Figure 6b), se dimérise avec HIF-1 $\beta$  et peut déclencher la transcription de gènes possédant une boîte HRE (Hypoxia Response Element), tels que le VEGF, FGF, PDGF (Figure 6c). La production de ces facteurs angiogéniques entraîne les différentes étapes de l'angiogénèse, à savoir (Ronca *et al.*, 2017) :

- Remodelage des jonctions cellule-cellule au niveau des cellules endothéliales,
- Rupture de la membrane basale des vaisseaux et détachement des péricytes,
- Migration et prolifération des cellules endothéliales,
- Formation du lumen,
- Recrutement de péricytes,
- Retour des cellules endothéliales à un niveau de quiescence et formation d'une nouvelle membrane basale.

Ces différentes étapes visent à former des vaisseaux matures, composés d'une monocouche de cellules endothéliales rendue étanche par les jonctions entre cellules, une membrane basale, et un soutien par les péricytes. Néanmoins, il est observé dans les tumeurs une néovascularisation anarchique et non fonctionnelle (Hida *et al.*, 2016). Contrairement aux vaisseaux des tissus sains, les vaisseaux tumoraux présentent une morphologie différente : peu de jonctions entre les cellules endothéliales, qui ne forment pas une simple monocouche, et peu de couverture des vaisseaux par des péricytes. Ces vaisseaux immatures engendrent des « fuites » (Figure 6d), et ne permettent pas un flux régulier du sang (Hida and Maishi, 2018). Par conséquent, l'apport d'oxygène est faible, et aggrave donc l'hypoxie, déclenchant un cercle vicieux. De plus, l'absence de membrane basale et la discontinuité de la barrière endothéliale facilite l'intravasation des cellules tumorales (Figure 6e), et ainsi le processus métastatique (Borriello *et al.*, 2020).

L'hypoxie génère ainsi une sécrétion anormale et permanente de facteurs de croissance angiogéniques, qui entraîne une modification du phénotype des cellules endothéliales, les rendant anergiques. En conditions physiologiques, les stimuli inflammatoires, et notamment le TNF- $\alpha$ , permettent l'expression de molécules d'adhésion dont VCAM-1, ICAM-1. Ces molécules sont nécessaires

à la migration des lymphocytes dans les tissus, dont l'extravasation implique des étapes de rolling et d'adhésion avant de traverser la barrière endothéliale. L'anergie endothéliale induite par la stimulation angiogénique chronique tumorale diminue l'expression de ces molécules d'adhésion à leur surface, et empêche ainsi l'extravasation des lymphocytes hors des vaisseaux (Figure 6f). Plusieurs études ont donc visé à normaliser les vaisseaux, et ont ainsi pu observer une amélioration de l'infiltrat des LT CD8 (Buckanovich *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2017; Riegler *et al.*, 2019).



**Figure 6: Le cercle vicieux de l'hypoxie.**

a) Induction de zones hypoxiques suite à la croissance tumorale, b) stabilisation du facteur de transcription HIF1-  $\alpha$ , induisant c) la production de facteurs de croissance angiogéniques. d) Les nouveaux vaisseaux sont non fonctionnels, présentent des fuites et permettent e) l'intravasation des cellules tumorales tout en bloquant f) l'extravasation des lymphocytes.

## Immunothérapies

### Les différentes immunothérapies

Partant du constat que l'oncogénèse pouvait déclencher une RI et s'y adapter, les immunothérapies se sont développées. Leur but n'est pas de détruire directement les cellules tumorales, mais d'agir sur les différents composants du TME afin de permettre une RI anti-tumorale efficace. Les immunothérapies s'appuient sur les connaissances en immunologie des différentes étapes de la réponse immunitaire (résumées en Figure 7), afin d'en lever les freins ou d'apporter directement des effecteurs.

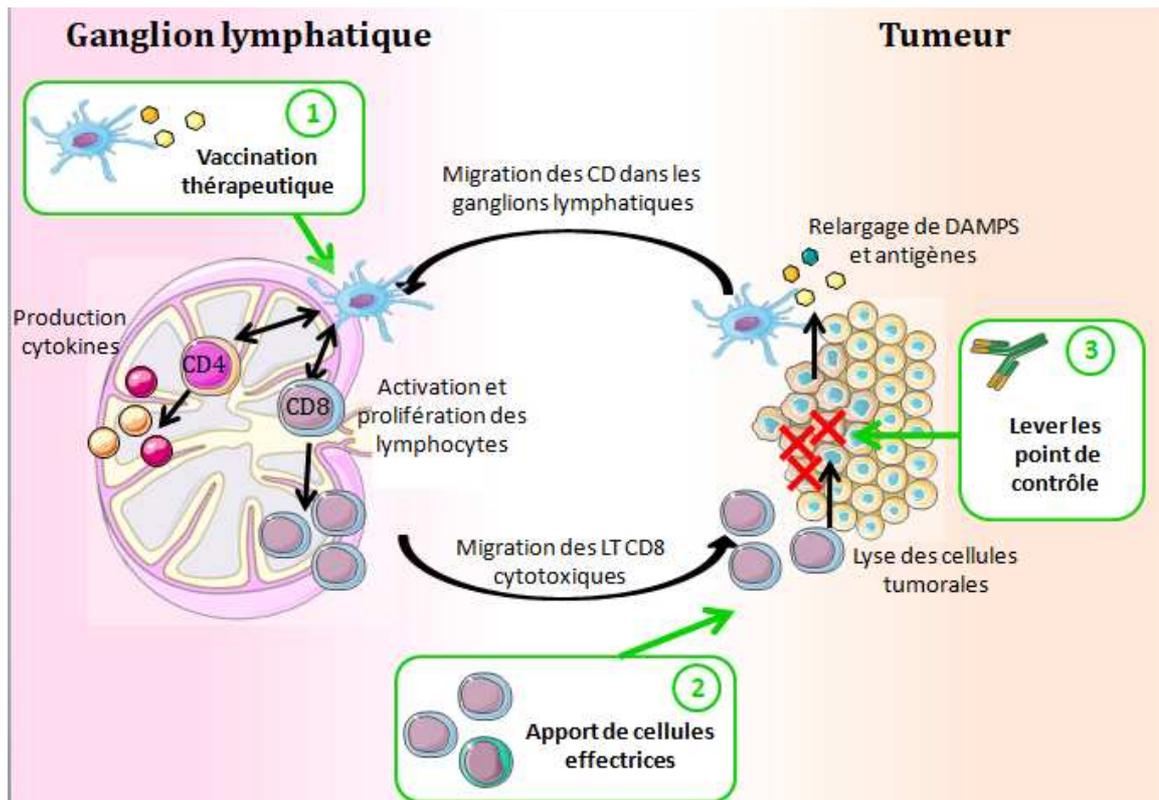


Figure 7: Réponse immunitaire et Immunothérapies.

Étapes de l'activation du système immunitaire face à une lésion cancéreuse. Les immunothérapies interviennent au moment de 1) l'activation des cellules effectrices, par transfert de cellules dendritiques (CD) ou vaccination associées à des adjuvants, 2) l'apport de cellules effectrices (LT, NK) 3) phase de lyse des cellules tumorales par les cellules effectrices, par l'injection d'anticorps anti-points de contrôle ou de cytokines.

## Vaccination thérapeutique

La première étape d'une réponse immunitaire est l'activation du système immunitaire (SI), qui nécessite l'intervention des CPA professionnelles (principalement les cellules dendritiques, CD). En fonction du type de cellule et du stress subi avant le déclenchement d'un programme de mort cellulaire, différents signaux seront émis par la cellule afin d'attirer (« find me ») et de permettre sa phagocytose (« eat me ») par les CPA. La combinaison de ces signaux, associés aux différents DAMPs relargués par les cellules, conditionne le développement d'une réponse immunitaire ou d'une tolérance vis-à-vis des antigènes ainsi captés par les CPA. Une fois activées, les CD migrent vers les organes lymphoïdes secondaires où elles présentent aux lymphocytes les antigènes tumoraux sur des molécules du CMH, afin de les activer à leur tour. La vaccination thérapeutique peut intervenir aux différentes étapes de ce déclenchement de RI.

La modification de virus oncolytiques pour leur faire exprimer le GM-CSF est une première stratégie de vaccination (Figure 8a). Ces virus se répliquent de manière préférentielle dans les cellules tumorales, les tuant et permettant ainsi le relargage d'antigènes tumoraux et de signaux de dangers. De plus, ces virus sont modifiés afin de faire exprimer aux cellules qu'ils infectent le GM-CSF, un facteur permettant d'attirer et d'activer les cellules dendritiques (Palucka and Banchereau, 2013). Dans un essai clinique de phase III, les patients atteints d'un mélanome non opérable ont été injectés soit avec la thérapie virale, soit avec du GM-CSF (Andtbacka *et al.*, 2015). Le traitement viral a permis d'améliorer la survie et la durée de la réponse au traitement. Une combinaison de ce virus avec une autre immunothérapie, ciblant PD-L1 avec un anticorps bloquant, est également en cours d'essai clinique (Ribas *et al.*, 2017).

Une seconde approche vise à fournir aux CD des peptides tumoraux. Elle consiste en la synthèse des peptides antigéniques suivie de leur injection (Figure 8b). Afin d'obtenir une réponse optimale, ces peptides doivent contenir des antigènes destinés aux LT CD4 et CD8, et doivent être associés à une injection de GM-CSF et d'agonistes de récepteurs de signaux de dangers, les TLR (Toll Like Receptor), afin de permettre la maturation des CD. En effet, une injection d'antigènes tumoraux seuls, sans être associés à des DAMPs n'entraînera qu'une réponse tolérogène vis-à-vis de ces antigènes. Afin de mieux cibler les CD, les peptides peuvent être couplés à un anticorps. Si l'injection de peptides tumoraux est une solution prometteuse, elle limite le nombre d'antigènes présentés et pose la question délicate du choix des peptides utilisés. Par conséquent, des cellules tumorales irradiées et modifiées pour exprimer le GM-CSF peuvent également être utilisées, afin d'augmenter le nombre d'antigènes peptidiques pouvant être présentés.

L'utilisation de longs peptides synthétiques permet également d'améliorer l'immunogénicité de ces vaccins. En effet, le manque d'immunogénicité des peptides courts est en partie lié à leur chargement externe sur des cellules autres que des CPA, telles que les LB ou LT. Ne possédant pas les molécules de co-stimulation nécessaires au développement d'une réponse immunitaire, ce chargement exogène mène à une tolérance vis-à-vis de ces épitopes. Au contraire, les longs peptides doivent être internalisés et dégradés avant d'être chargés sur les molécules du CMH, ce qui est principalement réalisé par les CPA, à même de permettre le développement de RI efficaces (Melief and van der Burg, 2008; Kenter *et al.*, 2009).

L'utilisation d'ARN messager (ARNm) codant pour les antigènes tumoraux à la place de peptide permet également de prévenir un potentiel chargement exogène. Ce type de vaccination consiste en la synthèse *in vitro* d'ARNm pouvant coder pour des protéines entières exprimées par les cellules tumorales. Après leur injection, les ARNm pénètrent les cellules et seront traduits, avant de pouvoir être chargés sur

des molécules du CMH (Miao, Zhang and Huang, 2021). La cible principale de ce type de vaccination sont les cellules dendritiques, afin de leur faire exprimer les antigènes tumoraux sur des molécules du CMH de classe I et II (Figure 8c).

L'utilisation d'ARNm permet de coder pour des protéines entières, afin de présenter de multiples épitopes, contrairement aux peptides. Cependant l'ARNm étranger peut être reconnu par les TLR et déclencher une réponse immunitaire, notamment la réponse interféron : si elle entraîne un contexte inflammatoire favorable à la RI, elle a également pour conséquence de freiner la traduction, empêchant la synthèse des protéines. Les ARNm utilisés pour les vaccins doivent donc être modifiés (élimination du triphosphate à l'extrémité 5' et ajout d'une coiffe) afin de ne pas être reconnus par les récepteurs de DAMPs. Les ARNm sont également sensibles aux RNAses, et peuvent être rapidement dégradés dans la circulation sanguine. L'ajout de polymère, de nanoparticules lipidiques et l'utilisation de voies d'administration locales (sous-cutanées, intra-musculaire, intra-tumorale) permet d'augmenter leur demi-vie biologique (Heine, Juraneck and Brossart, 2021).

Plusieurs essais cliniques sont en cours et montrent une augmentation de la RI suite à cette vaccination thérapeutique. Notamment, un essai de phase I chez des patients atteints par un mélanome de stade IIIB, C ou IV ont pu bénéficier de l'injection d'un mélange d'ARNm codant pour 4 antigènes tumoraux référencés : NY-ESO-1, MAGE-3, tyrosinase et TPTE (Sahin *et al.*, 2020). Les patients présentant au moins un de ces antigènes lors de biopsie ont reçu 8 vaccinations par injection intraveineuse. Des réponses partielles ont été observées, et l'analyse des échantillons de sang a montré une augmentation de la fréquence des LT CD8 et/ou CD4 reconnaissant l'un de ces antigènes.

La dernière approche en vaccination thérapeutique consiste à fournir directement au patient des CD activées et prêtes à déclencher une RI (Figure 8d). Ces cellules étant rares, leurs progéniteurs sont isolés à partir du sang périphérique par aphérèse, avant d'être cultivés, différenciés et activés *ex vivo*. Les CD matures sont alors chargées en peptides tumoraux avant leur ré-injection (Bol *et al.*, 2016). Ce chargement peut être effectué par la co-culture des CD avec :

- des peptides tumoraux pré-designés, comportant des épitopes CD4 et CD8 afin d'induire une réponse immunitaire optimale,
- des long peptides synthétiques constitués de plusieurs épitopes d'intérêt,
- des cellules tumorales lysées, afin de les charger avec un large éventail d'antigènes tumoraux,
- ou par incorporation d'ARN codant pour les antigènes tumoraux.

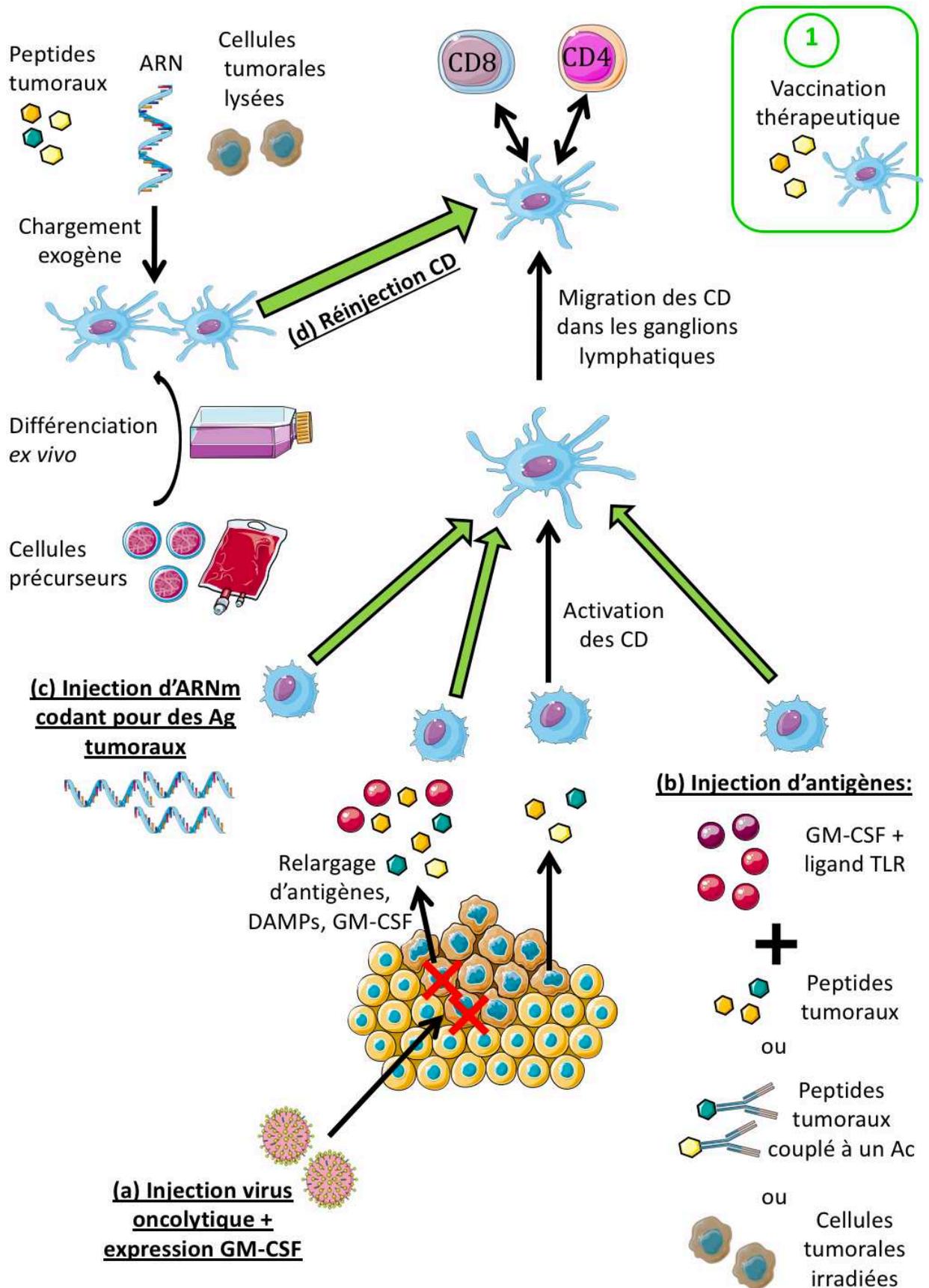


Figure 8 : Stratégies de vaccination thérapeutique

a) Injection de virus oncolytiques modifiés pour faire exprimer aux cellules tumorales le GM-CSF. b) Injection d'antigènes tumoraux, sous la forme de peptides seuls ou couplés à des anticorps ou de cellules tumorales. c) Injection d'ARNm codant pour des antigènes tumoraux d) Injection de cellules dendritiques matures, activées et chargées en peptides tumoraux.

### Transfert de cellules effectrices

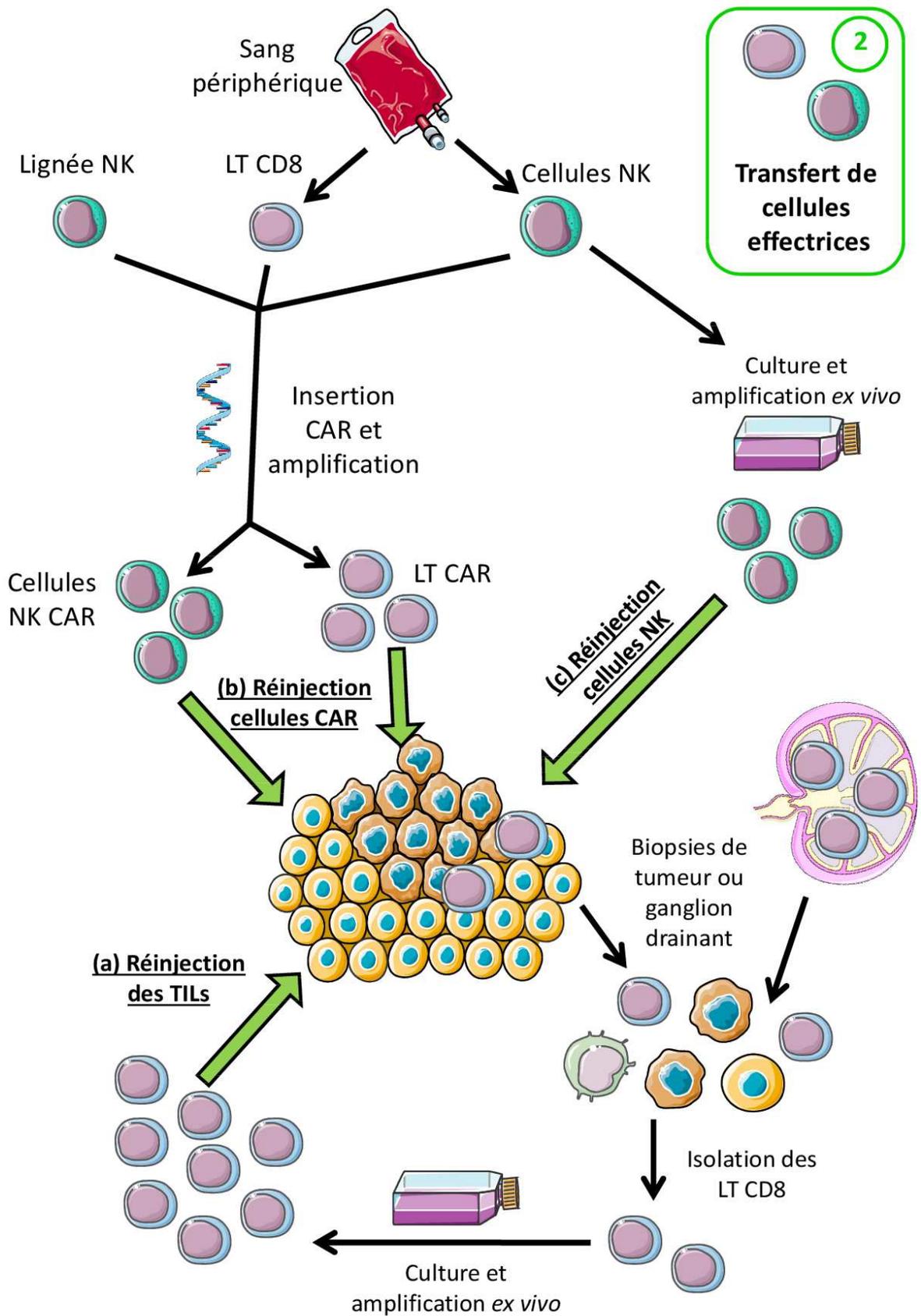
Une fois les CD activées, leur rôle est de déclencher la réponse immunitaire adaptative, consistant à activer les LT CD4 et CD8 en leur présentant des antigènes tumoraux. Les LT CD8 notamment, une fois activés, prolifèrent et migrent vers la tumeur où ils exercent leur activité cytotoxique vis-à-vis des cellules tumorales. Afin de décupler cette réponse, le transfert adoptif de LT a été envisagé.

Les LT utilisés proviennent généralement du patient. Dans le cas où des biopsies de tumeurs peuvent être obtenues, les TILs sont récupérés et amplifiés *ex vivo* (Figure 9a). Étant donné que ces lymphocytes infiltraient la tumeur, cette méthode permet théoriquement d'obtenir des LT spécifiques des cellules tumorales, préalablement activés. Néanmoins, il a été démontré dans le mélanome que tous les TILs ne reconnaissent pas les cellules tumorales, rendant nécessaire la purification des TILs réactifs à l'aide de leur expression de PD-1, Lag3, Tim3 et 4-1BB (Gros *et al.*, 2014). Dans le cas où l'obtention de biopsies s'avère impossible, l'obtention de LT à partir des ganglions lymphatiques drainants est également envisageable. C'est notamment le cas pour les cancers colo-rectaux, où les biopsies sont non utilisables car fréquemment contaminées par la flore intestinale (Fan *et al.*, 2018).

Cependant, toutes les tumeurs ne sont pas infiltrées par des LT CD8 cytotoxiques (CTLs). Des proportions plus faibles de TILs sont retrouvées dans les cancers autres que le mélanome, qui est particulièrement immunogène (Gokuldass *et al.*, 2020). La modification génétique de LT a donc été explorée, avec l'introduction dans le génome d'un récepteur antigénique chimérique (CAR) (Figure 9b). Ce récepteur est composé de la fusion de la partie variable d'un anticorps reconnaissant un antigène, à une partie transmembranaire et intracellulaire permettant la transduction du signal (typiquement domaine CD3 $\zeta$  couplé au domaine intracellulaire CD28) (Rosenberg and Restifo, 2015). Les constructions CAR de troisième génération présentent des modulations de leur domaines intracellulaires, qui peuvent également intégrer des éléments des récepteurs CD137/4-1BB, CD134/OX40 ou ICOS (Catros, 2019).

Ces LT CAR permettent de reconnaître des antigènes non présentés par le CMH, contrairement au système d'activation classique par le TCR. Ils agrandissent ainsi le champ des possibles antigènes ciblés, tout en posant la question de quel antigène cibler. Idéalement, la cible doit être exprimée uniquement par la tumeur afin d'éviter des potentiels effets toxiques liés au ciblage d'autres tissus par les LT. En réalité, de nombreux essais cliniques sont en cours avec des antigènes surexprimés sur les cellules tumorales par rapport aux tissus sains. Notamment, dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques des essais cliniques utilisant des LT CAR ciblant le CD19, largement exprimé par les lymphocytes B, sont en cours (Martino *et al.*, 2021).

Afin également de s'affranchir de la présentation antigénique par le CMH, des transferts de cellules NK sont réalisés. L'activation de ces cellules du SI inné ne nécessite pas de présentation d'antigènes par des CPA, mais repose sur une balance entre signaux activateurs et inhibiteurs présentés par les cellules tumorales. Brièvement, les cellules NK disposent d'un arsenal de récepteurs activateurs détectant des ligands du stress cellulaire, et de récepteurs inhibiteurs détectant des molécules inhibitrices et des molécules du CMH. Le transfert de cellules NK allogéniques est particulièrement prometteur, car les récepteurs inhibiteurs cellules NK du donneur ne reconnaissent pas le CMH du receveur, cette absence de signaux inhibiteurs décuple leur activité anti-tumorale (Lupo and Matosevic, 2019).



**Figure 9: Apport d'effecteurs de la Réponse Immunitaire**

a) transfert de lymphocytes infiltrant la tumeur ou provenant de ganglions lymphatiques drainants. b) Introduction de CAR dans les lymphocytes T ou cellules NK. c) transfert allogénique ou autologues de cellules NK amplifiées ex vivo.

Les cellules NK peuvent être isolées à partir de sang périphérique ou de cordon ombilical (Figure 9c), nécessitant de les amplifier *ex vivo*. Cependant obtenir un nombre suffisant de cellules NK ainsi s'avère plus difficile que pour les LT. Afin d'améliorer leur capacité anti-tumorale, l'introduction de CAR a également été réalisée chez les cellules NK (Figure 9b), malgré leur résistance à la transduction virale. D'autres méthodes de transduction (électroporation, nanoparticules) ont donc été développées, avec des constructions de récepteur CAR similaires à celles utilisées pour les LT (Siegler *et al.*, 2018). Afin d'obtenir plus facilement un grand nombre de cellules NK, et de faciliter la transduction de CAR, des lignées de cellules NK ont été utilisées. Cependant, ces lignées ayant été obtenues à partir de patients atteints de leucémie, elles doivent être irradiées avant leur injection, afin d'empêcher la pérennisation des cellules dans l'organisme (Fang, Xiao and Tian, 2017).

### Lever l'inhibition du système immunitaire

Une réponse immunitaire classique doit être contrôlée dans le temps et en intensité, afin de ne pas induire d'effets néfastes sur l'organisme et d'éviter des réactions auto-immunes. Divers freins à l'activation des cellules du SI existent donc de manière physiologique, et leur prolifération ainsi que leur fonction sont régulées par différentes molécules. Dans le cas d'immunothérapies, différentes stratégies ont donc été élaborées afin de lever de manière artificielle ses freins et ainsi augmenter l'ampleur de la RI. L'activation des LT dans les ganglions lymphatiques par les CD nécessitent trois signaux indispensables:

- Reconnaissance du complexe CMH-peptide par le TCR des LT,
- Liaison de CD28 (LT) à B7 (CD), qui envoie un deuxième signal d'activation,
- La présence de cytokines telles que l'IL-2 et l'IL-12.

Cependant, suite à l'engagement de leur TCR dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT augmentent l'expression dans les heures qui suivent d'une seconde molécule à leur surface, CTLA-4. Elle entre en compétition avec le CD28 pour se lier à B7, et envoie ainsi un signal inhibant l'activation des LT. De manière physiologique, ce mécanisme a pour but d'empêcher l'activation de LT qui aurait un TCR possédant une affinité trop forte pour leur complexe CMH/peptide. Une première stratégie a donc visé à injecter des anticorps bloquant CTLA-4 (Figure 10a), afin de faciliter l'activation des LT. Cette stratégie valut un prix Nobel en 2018 à James P Allison (Callahan, Wolchok and Allison, 2010; Yuan *et al.*, 2010), partagé avec TakusuHonjo, qui en 1992 découvrit le rôle de PD-1 (Ishida *et al.*, 1992).

Une fois que les LT ont migré dans la tumeur, la lyse des cellules tumorales présentant le bon complexe CMH/peptide peut être inhibée par la liaison de PD-1 (LT) à PD-L1, fréquemment exprimé à la surface des cellules tumorales. L'injection d'anticorps bloquant PD-1 (Figure 10b) permet alors d'inhiber ce blocage (Darvin *et al.*, 2018). De prime abord développés dans le mélanome, les anticorps anti PD-1 ou PD-L1 font aujourd'hui l'objet de très nombreux essais cliniques dans plusieurs cancers<sup>1</sup>. 10 anticorps ont été validés par la FDA, et le nombre d'essai clinique a triplé entre 2017 et 2020, avec notamment le développement de nouvelles combinaisons thérapeutiques (Upadhaya *et al.*, 2021). Depuis, plusieurs inhibiteurs du système immunitaire ont été découverts et ciblés en thérapie (André *et al.*, 2018; Marron *et al.*, 2021).

Les cellules NK peuvent également être la cible des anticorps dirigés contre les points de contrôles immunitaires. L'activité cytotoxique des NK est liée à la l'intégration de signaux par leurs récepteurs

---

<sup>1</sup> <https://www.cancerresearch.org/scientists/immuno-oncology-landscape/pd-1-pd-l1-landscape>

activateurs et inhibiteurs ; par conséquent des anticorps bloquant leurs récepteurs inhibiteurs est envisagée. L'utilisation d'anticorps bloquant le NKG2A a notamment été combinée à des anti-PD-1 dans des modèles pré-cliniques (André *et al.*, 2018).

Récemment, l'efficacité de ces traitements a été reliée au microbiote intestinal. Des premières études rétrospectives ont démontré une corrélation entre la prise d'antibiotiques et une réponse moindre aux anti-PD-1 et PD-L1 (Routy, Le Chatelier, *et al.*, 2018). Des études pré-cliniques ont ensuite mis en évidence le lien entre la présence de certaines bactéries dans la flore commensale et une meilleure réponse aux immunothérapies ou chimiothérapie immunogènes (Routy, Gopalakrishnan, *et al.*, 2018). Si le microbiote a bien un rôle primordial à jouer dans la réussite des immunothérapies, les mécanismes d'actions restent à ce jour peu connus. Parmi les hypothèses les plus probables, il est envisagé une migration de bactéries entières ou de PAMPs (PathogenAssociatedMolecular Patterns) dans les organes lymphoïdes secondaires, qui agiraient alors comme des adjuvants de la réponse immunitaire. Les principales cellules impactées par une altération du microbiote étant les CD, une possible migration de ces cellules de la lamina propria vers les organes lymphoïdes secondaires peut également expliquer cet impact, étant donné que des épitopes partagés entre certaines bactéries et tumeurs ont également été découverts (Fessler, Matson and Gajewski, 2019).

Plus proche du site tumoral, la composition moléculaire de la matrice extracellulaire peut également freiner la RI, et plus particulièrement l'activité des LT. La concentration en ATP et adénosine, régulée par l'expression des enzymes CD39 et CD73, a notamment un fort impact sur les LT. Son ciblage par des anticorps bloquants permet, *in vitro*, de restaurer les fonction des LT CD4 et CD8 en présence de fortes concentrations d'ATP (Perrot *et al.*, 2019).

La prolifération et l'action des cellules immunitaires sur le site tumoral sont aussi finement régulés par les cytokines. Elles peuvent être injectées par voie systémique aux patients, mais malgré leur efficacité thérapeutique, les effets secondaires néfastes ont conduit au développement de stratégies permettant un meilleur ciblage de la tumeur (Baldo, 2014). Notamment, le couplage avec des anticorps ou fragments d'anticorps ciblant la tumeur ou son environnement ont permis une diminution des effets toxiques des cytokines, tout en maintenant leurs effets thérapeutiques.

Comme mentionné précédemment, le GM-CSF permet le recrutement et la maturation des cellules dendritiques, mais il permet également d'augmenter l'expression de molécules d'adhérence à la surface des monocytes et granulocytes (Figure 10c), facilitant leur extravasation dans les tissus. Le TNF- $\alpha$  (Figure 10d), qui augmente la perméabilité vasculaire, permet également l'augmentation de l'infiltrat intra-tumoral de cellules immunitaires (Murer and Neri, 2019). Ces deux cytokines sont utilisées, couplées à divers anticorps ciblant les cellules tumorales, dans des essais cliniques.

Les lymphocytes T et les cellules NK étant les principales cellules capables de lyser les cellules tumorales, l'injection d'IL-2, IL-12 et IL-15 a également été étudiée (Figure 10e). Parmi leurs nombreux effets, elles permettent notamment de stimuler leurs fonctions cytotoxiques ainsi que leur prolifération. Enfin, pour faciliter la reconnaissance des cellules tumorales par les LT, l'injection d'IFN $\gamma$  permet d'augmenter l'expression des molécules de CMH (Figure 9f), et ainsi permet une présentation accrue des antigènes tumoraux. Toutes ces cytokines ont donc été testées dans des essais cliniques, également couplées à des anticorps afin de limiter leurs effets secondaires toxiques (Valedkarimi *et al.*, 2017).

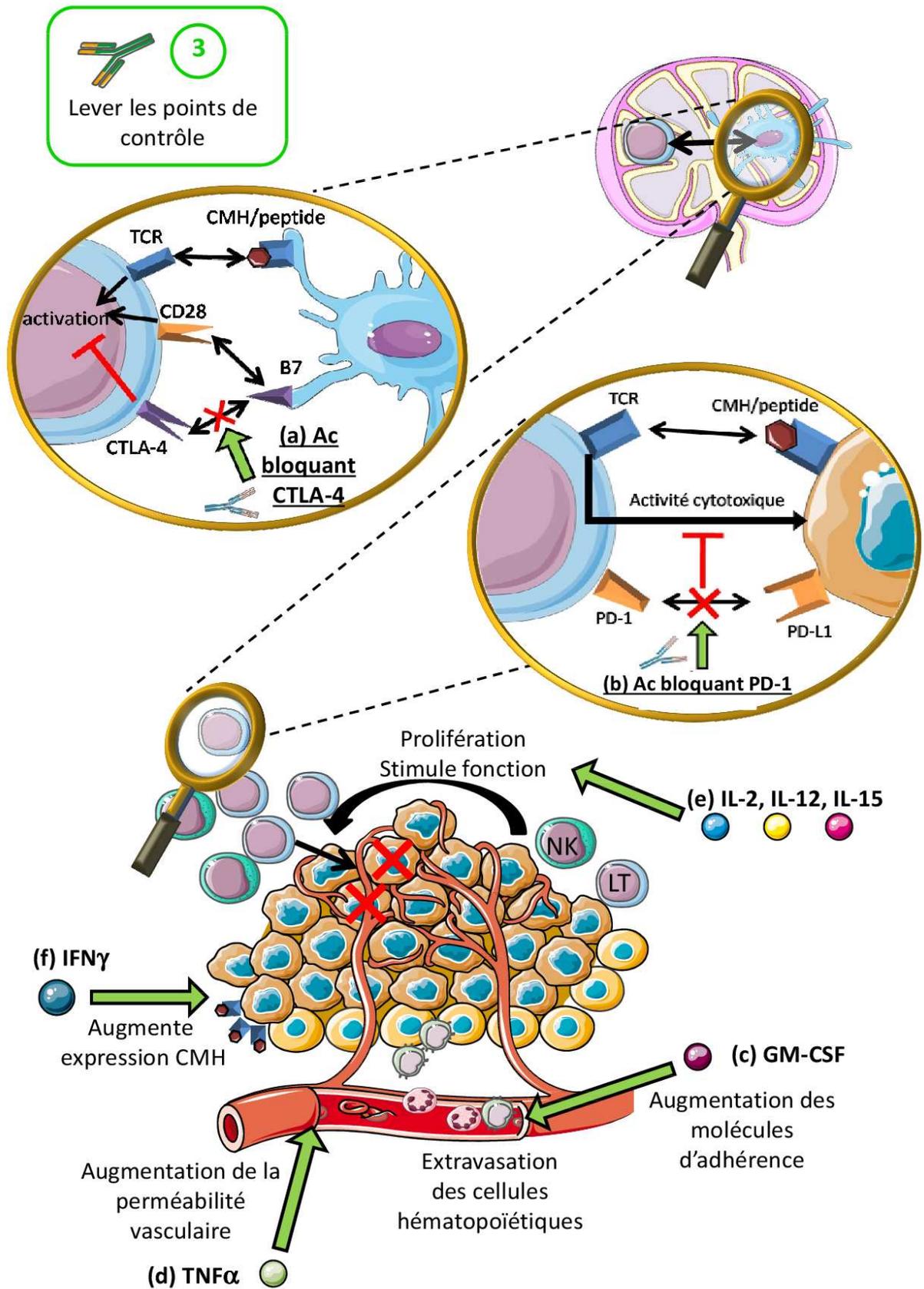


Figure 10 : Levée des points de contrôles.

a) Injection d'anticorps (Ac) bloquant CTLA-4 ou b) PD-1. Injection de cytokines : c) GM-CSF d) TNF- $\alpha$  e) IL-2, IL-12 ou IL-15 f) IFN- $\gamma$ .

## Succès et échecs des transferts adoptifs de lymphocytes T

De très nombreux essais cliniques d'immunothérapies ont été réalisés ou sont en cours actuellement. Dans le cadre de cette thèse, nous allons nous intéresser tout particulièrement au transfert adoptif de LT. Les premiers essais ont été conduits par l'équipe du Pr. Rosenberg, avec le premier essai clinique réalisé avec des TILs dans le mélanome en 1988 (Rosenberg *et al.*, 1988).

### Tumeur liquides

Les tumeurs liquides excluent la possibilité d'extraire des LT à partir de biopsies tumorales. Le développement des outils de modifications génétiques et le développement des LT CAR ont donc permis de générer artificiellement de grand nombre de LT tous dirigés vers un même antigène. La lymphodéplétion préalable au transfert adoptif a permis une meilleure acceptation de ces greffes de cellules, et une meilleure persistance dans le temps.

Parmi les très nombreux essais cliniques et différents antigènes tumoraux ciblés (Filley, Henriquez and Dey, 2018), le ciblage de CD19 a émergé comme une stratégie prometteuse dans le traitement des leucémies B. En effet, les leucémies aiguës lymphoblastiques, leucémies lymphoïdes chroniques et lymphomes diffus à grandes cellules B ont pu bénéficier d'essais cliniques, qui ont mis en évidence des rémissions durables de la maladie après traitement (Kochenderfer *et al.*, 2015; Porter *et al.*, 2015; Turtle *et al.*, 2016). Ces succès ont mené à l'approbation de LT CAR dans le traitement des enfants et jeunes adultes atteints de lymphome B diffus à grande cellules B par la FDA en 2017 (Novartis, 2017). Les essais cliniques se poursuivent, notamment dans le lymphome folliculaire où cette thérapie a pu induire jusqu'à 88% de réponse complète (Hirayama *et al.*, 2019).

Malgré ces résultats très encourageants, la toxicité liée au ciblage de l'antigène CD19 reste problématique. En effet, ce marqueur de la lignée B est exprimé non seulement par les cellules malignes, mais également par les lymphocytes B matures ou non. Le ciblage d'autres antigènes a donc été envisagé, notamment dans le myélome multiple. Ainsi, Ramos *et al.* ont réalisé sur des patients atteints de myélome multiple un transfert de LT avec un CAR dirigé contre la chaîne  $\kappa$  des Immunoglobulines exprimée à la surface des cellules de myélome multiple. Ceci a permis d'épargner les lymphocytes B normaux exprimant la chaîne  $\lambda$ , et ainsi améliorer le ciblage de la pathologie (Ramos *et al.*, 2016). Cet essai clinique de phase I a entraîné une stabilisation de la maladie de 6 à 24 mois pour 5 des 8 patients traités.

Une autre cible potentielle dans le myélome multiple est l'antigène de maturation des cellules B (BCMA), exprimé par les cellules malignes mais également sur les plasmocytes normaux. Plusieurs essais cliniques sont en cours, avec des réponses globales de 81% (Brudno *et al.*, 2018), pouvant même aller jusqu'à 88,2% (Xu *et al.*, 2019). Si ces résultats sont très encourageants, le ciblage de BCMA entraîne une toxicité hématologique non négligeable (Raje *et al.*, 2019). Tout comme pour le ciblage de CD19, la toxicité du ciblage de marqueurs tumoraux partagés avec des cellules du SI met en lumière la nécessité d'un ciblage plus précis des cellules tumorales.

### Tumeurs solides

Sur les tumeurs solides, le transfert de lymphocytes T a mené à des résultats moins concluants. De nombreux essais cliniques avec des LT CAR ont été menés, mais peu de rémissions complètes et durables ont été observées. Cependant les essais cliniques en cours sont de phase I/II, et visent à évaluer la faisabilité et la toxicité de ces transferts adoptifs, il est donc difficile d'évaluer leur efficacité thérapeutique. Plus de 40 essais cliniques de CAR dans des tumeurs solides sont actuellement référencés

sur le site [https:// clinicaltrials.gov/](https://clinicaltrials.gov/) du National Institute of Health. Parmi les essais les plus prometteurs figurent :

- le transfert de LT CAR anti-CEA (antigène carcino-embryonnaire) dans le cancer colorectal. Le CEA est exprimé de manière quasi-exclusive sur les cellules tumorales. Une étude a mis en évidence une diminution du volume tumoral par imagerie TEP/TDM pour 2 des 10 patients de cette étude (C. Zhang *et al.*, 2017),
- le transfert de LT CAR anti-HER2 dans le sarcome. HER2 est exprimé dans de nombreux cancers, et représente donc une cible intéressante. Une étude sur 19 patients atteints d'ostéosarcome a montré une stabilisation de la maladie pour 3 d'entre eux (Ahmed *et al.*, 2015),
- le transfert de LT CAR anti-EGFR, également une cible commune à plusieurs cancers. Cette thérapie a permis à 5 patients sur 11 atteints de cancer du poumon réfractaire aux traitements et/ou métastatique d'atteindre une stabilisation de la maladie (Feng *et al.*, 2016).

Toutes ces études ont démontré une migration des LT CAR au niveau de la tumeur par analyse histologique de biopsies, mais aucune n'a pu mettre en évidence une régression tumorale. A l'exception d'une étude sur le neuroblastome où 11 patients présentant une tumeur active ont pu bénéficier d'un transfert de LT CAR dirigés contre le disialoganglioside GD2, où l'étude a mis en évidence une réponse complète chez 3 de ces patients. Le suivi des LT CAR dans le sang a montré leur persistance jusqu'à 4 ans après le traitement, mais en très faible quantité (Louis *et al.*, 2011).

Si les régressions tumorales suite au transfert de lymphocytes T CAR sont rares, la présence de tumeurs solides ouvre la possibilité à l'extraction de TILs à partir de biopsies. Cela a très majoritairement été développé dans le mélanome, tumeur très immunogène qui semble pouvoir permettre de produire des TILs *ex vivo* de manière répétable. A partir de biopsies, des TILs ont donc été extraits et amplifiés avant d'être réinjectés aux patients, en général en parallèle d'injection d'IL-2 afin d'aider à leur prolifération *in vivo*. Plusieurs études ont alors mis en évidence des réponses complètes pour des patients atteints de mélanome métastatique (Besser *et al.*, 2010; Saint-Jean *et al.*, 2018). Notamment, une étude prospective sur une centaine de patients a pu mettre en évidence un taux de réponse complète de 24% (Goff *et al.*, 2016).

Cependant toutes les tumeurs ne sont pas accessibles, ou ne sont pas suffisamment infiltrées en lymphocytes pour permettre d'amplifier *ex vivo* des TILs en quantité suffisante. Dans le cas du cancer colorectal, l'utilisation du ganglion sentinelle à la place de biopsie tumorale a tout de même permis de réaliser des transferts de LT. Cette méthode a permis dans un essai pilote (Karlsson *et al.*, 2010) puis dans un essai de phase I/II (Zhen *et al.*, 2015) d'induire des réponses complètes chez une partie des patients.

Afin d'améliorer les réponses après transfert adoptif, des combinaisons avec d'autres immunothérapies sont en cours d'évaluation. Notamment, des transferts adoptifs de LT ont été combinés à une vaccination par injection de cellules dendritiques, dans un essai clinique pilote dans le mélanome métastatique (Poschke *et al.*, 2014), et dans le glioblastome (Reap *et al.*, 2018). Cette dernière étude a mis en évidence une augmentation du nombre de LT transférés exprimant les cytokines IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et CCL3 par rapport au groupe ayant reçu un véhicule à la place des cellules dendritiques. Également dans le mélanome, le transfert de TILs a été associé à une injection d'adénovirus exprimant l'IFN $\gamma$ , et a pu induire une réponse complète chez 3 patients sur 13 atteints de mélanome métastatique au stade IV (Khammari *et al.*, 2015). De nombreux essais cliniques sont donc en cours, utilisant le transfert de cellules, seul ou en

combinaison avec d'autres thérapies dont la radiothérapie, la chimiothérapie, d'autres immunothérapies telles que les inhibiteurs de points de contrôles<sup>2</sup>.

Malgré les innovations et nouvelles combinaisons thérapeutiques, la régression tumorale de cancers solides semble plus difficile que celle de cancers liquides. Cette différence d'efficacité peut s'expliquer en partie par le microenvironnement tumoral. Dans le cas de tumeur solides, de nombreux mécanismes se sont mis en place au niveau du TME pour bloquer la réponse immunitaire endogène. Ces mécanismes d'échappement à la RI sont particulièrement adaptés pour résister aux immunothérapies. Les patients répondant sont ceux qui présentent des TME « chaud », signe qu'une RI est déjà en place. Dans le cas d'un TME « froid », ou de « désert immunologique », une modification profonde du microenvironnement tumoral est nécessaire à une réponse favorable aux immunothérapies.

## Radiothérapie interne vectorisée

### Intérêt et principe général

Parmi les traitements à même d'avoir un impact sur le TME figure la radiothérapie interne vectorisée (RIV). Elle consiste en l'injection d'un vecteur radiomarqué, afin de cibler et d'irradier les cellules tumorales. L'administration en systémique permet de cibler les différents foyers cancéreux, contrairement aux irradiations externes. Les premières injections de radioéléments ont été réalisées afin de soigner des troubles d'hyperthyroïdies, en 1939. Elles ont été permises par un travail conjoint entre Karl Compton et Saul Hertz, qui a mené à la production grâce à un cyclotron d'iode radioactif artificiel, l'iode-128 (Becker and Sawin, 1996). Suite aux premières études montrant une accumulation rapide dans la thyroïde de l'iode-128, son utilisation pour le traitement des hyperthyroïdies fut développée.

Cependant la demi-vie de 25 minutes de ce radioélément poussa rapidement la recherche vers le développement et l'utilisation de deux autres radioéléments : l'iode-131 (demi vie : 8 jours) et l'yttrium-90, plus énergétique (demi vie : 2,5 jours). L'utilisation de radioéléments fut également élargie au traitement des cancers, notamment les cancers hématologiques (Goldsmith, 2020). Les effets biologiques des rayonnements ionisants peuvent être directs ou indirects. Les effets directs sont liés au dépôt d'énergie au niveau de l'ADN, provoquant des cassures simple ou double brins (Baskar *et al.*, 2014). Les effets indirects sont liés à la production de ROS induits suite à la radiolyse de l'eau. Cette radiolyse engendre la formation de radicaux libres et d'électrons, qui peuvent à leur tour soit attaquer directement les molécules d'ADN, soit réagir avec d'autres molécules d'eau ou de dioxygène, générant ainsi des radicaux libres secondaires hautement réactifs tels que O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Kawamura, Qi and Kobayashi, 2018). Si les ROS font partie des sous-produits de la chaîne respiratoire mitochondriale, et participent à des mécanismes physiologiques tels que la réparation des tissus, un excès de ROS conduit à un stress oxydatif et des lésions à l'ADN pouvant entraîner la mort cellulaire programmée (Dong *et al.*, 2020).

Un des principaux freins au développement de la RIV est la détermination d'une cible, et le choix d'un vecteur permettant, une fois le radiopharmaceutique injecté, d'atteindre les cellules tumorales afin de les irradier. L'injection systémique implique peu de contrôle de la dose délivrée à la tumeur, de plus les cellules tumorales n'exprimant pas le marqueur ciblé risquent d'être épargnées par le traitement

---

<sup>2</sup><https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=cancer&term=&intr=Adoptive+immunotherapy&cntry=&state=&city=&dist=&Search=Search>

(Karagiannis, 2007). De plus, l'antigène tumoral ciblé est généralement surexprimé par la tumeur, mais également exprimé par certains tissus sains, entraînant leur irradiation.

L'utilisation d'émetteurs  $\beta$  permet de pallier l'expression hétérogène des marqueurs tumoraux grâce à leur long parcours dans la matière (quelques millimètres). Les deux premières RIV acceptées par la FDA ciblaient toutes deux le CD20 dans le lymphome B non hodgkinien, à l'aide d'anticorps couplés soit à l'yttrium-90 (Zevalin) ou l'iode-131 (Bexxar) avec une remarquable efficacité, même si le traitement Bexxar fut stoppé en 2014. L'iode-131 a également été utilisé dans le traitement du cancer médullaire de la thyroïde métastatique, pour lequel aucun traitement n'existe actuellement. Une RIV en deux temps, en utilisant un anticorps bispécifique anti CEA (antigène carcino embryonnaire) et DTPA (Diethylene Triamine Pentaacetic Acid) injecté au patients, suivi 4 jours plus tard de l'injection d'un haptène couplé à l'iode-131 a été réalisée. Cette technique de pré-ciblage permet de diminuer l'irradiation des tissus sains ; en effet la molécule radiomarquée est un haptène, de petite taille et de biodistribution rapide. Cette RIV pré-ciblée a permis l'augmentation de la survie globale des patients (Chatal *et al.*, 2006). Un essai clinique de phase II a également mis en évidence une stabilisation de la maladie pendant plus de 6 mois chez 73,8% des patients (Salaun *et al.*, 2012).

Deux autres cancer solides sont particulièrement étudiés : les tumeurs neuro-endocrines (TNE) et le cancer de la prostate résistant à la castration (Goldsmith, 2020). Les tumeurs neuroendocrines expriment à leur surface des récepteurs de la somatostatine pouvant être ciblés par divers peptides, qui ont été dans un premier temps radiomarqués à l'yttrium-90. Cependant c'est le développement de ces mêmes peptides radiomarqués au lutétium-177, un autre émetteur  $\beta$  de plus faible énergie, qui permet de diminuer la toxicité associée au traitement et de commencer un essai clinique de phase III (Strosberg *et al.*, 2017). Les tumeurs de la prostate, quant à elles, sont caractérisées par leur expression de PSMA (Antigène Membranaire Spécifique de la Prostate), qui peut également être ciblé grâce à des peptides radiomarqués au lutétium-177, avec des essais cliniques de phase II en cours (Hofman *et al.*, 2018; Kesavan *et al.*, 2018).

L'utilisation de radioéléments émetteurs de particules alpha est plus tardive, de par leur moindre disponibilité. Leur énergie très élevée et faible parcours dans la matière semblent prédisposer ce type de radioéléments aux tumeurs liquides (Kraeber-Bodéré *et al.*, 2014). Ce fut le cas de la première RIV- $\alpha$  injectée, qui cibra le CD33 à l'aide d'un anticorps radiomarqué au bismuth-213 dans le cas de leucémie aiguë myéloïde (Jurcic *et al.*, 2002). D'autres cibles tel que le CD20, CD22 et CD19 ont par la suite été étudiées dans le même type de cancer. Néanmoins, si leur faible parcours dans la matière ne semble pas être optimal pour le traitement de masses tumorales solides, plusieurs essais cliniques sont venus contredire cette idée.

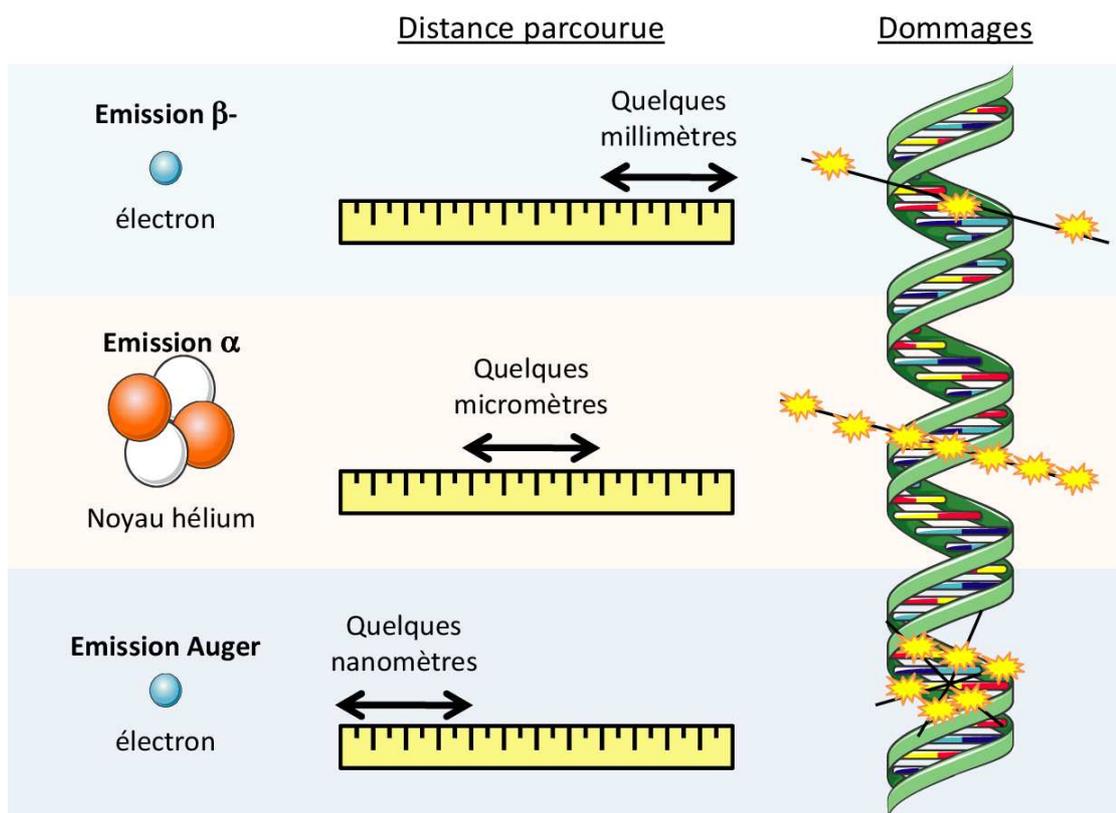
Dans le cas des tumeurs neuroendocrines, 7 patients réfractaires au traitement par des analogues de la somatostatine radiomarqués au lutétium-177 ont pu bénéficier de la même thérapie, mais utilisant le bismuth-213. Des réponses partielles ont été observées chez les patients (Kratochwil *et al.*, 2014). Des régressions tumorales impressionnantes ont également été observées par imagerie TEP dans le cas de cancers de la prostate métastatiques, après traitement à la RIV- $\alpha$  utilisant l'actinium-225 (Kratochwil *et al.*, 2017; Sathekge *et al.*, 2019). Un des cancers les plus agressifs, le mélanome métastatique, a également fait l'objet de traitement par la RIV- $\alpha$ . La faisabilité du ciblage de la protéine MCSP (Melanoma Chondroitin Sulfate Proteoglycan) à l'aide de l'anticorps 9.2.27 radiomarqué au bismuth-213 a été testé dans une première étude en réalisant des injections dans les lésions tumorales (Allen *et al.*, 2005). L'absence de toxicité dans ce premier essai a permis par la suite l'injection en intraveineuse de cette même RIV chez 22 patients atteints de mélanome métastatique au stade IV, dans un essai clinique de

phase I (Raja *et al.*, 2007). Une absence de toxicité rénale, ainsi que la stabilisation de la pathologie chez 50% des patients montre le potentiel de cette thérapie. Les radioéléments présentent donc des effets thérapeutiques différents suivant le type de particules émises. Leur différentes propriétés sont décrites dans la partie suivante, ainsi que les différents critères de choix lors de la mise au point d'une RIV.

### Les différents émetteurs

Différents types de radioéléments peuvent être utilisés en thérapie (Karagiannis, 2007; Gudkov *et al.*, 2015), et se caractérisent par leur émissions et sont résumés en [Figure 11](#) :

- Les émetteurs beta- ( $\beta^-$ ), caractérisés par l'émission d'un électron. Leur énergie est moyenne (de 800 KeV pour le lutetium-177 à 2,3 MeV pour l'yttrium-90) et leur parcours dans la matière de l'ordre de quelques millimètres.
- Les émetteurs alpha ( $\alpha$ ), caractérisés par l'émission d'un noyau d'hélium. Leur énergie est élevée (5,9 MeV pour l'astate-211, 5,5MeV pour le bismuth-213) et leur parcours dans la matière de quelques dizaines de micromètres.
- Les électrons Auger, dont l'émission fait suite à une conversion interne ou capture électronique. Leur principale caractéristique est leur parcours très faible dans la matière, de l'ordre de quelques nanomètres, nécessitant un ciblage nucléaire afin d'obtenir des dommages à l'ADN.



*Figure 11 : Différents types de radioéléments utilisés en Radiothérapie Interne Vectorisée (Gudkov *et al.*, 2015)*

Le choix du radioélément, en radiothérapie interne vectorisée, fait intervenir plusieurs critères :

- Le radioélément est injecté couplé à un vecteur, et les propriétés du radioélément ainsi que sa demi-vie doivent être compatibles avec les propriétés et demi-vie biologique de ce vecteur. Dans le cadre de cette thèse, le ciblage de l'antigène tumoral membranaire se fera à l'aide d'un anticorps. Ce type de vecteur n'est pas adapté aux émetteurs d'électrons Auger, dont le faible parcours dans la matière n'est pas compatible avec un ciblage membranaire.
- Dans le cas de la thérapie, le radioélément doit avoir un TEL (Transfert d'Énergie Linéique, correspondant à l'énergie déposée rapportée à la distance parcourue dans la matière) le plus élevé possible, afin d'induire un maximum de dommages à l'ADN. De plus, afin de limiter les dommages portés aux tissus sains, un parcours dans la matière faible est préférable, notamment dans le cas de tumeurs de petits volumes. C'est le cas des particules alpha, qui ont un parcours dans la matière de l'ordre de quelques diamètres de cellules, et qui présentent des TEL élevés (100keV/mm contre 0,2keV/mm pour les  $\beta$ ).
- Les émetteurs alpha présentent l'avantage supplémentaire de ne pas voir leurs effets cytotoxiques limités par l'hypoxie tumorale. En effet, l'hypoxie et donc un niveau d'oxygène faible engendre une moindre formation de ROS, protégeant l'ADN des émetteurs de type beta. A l'inverse, les effets cytotoxiques des émetteurs alpha ne semblent pas être impactés par les conditions hypoxiques (Maucksch *et al.*, 2018; Reissig *et al.*, 2020).
- Aux contraintes théoriques s'ajoutent des contraintes matérielles ; pour qu'un émetteur alpha soit utilisé en thérapie, il doit être productible et disponible en quantité suffisante. Le [Tableau I](#) référence les principaux émetteurs alpha remplissant ces différentes conditions et utilisés en thérapie interne vectorisée.

Nom du radionucléide	Energie maximale	Demi-vie
Bismuth-213	5,8 MeV	45 minutes
Astate-211	5,9 MeV	7 heures
Actinium-225	5,8 MeV	10 jours
Radium-223	5,7 MeV	11,3 jours

*Tableau I : Nom et propriétés des principaux émetteurs alpha étudiés en clinique (Gudkov *et al.*, 2015)*

## Impact sur le microenvironnement tumoral

### Les effets sur les cellules tumorales

La majorité des études se penchant sur l'impact des rayonnements alpha sur les tumeurs documentent principalement les effets sur les cellules tumorales. Notamment, l'apparition de cassures double brins a été observée dans de nombreuses lignées tumorales *in vitro* et *in vivo*. Dans un modèle de cancer ovarien, 80% des cellules tumorales humaines greffées présentent ces cassures double brins après une RIV utilisant un anticorps anti-HER-2 couplé au bismuth-213, contrairement au groupe contrôle pour lequel seulement 10% des cellules tumorales présentent ce type de dommages (Dekempeneer *et al.*, 2020). Des dommages similaires sont observés avec un autre émetteur alpha, l'astate-211, de manière dose dépendante (Li *et al.*, 2017).

Une conséquence directe des dommages causés à l'ADN est le blocage du cycle cellulaire, les cellules devant s'arrêter afin de tenter de les réparer. Le blocage en phase G2/M a été observé dans plusieurs études (schéma récapitulatif [Figure 12a, b et c](#)) :

- dans des lignées cellulaires neuroendocrines ciblées avec de l'actinium-225 (Graf *et al.*, 2014)
- dans des cellules souches de glioblastome, ciblées avec la substance P radiomarquée à l'actinium-225 (Majkowska-Pilip *et al.*, 2018)
- sur des lignées de leucémie aigüe myéloïde ciblées avec un anticorps anti-CD33 radiomarqué au bismuth-213 (Friesen *et al.*, 2013)
- dans une lignée de lymphome non Hodgkinien ciblée avec un anticorps anti-CD20 radiomarqué au bismuth-213 (Roscher *et al.*, 2013)
- Dans une lignée leucémique, ciblée avec un anticorps anti-CD45 également radiomarqué au bismuth-213 (Friesen *et al.*, 2007)
- Dans une lignée de myélome multiple humaine irradiée avec un anticorps anti-CD138 ou anti-Muc-1, radiomarqués au bismuth-213 (Supiot *et al.*, 2002)
- Dans une lignée de myélome multiple murine, après irradiation non spécifique avec de la BSA radiomarquée au bismuth-213 (Gorin *et al.*, 2015)

Le blocage en phase G2/M semble donc être systématique suite à l'irradiation alpha, quel que soit le radioélément, le ciblage ou la lignée tumorale. Si les dommages sont irréparables, ils mènent en général à la mort par apoptose. Dans le cas où les dommages ne sont pas suffisants pour induire la mort cellulaire, de nombreux gènes peuvent alors être mutés. Dans le cas d'un modèle de cancer de la prostate, la protéine Kh2 (human Kallikrein related peptidase 2), a été ciblée par un anticorps radiomarqué à l'actinium-225. Cette enzyme membranaire est régulée par le récepteur aux androgènes (AR) et est fortement exprimée dans les tissus prostatiques. Cette étude a mis en évidence des modulations dans l'expression de gènes chez les cellules tumorales survivantes. Notamment, l'expression de MMP7 et SCHLAD1, deux gènes impliqués dans la formation de métastases, ont été surexprimés dans des tumeurs ayant résisté à une thérapie ciblée à l'actinium-225 (Bicak *et al.*, 2020).

Cependant, ces mutations génétiques suite aux irradiations peuvent également être mises à profit pour la thérapie. Dans une seconde étude utilisant le même modèle, il a été démontré que les irradiations induisent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Parmi eux se trouve le facteur de transcription AR (récepteur aux androgènes). Outre son rôle dans la réparation de l'ADN, il induit également la production de Kh2. L'irradiation permet ainsi une boucle permettant l'augmentation de l'expression de la cible : le ciblage de Kh2 permet l'irradiation des cellules et des dommages à l'ADN, qui induisent une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans leur réparation, dont le facteur de transcription AR. Ce dernier induit alors une augmentation de l'expression de Kh2 (McDevitt *et al.*, 2018).

Ces effets cellulaires se traduisent par des modifications histologiques des tumeurs *in vivo*. Une augmentation des zones de nécrose ([Figure 12d](#)) a notamment été reportée (Salvanou *et al.*, 2020), conséquence directe des effets cytotoxiques des irradiations. Une étude histologique plus poussée a été menée par Oshima *et al.*, dans un modèle préclinique de phéochromocytome, une tumeur rare se développant à partir des cellules médullo-surrénales (Ohshima *et al.*, 2018). Les tumeurs contrôles présentent des structures en îlots, entourés de stroma fibreux. Après traitement avec de la norépinéphrine radiomarquée à l'astate-211, ces structures n'étaient plus observables en histologie. Les tumeurs après traitement se sont révélées plus hémorragiques, avec une expression réduite de Ki67, un marqueur de prolifération, ainsi qu'une augmentation de l'infiltrat lymphocytaire. Ces effets semblent

dose-dépendant, étant donné que l'analyse des tumeurs de souris ayant reçu des doses toxiques montrent des hémorragies plus prononcées, et un remplacement de certaines zones tumorales par du tissu fibreux.

### Les effets sur le stroma tumoral

Les irradiations alpha peuvent donc avoir des effets non seulement sur les cellules tumorales, mais également sur le stroma tumoral. Ces effets peuvent découler de l'irradiation directe des constituants du microenvironnement tumoral, ou être dû à l'impact du relargage de diverses molécules, telles que les DAMPs, par les cellules tumorales mortes. Un des principaux constituants du TME, les néo-vaisseaux, a été particulièrement étudié dans le cas des glioblastomes.

Des liposomes ciblant une intégrine présente à la fois sur les cellules endothéliales angiogéniques et sur les cellules marginales de glioblastome, radiomarqués avec l'actinium-225, ont permis de mettre en évidence un impact sur la barrière hémato-encéphalique (Sattiraju *et al.*, 2017). Après traitement du modèle orthotopique de glioblastome par injection intracrânienne des liposomes radiomarqués, les souris sont injectées par voie intraveineuse avec le bleu Evans. Après prélèvement, l'analyse des tranches de cerveau montre une nette augmentation de la pénétration du Bleu Evans dans le cerveau des souris traitées comparée aux souris contrôles. Cette augmentation de l'extravasation du Bleu Evans démontre une modification de l'étanchéité de la barrière hématoencéphalique, qui d'ordinaire ne permet pas le passage de cette molécule. Ces effets sont dose-dépendant, apparaissent dès deux jours après traitement et augmentent jusqu'à 10 jours post-traitement.

Deux autres études, menées dans un autre modèle de glioblastome, révèlent un autre impact des rayonnements alpha sur la néo-vascularisation. Behling et ses collaborateurs ont également utilisé l'actinium-225, mais couplé à l'anticorps E4G10, ciblant une cadhérine monomérique présente uniquement sur la néo-vascularisation tumorale, et absente des vaisseaux matures (Behling, Maguire, Di Gialleonardo, *et al.*, 2016; Behling, Maguire, Lopez Puebla, *et al.*, 2016). Les tumeurs du groupe contrôle présentent une néo-vascularisation tumorale tortueuse, avec une membrane basale discontinue et peu de jonctions entre les cellules endothéliales. 10 jours après traitement, une normalisation des vaisseaux est observée : la couverture des vaisseaux en péricytes et collagène de type IV est significativement augmentée, les vaisseaux sont plus organisés (Figure 12f), et globalement une diminution du nombre de cellules endothéliales est observée.

La fonctionnalité de ces vaisseaux tumoraux « normalisés » a été testée par l'injection de Dasatinib, un inhibiteur de tyrosine-kinase (BCR-Abl et famille Src principalement) étudié en pré-clinique pour le traitement des glioblastomes, marqué au carbone 14. Les autoradiographies de tranches de cerveau ont montré une augmentation de l'accumulation de Dasatinib de 58% dans le cas où les tumeurs étaient pré-traitées avec l'anticorps radiomarqué (Figure 12g). L'alpha thérapie semble donc avoir rendus les vaisseaux fonctionnels. Dans cette même étude, une quantification de l'infiltrat de lymphocytes T montre également une déplétion des LTregs au niveau tumoral après thérapie, révélant un potentiel impact de la radiothérapie alpha sur les cellules immunitaires du TME.

### Les effets sur les cellules immunitaires du TME

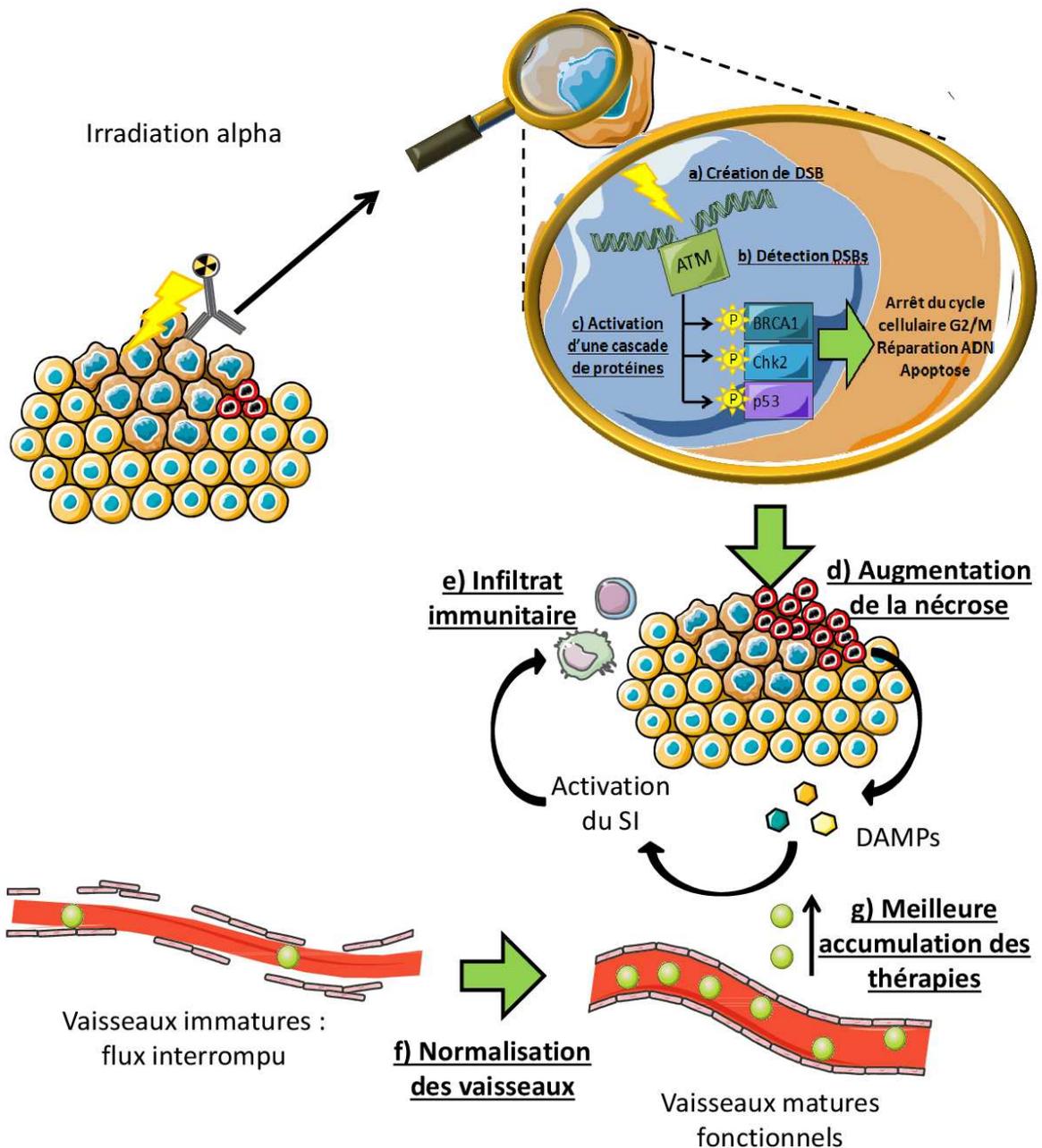
Une des premières preuves que les rayonnements alpha ont un impact sur le système immunitaire fut l'injection de cellules tumorales MC-38 préalablement irradiées de manière non spécifiques, *in vitro* avec de la BSA radiomarquée au bismuth-213 (Gorin *et al.*, 2014). Ces cellules irradiées ont pu agir comme un vaccin, et ont permis de protéger les souris lors d'une seconde greffe des mêmes cellules, 73 jours plus tard. 90% des souris vaccinées ont alors rejeté la seconde greffe tumorale.

L'isolement de lymphocytes T de souris naïves ou vaccinées a permis de mettre en évidence la présence de LT CD8 réactifs vis-à-vis de la lignée MC-38, uniquement chez les souris vaccinées. De plus, lorsque la même étude fut conduite dans des souris athymiques, ne possédant pas de lymphocytes T, la vaccination n'a pas pu conduire cette fois-ci au rejet de la seconde greffe. Par conséquent, les cellules tumorales irradiées ont pu protéger les souris d'une seconde greffe, par une activation du système immunitaire. *In vitro*, le milieu conditionné par les MC-38 irradiées contient des niveaux plus élevés d'Hsp70 et HMGB1 comparés aux contrôles. Ces DAMPs ou signaux de dangers sont indispensables au déclenchement d'une réaction immunitaire. Ce milieu conditionné a également permis d'activer des cellules dendritiques.

Une autre étude, menée *in vitro* sur des lignées cancéreuses de sein, poumon et de la prostate irradiées par le radium-223 ont révélé d'autres effets immunogéniques des rayonnements alpha. Après irradiation, un déclenchement de la réponse du réticulum endoplasmique au stress est observé, provoquant une augmentation de la production de calréticuline. Cette protéine a pour rôle d'aider le chargement de peptide sur les molécules du CMH de classe I, indispensable pour la reconnaissance des cellules par les lymphocytes. Les molécules HLA-A, B et C ont également vu leur expression membranaire augmentée, facilitant la reconnaissance des cellules tumorales par les LT CD8. Enfin, la réponse au stress du réticulum endoplasmique déclenche l'expression membranaire de la calréticuline, qui joue alors le rôle de DAMP envoyant un signal facilitant la phagocytose par les cellules dendritiques et leur subséquente production d'IFN $\gamma$  (Obeid *et al.*, 2007). Ces différents effets ont permis, *in vitro*, une sensibilité accrue des cellules tumorales aux LT CD8 (Malamas *et al.*, 2016).

Ces deux précédentes études montrent les effets immunogéniques indirects des rayonnements alpha, en passant par leur impact sur les cellules tumorales, mais n'étudient pas les effets directs des rayonnements sur les cellules du système immunitaire. Récemment, le ciblage du modèle de mélanome B16F10 dans une souris immunocompétente, à l'aide de nanoparticules radiomarquées à l'actinium-225, a pu mettre en évidence l'impact des rayonnements alpha sur ce TME (Urbanska *et al.*, 2020). Outre la diminution de la croissance tumorale, l'analyse histologique a révélé l'augmentation de l'infiltrat de LT CD3 et de macrophages suite à la thérapie (Figure 12e). Pour ces deux populations, l'augmentation commence dès 24h après traitement et atteint un pic au bout de 96h, avant de diminuer.

Le séquençage des cellules CD45+ extraites des tumeurs contrôles ou traitées a également pu révéler une augmentation des LT CD8 naïfs et des cellules NK. L'augmentation de l'expression de granzyme B, une molécule nécessaire à la lyse des cellules tumorales, montre également un effet favorable des rayonnements alpha sur la réponse anti-tumorale. Une diminution des macrophages non activés et une augmentation des macrophages de type M1 semble indiquer que les signaux de dangers relargués dans le TME ont permis l'activation des macrophages et leur polarisation en un phénotype anti-tumoral. Cependant, et contrairement à la précédente étude sur le glioblastome, une augmentation des LT CD4 régulateurs a été observée dans le TME.



*Figure 12 : Schéma récapitulatif des effets de la RIV- $\alpha$  sur le microenvironnement tumoral.*

Après irradiation, a) des cassures double brins (DSB) se forment dans l'ADN et sont détectés b) par les sérine/thréonine kinases ATM. Leur rôle est d'activer une série de kinases c) en les phosphorylant, qui vont jouer le rôle d'effecteur afin de stopper le cycle cellulaire, réparer l'ADN et, en cas de dommage irréparable, déclencher l'apoptose. Ceci provoque au niveau tissulaire d) une augmentation de la nécrose, permettant e) une activation du système immunitaire. Les irradiations permettent également une déplétion et normalisation des vaisseaux (f).

## Association thérapeutique

### Chimiothérapie

Afin d'optimiser l'effet thérapeutique des rayonnements alpha, la RIV- $\alpha$  a été associée à divers autres traitements anti-cancéreux. Les principaux effets des rayonnements étant les dommages causés à l'ADN, une des premières combinaisons testée fut l'association avec la chimiothérapie. L'objectif est d'utiliser les agents chimiothérapeutiques comme des radiosensibilisants. En effets, ils induisent un stress cellulaire qui empêche la division et donc la prolifération des cellules. Ces molécules peuvent cibler différentes étapes de la division cellulaire : la réplication de l'ADN avec des inhibiteurs d'enzymes tel que PARPi (Andrea, 2018), ou des analogues de nucléosides comme la gemcitabine (Saung *et al.*, 2017). Ils peuvent également agir sur les microtubules, en les stabilisants afin de bloquer les cellules en phase G2/M, comme c'est le cas pour le paclitaxel (Weaver, 2014), ou empêcher la réparation des cassures double brins de l'ADN en inhibant les enzymes impliquées dans ces réparations. Les cellules tumorales, qui sont caractérisées par une réplication élevée et une instabilité génomique, sont particulièrement sensibles aux agents chimiothérapeutiques.

Néanmoins, une première étude *in vitro* sur la combinaison de gemcitabine, un analogue de nucléoside, n'a pas permis une radiosensibilisation de lignées humaines de myélome multiple. Si le traitement avec le chimiothérapeutique induit un arrêt de la prolifération et une accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire, l'ajout d'anticorps anti-CD138 radiomarqué au bismuth-213 24h plus tard n'augmente pas la mort cellulaire (Supiot *et al.*, 2007). L'absence de radiosensibilisation des cellules tumorales par la gemcitabine peut s'expliquer par la radiorésistance des cellules en phase S.

*In vivo*, l'association de la chimiothérapie et de la RIV- $\alpha$  a principalement été étudiée dans le modèle de xénogreffe de carcinome du colon utilisant la lignée LS-174T. Cette lignée est traitée par un anticorps ciblant l'antigène HER2 radiomarqué au plomb-212 associé à la gemcitabine. Dans ce modèle pré-clinique, la RIV- $\alpha$  ou la chimiothérapie seule ont peu d'effet sur la croissance tumorale (Milenic *et al.*, 2007). Néanmoins, l'association thérapeutique permettra d'atteindre une médiane de survie de 196 jours, comparé au groupe traité avec la RIV- $\alpha$  seule qui présente une médiane de survie de 56 jours. Une étude plus approfondie des effets sur l'ADN de cette association montre une forte augmentation des cassures double brins associée à une inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN (K. J. Yong *et al.*, 2013). La gemcitabine permet donc de fragiliser les cellules tumorales dans ce modèle, optimisant l'effet thérapeutique de la RIV- $\alpha$ .

Dans le cas de ces deux études précédentes, le chimiothérapeutique est injecté 24h avant le traitement avec la RIV- $\alpha$ , afin de sensibiliser les tumeurs. Néanmoins, ce schéma thérapeutique n'est pas systématique, et deux études ont mis en lumière l'importance cruciale de tester différents séquences d'administration, afin de déterminer la bonne séquence thérapeutique à administrer, en fonction du type de chimiothérapeutique et du radioélément utilisé.

Dans le même modèle pré-clinique de carcinome colique, l'anticorps HER2 fut radiomarqué soit au plomb-212, soit au bismuth-213, et chaque RIV a permis une augmentation de la survie des animaux. L'association est réalisée avec le paclitaxel, une molécule ciblant et stabilisant les microtubules. Comme pour l'étude précédente, l'association thérapeutique de la RIV au plomb-212 a démontré une efficacité thérapeutique optimale lorsqu'elle était précédée par l'injection de paclitaxel. Le double traitement a permis d'augmenter la catastrophe mitotique, les dommages à l'ADN et par conséquent l'apoptose des cellules (Kwon Joong Yong *et al.*, 2013). A l'inverse, le traitement par la RIV au bismuth-213 précédé par l'injection de paclitaxel s'est révélé sans effet thérapeutique. Après plusieurs tests de séquence

thérapeutique, l'efficacité optimale est atteinte avec une première administration de paclitaxel suivie de la RIV au bismuth-213, suivie de 2 injections additionnelles de paclitaxel post-RIV- $\alpha$ .

Le bismuth-213 semble donc plus efficace lorsqu'il est suivi de chimiothérapie, tandis que le plomb-212 lorsqu'il est précédé par la chimiothérapie. Ces résultats furent confirmés dans une seconde étude, ou cette fois-ci la RIV au bismuth-213 ou plomb-212 fut associée au carboplatine. Ce chimiothérapeutique a un mécanisme d'action différent du paclitaxel, se liant à l'ADN afin de déformer l'hélice et induire des dommages nécessitant un arrêt du cycle cellulaire. A nouveau, une efficacité thérapeutique optimale a été atteinte pour la RIV au plomb-212 lorsqu'elle était précédée par la chimiothérapie, tandis que pour la RIV au bismuth-213, la combinaison optimale nécessite une injection de carboplatine après la RIV (Milenic *et al.*, 2013).

Bien que le plomb-212 et le bismuth-213 soit tous deux des émetteurs alpha, leurs propriétés différentes (notamment la demi-vie, de 10,6 heures et 45 minutes respectivement) peuvent induire des mécanismes d'action différents sur les cellules tumorales, nécessitant un ajustement des combinaisons thérapeutiques. De plus, la capacité de la chimiothérapie à radiosensibiliser les cellules semblent également dépendre du type de cellule tumorale, étant donné que des résultats contradictoires ont été observés *in vitro* sur des lignées de myélome multiple.

#### Augmenter l'accumulation du second traitement au site tumoral

La RIV- $\alpha$ , de par son impact sur les vaisseaux tumoraux, peut également être utilisée pour améliorer l'accumulation de chimiothérapie au niveau du site tumoral. Les études sur le glioblastome ont montré la possibilité de cibler les néovaisseaux afin de leur rendre leur fonctionnalité et de permettre une meilleure accumulation de drogues. De manière similaire, le ciblage des néovaisseaux tumoraux dans un modèle de carcinome du colon grâce à l'anticorps E4G10 radiomarqué à l'actinium-225 a permis de normaliser les vaisseaux, facilitant l'accumulation de petites molécules (Escorcia *et al.*, 2010). La RIV- $\alpha$  est soit précédée, soit suivie de l'injection de deux agents chimiothérapeutiques, la leucovorine et le 5-fluorouracile (5-FU). La séquence d'administration RIV- $\alpha$  puis chimiothérapie permet le meilleur effet thérapeutique. Associée à l'augmentation de l'accumulation de petites molécules sur le site tumoral après RIV- $\alpha$ , ces données semblent indiquer que la RIV- $\alpha$  permet une meilleure accumulation de la chimiothérapie au niveau du site tumoral, améliorant ainsi l'efficacité de la combinaison thérapeutique.

A l'inverse, certaines thérapies peuvent permettre une meilleure accumulation de la RIV- $\alpha$  sur le site tumoral. Ainsi, dans un modèle de cancer du sein triple négatif, les souris ont dans un premier temps reçu une thérapie hormonale composée de DHT, un agoniste du récepteur aux androgènes. L'activation de ce facteur de transcription permet l'expression de Kh2 à la surface membranaire des cellules tumorales. La combinaison de ce traitement avec un anticorps ciblant le Kh2 radiomarqué à l'actinium-225 a permis d'améliorer l'efficacité thérapeutique, passant la médiane de survie de 121 jours pour la RIV- $\alpha$  seule, à 313 jours pour l'association thérapeutique avec le DHT (Thorek *et al.*, 2019). De plus, la combinaison a permis d'augmenter l'expression de Kh2, la cible de la RIV- $\alpha$ , au niveau des cellules cancéreuses. Les études de biodistribution ont ainsi montré une meilleure accumulation à la tumeur et une diminution de l'irradiation des autres tissus sains, notamment le foie.

Dans le cas du cancer de la thyroïde, l'astate-211 est particulièrement étudié de par sa ressemblance avec l'iode, lui permettant d'être accumulé dans les cellules tumorales exprimant le symporteur NIS. Son activité thérapeutique dans des cellules cancéreuses exprimant ce transporteur a déjà été prouvée (Petrich *et al.*, 2006). Néanmoins, de nombreuses formes oxydées de l'astate coexistent

en solution aqueuse, empêchant leur passage par le symporteur NIS. Afin d'améliorer la pureté chimique de l'astate en stabilisant les formes oxydées, l'acide ascorbique (ou vitamine C) a été ajoutée à l'astate-211 avant injection à des souris xenogreffées avec K1-NIS, des cellules de cancer de la thyroïde humain transfectées pour exprimer le symporteur NIS. L'ajout d'acide ascorbique a permis *in vitro* d'améliorer la pureté chimique de l'astate-211, et *in vivo* d'augmenter l'accumulation du radioélément dans les cellules cancéreuses (Watabe *et al.*, 2019). Cette amélioration de la distribution s'est traduite par une augmentation de la survie des animaux.

### Grefe de moelle osseuse

La greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) allogéniques est le traitement référence de plusieurs pathologies hématologiques. Elle consiste en une irradiation de la moelle osseuse afin d'éliminer les cellules leucémiques et permettre la prise de greffe. Classiquement, une irradiation externe du corps entier est réalisée, ce qui expose de nombreux tissus sains aux irradiations. L'utilisation d'anticorps radiomarqués ciblant des antigènes présents sur les CSH peut permettre un meilleur ciblage de l'irradiation. Les particules alpha sont particulièrement adaptées à ce type d'approche, de par leur trajet très court dans la matière, leur permettant de tuer les cellules leucémiques isolées. De plus, le ciblage interne permet de dépléter le compartiment hématopoïétique en limitant la toxicité aux tissus sains, et facilite la prise de greffe de CSH allogéniques.

Ce concept fut testé chez des chiens sains, en utilisant un anticorps dirigé contre le CD45 radiomarqué au bismuth-213. Le CD45 est exprimé sur toutes les cellules souches hématopoïétiques, et le ciblage de cet épitope a permis de dépléter de manière efficace les cellules de la moelle osseuse. Après la greffe allogénique, la prise est mesurée par le pourcentage de chimérisme observé plusieurs semaines après le traitement. Dans ce cas, le chimérisme atteint était très hétérogène, allant de 30 à 70%, 27 semaines après greffe (Sandmaier *et al.*, 2002). Afin de réduire le rejet de greffe, une des principales complications liées à la greffe de cellules hématopoïétiques et principalement liée à une réaction des lymphocytes T, une étude similaire fut conduite en ciblant le TCR  $\alpha\beta$  (Bethge *et al.*, 2003). Une diminution de la toxicité au foie fut observée, mais un chimérisme plus faible qu'avec l'anti-CD45 fut obtenu. Ces deux anticorps furent à nouveau testés en parallèle avec une escalade de dose dans une tierce étude, où l'anticorps anti-CD45 permit à nouveau un chimérisme plus élevé que celui obtenu avec l'anticorps anti-TCR  $\alpha\beta$ , indiquant une meilleure prise de la greffe (Bethge *et al.*, 2004).

Afin d'améliorer la prise de la greffe, l'anticorps anti-CD45 fut radiomarqué avec un autre émetteur alpha : l'astate-211. Comparé au bismuth-213, il possède une demi-vie plus longue (7,2 heures pour l'astate-211 contre 45 minutes pour le bismuth-213). La faisabilité de l'association fut également testée chez des chiens sains, et a permis d'obtenir un chimérisme élevé et stable jusqu'à 52 semaines après la greffe (Chen *et al.*, 2012). Une étude dans un modèle pré-clinique murin de leucémie aigüe myéloïde fut donc réalisée. Après injection de l'anticorps anti-CD45 radiomarqué à l'astate-211 puis greffe de cellules de la moelle osseuse, 40% de souris on put être soignées (Orozco *et al.*, 2013). Actuellement, un essai clinique de phase I/II de cette combinaison thérapeutique est en cours (NCT03128034), afin de tester la toxicité et définir la meilleure activité de l'anticorps anti-CD45 radiomarqué à l'astate-211 à injecter.

## Objectifs de thèse

Peu d'associations de RIV- $\alpha$  avec des immunothérapies sont reportées. Or, le potentiel impact de la RIV- $\alpha$  sur le microenvironnement tumoral pourrait permettre d'améliorer l'action des immunothérapies. Connaître l'impact précis de la RIV- $\alpha$  sur les différents composants du microenvironnement tumoral est nécessaire afin de déterminer quelles associations thérapeutiques seraient les plus judicieuses.

L'objectif principal de cette thèse était donc d'évaluer, dans un modèle pré-clinique murin de myélome multiple, l'impact de la RIV- $\alpha$  sur le microenvironnement tumoral, et plus précisément sur les populations lymphocytaires présentes dans le TME. L'équipe 13 est spécialisée dans le traitement du myélome multiple par la RIV- $\alpha$ , et un modèle d'association thérapeutique la combinant avec un transfert adoptif de lymphocytes T CD8 a également été mis en place dans ce même modèle. Dans la continuité de ce premier travail, les mécanismes d'action de ces deux thérapies combinées ont donc été étudiés.

Les différentes méthodes d'étude du TME envisagées lors de ce travail étaient invasives, nécessitant le sacrifice de l'animal afin de prélever la tumeur pour analyse. Par conséquent, des méthodes de suivi des lymphocytes non invasives, par imagerie TEP, ont également été investiguées et seront détaillées dans la seconde partie de ce manuscrit.

## Partie microenvironnement tumoral

### Préambule : description du modèle

L'étude du microenvironnement est réalisée dans un modèle préalablement développé et décrit dans l'équipe 13 (Ménager et al., 2015). Il a consisté à greffer en sous-cutané la lignée murine de Myélome Multiple 5T33-OVA, qui exprime naturellement l'antigène CD138 et qui a été transduite pour exprimer le peptide SIINFEKL, extrait de la séquence de l'ovalbumine (OVA) présenté dans un contexte H-2K<sup>b</sup>.

Les souris ont été réparties de manière aléatoire entre les différents groupes traités :

- Groupe contrôle
- Groupe recevant la RIV- $\alpha$  (Figure 13) dix jours après greffe tumorale. Elle a consisté en l'injection intraveineuse de l'anticorps 9E7.4 (Fichou *et al.*, 2015), dirigé contre l'antigène CD138, radiomarqué avec du bismuth-213, un émetteur alpha. 3,7MBq ont été injecté par souris.
- Groupe recevant un transfert adoptif de 5 millions de lymphocytes T OT-1 (ACT), 11 jours après greffe tumorale. Ces lymphocytes proviennent de souris transgéniques exprimant un TCR reconnaissant le peptide OVA présenté dans un contexte H-2K<sup>b</sup>. Les lymphocytes ont été activés et amplifiés *in vitro* avant leur injection par voie intraveineuse.
- L'association de la RIV- $\alpha$  et du transfert adoptif de LT OT-1 (traitement 10 et 11 jours après greffe tumorale, respectivement).

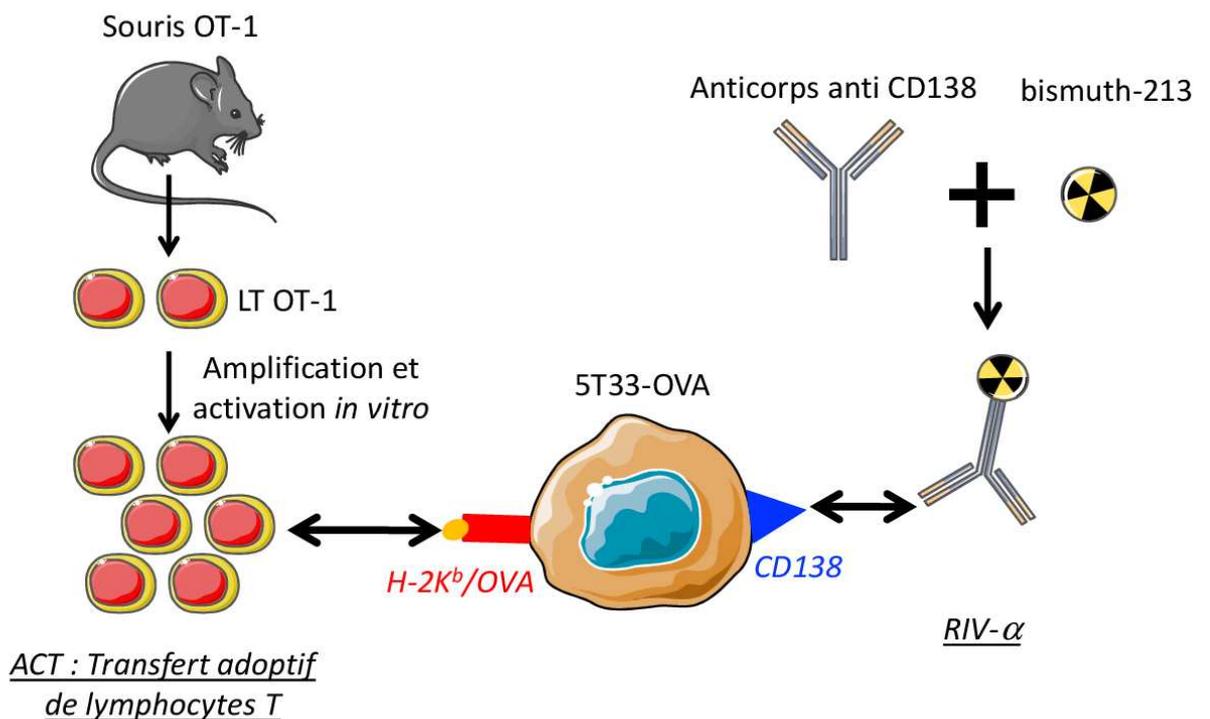


Figure 13 : Transfert adoptif de lymphocytes T (ACT) et RIV-a

L'expression des antigènes tumoraux ciblés par les thérapies, le complexe H-2K<sup>b</sup>/OVA et CD138, a été vérifiée par cytométrie en flux avant chaque expérimentation. Des histogrammes représentatifs des expressions obtenues sont présentés en Figure 14a. L'anticorps anti-CD138 (clone 9E7.4) utilisé pour la RIV- $\alpha$  a été couplé à un chélate, le CHX-A-DTPA, afin de permettre son radiomarquage au bismuth-213. Sa capacité à se fixer sur le CD138 une fois couplé a également été vérifiée par cytométrie en flux à l'aide d'un anticorps secondaire. Un cytogramme représentatif des résultats obtenus est présenté en Figure 14b. Enfin, la capacité des LT OT-1 à lyser les cellules cibles une fois activés *in vitro* a été vérifiée par un test de relargage du chrome-51. Ce test a été effectué sur les cellules cibles 5T33-OVA et sur des cellules 5T33 non reconnues par les LT OT-1. Un exemple représentatif des pourcentages de lyse spécifique des cellules cibles obtenus est représenté en Figure 14c.

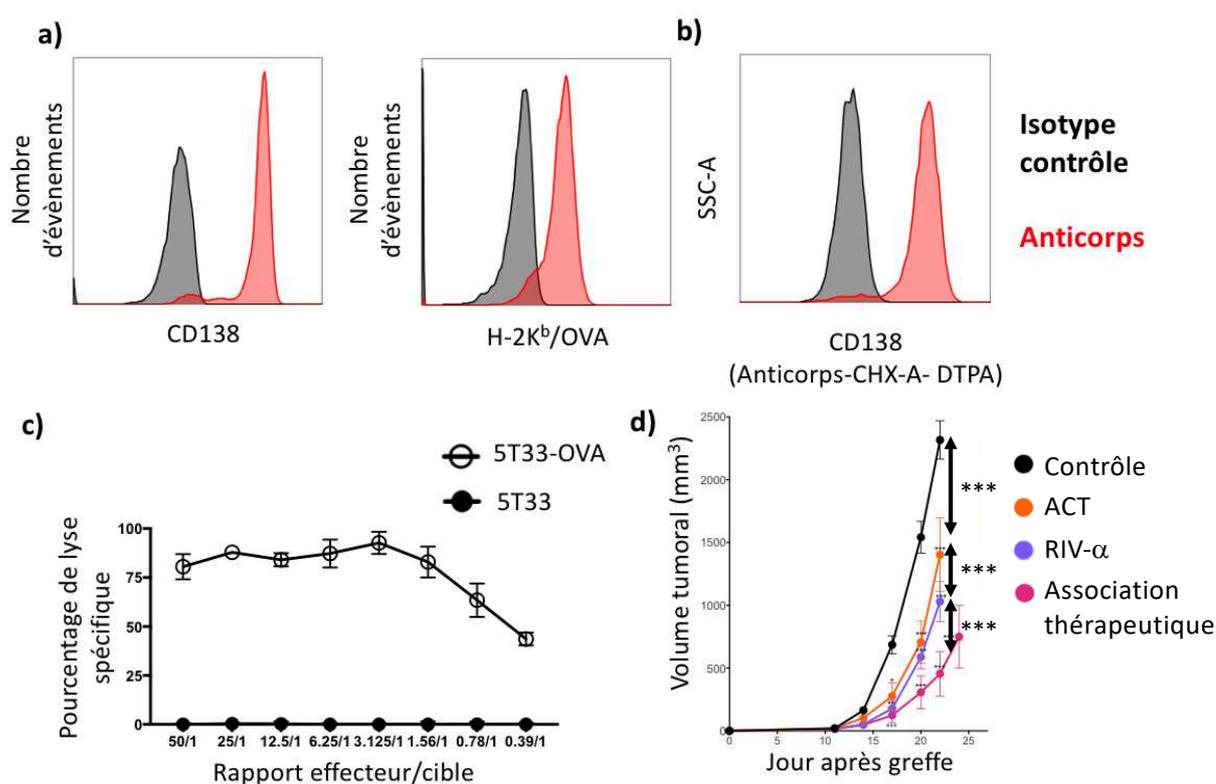


Figure 14: Contrôle des cellules tumorales et des thérapies.

a) expression mesurée par cytométrie en flux des antigènes CD138 et H-2K<sup>b</sup>/OVA sur les 5T33-OVA, superposition des isotypes contrôles en bleu et anticorps en rouge b) Fixation de l'anticorps anti-CD138 CHX-ADTPA utilisé pour la RIV- $\alpha$  sur les 5T33-OVA *in vitro* c) Activité cytotoxique des LT OT-1 *in vitro* après stimulation et avant injection pour l'ACT d) Croissance tumorale de la lignée 5T33 OVA *in vivo*, en fonction du traitement (n=10, \*\*\* = p<0,001, ANOVA à deux voies).

Cette association thérapeutique a permis une amélioration de la survie des souris et une diminution de la croissance tumorale (Figure 14d). Si l'ACT ou la RIV- $\alpha$  seule permettent une diminution de la croissance tumorale, celle-ci est encore plus prononcée avec l'association thérapeutique. L'étude des mécanismes d'action de ces deux thérapies, et plus précisément l'impact de la RIV- $\alpha$  sur le TME, ont ainsi été étudiés dans la première partie de cette thèse.

## Matériel et méthodes

### I - Culture des cellules tumorales

La lignée 5T33-OVA a été obtenue comme précédemment décrit (Ménager *et al.*, 2015). Les cellules sont conservées dans l'azote liquide par aliquot de  $5 \times 10^6$  cellules dans 10% de diméthylsulfoxyde et 90% de Sérum de veau fœtal (SVF). Pour chaque expérience, un aliquot est décongelé et les cellules sont cultivées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et 95% d'humidité, dans du milieu complet composé de RPMI 1640 (Thermofischer) supplémenté avec 10% de SVF (Biosera), 1% de glutamine, pénicilline et streptomycine (Gibco). Après amplification pendant 2 semaines, l'expression des marqueurs ciblés par la RIV- $\alpha$  et l'ACT (CD138 et complexe H-2K<sup>b</sup>/OVA, respectivement) sont vérifiés par cytométrie en flux. L'absence de contamination par des mycoplasmes est systématiquement vérifiée avant chaque greffe tumorale à l'aide du kit HEK-bluedetection (Invivogen). Les cellules sont ensuite lavées trois fois avec du tampon phosphate avant injection.

### II - Expérimentation animale

Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique d'expérimentation Animale des Pays de la Loire (protocole n°CEA.2013.2). Les animaux sont hébergés à l'Unité Thérapeutique Expérimentale (UTE, SFR François Bonamy, IRS-UN, Université de Nantes, licence n°B-44-278) dans les conditions conventionnelles. Des souris femelles C57BL/6KalwRij (ENVIGO) ayant 8 à 12 semaines d'âge au début des expérimentations sont utilisées pour les greffes tumorales.  $2 \times 10^6$  cellules sont injectées en sous-cutané dans le flanc droit des souris. 10 jours après la greffe, les souris reçoivent une injection de RIV- $\alpha$ , et une seconde injection de  $5 \times 10^6$  lymphocytes T OT-1 24h plus tard. Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale à des points prédéterminés, 16 et 19 jours après greffe, et les tumeurs sont prélevées pour l'étude du TME. La longueur, largeur et épaisseur des tumeurs sont mesurée à l'aide d'un caliper et le volume tumoral est calculé selon la formule suivante :

$$\text{volume tumoral (mm}^3\text{)} = \frac{\text{longueur} \times \text{largeur} \times \text{épaisseur}}{2}$$

### III - Radiothérapie interne vectorisée

L'anticorps anti-CD138 (clone 9E7.4) est conjugué en utilisant 20 équivalents de 2-(4-isothiocyanatobenzyl)-cyclohexyl-diéthylentriaminepenta-acetic acid (SCN-CHX-A"-DTPA, Macrocyclics, Dallas, TX, USA). Le nombre moyen de chélate par anticorps, vérifié comme précédemment décrit (Chérel *et al.*, 2013) est de 4. L'absence de dégradation de l'anticorps est vérifiée par UPLC avant chaque expérimentation (Cf Annexe 1, exemple de profil UPLC obtenu). 100 $\mu$ g d'anticorps immunoconjugué est utilisé pour le radiomarquage avec du bismuth-213, qui est élué à partir d'un générateur <sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi (European Commission, Joint Research Centre, Directorate for Nuclear Safety and Security, Karlsruhe, Germany). Le radiomarquage est réalisé en présence d'acétate de sodium 0,6M (pH 5,3) supplémenté avec 0,01% d'acide ascorbique pendant 10 minutes à 37°C. L'anticorps ainsi radiomarqué est purifié du bismuth-213 libre par chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne PD-10 (Sephadex G-25). La pureté radiochimique est vérifiée par migration sur ITLC-SG en utilisant un tampon citrate (pH=4,5), et est à minima supérieure à 96%. La RIV- $\alpha$  est administrée par l'injection de 3,7MBq de l'anticorps radiomarqué dans la veine caudale des souris.

#### IV - Culture des LT OT-1 et injection

Les souris OT-1 ont été modifiées génétiquement afin que leurs LT CD8 expriment un TCR reconnaissant le peptide SIINFEKL, extrait de la séquence de la protéine ovalbumine (OVA), présenté dans un contexte H-2K<sup>b</sup>. La rate et les ganglions de souris OT-1 sont prélevés et dissociés mécaniquement afin d'obtenir une suspension cellulaire. Après lyse des globules rouges à l'aide du kit Lysing buffer (BD Bioscience) selon les instructions du fournisseur, les LT CD8<sup>+</sup> sont isolés à l'aide du kit CD8<sup>+</sup> T Cell isolation kit mouse (Miltenyi). La stimulation des LT OT-1 est réalisée en les cultivant en présence de cellules spléniques provenant de souris C57BL/6, préalablement irradiées et chargées avec le peptide SIINFEKL (rapport LT OT-1/cellules spléniques de 1/5). Le milieu de culture des LT est composé de milieu DMEM high glucose (ThermoFisherScientific) complété avec 10% de SVF (Biosera), 1% de glutamine, penicilline et streptomycine (Gibco), 1% d'acides aminés non essentiels et Sodium pyruvate (Life technologies), 5µM de β-mercaptoethanol (Sigma) et 5U/mL d'IL-2. Les cellules sont stimulées pendant 3 jours avec ce milieu additionné de 20ng/mL d'IL-12. Après 3 jours de culture, les cellules sont remises en suspension et divisées en 4 puits complétés avec du milieu frais de culture des LT. Après 2 jours de culture supplémentaire, les cellules sont lavées trois fois en DPBS avant d'être utilisées.

#### V - Test de cytotoxicité

L'activité cytotoxique des LT O-1 est évaluée par un test de relargage du chrome-51. 1x10<sup>6</sup> cellules cibles (5T33 ou 5T33 OVA) sont radiomarquées avec 1,37MBq de chrome-51 (PerkinElmer) pendant 1h à 37°C, puis lavées trois fois. Les LT OT-1 sont ensuite cultivés avec les cellules cibles avec différents rapport effecteur/cible (de 50/1 à 0,39/1). Le minimum de relargage de chrome-51 est déterminé par l'incubation des cellules cibles avec du milieu, et le maximum de relargage par leur incubation avec du milieu complété avec 2,5% de Triton. Après 4h de co-culture, 25µL de surnageant de chaque puit est prélevé et ajouté à 100 µL de liquide scintillant (PerkinElmer). L'activité est comptée et le pourcentage de lyse spécifique est calculé de la manière suivante (chaque mesure est réalisée en triplicat) :

$$\% \text{ de lyse spécifique} = \frac{\text{activité puit} - \text{activité des puits minimum}}{\text{activité des puits maximum} - \text{activité des puits minimum}} \times 100$$

#### VI - Analyse par cytométrie en flux

Après prélèvement, les tumeurs sont dissociées mécaniquement entre deux lames de verre, et la suspension cellulaire ainsi obtenue est filtrée (filtre 70µM, Dutscher). Les globules rouges sont lysés et les cellules numérotées sur cellule de Malassez. Pour chaque tumeur et panel, 250 000 cellules sont incubées pendant 30 minutes avec les anticorps dirigés contre les marqueurs extracellulaires à température ambiante, dilués dans du milieu complet supplémenté avec du Fc block (anti CD16/32, BD bioscience). Pour chaque incubation avec des anticorps, des contrôles isotypiques adéquats sont réalisés en parallèle dans des conditions identiques. Les échantillons sont lavés deux fois dans du milieu de culture après chaque incubation avec des anticorps ou isotypes contrôles. Le détail des panels d'anticorps est détaillé dans le [Tableau II](#) ci-dessous. Suivant les panels, le Zombie NIR (Biolegend), ou Viability (Miltenyi) est utilisé pour marquer les cellules mortes selon le protocole du fournisseur. Pour les cibles intracellulaires, les cellules sont fixées puis perméabilisées avant leur incubation avec les anticorps. Les cellules sont analysées sur le Symphony en utilisant le logiciel Diva (BD Bioscience) et FlowJo pour les analyses détaillées.

	Antigène	Fluorochrome	Référence	Isotype contrôle
Panel LT CD8	CD8	Pacific blue	Biolegend 100728	IgG Armenian hamster
	Tétramère	PE	Plateforme P2R	Tétramère irrelevant
	CD138	Al647	Biolegend 142526	IgG2ak Rat
	Ki67	Vio515	Miltenyi 130-108-830	REA
LT CD4 régulateurs	CD4	Al488	Biolegend 100423	IgG2bk Rat
	CD25	PE	Ebioscience 12-0251-82	IgG1 Rat
	Foxp3	Vio667	Miltenyi 130-111-604	REA
Phénotype LT CD8	CD45	Al700	Biolegend 103127	IgG2bk Rat
	CD8a	Viogreen	Miltenyi 130-122-017	REA
	Tétramère	PE	Plateforme P2R	Tétramère irrelevant
	PD-1	PercPVio700	Miltenyi 103-111-957	REA
	Tim3	BV711	Biolegend 119727	IgG2a, k Rat
	Lag3	Viobright515	Miltenyi 130-111-515	REA
	2B4	APC/Fire750	Biolegend 133515	IgG1, k Mouse
	TOX	APC	Miltenyi 130-118-335	REA
	CD127	PE-Vio770	Miltenyi 130-110-257	REA
Phénotype des cellules tumorales	CD138	Al647	Biolegend 142526	IgG2a, k Rat
	PD-L1	BV650	Biolegend 124336	IgG2b, k Rat
	H-2k <sup>b</sup>	Vioblue	Miltenyi 130-115-592	REA

*Tableau II: Résumé des panels utilisés en cytométrie de flux.*

*Tous les anticorps ont été préalablement titrés pour déterminer leur concentration d'utilisation optimale. Les panels contrôles se composent des isotypes contrôles correspondant à chaque anticorps marqués avec le même fluorochrome.*

## **VII - Marquage par immunofluorescence des tumeurs congelées**

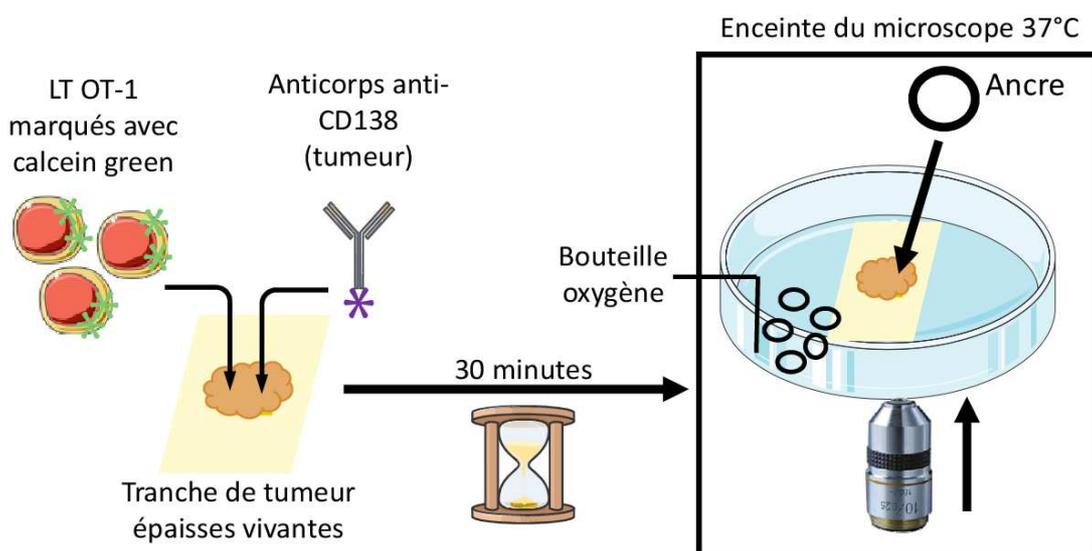
Les tumeurs sont incluses dans de l'OCT (Leica) et congelées dans du 2-méthylbutane (TCI AMERICA) préalablement refroidi à -110°C en le mettant en contact avec l'azote liquide. Elles sont ensuite stockées à -80°C jusqu'à leur découpe au cryostat (Leica, coupe de 10µM). Pour chaque tumeur, deux coupes à deux profondeurs différentes sont réalisées. Les tranches sont ramenées à température ambiante, réhydratées dans du Tris 0,1M et fixées avec du Periodate-Lysine-Paraformaldéhyde (McLean and Nakane, 1974). Les sites de fixation non spécifiques sont bloqués par incubation avec du Tris 0,1M complété avec 1% de BSA (Bovine SerumAlbumin, Sigma) et du Fc block pendant 1h. Les tranches sont ensuite incubées sur la nuit avec un anticorps anti CMH-I (Biolegend référence n°114612) ou son isotype contrôle dilué dans du Tris 0,1M supplémenté avec 1% de BSA. Après 3 lavages de 5 minutes chacun en tampon phosphate, les noyaux sont marqués avec du DAPI (Invitrogen) avant montage permanent. L'acquisition des images est réalisée à l'aide d'un microscope confocal (Nikon) et analysées sous Fiji (Schindelin *et al.*, 2009).

## **VIII - Analyse de la motilité ex vivo des LT OT-1**

Les LT OT-1 sont isolés et stimulés *in vitro* comme précédemment décrits. Lors du 5ème jour de stimulation, ils sont séparés des débris et cellules mortes à l'aide de Pancoll (Pan biotechref n°P04-64100) selon les instructions du fournisseur. Les lymphocytes sont marqués avec la calcéine verte AM (Invitrogen) pendant 20 minutes, puis lavés trois fois en tampon phosphate.

Les tumeurs 5T33-OVA sont prélevées sur des souris contrôles ou préalablement traitées avec la RIV- $\alpha$ . Des fragments d'environ 5 mm de diamètre sont inclus dans un gel contenant 5% d'agarose à faible température de gélification (Sigma). Des tranches de 300 $\mu$ m d'épaisseur sont obtenues à l'aide d'un vibratome dans du tampon phosphate à 4°C. Les tranches sont transférées dans des inserts de culture (Millipore) disposés dans des plaques 6 puits contenant 1 mL de milieu de culture complet. 300ng d'anticorps anti CD138 Alexafluor647 (clone 9E7.4) et 200 000 LT OT-1 préalablement marqués sont ajoutés à chaque tranche de tumeur, pendant 30 minutes ou 24 heures à 37°C. Un anneau en acier inoxydable est posé sur chaque tranche afin de concentrer les anticorps et cellules.

Après incubation, les tranches sont lavées deux fois avec du milieu de culture complet, puis maintenues dans un milieu de culture oxygéné. Les vidéos time lapse sont obtenues à l'aide d'un microscope confocal à haute vitesse (schéma expérimental présenté en [Figure 15](#)). Jusqu'à 100 $\mu$ m de profondeur ont pu être imagés, (objectif x20, ouverture numérique NA : 0,75). Grâce à l'utilisation du Z-axis piezo nanopositionner (Mad City Lab), qui permet l'acquisition du z-stack en 3 secondes, des vidéos time lapse de 30 minutes ont été obtenues avec une image toutes les 15 secondes. L'analyse des films est réalisée sur le logiciel Imaris, en utilisant le module « détection de surface » afin de suivre les LT.



*Figure 15: Schéma expérimental de l'analyse de la motilité des LT OT-1 sur les tranches de tumeur.*

## IX - Analyse Immunohistochimique

### a) Marquage des tranches de tumeurs

Le marquage des tumeurs par immunohistochimie est réalisé par la plateforme MicroPicell (SFR Santé François Bonamy). Chaque tumeur est fixée dans du formol et incluse en paraffine avant de réaliser des tranches de 8 $\mu$ m d'épaisseur. Le marquage est réalisé sur l'automate Impath36A.Menarini. Chaque tranche est lavée deux fois dans du Xylène puis dans l'éthanol absolu pendant 5 minutes, puis réhydratée. Après démasquage des antigènes avec la solution High pH (Dako) pendant 30 minutes à 97°C, les peroxydases endogènes sont inhibées et une solution de blocage des sites non spécifiques est appliquée pendant 20 minutes (Animal free blocker, VectorLaboratories). Un anticorps anti CD8 (Invitrogen, clone 4SM16) ou son isotype contrôle est utilisé pour le marquage des tranches. De l'histofine de rat dirigé contre l'HRP de souris (Nichirei) est ensuite ajouté aux tranches, avant lavage et révélation avec le DAB (Impath DAB detection Kit). Les noyaux sont marqués à l'hématoxyline avant montage permanent.

## b) Analyse QuPath

Les images des tranches de tumeurs marquées en immunohistochimie avec l'anti CD8 sont obtenues avec le Nanozoomer HAMAMATSU et analysées à l'aide du logiciel QuPath, version 0.2.3 (Bankhead *et al.*, 2017). Le module de détection des tissus a permis de générer des régions d'intérêt et, si nécessaire, les artéfacts sont retirés manuellement de ces régions. La détection des cellules est basée sur le marquage à l'hématoxyline des noyaux. Les cellules positives pour le marquage CD8 sont définies comme ayant un marquage cytoplasmique dont la médiane est égale ou supérieure à un seuil de 0,18. Les tranches de tumeurs marquées avec l'isotype contrôle présentent moins de 1% de cellules positives avec le même seuil. Pour l'analyse de la distribution des LT CD8, une grille composée de carré de 300x300µM a été générée de manière à segmenter la région d'intérêt. Le pourcentage de cellules CD8+ dans chaque carré composant la grille a été extrait. Les carrés contenant moins de 100 cellules ont été retirés de l'analyse. La distribution des fréquences relatives est calculée sur GraphPadPrism.

## X - Analyse de l'expression des cytokines et chimiokines

### a) Extraction des ARN tumoraux

Des échantillons tumoraux d'environ 3 mm de diamètre sont prélevés et conservés à -80°C dans du RNA later (ThermoFischerScientific). Les fragments tumoraux sont dissociés dans du tampon de lyse, en utilisant des tubes contenant de la matrice de lyse et l'appareil FasPrep-24 (MP Biomedical). Une fois homogénéisé, l'ARN est extrait des échantillons à l'aide du kit Nucleospin RNA Plus (Macherey-Nagel), et l'ADN résiduel est dégradé avec le kit TURBO DNA-free (Life technologies) suivant les instructions du fournisseur.

La concentration en ARN et sa pureté (rapport A260/280 et A260/230) sont mesurés en duplicat au nanodrop (SimpliNano). Si nécessaire (un des deux rapports inférieurs à 1,7), les ARN sont précipités avec de l'acétate de Sodium en présence d'éthanol absolu et de glycogène (ThermoScientific) sur la nuit à -80°C. Les échantillons sont ensuite centrifugés 1h à 12000g, 4°C, puis lavés avec de l'éthanol 70% avant d'être repris dans de l'eau. Le RIN (RNA Integrity Number) permet de vérifier l'absence de dégradation de l'ARN, et est évalué pour chaque échantillon à l'aide de la Puce agilent RNA 6000 NANO serie II (Agilent). Les résultats sont analysés sur le logiciel 2100 Expert. Tous les échantillons analysés ont présenté un RIN au moins supérieur à 7. L'ensemble des résultats des contrôles qualité de l'ARN (rapport A260/280, A260/230 et RIN) sont présentés dans le [Tableau III](#) ci-dessous.

### b) Reverse transcription

Pour chaque échantillon, 1µg d'ARN est reverse-transcrit en utilisant le kit Superscript III et RNase OUT (Invitrogen) suivant les instructions du fournisseur. Afin de vérifier l'absence de contaminants ADN dans les échantillons ARN de départ, qui provoqueraient des faux positifs, les échantillons ont été soit reverse-transcrits (RT), soit mis dans les mêmes conditions de reverse-transcription mais sans l'enzyme (mock-RT). Une PCR pour un gène de ménage, la b-actine, a ensuite été réalisée sur l'intégralité des échantillons, mock-RT et RT, à l'aide du kit Taq DNA polymerase (Promega). La présence d'amplification d'ADN dans les échantillons RT et l'absence d'amplification dans les échantillons mock-RT est vérifiée en faisant migrer les résultats de PCR sur gel d'agarose.

Jour prélèvement	Traitement	Numéro échantillon	Rapport 260/280	Rapport 260/230	RIN
J16	RIV-a + ACT	1	1,79	1,76	9,9
		3	1,76	1,82	8,7
		7	1,82	1,97	8,9
		10	1,84	2,16	9,8
		11	1,77	2,1	9,9
J19		14	1,82	1,78	9,8
		17	1,83	2,02	7,5
		18	1,85	2,06	8,7
		19	1,81	2,26	9,1
		22	1,8	1,94	10
J16	RIV-a	28	1,79	1,99	9,3
		29	1,8	2,08	8,1
		30	1,87	2,24	9,1
		31	1,82	2,09	9,2
		37	1,83	2,04	9,7
J19		27	1,81	1,88	9,8
		40	1,76	1,8	9,4
		43	1,78	1,9	9,9
		45	1,76	1,74	9,7
		46	1,86	2,03	9,9
J16	Contrôle	49	1,82	2,01	9,3
		53	1,71	1,86	7,9
		57	1,76	2,03	8,7
		106	1,79	2,2	7,1
		107	1,74	2,16	7,9
J19		59	1,78	1,9	9,5
		60	1,8	2,02	8,8
		61	1,8	1,84	9,8
		111	1,82	2,12	8,5
		112	1,8	2,13	7,3
J16	ACT	64	1,75	2,02	9,1
		66	1,77	1,95	9,3
		67	1,8	2,03	7,8
		68	1,79	2,05	7,4
		72	1,8	2,25	7,4
J19		75	1,8	1,94	8,3
		76	1,79	1,9	9,2
		77	1,77	2,19	8,2
		78	1,82	1,97	7,1
		81	1,79	2,23	8,4

*Tableau III: Récapitulatif des caractéristiques des échantillons d'ARN obtenus à partir des tumeurs.*

### c) Analyse de l'expression des cytokines et chimiokines par RT-qPCR

Chaque échantillon reverse-transcrit a ensuite été évalué pour la potentielle présence d'ADN codant pour différentes cytokines et chimiokines (liste complète des amorces utilisées en [Tableau IV](#)) par qPCR à l'aide du kit Maxima SYBR Green/ROX (ThermoScientific) sur le MX3500P (Agilent). Toutes les réactions sont réalisées en duplicats et en parallèle de contrôles négatifs pour lesquels l'ADN est remplacé par de l'eau. L'expression relative de chaque gène est calculée selon la méthode du  $2e^{-\Delta\Delta Ct}$ , comme précédemment décrit (Livak and Schmittgen, 2001). L'ARN reverse-transcrit de splénocytes murin stimulés pendant 3 jours *in vitro* avec de la Concavalin A (5 $\mu$ g/mL, Sigma) et du Lipopolysaccharide (100ng/mL, Sigma) ont servi comme contrôles positifs pour l'expression des différents gènes. La GAPDH a servi de contrôle interne comme gène de ménage.

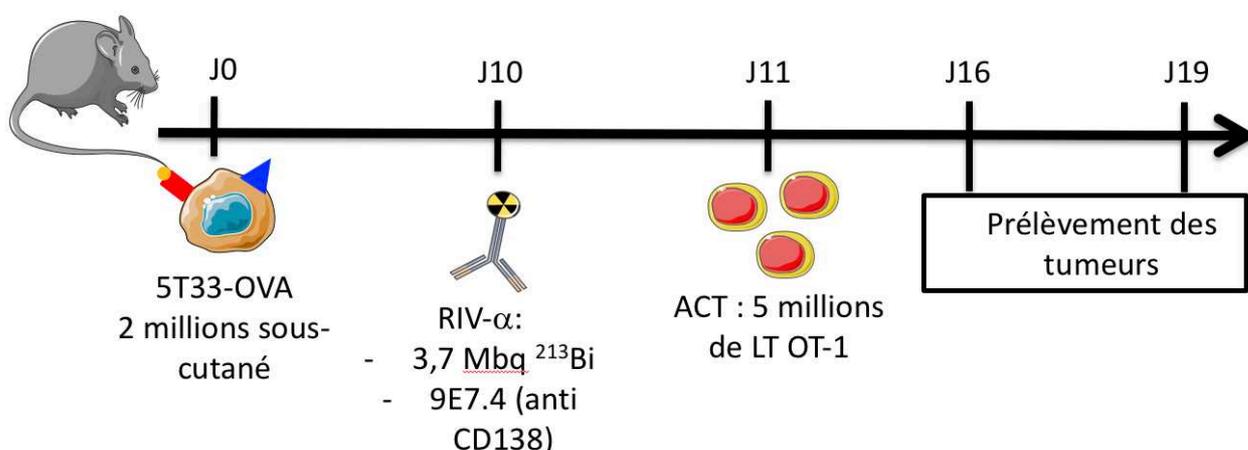
Nom du gène	Amorce sens	Amorce anti sens
$\beta$ -actine	ctgtccctgtatgcctctg	atgtcacgcacgcacgatttcc
GAPDH	ggcattgtcttcaatgacaa	tgtgagggagatgctcagtg
CXCL10	ggatccctctcgcaagga	atcgtggcaatgatctcaaca
IL-10	ataactgcacccacttcca	gggcatcacttctaccaggt
TGF- $\beta$	cctgcaagaccatcgacatg	tgttgtaaaagcgagcacc
IL-1 $\alpha$	tgcagcagggtttctaggtg	atgaaagggctccaagtgcag
IL-2	gcaggccacagaattgaaag	tccaccacagttgctgactc
VEGF	ctgtaacgatgaagccctggag	tggtaggtttgatccgcat
IL-12	cgagagaggcagagaactcac	ctctccccaccctatttcc
Csf1	ccaggatgaggacagacagg	ggtagtggtaggatgttcca
IFN $\gamma$	tggctctgcaggattttcatg	tcaagtggcatagatgtggaagaa
CCL-2	tgaagctaatgcatccactacc	catcacagtcaggagtcacac
IL-4	actctttcgggcttttcgatg	tgatgctcttaggctttccag
TNF $\alpha$	tgggagtagacaaggtacaacc	catcttctcaaaattcgagtgacaa
IL-1 $\beta$	gcactacaggctccgagatgaac	ttgtcgttgcttggttctcctgt
LDHA	aaagtcttccccgtgtcctagc	Ttccccacaccatctcaacacc
LDHB	tcaagtacagccctgactgcac	Aatccagattgcatccgcttcc
HIF1 $\alpha$	accacaactgccaccactgatg	Agtgccactgtatgctgatgcc
CCL-5	gcttccctgtcattgcttgctc	agatgcccatttcccaggacc

*Tableau IV : Résumé des amorces sens et anti sens utilisées pour les dosages par qPCR (Sigma)*

## Résultats

### I – Plan de traitement et prélèvements

Les résultats présentés dans cette partie font l'objet d'un article en cours de soumission présenté en [Annexe II](#). A partir des résultats obtenus sur la diminution de la croissance tumorale suite à l'administration de RIV- $\alpha$  et ACT, des prélèvements tumoraux sont réalisés à J16 et J19 ([Figure 16](#)). J16 correspond au moment où l'effet thérapeutique commence à être observable au niveau des volumes tumoraux, et J19 au moment où l'on observe le plus de différences entre les groupes traités et le groupe contrôle. Des prélèvements à J22 ont également été réalisés dans une étude préliminaire, néanmoins peu de différences entre les TME ont été notés entre J19 et J22. De plus, les volumes tumoraux élevés et proches du point limite, notamment dans le groupe contrôle à J22, entraînent de la nécrose rendant l'analyse des tumeurs difficile. Par conséquent, J16 et J19 sont les deux points de prélèvements qui ont été conservés par la suite.



*Figure 16: Schéma thérapeutique et plan de prélèvement des tumeurs*

*Après greffe tumorale, les souris sont traitées à J10 et/ou J11 avec la RIV- $\alpha$  et/ou l'ACT.*

Une fois prélevées, différentes analyses sont réalisées sur les tumeurs, afin d'étudier les différentes composantes du microenvironnement tumoral :

- Analyse des cellules immunitaires infiltrant la tumeur et de leur phénotype par cytométrie en flux
- La motilité des LT OT-1 est évaluée *ex vivo* sur des tranches de tumeur vivantes.
- La distribution des LT CD8 dans les tumeurs est analysée sur des coupes par immunohistochimie
- L'expression des cytokines et chimiokines dans les tumeurs est dosée par RT-qPCR sur les ARN messagers

### II – Effet anti-tumoral de la RIV- $\alpha$ sur le TME

#### a) L'expression du CMH

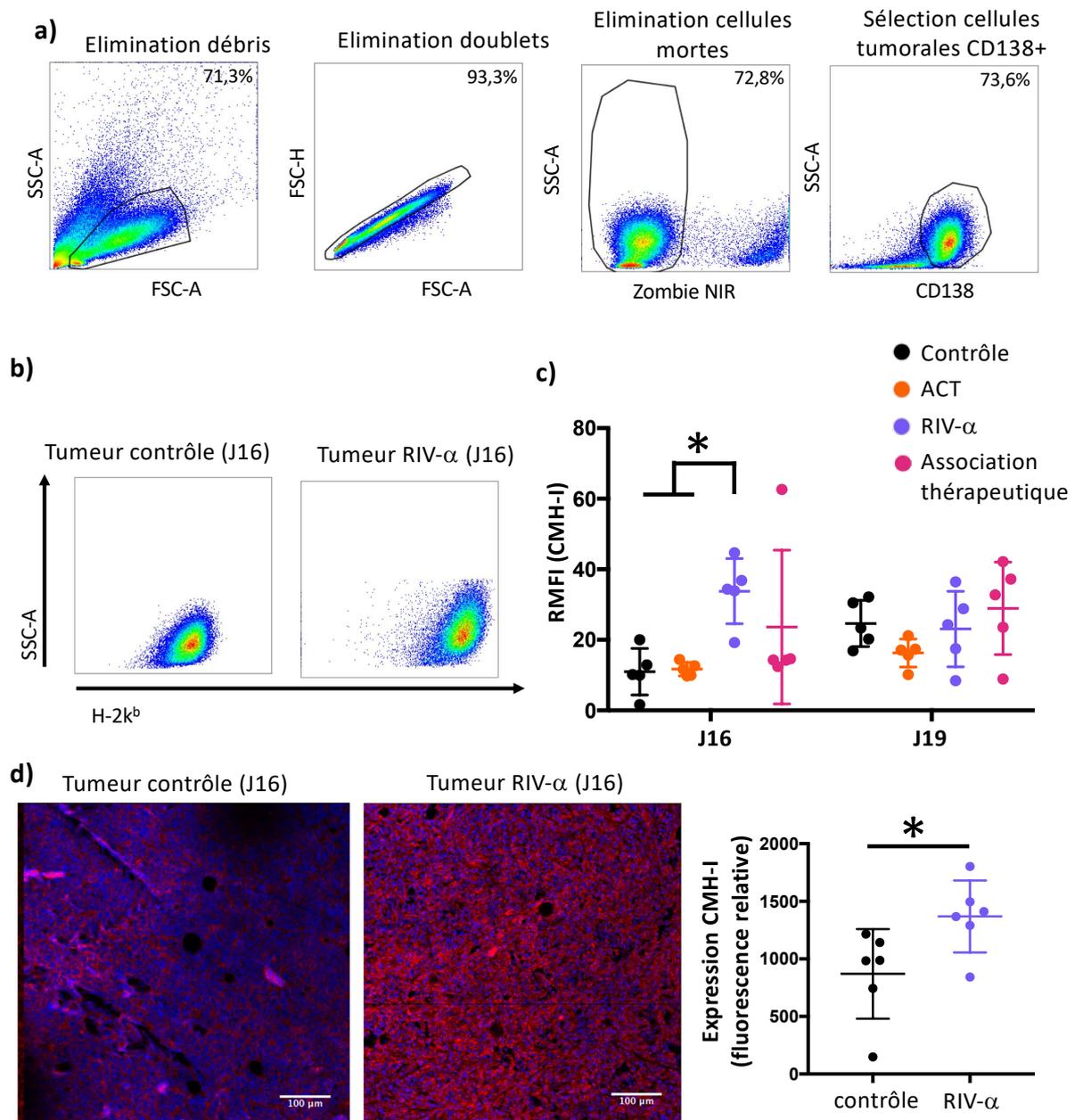
L'expression des molécules du CMH-I par les cellules tumorales permet leur reconnaissance et lyse par les LT CD8. Comme précédemment discuté dans l'introduction, un des mécanismes de défense des cellules tumorales face à la réponse immunitaire consiste en la diminution de l'expression du CMH. *In vitro*, il a été observé précédemment dans l'équipe que l'irradiation non spécifique de lignées tumorales

avec de la BSA radiomarquée au bismuth-213 permettait d'augmenter l'expression des CMH-I (JB Gorin. résultats non publiés. 2010).

La lignée 5T33-OVA est d'haplotype H-2K<sup>b</sup>, dont l'expression est quantifiée par cytométrie en flux et exprimée en rapport de médiane d'intensité de fluorescence (RMFI) entre les échantillons marqués et les isotypes contrôles. Pour chaque groupe, la médiane (+écart-type) des RMFI est calculée. Les résultats sont présentés dans la [Figure 17 a\) et b\)](#). Les débris sont retirés de l'analyse dans une première fenêtre analysant la taille (FSC-A) et la granulométrie (SSC-A) des cellules. Les doublets et cellules mortes sont ensuite exclus, et le CD138 est utilisé comme marqueur des cellules tumorales.

A J16, les cellules tumorales traitées avec la RIV- $\alpha$  présentent une augmentation significative de l'expression d'H-2K<sup>b</sup> comparé au groupe contrôle : le RMFI passe d'une médiane de 10,18 (+6,6) dans le groupe contrôle à 34,35 (+9,2) dans le groupe RIV- $\alpha$ . Les tumeurs traitées avec l'ACT seulement ont un niveau d'expression similaire au groupe contrôle, avec une médiane de RMFI de 11,6 (+1,9)([Figure 17c](#)). Si ces résultats semblent indiquer que la RIV- $\alpha$  est à l'origine de cette augmentation de l'expression d'H-2K<sup>b</sup>, elle n'est néanmoins pas observée dans le groupe traité avec l'association thérapeutique : leur niveau d'expression reste proche du groupe contrôle, avec une médiane de RMFI de 14,29 (+21,82).

L'augmentation d'expression d'H-2K<sup>b</sup> entre le groupe contrôle et RIV- $\alpha$  est également visible par immunofluorescence sur les tranches congelées de tumeurs analysées au microscope confocal ([Figure 17d](#)). La quantification de la fluorescence sur ces tranches corrèle avec les données obtenues par cytométrie en flux, avec une augmentation de la fluorescence relative qui passe d'une médiane de 985,2 (+388) dans le groupe contrôle à 1389 (+312) dans le groupe RIV- $\alpha$ . Cependant cet effet semble transitoire, car à J19 aucune différence significative entre les groupes n'est détectée ([Figure 17c](#)).



**Figure 17: Expression d' H-2K<sup>b</sup> par les cellules tumorales.**

a) stratégie d'analyse des cellules par cytométrie en flux b) Cytogramme représentatif de l'expression d'H-2K<sup>b</sup> par les cellules tumorales dans le groupe contrôle et RIV- $\alpha$  à J16 c) Rapport de médiane de fluorescence entre les échantillons marqués et non-marqués, à J16 et J19 pour les différents groupes (\* =  $p < 0,05$ , test de Kruskal-Wallis,  $n=5$  pour chaque jour de prélèvement et traitement). d) Image représentative de l'expression d'H-2K<sup>b</sup> sur des tranches de tumeurs congelées et analysées en immunofluorescence. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI) et H-2K<sup>b</sup> en rouge. La quantification du niveau d'expression d'H-2K<sup>b</sup> est calculée sous Fiji et présentée en graphe ( $n=3$  tumeurs par condition, avec 2 régions analysées par tumeur, \* =  $p < 0,05$ , test de Student)

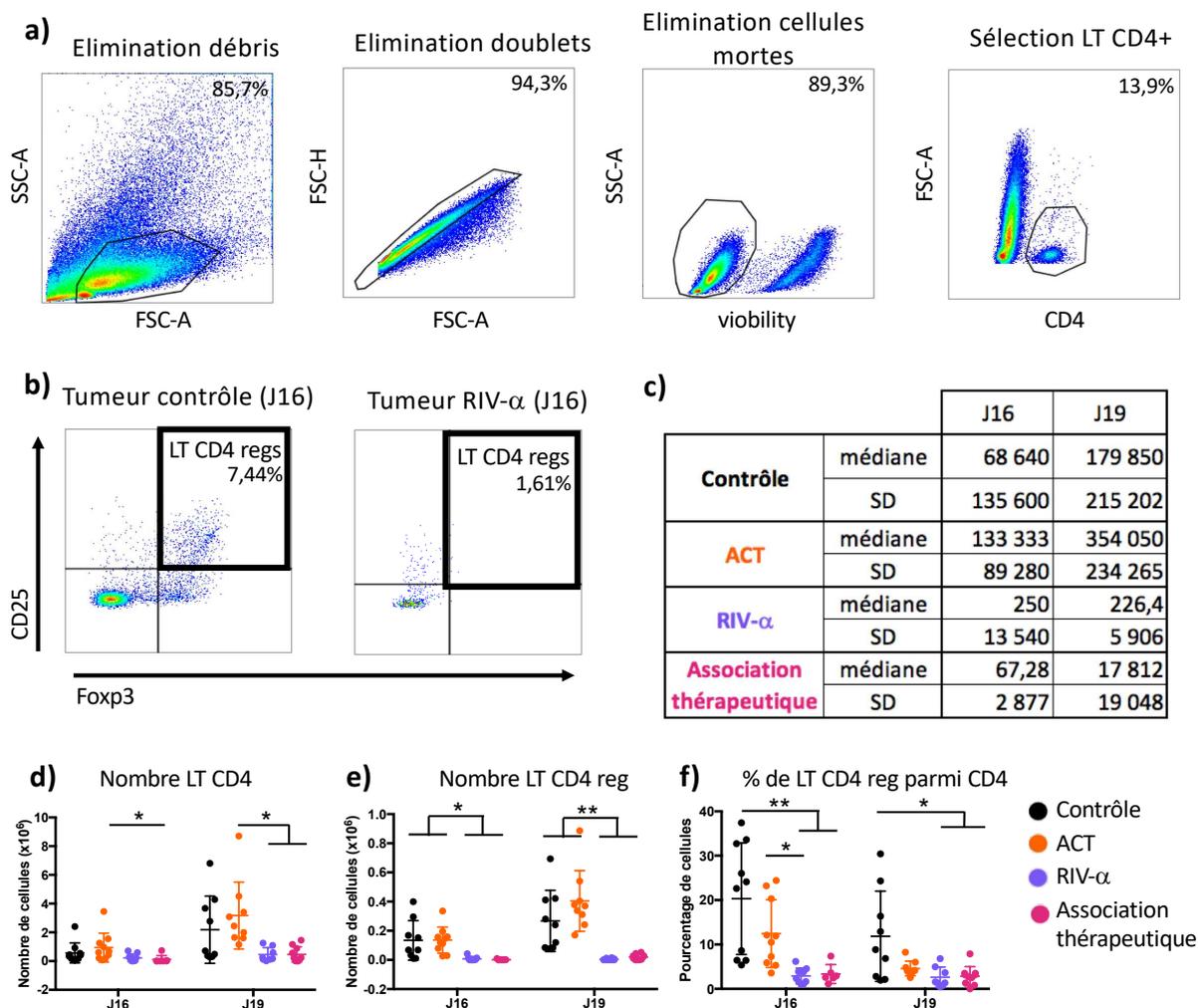
## b) Déplétion des lymphocytes endogènes

Parmi les cellules immunitaires présentes dans le TME, l'infiltrat de lymphocytes T CD4, et plus particulièrement les LT CD4 régulateurs, a été analysé. La stratégie d'analyse par cytométrie de flux est détaillée dans la [Figure 18a](#). Comme précédemment, les débris, doublets et cellules mortes sont éliminés. Les lymphocytes T CD4 régulateurs se caractérisent par leur expression de CD4, Foxp3 et CD25. Des cytogrammes représentatifs des fréquences de LT CD4 régulateurs obtenus à J16 dans les groupes contrôles et RIV- $\alpha$  sont représentés en [Figure 18b](#), et le détail des médianes et des écart-types (SD) observés pour les LT CD4 régulateurs est rapporté en [Figure 18c](#).

Les LT CD4 infiltrant la tumeur montrent une déplétion dans les groupes ayant reçu la RIV- $\alpha$ , notamment à J19 ([Figure 18d](#)). Les groupes ayant reçu l'ACT seule présentent un infiltrat de 2 441 000 (+2 327 000) LT CD4, comparé aux groupes RIV- $\alpha$  ou association thérapeutique qui présentent des infiltrats de 210 300 ( $\pm$ 479 500) et 225 300 ( $\pm$ 528 800) LT CD4, respectivement. Bien que non significative, une tendance similaire est observée entre le groupe contrôle et les groupes RIV- $\alpha$  et association thérapeutique.

Cette déplétion semble être plus prononcée dans le cas particulier des LT CD4 régulateurs. A J16, les tumeurs contrôles et traitées avec l'ACT présentent une médiane de 68 640 (+135 600) et 133 333 (+89 280) LT CD4 régulateurs par tumeur, respectivement ([Figure 18c et e](#)). Par comparaison, les groupes RIV- $\alpha$  et association thérapeutique sont infiltrés par un nombre médian de LT CD4 régulateurs significativement plus faible, de 250 (+13 540) et 67 (+2 877). Cette déplétion des LT CD4 régulateurs dans les groupes ayant reçu la RIV- $\alpha$  est significative, et est également observée à J19. La RIV- $\alpha$  semble donc être la composante nécessaire à cette déplétion, qui est stable jusqu'à au moins 9 jours après le traitement.

Afin d'évaluer si la déplétion est spécifique au LT CD4 régulateurs, leur pourcentage parmi les LT CD4 totaux est représenté en [Figure 18f](#). A J16, une diminution significative du pourcentage de LT CD4 régulateurs est observée entre les groupes contrôles (23,55% +12,5), comparé aux groupes RIV- $\alpha$  ou association thérapeutiques, pour lesquels ils représentent seulement 2,36% (+1,8) et 2,8% (+2,1) des LT CD4, respectivement. Une tendance similaire est observée entre le groupe ACT seul et ces deux derniers groupes. A J19, une diminution similaire est observée entre le groupe contrôle et les groupes RIV- $\alpha$  ou association thérapeutique. Bien que non significative, une diminution du pourcentage de LT CD4 régulateurs est également observée dans le groupe ACT.



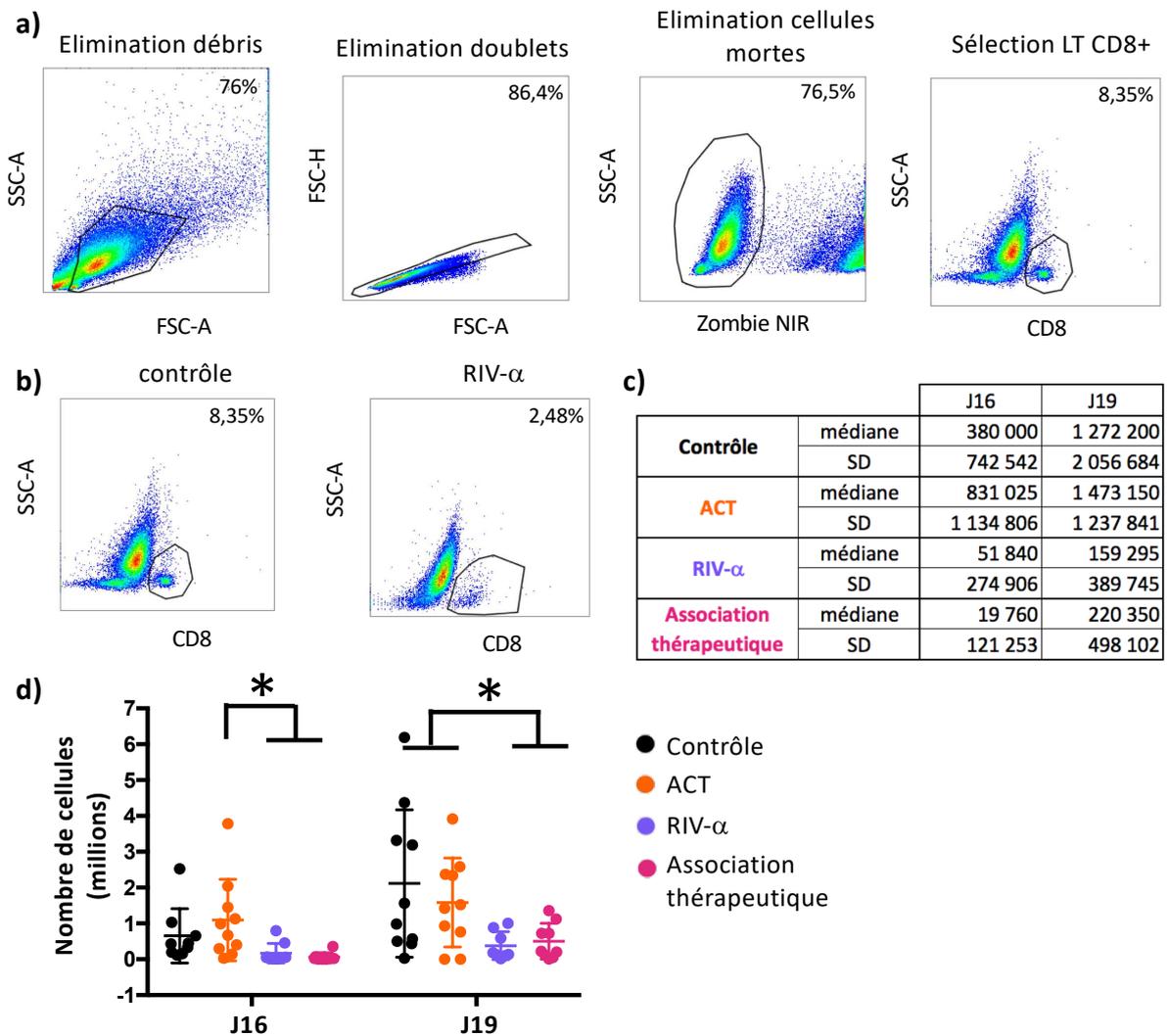
**Figure 18: Infiltrat de LT CD4 régulateurs.**

a) Stratégie d'analyse des cellules par cytométrie en flux b) Cytogrammes représentatifs des pourcentages de LT CD4 régulateurs à J16 dans les groupes contrôle et RIV- $\alpha$  c) Quantification du nombre de LT CD4 régulateurs, médiane et écart-type (SD) pour chaque condition et temps d) Nombre absolu de LT CD4, e) LT CD4 régulateurs et f) pourcentage de LT CD4 régulateurs au niveau du site tumoral, à J16 et J19 pour les différents groupes (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,005$ , test de Kruskal-Wallis, 2 expériences indépendantes avec  $n=5$  pour chaque jour de prélèvement et traitement).

L'infiltrat de LT CD8, principaux effecteurs de la réponse immunitaire, est également étudié, et la stratégie d'analyse est résumée en Figure 19a. Etant donné que le modèle murin est immunocompétent, les LT CD8 endogènes de la souris sont séparés des LT OT-1 par un marquage avec un tétramère H-2K<sup>b</sup>-peptide SIINFEKL, reconnaissant le TCR transgénique des LT OT-1, dans les groupes ayant reçu l'ACT. Des cytogrammes représentatifs de l'infiltrat T CD8 à J19 dans les groupes contrôle et RIV- $\alpha$  sont représentés en Figure 19b. Le nombre absolu de LT CD8 endogènes est calculé, la médiane et les écart-types sont rapportés dans la Figure 19c, en fonction des différents groupes, et représentés sous forme de graphe en Figure 19d.

A J16, un nombre significativement plus élevé de LT CD8 est observé dans le groupe ayant reçu l'ACT, avec une médiane de 831 025(+1 134 806), comparé au groupes ayant reçu l'association thérapeutique, qui présentent un nombre médian de LT CD8 de 19 760(+121 953). Bien que cette différence ne soit pas significative, une tendance similaire est observée entre le groupe contrôle et celui

traité avec la RIV- $\alpha$ , dont l'infiltrat est plus faible. Entre J16 et J19, le nombre de LT CD8 endogènes dans le groupe contrôle passe de 380 000(+742 542) à 1 272 200(+2 056 684). Cette augmentation permet cette fois-ci de mettre en évidence une différence significative entre les groupes contrôle et ACT, comparés avec les groupes RIV- $\alpha$  et association thérapeutique. Comme les LT CD4 régulateurs, les LT CD8 présents dans la tumeur sont également déplétés en raison de leur sensibilité aux rayonnements alpha.



**Figure 19: Infiltrat de LT CD8 endogènes.**

a) Stratégie d'analyse des cellules par cytométrie en flux. b) Cytogrammes représentatifs du nombre de LT CD8 endogènes à J19 dans les groupes contrôle et RIV- $\alpha$ . c) Quantification du nombre de LT CD8 endogènes, médiane et écart-type (SD) pour chaque condition et chaque temps d) Nombre absolu de LT CD8 endogènes au niveau du site tumoral, à J16 et J19 pour les différents groupes (\* = p<0,05, test de Kruskal-Wallis, 2 expériences indépendantes avec n=5 pour chaque jour de prélèvement et traitement)

### c) Infiltrat de LT OT-1

Le bismuth-213 ayant une demi-vie très courte, il permet de réaliser le transfert de LT OT-1 24h après injection de la RIV- $\alpha$ , lorsque l'activité radioactive n'est quasiment plus détectable suite à l'écoulement de 30 demi-vies. Les LT OT-1 ne peuvent donc pas être éradiqués par les rayonnements ionisants. La stratégie d'analyse des LT CD8 a préalablement été détaillée dans la [Figure 19a](#), les LT OT-1

sont ensuite sélectionnés sur leur expression du TCR reconnaissant le complexe H-2K<sup>b</sup>/OVA grâce à un marquage tétramère. Comme pour les précédentes analyses, le nombre absolu de LT OT-1 dans la tumeur a été déterminé (Figure 20a).

Cette analyse n'est réalisée que chez les groupes de souris ayant reçu une injection de LT-OT-1 : ACT et Association thérapeutique. A J16, un infiltrat comparable est observé entre ces deux groupes, avec une médiane de 448 400 (+469 100) LT OT-1 pour le groupe ACT et 209 700 (+281 700) pour le groupe traité avec l'association thérapeutique. La RIV- $\alpha$  ne semble donc pas permettre une augmentation de la migration des LT OT-1 vers le site tumoral lors de l'association thérapeutique. Néanmoins, l'analyse du rapport LT OT-1/cellules tumorales, calculé en réalisant le rapport entre le nombre de LT OT-1 et le nombre de cellules tumorales (CD138+), révèle une différence entre ces deux groupes. En effet à J16 la médiane des rapports LT OT-1/cellules tumorales dans le groupe ayant reçu l'association thérapeutique est de 0,37 (+0,32), soit 1 LT OT-1 pour 2,7 cellules tumorales (Figure 20b). Au contraire, les tumeurs ayant reçu l'ACT seule présentent une médiane de rapport LT OT-1/cellules tumorales de 0,05 (+0,02), soit 1 LT OT-1 pour 20 cellules tumorales.

Etant donné que le nombre de LT OT-1 infiltrant la tumeur est comparable, cette différence est liée au nombre de cellules tumorales. À J16, les tumeurs excisées traitées avec l'ACT seule présentent un volume médian de 205mm<sup>3</sup>, tandis que celles traitées avec l'association thérapeutique présentent un volume médian de 28mm<sup>3</sup>. Si la RIV- $\alpha$  ne permet pas un infiltrat de LT OT-1 plus important en nombre, la diminution du nombre de cellules tumorales suite à l'irradiation permet un rapport LT OT-1/cellules tumorales plus propice à la lyse par les LT OT-1. A J19, bien que le nombre absolu de LT OT-1 infiltrant la tumeur augmente dans les deux groupes comparé à J16, cette augmentation n'est pas perçue au niveau des rapports LT OT-1/cellules tumorales. Dans le groupe ACT, ce rapport reste similaire entre J16 et J19, tandis que dans le groupe traité avec l'association thérapeutique il diminue, passant de 0,37 (+0,32) à J16, à 0,03 (+0,3) à J19. Cette diminution du rapport LT OT-1/cellules tumorales dans ce groupe, malgré l'augmentation du nombre de LT OT-1 témoigne d'un échappement de la croissance tumorale.

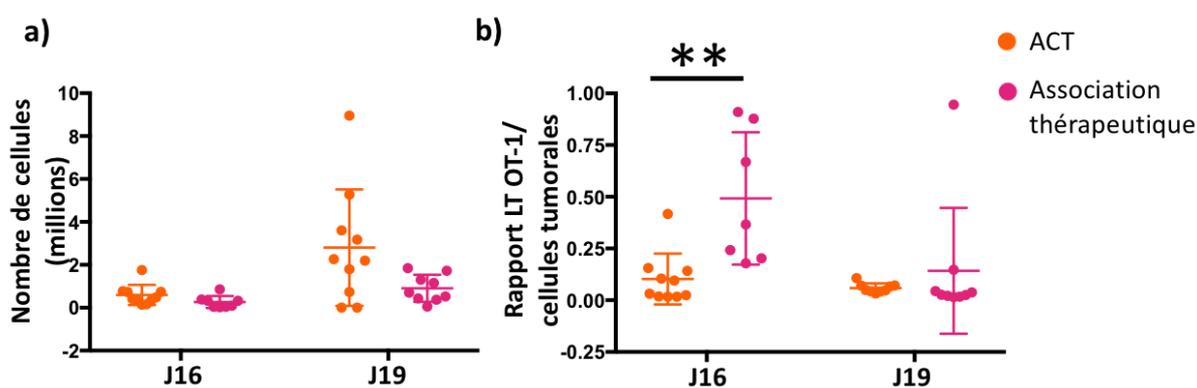


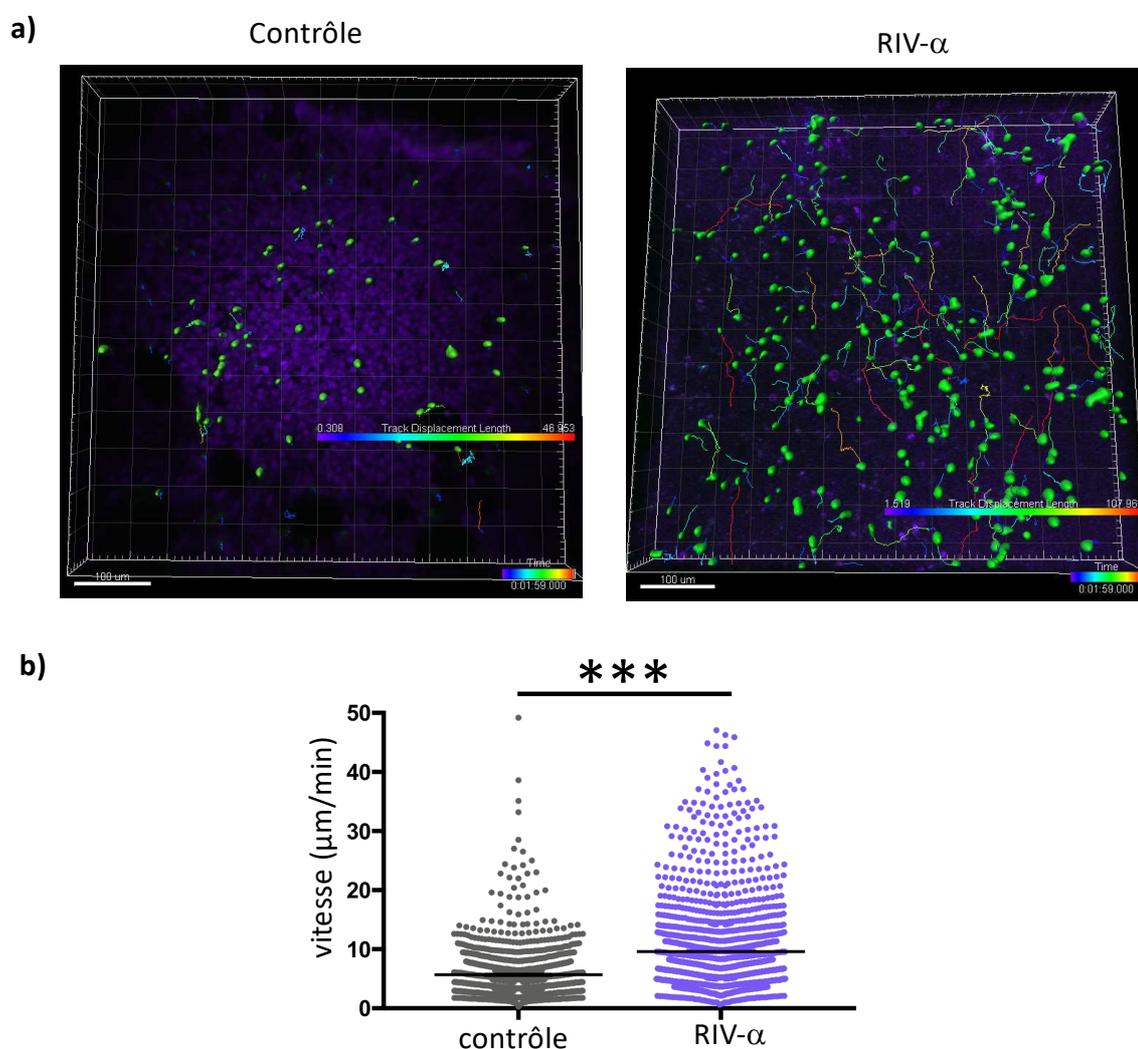
Figure 20 : Infiltrat de LT OT-1 au site tumoral.

a) Nombre absolu de LT OT-1 au niveau du site tumoral, à J16 et J19 pour les différents groupes. b) Rapports LT OT-1/cellules tumorales (LT OT-1/cellules tumorales) à J16 et J19 pour les différents groupes. (\*\* =  $p < 0,005$ , test de Kruskal Wallis, 2 expériences indépendantes avec  $n=5$  pour chaque jour de prélèvement et traitement).

#### d) Motilité et distribution des LT OT-1

Après avoir évalué l'infiltrat de LT OT-1, leur motilité fut également étudiée. Pour cela, des tranches de tumeurs épaisses sont maintenues en vie *ex vivo*. Afin d'évaluer l'impact de la RIV- $\alpha$  sur la motilité des LT OT-1, ces derniers sont marqués avec une sonde fluorescente, la calcéine verte, et déposés sur les tranches de tumeurs soit contrôle, soit traitées avec la RIV- $\alpha$ . La motilité des LT OT-1 est mesurée par time-lapse au microscope confocal. Des images sont acquises pendant 30 minutes, afin de mesurer les déplacements des LT OT-1 en x, y et z, dans les tumeurs contrôles ou traitées avec la RIV- $\alpha$ .

Les vidéos time-lapse sont analysées sur le logiciel Imaris, permettant de suivre et de quantifier le déplacement des LT OT-1. Un exemple de suivi des LT sur une tumeur contrôle et une tumeur traitée avec la RIV- $\alpha$  sont représentés dans la [Figure 21a](#). La quantification du déplacement des LT OT-1 met en évidence une augmentation de leur motilité sur les tranches de tumeurs traitées avec la RIV- $\alpha$  ([Figure 21b](#)) : les LT OT-1 passe d'une vitesse médiane de 4,99 $\mu$ M/minute (+4,1) sur des tranches de tumeurs contrôles à 7,07 $\mu$ M (+8,6) sur des tranches traitées avec la RIV- $\alpha$ .



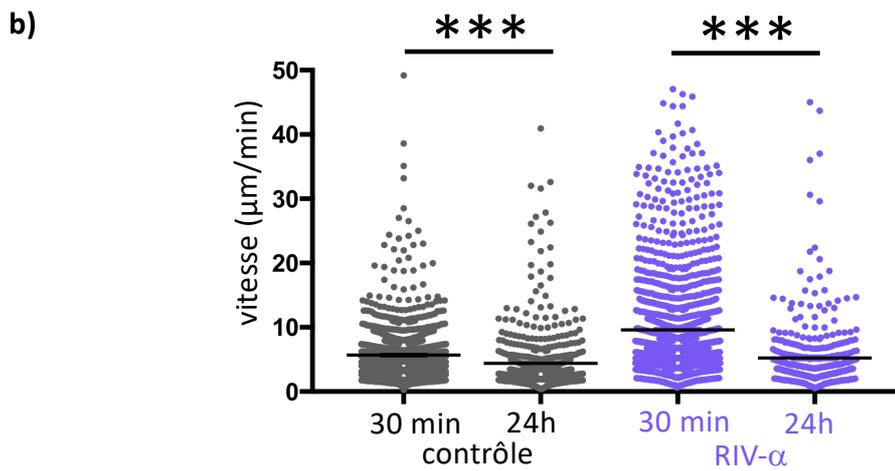
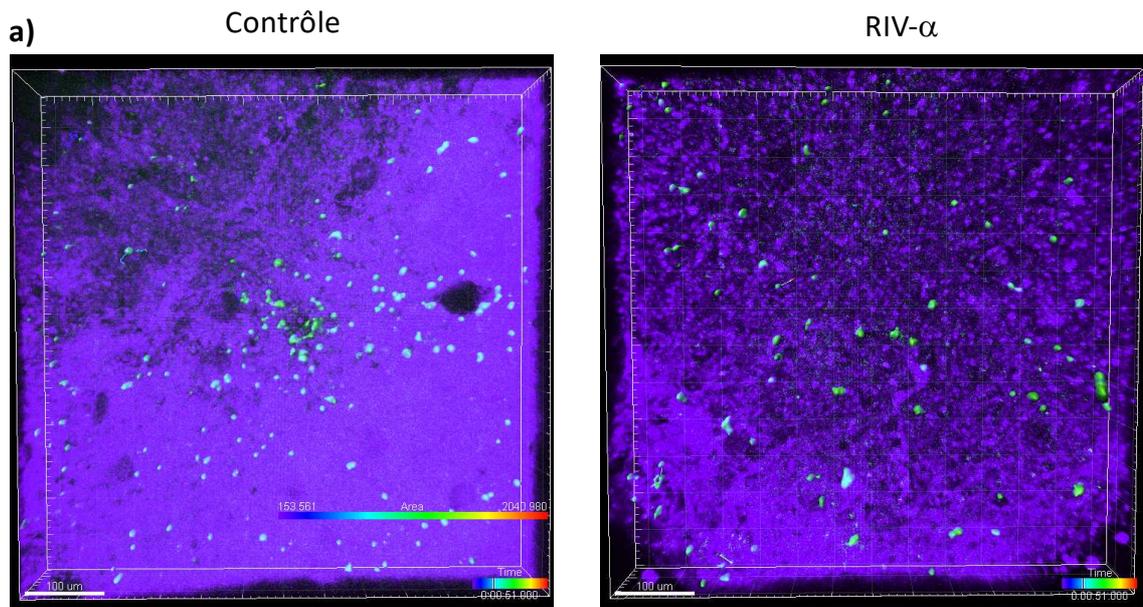
*Figure 21 : Étude de la motilité des LT OT-1 ex vivo.*

a) Image des films analysés, les LT OT-1 sont en vert et les cellules tumorales en violet. Les traits représentent les différents chemins parcourus par les LT OT-1. b) quantification de la vitesse des LT OT-1 (\*\*\*) =  $p < 0,0005$ , test de Student, 2 expériences indépendantes avec  $n=2$  films pour chaque condition).

L'augmentation de la motilité des LT OT-1 sur les tumeurs traitées avec la RIV- $\alpha$  est surprenante, car les données de littérature indiquent que les lymphocytes T CD8 nécessitent un contact prolongé avec leur cible, et par conséquent une immobilité, afin de les lysés. Dans notre cas, l'augmentation de l'expression des molécules H-2K<sup>b</sup> suite à la RIV- $\alpha$  laisse à penser que les cellules tumorales seraient plus facilement reconnues et lysées. Par conséquent, une baisse de la motilité était attendue dans le cas des tumeurs traitées avec la RIV- $\alpha$ .

Cependant, une étude de Bhat et collaborateurs a mis en évidence de longues périodes de motilité *in vitro*, de l'ordre de 5 à 7h, lors de la mise en contact de LT CD8 avec leur cible, avec les premières lyses ne survenant qu'à partir de 15h de co-culture (Bhat *et al.*, 2014). Dans notre première étude, les LT OT-1 ont été mis en contact avec les tranches de tumeurs pendant 30 minutes seulement avant de commencer les time-lapse, laissant suggérer que nous sommes dans cette phase initiale de motilité qui précède la lyse.

Par conséquent, nous avons réitéré l'expérience, en laissant les LT OT-1 soit 30 minutes sur les tranches de tumeurs, afin de confirmer la première étude, soit 24h. Les premiers résultats sur le temps court (30 minutes) ont donc été confirmés, avec à nouveau une motilité accrue des LT OT-1 observée sur les tranches de tumeurs traitées avec la RIV- $\alpha$ . Après 24h cependant, l'étude des time-lapse a révélé une baisse de la motilité significative par rapport au temps 30 minutes, pour les deux types de tumeur : les LT OT-1 passent d'un déplacement médian de 4,99 $\mu$ m/min (+4,1) à 3,09 $\mu$ m (+4,5) sur les tumeurs contrôles, et de 7,07 $\mu$ m/min (+4,5) à 3,59 $\mu$ m/moin (+5,4) sur les tumeurs traitées avec la RIV- $\alpha$ . Des images représentatives des time-lapse obtenus après 24 heures sont présentées en [Figure 22a](#). La quantification des déplacements est représentée en [Figure 22b](#), et le détail des statistiques pour les différentes conditions est donné en [Figure 22c](#). Après 24h d'incubation, les LT OT-1 présentent une motilité diminuée par rapport au temps 30 minutes, et le traitement préalable de la tumeur n'a plus d'impact sur la distance parcourue.



c)

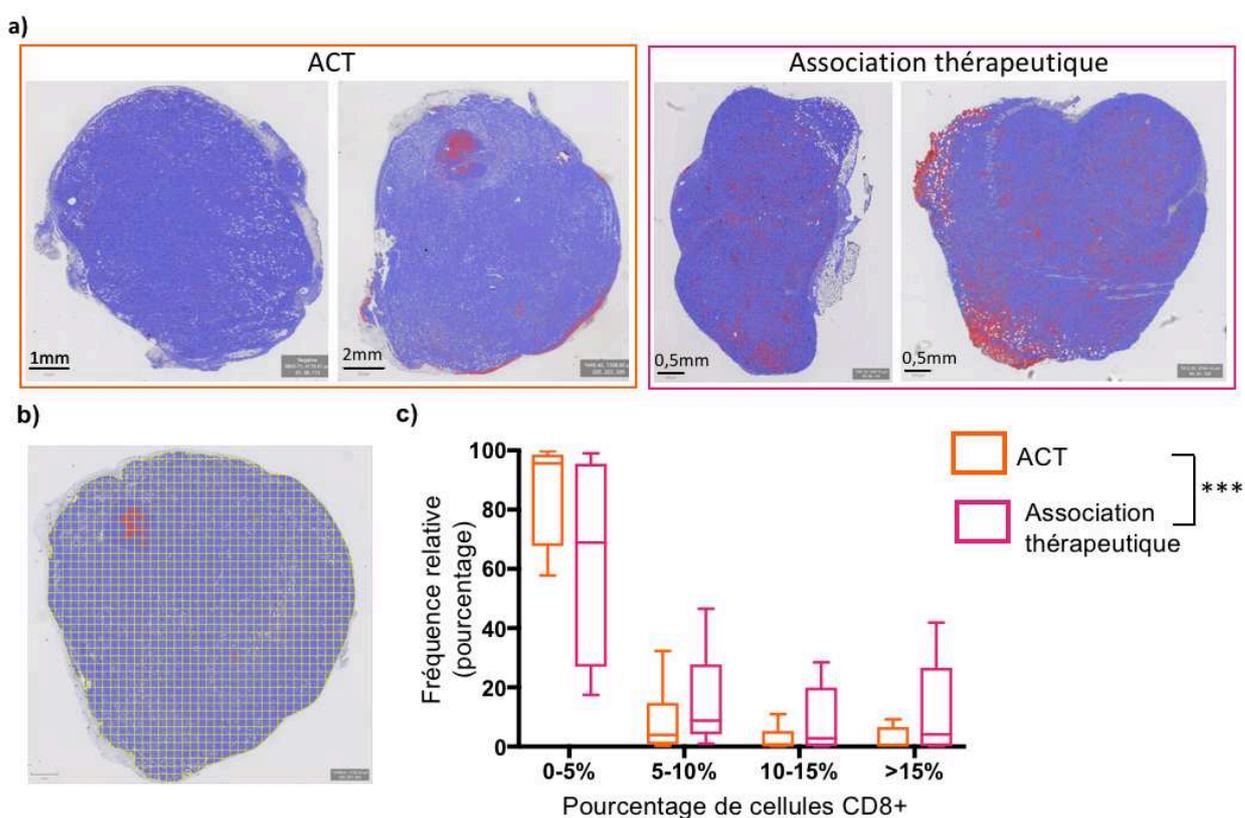
		30 minutes		24 heures	
		tumeur contrôle	tumeur traitées avec RIV- $\alpha$	tumeur contrôle	tumeur traitées avec RIV- $\alpha$
30 minutes	tumeur contrôle		**** p<0,0001	**** p<0,0001	**** p<0,0001
	tumeur traitées avec RIV-a	**** p<0,0001		**** p<0,0001	**** p<0,0001
24 heures	tumeur contrôle	**** p<0,0001	**** p<0,0001		ns
	tumeur traitées avec RIV-a	**** p<0,0001	**** p<0,0001	ns	

Figure 22: Évolution de la motilité des LT OT-1 ex vivo.

a) Images des films analysés à 24h, pour une tumeur contrôle (gauche) et traitée avec la RIV- $\alpha$  (droite). Les LT OT-1 sont en vert et les cellules tumorales en violet. Les traits représentent le chemin parcouru par les LT OT-1. b) Quantification de la vitesse des LT OT-1 à 30 min et 24h. c) détail des tests statistiques réalisés, \*\*\*\* =  $p < 0,0001$ , test de Kruskal Wallis,  $n=4$  films pour chaque condition).

Si la motilité des LT OT-1 à leur arrivée dans la tumeur est accrue, il est possible que cela induise une répartition différente des cellules immunitaires dans la tumeur. Par conséquent la distribution des LT CD8 dans des tumeurs à J16 et J19 a été étudiée (n=3 tumeurs par traitement et point temps, avec pour chaque tumeur deux coupes réalisées à deux profondeurs différentes). Les lames marquées en IHC avec un anticorps anti-CD8 sont analysées à l'aide de QuPath. Les tumeurs traitées avec l'ACT seule présentent un infiltrat de LT CD8 soit très faible, soit ségrégué dans une partie de la tumeur (Figure 23a). A l'inverse, les tumeurs traitées avec l'association thérapeutique présentent un infiltrat plus homogène et plus dense de LT CD8.

Afin de quantifier la différence de répartition, chaque tranche a été divisée à l'aide d'une grille formée de carrés de 300µM de côtés sur le logiciel QuPath (Figure 23b). Le pourcentage de cellules positives dans chaque carré de la grille pour chaque tranche a été extrait, et la répartition des fréquences ainsi obtenues est représentée en Figure 23c. L'infiltrat hétérogène de LT se traduit pour le groupe ACT par une fréquence élevée de carrés au sein de la grille présentant un faible pourcentage de CD8 (0 à 5%). Au contraire, la répartition des fréquences pour le groupe traité avec l'association thérapeutique est différente, avec notamment une part plus importante de carrés au sein de la grille présentant des pourcentages de cellules CD8 allant de 10 à plus de 15%.

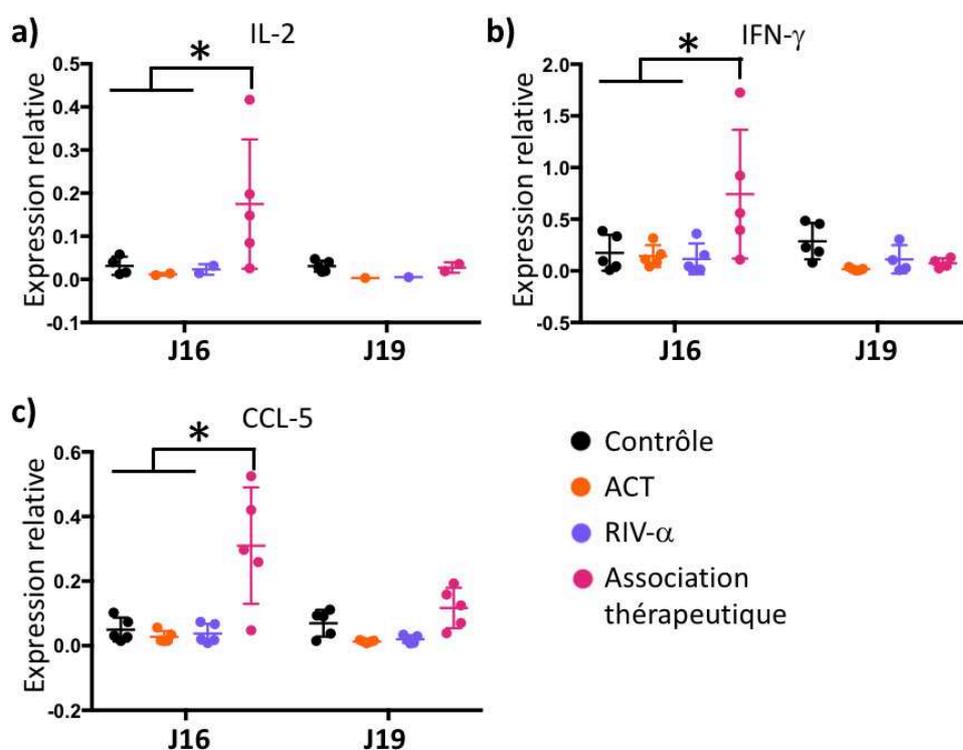


**Figure 23: Analyse de la répartition des LT CD8 dans les tranches de tumeurs.**

a) image de tranches représentatives de tumeurs traitées avec l'ACT ou la combinaison thérapeutique. Les noyaux sont détectés en bleu et les cellules positives pour le CD8 en rouge. b) Création d'une grille de 300x300µM découpant la région d'intérêt c) Suite à la création de la grille sur chaque tranche, fréquence relative des carrés présentant un pourcentage donné de cellules positives pour le CD8 (n=3 tumeurs pour chaque conditions, \*\*\*= p<0,001, test de Student).

### e) Expression de chimiokines et cytokines

L'expression de chimiokines par les cellules tumorales est difficilement analysable directement par cytométrie en flux, car ces facteurs sont sécrétés à l'extérieur des cellules. Leur production a donc été évaluée par RT-qPCR. Le niveau d'expression de chaque gène étudié est rapporté à celui d'un gène de ménage, et son expression relative par rapport à un témoin est calculée selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  comme précédemment décrit (Livak and Schmittgen, 2001). Des résultats intéressants sont obtenus pour l'expression d'IL-2, d'IFN $\gamma$  et de CCL-5, et sont rapportés dans la Figure 24a, b et c, respectivement. L'IL-2 est produite par les lymphocytes T et permet leur prolifération, leur croissance ainsi que la différenciation des cellules NK, monocytes et macrophages. L'IFN $\gamma$  est quant à lui produit par les lymphocytes T et cellules NK activées, et a pour rôle d'augmenter l'expression du CMH, d'induire l'arrêt du cycle cellulaire voire l'apoptose. Le CCL-5 est une chimiokine permettant le recrutement des populations lymphocytaires et leur prolifération.



	IL-2		IFN- $\gamma$		CCL-5	
	médiane	SD	médiane	SD	médiane	SD
contrôle	0,028	0,021	0,095	0,174	0,031	0,037
ACT	0,012	0,003	0,112	0,106	0,017	0,018
RIV- $\alpha$	0,023	0,012	0,046	0,148	0,02	0,031
Association thérapeutique	<b>0,148</b>	<b>0,15</b>	<b>0,56</b>	<b>0,623</b>	<b>0,297</b>	<b>0,18</b>

Figure 24: Expression de cytokines au niveau du site tumoral.

a) Expression relative d'IL-2 (a), d'IFN $\gamma$  (b) et CCL-5, rapportée à un gène de ménage et à un contrôle positif (\*= $p < 0.05$ , test de Kruskal Wallis,  $n=5$  pour chaque jour de prélèvement et traitement). d) détail des médianes et écart-types (SD) des expressions relatives des différents groupes et cytokines à J16

Pour ces trois cytokines, une augmentation significative de l'expression est observée à J16 dans le groupe recevant l'association thérapeutique, comparée à tous les autres groupes. Le détail des expressions relatives observées à J16 est donnée dans le tableau en [Figure 24d](#). Etant donné que les lymphocytes T sont les principaux producteurs de ces cytokines, cette augmentation concorde avec l'observation d'une augmentation du nombre de LT OT-1 au niveau de la tumeur à J16. L'expression de CCL-5 concorde également avec une meilleure répartition de l'infiltrat de LT CD8 observé à J16 dans les tranches de tumeurs analysées par IHC. Malheureusement, cet effet est perdu à J19, où plus aucune différence significative d'expression n'est observée entre les différents groupes.

### Conclusion

La RIV- $\alpha$ , en plus de son effet toxique sur les cellules tumorales, présente plusieurs effets bénéfiques pour le développement d'une réponse immunitaire au niveau du site tumoral à un temps précoce : on observe en effet, une déplétion des lymphocytes, notamment les LT CD4 régulateurs, la création d'un environnement favorable à l'infiltrat de LT OT-1, qui présentent une meilleure motilité et répartition dans la tumeur, ainsi qu'une production accrue d'IL-2, de CCL-5 et d'IFN $\gamma$ . Cette première phase semble correspondre à la phase d'élimination / équilibre, où la réponse immunitaire est capable de se développer sur le site tumoral de manière efficace. Néanmoins, la plupart de ses effets ne durent pas dans le temps : la tumeur réussit à échapper, le rapport LT OT-1/cellules tumorales diminue à J19, tout comme la production de cytokines et chimiokines.

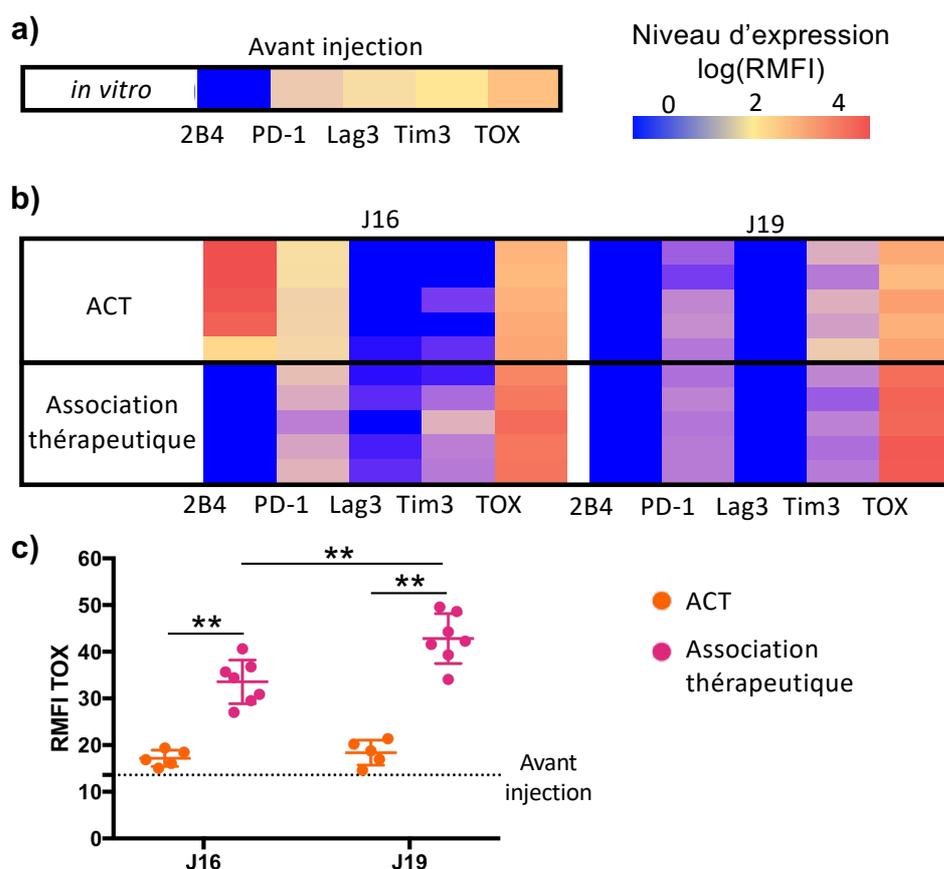
## III –Réponse tumorale suite aux traitements

### a) Phénotype épuisé/différencié des LT OT-1

Etant donné que la prolifération tumorale continue malgré l'important infiltrat de LT OT-1 dans le TME, nous avons évalué le phénotype de ces LT. En effet, lors d'infections chroniques ou de lésions cancéreuses, la stimulation constante des LT peut entraîner un phénotype dit « épuisé », entraînant une diminution de la prolifération des LT, une incapacité à sécréter des cytokines et à lyser les cellules cibles (Zarour, 2016). Ce phénotype épuisé est fréquemment observé chez les LT infiltrant les tumeurs, et est caractérisé entre autre par l'expression de divers marqueurs d'épuisement tels que Lag-3, Tim-3, PD-1 et 2B4 (Baitsch *et al.*, 2011; Ma *et al.*, 2019). Les effets de ces différentes molécules ne sont pas entièrement élucidés, mais comportent entre autres, une compétition pour la liaison à des récepteurs de co-stimulation, l'augmentation de l'expression de gènes inhibiteurs, l'envoi de signaux inhibant l'action des LT. Afin d'apprécier le phénotype des LT, l'expression de plusieurs marqueurs d'épuisement doit être évaluée de manière globale, étant donné que l'expression d'un seul de ces marqueurs n'est pas suffisant pour être associé à un phénotype épuisé (Dariane *et al.*, 2017).

Les niveaux d'expression de différents marqueurs sont rapportés en [Figure 25](#) sous forme d'une cartographie d'activité, *in vitro* avant leur injection ([Figure 25a](#)), et à J16 et J19 pour les LT OT-1 infiltrant les tumeurs ([Figure 25b](#)). Seul les LT OT-1 infiltrant les tumeurs traitées avec l'ACT seule à J16 montrent une expression de 2B4. Si Lag3 est exprimé avant injection par les LT OT-1, son expression ne perdure dans aucune des conditions de traitement *in vivo*. PD-1 et Tim3 sont exprimés de manière homogène par les LT OT-1 infiltrant les tumeurs. Tim3 semble plus exprimé dans le groupe traité avec l'association thérapeutique, tandis que PD-1 semble plus exprimé lors de l'ACT seule, cependant ces différences ne sont pas significatives.

Néanmoins, si ces marqueurs sont retrouvés chez les LT CD8 épuisés infiltrant les tumeurs (Baitsch *et al.*, 2011; Zelle-Rieser *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2019), ils ne signifient pas systématiquement une absence totale de fonction des LT. Par exemple, il a déjà été démontré une production normale d'IFN $\gamma$ , IL-2 et granzyme B par des LT CD8 exprimant PD-1 (Yang *et al.*, 2017). L'expression de ces marqueurs corrèle avec l'épuisement, mais ne l'induit pas. De plus, ces marqueurs sont également retrouvés à la surface des LT activés (Legat *et al.*, 2013; Verdeil *et al.*, 2016). La différenciation entre des LT activés et épuisés ne peut donc pas se faire uniquement sur l'expression de ces marqueurs, et nécessite une étude fonctionnelle, notamment par l'évaluation d'expression de cytokines comme le TNF- $\alpha$  ou l'IFN $\gamma$ .



**Figure 25: Phénotype des LT OT-1 infiltrant la tumeur**

a) Expression relative des différents marqueurs d' « épuisement » des LT OT-1 *in vitro* et b) à J16 et J19 c) Expression du facteur de transcription TOX par les LT OT-1, avant injection et lors des prélèvements à J16 et J19 (\*\*= $p < 0,005$ , test de Kruskal Wallis,  $n=5$  pour chaque prélèvement et condition de traitement *in vivo*).

Une autre possibilité est d'évaluer le niveau d'expression de TOX, un facteur de transcription décrit comme exprimé de manière transitoire et faible dans les infections aiguës, et plus élevé dans les infections chroniques et cancers (Khan *et al.*, 2019). Une étude récente montre notamment que son expression est suffisante pour déclencher un programme d'épuisement chez les LT murins (Scott *et al.*, 2019). Dans notre modèle, les LT OT-1 activés *in vitro* présentent une faible expression de TOX, concordant avec ces études. Une fois injectés *in vivo*, les LT OT-1 présents dans les tumeurs du groupe ayant reçu

l'association thérapeutique présente une augmentation progressive de l'expression de TOX au cours du temps : la médiane d'expression passe de 34,43 (+4,68) à J16 à 42,3 (+5,3) à J19 (Figure 25b). Au contraire, l'expression de TOX par les LT OT-1 dans le groupe ACT est stable, passant de 16,87 (+1,74) à J16 à 18,77 (+2,68) à J19. L'ensemble de ces résultats, (baisse d'expression d'IFN $\gamma$  et d'IL-2 dans la tumeur mesurée par qPCR à J19, expression de TOX et baisse du rapport LT OT-1/cellules tumorales) semble indiquer que les LT OT-1 entrent dans une phase d'épuisement dans les tumeurs traitées avec l'association thérapeutique.

### b) Expression de PD-L1 par tumeur

Les LT OT-1 ayant montré une expression de PD-1 dans certains groupes, l'expression de son ligand, PD-L1, connu pour être exprimé sur les cellules tumorales afin d'inhiber les réponses LT CD8, est évaluée. La stratégie d'analyse par cytométrie en flux est identique à celle utilisée pour l'analyse de l'expression du CMH, en Figure 17. Des histogrammes représentatifs de l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales dans chaque groupe sont représentés en Figure 26a. La quantification du niveau d'expression est calculée et représentée en RMFI en Figure 26b.

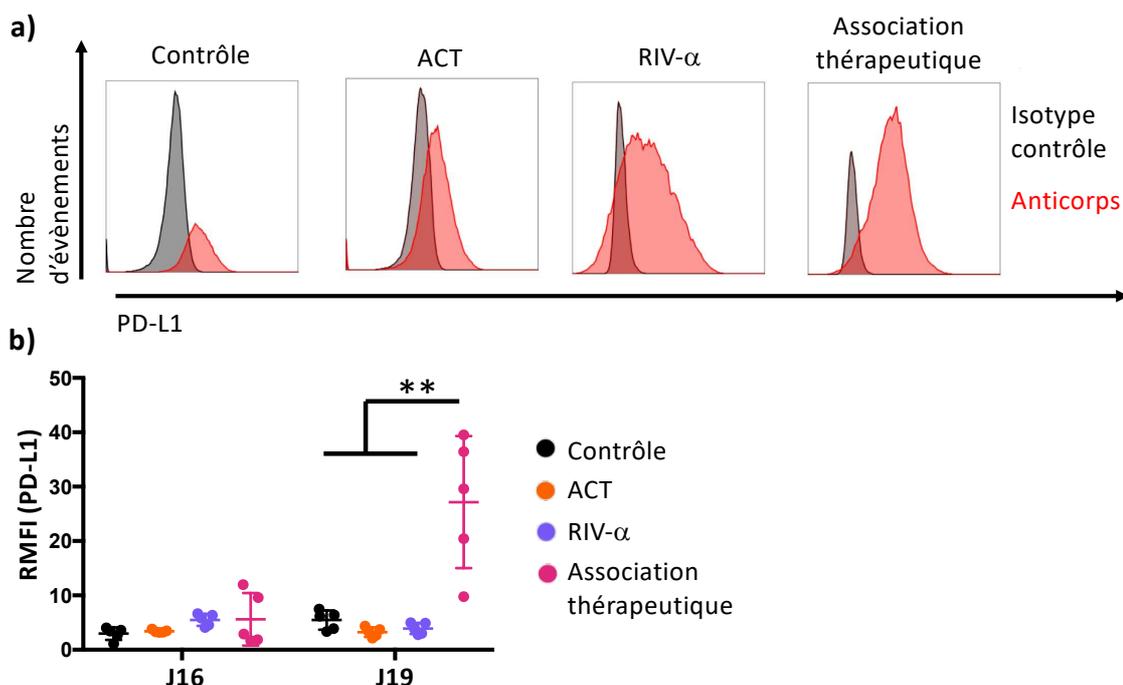


Figure 26: Expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

a) Superposition des histogrammes pour l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales (CD138+), avec en noir les cellules incubées avec l'isotype contrôle et en rouge celles incubées avec l'anticorps spécifique.  
 b) Rapport des médianes de fluorescences entre les marquages PD-L1 et isotype contrôle, en fonction du jour de prélèvement et du traitement reçu (\*\* = p < 0,005, test de Kruskal-Wallis, n=5 pour chaque prélèvement et traitement)

Si à J16 aucune différence n'est observée entre les différents groupes, à J19 une nette augmentation de l'expression de PD-L1 est observée pour le groupe ayant reçu l'association

thérapeutique. Les cellules tumorales ainsi traitées présentent une médiane d'expression de PD-L1 de 29,61 (+12,16), comparées aux groupe contrôle, ACT ou RIV- $\alpha$  seule qui présentent des médianes d'expression de 6,2 (+1,7), 3,3 (+0,9) et 3,9 (+1), respectivement. Ce résultat peut être mis en parallèle avec la détection par qPCR d'IFN $\gamma$  dans ce même groupe, à J16. En effet, il est décrit dans la littérature que l'IFN $\gamma$  est l'un des principaux inducteurs de l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales (Pardoll, 2012), provoquant ainsi un rétrocontrôle négatif de la réponse immunitaire.

### Conclusion

Suite à la première phase d'élimination observée dans les tumeurs ayant reçu l'association thérapeutique, une phase d'adaptation semble s'être mise en place : les cellules tumorales expriment peu de CMH-I, l'IFN $\gamma$  sécrété par les LT provoque un pic d'expression de PD-L1. A partir de J19, la réponse immunitaire observée à J16 semble s'épuiser, et la tumeur rentre dans une phase d'échappement: le rapport LT OT-1/cellules tumorales diminue, tout comme la production de cytokines, les marqueurs d'épuisement des LT OT-1 augmentent, et les cellules tumorales expriment PD-L1, leur permettant d'inhiber la lyse spécifique par les LT OT-1.

## Discussion

La RIV- $\alpha$  présente de nombreux effets sur le TME, en outre de la lyse des cellules tumorales suite aux irradiations par les particules alpha. Les cellules tumorales survivantes présentes une expression de CMH-I plus élevée dans le groupe traité avec la RIV- $\alpha$  seule, favorisant la reconnaissance des cellules par les LT CD8 activés. Néanmoins, cette augmentation n'est pas visible dans le groupe traité avec l'association thérapeutique. Il est possible que dans ce groupe, la RIV- $\alpha$  ait induit une augmentation de l'expression d'H-2K<sup>b</sup>, facilitant par la suite la lyse des cellules tumorales suite au transfert de LT OT-1. La pression de sélection engendrée par la combinaison thérapeutique a donc pu mener à une sélection des cellules tumorales exprimant à un plus faible niveau les molécules H-2K<sup>b</sup>. Cette augmentation de l'expression du CMH est également retrouvée chez les cellules tumorales traitées par irradiation externe (Reits *et al.*, 2006; Sato *et al.*, 2014).

L'impact principal de la RIV- $\alpha$  sur le microenvironnement tumoral, outre celui sur les cellules cancéreuses, est la déplétion des lymphocytes présents au niveau du site tumoral. Il a été rapporté *in vitro* que les LT CD4 régulateurs sont moins sensibles aux irradiations externes que les autres splénocytes, et qu'ils présentent une résistance aux signaux apoptotiques (Liu *et al.*, 2015; Beauford, Kumari and Garnett-Benson, 2020). *In vivo*, une augmentation du pourcentage de LT CD4 régulateurs a été observée dans la rate et la tumeur dans un modèle murin du cancer de la prostate, après une irradiation externe locale de 10 Gy (Kachikwu *et al.*, 2011). Après isolation et culture *in vitro*, ces LT CD4 régulateurs conservaient leur capacité à inhiber la prolifération de LT CD4. Dans un autre modèle murin, l'irradiation de l'abdomen de souris avec 10 Gy a également induit une augmentation du pourcentage de LT CD4 régulateurs dans les ganglions mésentériques (Billiard *et al.*, 2011). Une augmentation de l'expression de la chimiokine CCL17 semble indiquer que cette augmentation peut être liée à un recrutement de nouveau LT CD4 regs. Cependant dans ce modèle, une fois isolés *in vitro*, les LT CD4 régulateurs provenant de souris irradiées ont vu leur capacité à inhibitrice diminuée comparé aux souris contrôle.

Cette perte de capacité inhibitrice a également été observé chez des LT CD4 régulateurs humains isolés et irradiés *in vitro* avec 30 Gy (Cao *et al.*, 2009), avec également une diminution de leur production de TGF- $\beta$ . Une dernière étude a montré l'impact de la dose d'irradiation administrée sur les LT CD4 regs ; l'administration de faible dose (10 cGy) à des rats présentant un cancer du foie a mené cette fois-ci à une diminution de la proportion de LT CD4 régulateurs dans le foie comparé au groupe contrôle (Wang *et al.*, 2014). Dans notre cas, l'utilisation d'un émetteur de particules alpha, le bismuth-213 permet de dépléter de manière stable les lymphocytes CD4 régulateurs et CD8 endogènes présents au niveau du site tumoral, comme décrit dans l'étude de Behling et ses collaborateurs (Behling, Maguire, Lopez Puebla, *et al.*, 2016).

Les LT CD4 régulateurs jouent un rôle prépondérant dans l'inhibition de la réponse immunitaire. Lors de transferts adoptifs de LT CD8, il a déjà été observé que leur déplétion préalable permet une meilleure efficacité de l'ACT (Chen *et al.*, 2007). De plus, dans un essai clinique de transfert de TILs, une faible proportion de T régulateurs dans le sang est corrélée à une meilleure réponse au traitement chez les patients (Yao *et al.*, 2012). La neutralisation des LT CD4 régulateurs semble donc être bénéfique au traitement par ACT. Ces études concordent avec nos observations dans ce modèle, où l'administration de la RIV- $\alpha$  permet une déplétion des LT CD4 régulateurs et une lyse des cellules tumorales.

De manière comparable au LT CD4 régulateurs, les LT CD8 endogènes sont également déplétés suite au traitement par RIV- $\alpha$ . Les cellules lymphocytaires présentes au site tumoral semblent donc sensibles à ce traitement, et la déplétion est stable pendant au moins 9 jour après traitement. A l'inverse, il a été observé après traitement par irradiation externe une augmentation de l'infiltrat des LT CD8,

notamment dans des modèles de mélanome (Gupta *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2014). Dans ce cas, l'infiltrat de LT CD8 est lié à l'activation des cellules dendritiques, qui migrent dans les organes lymphoïdes secondaires afin d'activer les LT CD8, permettant par la suite leur recrutement au site tumoral. L'absence d'infiltrat de novo dans notre modèle peut être liée à une immunogénicité moindre des cellules tumorales du myélome multiple comparé aux cellules de mélanome.

Contrairement au LT CD8 endogènes, les LT OT-1 sont injectés après traitement par la RIV- $\alpha$  et ne sont donc pas déplétés. Suite à l'ACT, une augmentation du rapport LT OT-1/cellules tumorales et une production plus importante de cytokines sont alors observées. L'amélioration du rapport LT OT-1/cellules tumorales tient à la déplétion des cellules tumorales, et non à un infiltrat de LT OT-1 plus important. Ce rapport plus élevé semble également être à l'origine d'une production plus forte d'IL-2, d'IFN $\gamma$  et de CCL-5. En effet, les LT CD8 activés sont les principaux producteurs de ces cytokines, leur niveau de production élevé à J16 concorde avec le rapport LT OT-1/cellules tumorales élevé.

Un impact supplémentaire de la RIV- $\alpha$  sur l'efficacité de l'ACT est la motilité initiale accrue des LT CD8 infiltrant la tumeur. Les principaux facteurs impactant la motilité des LT CD8 sont les chimiokines et le taux d'oxygène présent dans le milieu, la composition matricielle et cellulaire du microenvironnement, et le niveau d'activation des cellules (Krummel, Bartumeus and Gérard, 2016; Nicolas-Boluda and Donnadieu, 2019). Dans notre cas, les mêmes LT OT-1 sont activés *in vitro* puis mis en contact avec des tranches provenant soit de tumeurs contrôles soit de tumeurs traitées par la RIV- $\alpha$ . L'acquisition étant réalisée avec une oxygénation identique, ni l'état d'activation ni le taux d'oxygène ne peuvent expliquer cette différence de motilité observée.

CCL-5 et CXCL10 sont les principales cytokines responsables de la migration des LT CD8, or le dosage par RT-qPCR n'a mis en évidence d'augmentation pour aucune de ces chimiokines après traitement par la RIV- $\alpha$  seule; l'augmentation de CCL-5 n'a été observé qu'avec l'association thérapeutique. De même, l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales a été décrite comme ayant un impact sur la motilité des LT CD8 (Brunner-Weinzierl and Rudd, 2018), mais de manière similaire à CCL-5, une augmentation de son expression n'a été observé que lors de l'association thérapeutique. Un autre facteur impactant fortement la migration des LT CD8 est la présence de fibres de collagène ainsi que les interactions avec des macrophages (Salmon *et al.*, 2012; Peranzoni *et al.*, 2018), néanmoins dans notre cas aucun macrophage n'a été détecté par cytométrie en flux. De plus, les colorations HPS des tumeurs n'ont pas révélé d'organisation en îlots entourés de collagène, qui auraient pu avoir un impact sur la migration des LT. Une explication possible à cette meilleure motilité serait une densité de cellules tumorales moindre suite à la RIV- $\alpha$ .

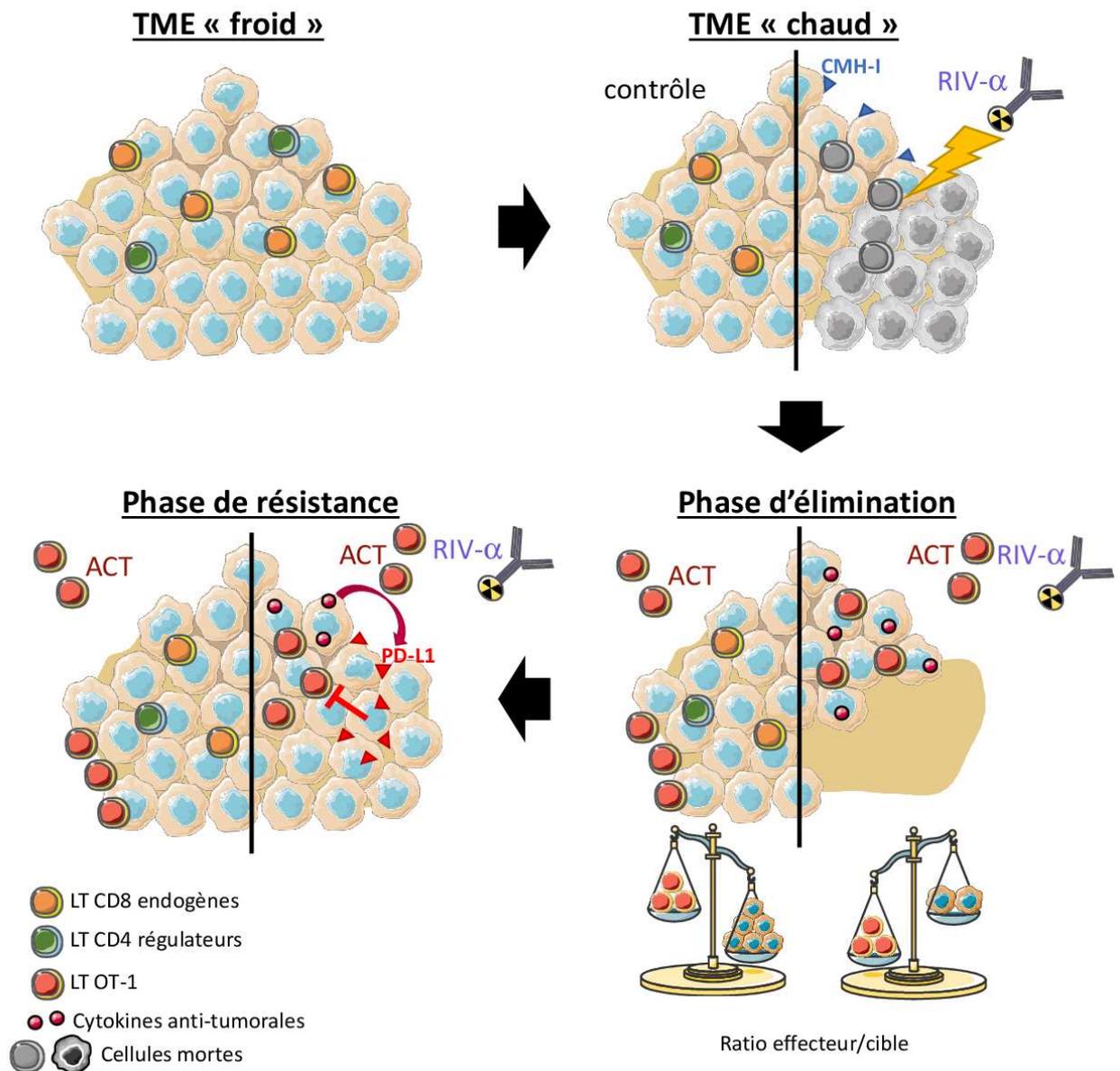
Cependant, cette motilité est observée dans un modèle de tranches *ex vivo*, qui comme mentionné ci-dessus ne prends pas en compte les différences d'oxygénation et d'activation des LT *in vivo*. Une imagerie biphotonique *in vivo* de tumeurs sous-cutanées permettrait d'intégrer ces autres paramètres. Suite à cette motilité améliorée, associée à un volume tumoral plus faible, il est observé une meilleure distribution des LT CD8 dans les tumeurs après l'association thérapeutique.

Néanmoins, ces effets anti-tumoraux sont transitoires, et l'apport de LT CD8 activés seul n'est pas suffisant pour induire une régression tumorale. A J19, même si un infiltrat conséquent de LT OT-1 est toujours observé dans la tumeur, le rapport LT OT-1/cellules tumorales diminue dans le cas de l'association thérapeutique. Cette diminution de la proportion des LT OT-1 au niveau du site tumoral s'accompagne alors d'une diminution de la production des cytokines anti-tumorales produites

classiquement par les LT CD8 activés : l'IL-2 et l'IFN $\gamma$ . Cette diminution de l'activité des LT s'accompagne par l'expression de marqueurs corrélés avec un état d'épuisement (Wherry and Kurachi, 2015).

Cependant diverses études ont montré que l'expression de ces marqueurs d'épuisement était également présente chez les LT CD8 activés et différenciés, et n'impliquait pas systématiquement une perte de fonction (Legat *et al.*, 2013; Fuertes Marraco *et al.*, 2015). Si l'expression de ces différents marqueurs ne permet pas de conclure sur l'état d'épuisement des LT OT-1, leur expression croissante du facteur de transcription TOX est une indication intéressante. Chez les souris, ce facteur de transcription est décrit comme exprimé de manière faible et transitoire en cas d'infection aiguë. Lors d'infections chroniques ou de cancer, son expression est élevée (Heim *et al.*, 2020; Sekine *et al.*, 2020). De plus, son expression à elle seule a permis d'induire un programme d'épuisement chez des T murins (Scott *et al.*, 2019). Associé au déclin de la production de cytokines anti-tumorales et à la diminution du rapport LT OT-1/cellules tumorales, ces différents éléments semblent pointer un épuisement des LT CD8. Néanmoins, un tri de ces LT OT-1 *ex vivo* et des tests *in vitro* de fonctionnalité permettraient de confirmer cette hypothèse.

A partir des différentes observations discutées précédemment, une proposition de mécanisme d'action de la RIV- $\alpha$  et de l'ACT dans une tumeur solide est résumée en [Figure 27](#) :



**Figure 27: Proposition de mécanisme d'action de la RIV-α et de l'ACT sur le TME.**

Le TME « froid » des tumeurs contrôles se caractérise par un infiltrat de LT CD4 régulateurs et de LT CD8 endogènes. La RIV-α permet de dépléter les cellules tumorales et lymphocytes infiltrant la tumeur. La diminution du volume tumoral s'accompagne d'une augmentation de l'expression du CMH-I sur les cellules survivantes. Lors de l'ACT, les LT OT-1 bénéficient d'un meilleur rapport LT OT-1/cellules tumorales, une meilleure distribution dans la tumeur et une augmentation de la production de cytokines. La réaction immunitaire déclenche des mécanismes de résistance chez la tumeur, par l'expression de PD-L1.

A partir de ces résultats, l'association de la RIV-α et d'immunothérapies semble prometteuse : la RIV-α semble induire un profond changement dans le TME, le rendant favorable à l'action des immunothérapies. Par comparaison, il existe d'ores et déjà de nombreuses études sur la combinaison des irradiations externes avec les immunothérapies, principalement les inhibiteurs de point de contrôles. Il a été démontré que les irradiations externes induisent une mort immunogénique par le relargage de DAMPs, ainsi qu'une augmentation de l'expression du CMH sur les cellules tumorales et l'induction d'un contexte inflammatoire (Reynders and De Ruyscher, 2015). Dans un modèle murin de carcinome du

colon, l'association de radiothérapie externe et de transfert adoptif de LT CD8 a permis une amélioration de l'efficacité thérapeutique (Reits *et al.*, 2006).

Néanmoins l'utilisation d'irradiation externe présente également des effets délétères pour la réponse immunitaire : une augmentation des macrophages de type M2 ainsi que des LT CD4 régulateurs, favorisé par le contexte inflammatoire et le relargage de TGF- $\beta$  (Sato, Okonogi and Nakano, 2020). A l'inverse, la RIV- $\alpha$  a permis une déplétion des LT CD4 régulateurs dans notre modèle, et aucune augmentation de cytokines pro-inflammatoire n'a été détectée. Une première hypothèse afin d'améliorer l'association thérapeutique serait d'appuyer le transfert de lymphocytes T, en réalisant par exemple plusieurs transferts à suivre. Une telle association a été réalisée dans d'autres travaux de l'équipe en collaboration avec l'équipe n°3 du CRCINA :

- développement d'une RIV- $\alpha$  au bismuth-213, dirigée contre l'antigène PD-L1 exprimé dans un modèle de mélanome xénotreffé (Capitao *et al.*, 2021). Cet article est présent en [Annexe III](#).
- développement d'un transfert adoptif de lymphocytes T déficients pour le gène PD-1, spécifiques de l'antigène melan-A dans le même modèle (Marotte *et al.*, 2020)

Chaque thérapie séparée a permis une diminution de la croissance tumorale. L'association d'une RIV- $\alpha$  avec 3 injections consécutives de LT (à 1 semaine d'intervalle chacune) a donc été menée dans ce même modèle (Marotte L\*, Capitao M\* et al, 2021, accepté *Oncolmunology* et présenté en [Annexe IV](#)). Si l'association thérapeutique a bien permis une diminution de la croissance tumorale supérieure à chaque thérapie seule, la répétition des injections de LT n'a pas été suffisante pour réduire la masse tumorale. Des phases de plateau dans la croissance sont observées avant que la croissance tumorale ne reprenne après chaque injection de LT. Les lymphocytes ayant été édités pour l'expression de PD-1, une inhibition de leur fonction par l'expression tumorale de PD-L1 est exclue. L'administration de plusieurs injections de LT ou d'inhibiteurs de point de contrôle, tels que des anticorps anti PD-L1, ne permettraient donc pas un meilleur contrôle de la croissance tumorale.

Afin d'améliorer la réponse immunitaire des LT, l'injection de cytokines telles que l'IL-2, IL-7 ou IL-21, pour soutenir la prolifération des effecteurs peut être envisagée (Klebanoff *et al.*, 2011). L'IL-2 serait un candidat particulièrement prometteur, étant donné que les principaux consommateurs d'IL-2 sont les LT CD4 régulateurs, et que ces derniers ont été préalablement déplétés par la RIV- $\alpha$ . Néanmoins cette stratégie risque à nouveau de pousser les cellules tumorales à s'adapter à la réponse immunitaire, en créant un TME froid, comme ce qui est observé à J19 dans notre modèle. Une possibilité plus intéressante consisterait à réaliser des cycles alternant RIV- $\alpha$  et transfert adoptif de lymphocytes T. De tels cycles permettraient de conserver constamment un environnement propice à la réponse immunitaire avant chaque injection d'immunothérapie, et de renouveler les LT épuisés.

Enfin, le modèle utilisé ici est un myélome multiple en greffe ectopique, permettant un accès facile à la tumeur afin d'en étudier son microenvironnement. Néanmoins, plusieurs populations n'ont pas pu être détectées par cytométrie en flux, telles que les cellules NK, macrophages et lymphocytes B. L'absence de ces cellules dans le TME de notre modèle nous empêche d'évaluer l'impact de la RIV- $\alpha$  sur des cellules qui ont un rôle crucial dans le TME. D'autres modèles plus immunogènes, ou présentant une organisation matricielle différente, permettraient d'évaluer l'impact de la RIV- $\alpha$  sur d'autres éléments du TME. De plus, l'impact d'autres émetteurs alpha sur le TME serait intéressant à évaluer. Comme mentionné dans l'introduction avec le cas des combinaisons de chimiothérapie avec des anticorps radiomarqués au bismuth-213 ou au plomb-212, l'impact des émetteurs alpha peut varier selon leur demi-vie et énergie moyenne. Récemment, une thérapie dans le même modèle mais utilisant un anti-CD138

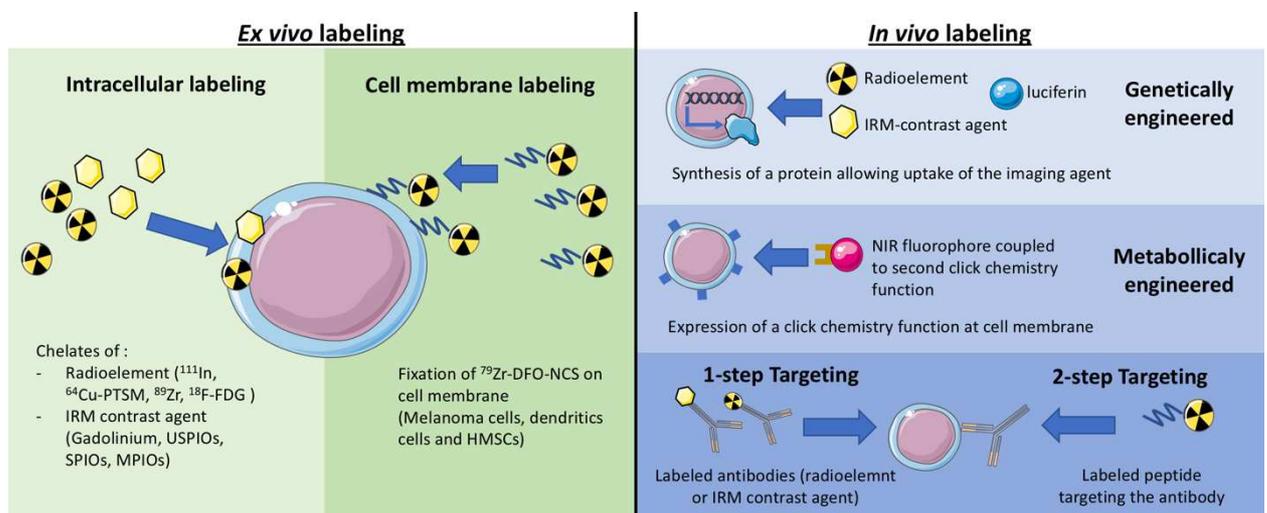
radiomarké à l'astate-211, dont la demi-vie est de 7,2h, a été réalisée au sein de l'équipe (Gouard *et al.*, 2020). L'étude du TME dans ce modèle permettrait de vérifier si les effets observés dans cette étude sont propres au bismuth-213 ou peuvent être engendrés par différents émetteurs de particule alpha.

Lors de cette étude, les différentes méthodes utilisées ont toutes nécessités le sacrifice des animaux afin de réaliser des prélèvements. Afin de pouvoir réaliser un suivi longitudinal, de diminuer le nombre d'animaux utilisés lors des expérimentations, et de développer des méthodes adaptables à un suivi clinique du TME, d'autres méthodes d'évaluation de la réponse immunitaires devront être développées.

## Partie Suivi cellulaire

Afin de mieux comprendre la réponse immunitaire suite au traitement, et de mieux suivre les cellules utilisées lors du transfert adoptif, nous avons souhaité développer une méthode de suivi *in vivo* (ou « tracking ») des LT OT-1. Afin de pouvoir réaliser un suivi longitudinal dans le corps entier, sans avoir à sacrifier la souris, nous nous sommes tournés vers les méthodes d'imagerie pré-existantes dans la littérature. Une revue de l'état de l'art publiée dans *Frontiers* (Perrin *et al.*, 2020) fait le point sur les différentes méthodes utilisées et les résultats obtenus (cf [Annexe V](#)). La [Figure 28](#) présente un schéma extrait de cette revue, résumant les deux principales approches utilisées lors du tracking des cellules en imagerie :

- le marquage *ex vivo* (« *Ex vivo labeling* ») consiste à marquer des cellules avant leur injection systémique. Cette méthode permet d'améliorer la sensibilité de la détection, car seules les cellules d'intérêt sont marquées. En imagerie TEP, les cellules sont principalement chargées avec du cuivre-64, zirconium-89 et indium-111. Cependant l'efflux de radioélément de la cellule ainsi que la demi-vie de l'émetteur choisi limite le suivi longitudinal des cellules.
- Le marquage *in vivo* (« *In vivo labeling* ») consiste à injecter un vecteur radiomarqué afin de cibler et révéler les cellules *in vivo*. Le ciblage peut être réalisé grâce à un anticorps reconnaissant une protéine exprimée principalement par les cellules cibles. Néanmoins, la plupart du temps, cette cible n'est pas exprimée exclusivement pas les cellules d'intérêt, induisant du bruit de fond. Afin de palier ce problème, la modification métabolique ou génétique des cellules avant leur injection peut également leur permettre d'exprimer des molécules qui seront présentes uniquement sur les cellules d'intérêt.



*Figure 28: Schéma extrait de la revue « Cell tracking in cancer immunotherapy » (Perrin *et al.*, 2020)*

Ces méthodes ont été largement utilisées pour le suivi de cellules tumorales, cellules souches, myéloïdes et macrophages dans diverses études pré-cliniques. Dans le cas de notre modèle, nous souhaitons développer une imagerie TEP afin d'obtenir une image plus résolutive que celle obtenue dans le cas d'imagerie infrarouge ou SPECT. De plus, celle-ci serait adaptée à un potentiel transfert en clinique, et permettrait une quantification du signal. L'objectif de ce second sujet est de développer une méthode

permettant de suivre les LT injectés lors d'une ACT dans le corps entier, par imagerie TEP dans le but de mieux comprendre les différentes réponses des patients au transfert adoptif de cellules.

Afin de mettre au point ces approches, un marquage fluorescent a d'abord été réalisé pour chaque méthode, afin de le mettre au point avant de passer au marquage radioactif. Différentes approches de chargement *ex vivo*, à l'aide de liposomes et de radioéléments, ont été testées et comparées à deux méthodes de marquage *in vivo* à l'aide de modifications métaboliques et de ciblage direct des LT OT-1 par des anticorps.

## Matériel et Méthodes

### I - Marquage liposomes

Les liposomes DSPC/Chol/DSPE-PEG2000/DPPE-Bodipy sont synthétisés et caractérisés par le Dr Marie MOUGIN-DEGRAEF selon la méthode d'hydratation d'un film lipidique décrite par Bangham (Bangham and Horne, 1964). Cette méthode simple permet d'obtenir des liposomes multilamellaires de taille hétérogène dont on devra réduire la taille par extrusion en passant les lipides par un filtre de polycarbonate ayant une taille de pores bien définie. On obtient ainsi des liposomes unilamellaires de taille homogène calibrés à 100 nm. La proportion de chaque lipide (rapport molaire) est décrite dans le [Tableau V](#) ci-dessous, et les références des lipides utilisés sont:

- Cholesterol (Chol / Mm : 386.66, Sigma)
- DSPC : 1,2-distearoyl-glycero-3-phosphocholine (Mm: 790.16, Avanti Polar Lipids)
- DSPE-PEG2000 : 1,2-Distearoyl-sn-glycerol-3-phosphoethanolamine-N-[Amino(Poly-ethyleneglycol)-2000], (Mm: 2790.52, Avanti Polar Lipids)
- DPPE-Bodipy : 1-palmitoyl-2-(dipyrrometheneborondifluoride)undecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (Mm 867.89, Avanti Polar Lipids)

Formulation	% de fluorochrome	DSPC	Cholesterol	DSPE-PEG2000	DPPE-Bodipy
DSPC/Chol /DSPE-PEG2000//DPPE-Bodipy, Rapport molaire 64 : 30 : 5 : 1	1%	64%	30%	5%	1%
DSPC/Chol /DSPE-PEG2000//DPPE-Bodipy, Rapport molaire 62 : 30 : 5 : 3	3%	62%	30%	5%	3%
DSPC/Chol /DSPE-PEG2000//DPPE-Bodipy, Rapport molaire 60 : 30 : 5 : 5	5%	60%	30%	5%	5%

*Tableau V : Rapport molaire de chaque formulation de liposomes*

Une solution de 20  $\mu\text{mol}$  de lipides (dont le rapport est défini dans le tableau ci-dessus) est dissoute dans un mélange chloroforme/méthanol (9:1, v/v). Le solvant est évaporé afin d'obtenir un film lipidique homogène. L'hydratation du film lipidique s'effectue en ajoutant 1 mL de phase aqueuse (tampon citrate 10 mM/acétate 170 mM pH 5). Le mélange lipidique est vortexé et maintenu à une température supérieure à la température de transition des lipides ( $T_{m_{\text{DSPE}}} = 74^\circ\text{C}$ ) durant 2 heures à l'évaporateur rotatif. La concentration finale de la solution est de 20  $\mu\text{mol/mL}$ .

La taille des liposomes est calibrée à l'aide d'un mini-extruder (Avanti Polar Lipids) préalablement chauffé à 74°C. La solution de liposomes est ainsi filtrée sur des membranes de polycarbonate de 100 nm. 20 passages sur le filtre sont nécessaires pour obtenir des liposomes de taille homogène et une solution translucide. La taille et l'indice de polydispersité sont contrôlés par granulométrie (Malvern High Performance Particule Size HPPS-ET, Instrument SA, UK). Le lot utilisé présente une taille moyenne de 105,5nm (+6,4). Le taux d'encapsulation passif lors de la formation des liposomes est de 1,5µL de phase aqueuse pour des liposomes de 100nm de diamètre.

## II - Marquage Zirconium

### a) Préparation du complexe [89Zr]tétraoxinate de zirconium(IV)

Le [89Zr]tétraoxinate de zirconium(IV) est synthétisé comme décrit précédemment (Man *et al.*, 2019). Brièvement, 10 MBq de [89Zr]tetraoxalate de zirconium(IV) dans une solution d'acide oxalique 1M (PerkinElmer) sont dilués dans un volume final de 300µL d'eau osmosée préalablement purifiée sur résine Chelex R100 Sodium (Sigma). Le pH est amené à 7 à l'aide d'une solution de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Le volume est ajusté à 500µL et cette phase aqueuse est ajoutée à 500µL d'hydroxyquinoline (Sigma) dans du chloroforme (1 mg/mL). Après 15 minutes sous vive agitation, la phase organique est extraite et évaporée sous flux d'azote. Le [89Zr]tétraoxinate de zirconium(IV) est ensuite dissous dans 20µL de DMSO. Un schéma récapitulatif des étapes de synthèse est présenté en Figure 29a.

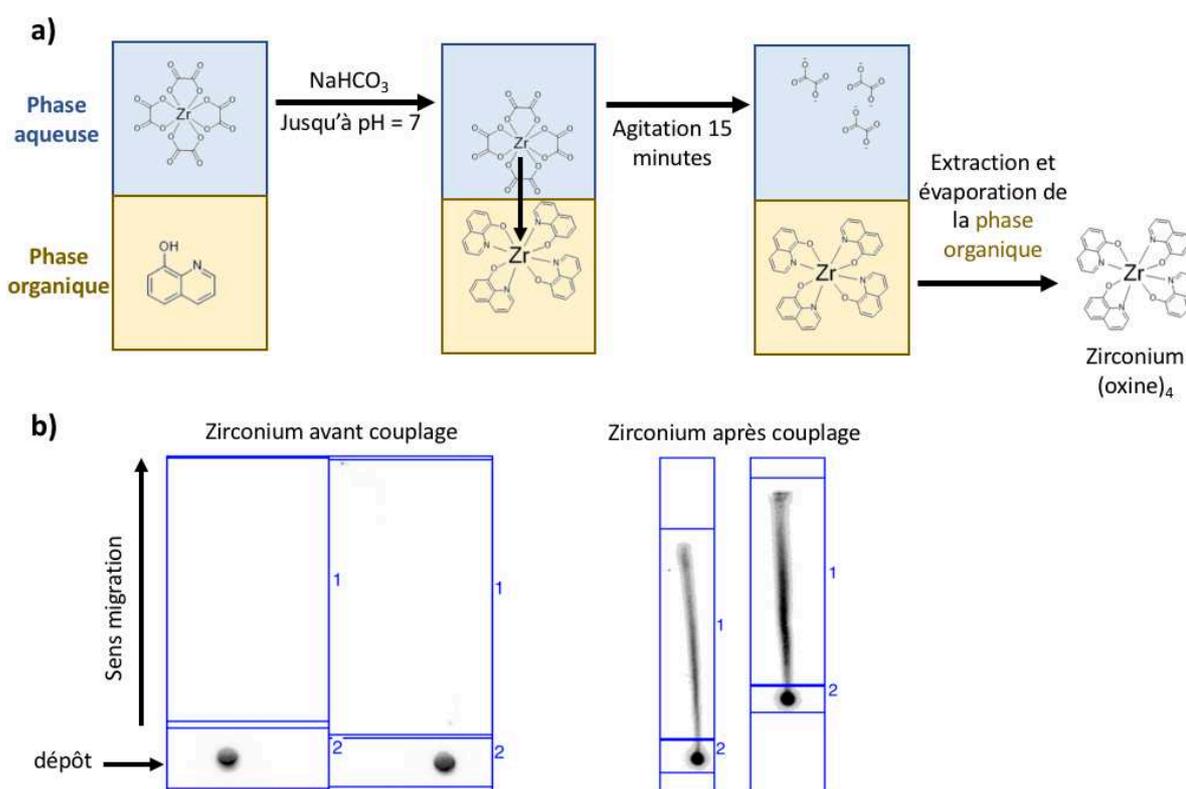


Figure 29: Synthèse du Zirconium(oxine)<sub>4</sub> à partir du Zirconium(oxalate)<sub>4</sub>.

a) Schéma de synthèse du zirconium(oxine)<sub>4</sub>; le zirconium est libéré des molécules d'oxalate en faisant passer le pH à 7, et peut passer dans la phase organique contenant l'oxine. b) Analyse des ITLC-SG par radiographie (ITLC-SG représentatives de 2 expériences indépendantes).

La formation du produit est vérifiée par migration sur ITLC-SG, en utilisant l'acétate d'éthyle en phase mobile. Les ITLC-SG sont ensuite révélées à l'aide d'un scanner Cyclone Phosphorimager (Perkin

Elmer), et les résultats obtenus sont présentés en [Figure 29b](#). L'acétate d'éthyle, un solvant apolaire, permet la migration du zirconium(oxine)<sub>4</sub>, tandis que le zirconium(oxalate)<sub>4</sub> reste sur le point de dépôt à cause de ses interactions avec la silice, polaire. Avant marquage, on n'observe aucune migration du produit. Après extraction, évaporation de la phase organique et reprise en DMSO du produit formé, on observe la présence de deux produits :

- Formation du produit Zirconium(oxine)<sub>4</sub> (partie supérieure de l'ITLC-SG). On observe une trainée, qui peut être liée à la dégradation du produit lors de sa migration ou à la présence de complexes incomplets (zirconium(oxine)<sub>1</sub>, zirconium(oxine)<sub>2</sub>, zirconium(oxine)<sub>3</sub>). La quantification des deux ITLC-SG donne 52,2 et 40,5% (ITLC-SG gauche et droite, respectivement) de formation de produit.
- L'activité restante au point de dépôt, elle, peut être liée au zirconium interagissant avec la silice, se décrochant des complexes avec l'oxine et ne migrant pas dans l'ITLC-SG. Il est également possible qu'une partie du zirconium couplé à l'oxalate passe de la phase aqueuse à la phase organique et reste par la suite au point de dépôt de l'ITLC-SG.

#### [b\) Marquage des LT OT-1 :](#)

1x10<sup>6</sup> de LT OT-1 préalablement stimulés sont lavés en tampon phosphate et mis en présence d'activité volumique croissante de [89Zr]tétraoxinate de zirconium(IV) pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois, et les lavages sont conservés afin d'en compter la radioactivité. L'efficacité de marquage est déterminée en mesurant l'activité contenue dans les cellules divisée par celle mesurée dans le milieu de lavage, et exprimée en pourcentage de l'activité totale. Les LT OT-1 sont maintenus en culture comme décrit précédemment, avec du milieu frais complété avec 1nM d'IL-15. Chaque jour, 100µL de chaque suspension cellulaire est prélevé et déposé dans un tube contenant un mélange d'huile de paraffine liquide et de dibutylphtalate (rapport 1/9, MERCK et Aldrich chemistry). Après centrifugation, les tubes sont brièvement congelés dans l'azote liquide avant d'être coupés pour séparer le culot contenant les cellules et le surnageant. La radioactivité est ensuite mesurée au compteur à scintillation NaI (Raytest). Le pourcentage de rétention du zirconium-89 par les cellules au temps T0 est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de rétention} = \frac{\text{activité comptée dans fraction cellulaire}}{\text{activité comptée dans fraction cellulaire} + \text{surnageant}}$$

L'activité mesurée dans les fractions aux différents temps (16, 40, 63 et 88h post marquage) est corrigée de la décroissance tumorale avant de calculer le pourcentage de rétention.

#### [III - Marquage en chimie click](#)

Au troisième jour de stimulation des LT OT-1, le milieu de culture est additionné de sucre ou choline comprenant une fonction azide. Après 48h de culture, des LT OT-1 sont lavés et révélés avec le DBCO MB 488 (Click Chemistry Tools) pendant 1h à 37°C. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avant d'être analysées par cytométrie en flux ou utilisées pour les tests de viabilité, stabilité ou cytotoxicité. Les métabolites utilisés sont les suivants :

- choline-azide : 1-Azidoethyl-choline (Jena Bioscience)
- glucose-azide : N-azidoacetylglucosamine-tetraacylated (Thermo Scientific)
- mannose-azide : N-azidoacetylmannosamine-tetraacylated (Thermo Scientific)
- galactose-azide : N-azidoacetylgalactosamine-tetraacylated (Thermo Scientific)

#### IV - Test fonctionnels *in vitro*

La stabilité du marquage *in vitro* est mesurée par cytométrie en flux. Une fois marqués, les LT OT-1 sont maintenus en culture *in vitro* avec du milieu de culture supplémenté avec 1nM d'IL-15. Les puits sont divisés en deux et complétés avec du milieu tous les deux jours pendant 5 jours. Un prélèvement quotidien d'un aliquot de cellules analysées par cytométrie en flux permet d'évaluer la stabilité du marquage fluorescent.

Afin de déterminer le potentiel effet toxique des marquages sur les LT OT-1, un marquage de viabilité utilisant le Zombie NIR (Biolegend), selon les recommandations du fournisseur, est réalisé après chaque marquage. Le pourcentage de cellules vivantes est ensuite mesuré par cytométrie en flux. L'impact potentiel des différents marquages sur la capacité des LT OT-1 à reconnaître et lyser les cellules cible est évalué par un test de relargage du Chrome51, comme précédemment décrits.

#### V - Suivi *in vivo*

Les souris C57BL/6 Kalwrij (ENVIGO) sont greffées en sous-cutané avec 2 millions de 5T33 ou 5T33-OVA, comme précédemment décrit. 11 jours après greffe, les souris sont injectées avec 5 millions de LT OT-1 par voie intraveineuse. Pour les expériences de chimie click, 5 nmoles de DBCO MF 488 sont injectées par voie intraveineuse 24h avant les prélèvements d'organes. 1, 2, 3 ou 4 jours après injection, les souris sont sacrifiées et la rate, sang, ganglions et tumeurs sont prélevés et dissociés mécaniquement. Après lyse des globules rouges les suspensions cellulaires sont incubées avec les anticorps pendant 30 minutes à température ambiante avant d'être lavées. Les panels d'anticorps utilisés sont détaillés en [Tableau VI](#). Les cellules mortes sont ensuite marquées avec le Zombie NIR (Biolegend) selon les recommandations du fournisseur. Pour les expériences de chimie click, une partie des cellules sont révélées *ex vivo* avec 100µM de DBCO MF 488 pendant 1h à 37°C, puis lavées trois fois. Les résultats sont analysés par cytométrie en flux sur le Fortessa X20 ou le Symphony.

Nom du panel	Antigène	Fluorochrome	Référence	Isotype contrôle
Panel ciblage <i>in vivo</i> 1	CD25	BV421	BD 562606	IgG1 Rat
	Tim3	BV711	Biolegend 119727	IgG2a,k Rat
	CXCR6	PE-Vio770	Miltenyi 130-122-757	REA
	CD69	APC	ebioscience 17-0691-82	IgGArmenian Hamster
	CD8a	Al488	Biolegend 100723	IgG2a,k Rat
	Tétramère	PE	Plateforme P2R	Tétramère irrelevant
Panel ciblage <i>in vivo</i> 2	CD38	Viogreen	Miltenyi 130-109-261	REA
	CXCR3	PE	BD 562152	IgGArmenian Hamster
	CD8a	Al488	Biolegend 100723	IgG2a,k Rat
	Tétramère	Al647	Plateforme P2R	Tétramère irrelevant
Panel expériences liposomes et chimie click	CD8	Pacific blue	Biolegend 100728	IgGArmenian hamster
	CD45.1	APC	BD 558701	IgG2a,k Souris

Tableau VI: Anticorps utilisés pour le suivi *in vivo* des LT OT-1.

Tous les anticorps ont été préalablement titrés pour déterminer leur concentration d'utilisation optimale. Les panels contrôle se composent des isotypes contrôles correspondant à chaque anticorps.

## Résultats

### I – Les liposomes

#### a) Principe

Les liposomes se composent d'une bicouche de phospholipides dans laquelle sont intégrés des phosphoéthanolamines couplés à un fluorochrome, le bodipy. Une fois mis en contact avec les cellules *in vitro*, ils les pénètrent de manière non-spécifique et permettent de les détecter grâce à leur fluorescence. A terme, il est possible de charger les liposomes avec des éléments radioactifs compatibles avec l'imagerie TEP, afin de suivre les cellules *in vivo* après chargement *ex vivo*.

#### b) In vitro : optimisation du marquage

Les LT OT-1 sont mis en culture *in vitro* et stimulés pendant 3 jours avant d'être amplifiés. Les liposomes sont ajoutés dans le milieu de culture au moment de l'amplification (Figure 30a, schéma expérimental). Ils sont ensuite cultivés pendant 48h avant d'être lavés et analysés par cytométrie en flux. Des concentrations croissantes de 0 à 320  $\mu\text{M}$  de liposomes sont utilisées pour marquer les LT OT-1, et la fluorescence est mesurée par cytométrie en flux (Figure 30b et c). En parallèle, les LT OT-1 sont également marqués avec un marqueur de mortalité, afin d'évaluer la viabilité des lymphocytes et la toxicité éventuelle des liposomes (Figure 30d).

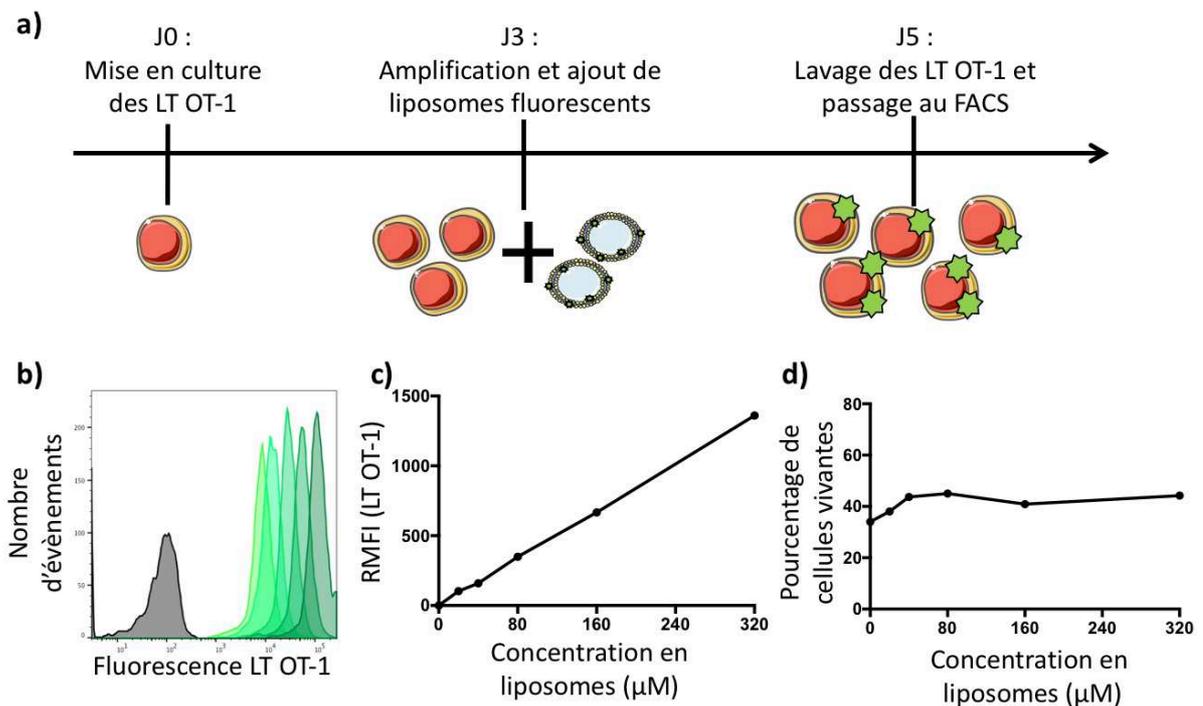


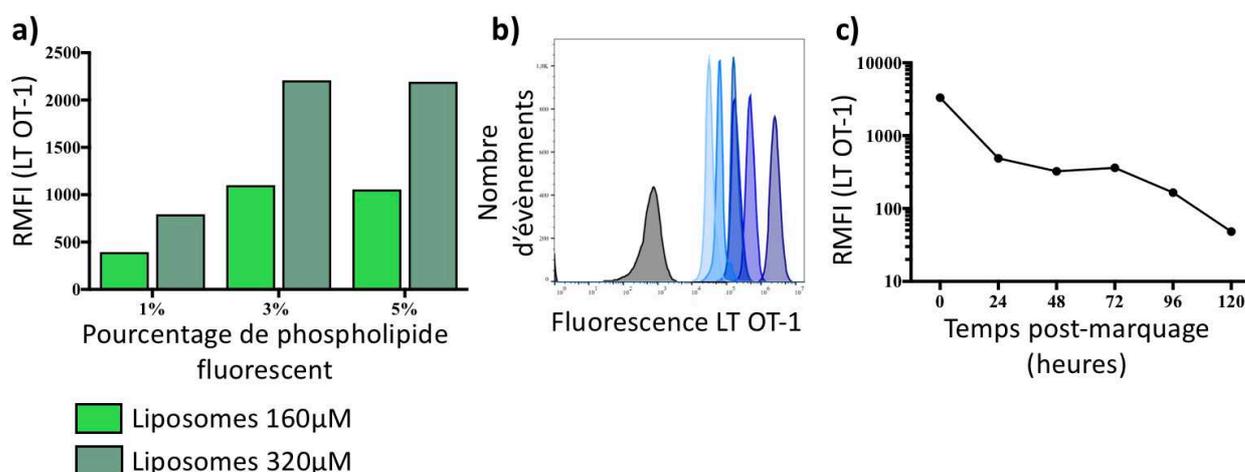
Figure 30: Intensité et toxicité du marquage avec des liposomes.

a) Schéma expérimental du marquage des LT OT-1 avec les liposomes b) Superposition des LT OT-1 non marqués (noir) et des LT OT-1 marqués avec une gamme de liposomes de 20 à 320  $\mu\text{M}$  (vert clair à vert foncé) c) Rapport des médianes de fluorescence entre les LT OT-1 marqués et non marqués en fonction de la concentration en liposomes. d) Pourcentage de LT OT-1 vivants en fonction de la concentration en liposomes utilisée pour le marquage.

Une augmentation de la fluorescence des LT OT-1 dépendante de la dose de liposomes utilisée est observée, sans modification de la viabilité des LT OT-1, qui conservent environ 40% de cellules viables même aux doses les plus élevées.

La quantité de phospholipides fluorescents intégrée aux liposomes pouvant être modulée, des liposomes contenant soit 1, 3 ou 5% de phospholipide-bodipy sont réalisés et les LT OT-1 sont cultivés avec 0, 160 ou 320  $\mu\text{M}$  de ces liposomes. Les résultats obtenus sont représentés sous forme de RMFI, le rapport de médiane de fluorescence entre les LT OT-1 marqués et les non marqués en [Figure 31a](#). Le maximum de fluorescence est atteint à partir de 160  $\mu\text{M}$  de liposomes contenant 3% de phospholipides-bodipy, avec un RMFI de 2207. Même si la fluorescence maximale est obtenue dès 160  $\mu\text{M}$ , afin de conserver le plus longtemps possible la fluorescence, la concentration 320  $\mu\text{M}$  fut conservée par la suite. Nous avons de plus montré qu'une telle concentration n'est pas toxique pour les LT. Après 48h de marquage, les LT OT-1 ont été lavés et remis en culture *in vitro* avec de l'IL-15 pendant 5 jours. L'IL-15 permet de maintenir les LT en culture, néanmoins l'utilisation de LT murins ne permet pas de les cultiver pendant plus de 5 jours. La fluorescence a été suivie toutes les 24h par cytométrie en flux, et les résultats sont présentés en [Figure 31b et c](#).

Une diminution de la fluorescence au cours du temps est observée : après marquage les LT OT-1 ont un RMFI de 3319, qui diminue jusqu'à 48,19 après 5 jours de culture. Néanmoins les cytogrammes montrent que malgré cette diminution, les LT OT-1 sont suffisamment fluorescents pour être détectés par cytométrie en flux. La viabilité des LT murins déclinant rapidement *in vitro* après stimulation, leur fluorescence n'a pas été suivie au-delà de 5 jours post-stimulation.



**Figure 31: Stabilité du marquage *in vitro*.**

a) test de différents pourcentages de phospholipides fluorescents contenu dans les liposomes b) Superposition des LT OT-1 non marqués (noir) et des LT OT-1 marqués avec 320  $\mu\text{M}$  de liposomes, de 0 à 120h post marquage (bleu clair à bleu foncé) c) Rapport de médiane de fluorescence entre les LT OT-1 marqués et non marqués au cours du temps.

### [c\) \*In vitro\* : fonction des LT OT-1](#)

La principale fonction des LT OT-1 étant de lyser les cellules cibles, un test de cytotoxicité fut réalisé avec les LT OT-1 marqués avec 0, 160 ou 320  $\mu\text{M}$  de liposomes fluorescents. Afin d'évaluer si le pourcentage de phospholipides fluorescents pouvait avoir un impact sur cette activité cytotoxique, chaque concentration de liposomes est réalisée avec des liposomes contenant soit 1, 3 ou 5% de phospholipides-bodipy. Les résultats sous forme de pourcentage de lyse spécifique sont représentés en

Figure 32. Les cellules cibles utilisées pour le test sont soit des cellules 5T33-OVA, reconnues par les LT OT-1, soit des cellules 5T33 non reconnues.

Les cellules cibles 5T33 ne sont lysées par aucun des LT OT-1, quelques soient les concentrations en liposomes utilisées. A l'inverse, on observe une lyse spécifique de la lignée 5T33-OVA, avec des pourcentages de lyse oscillant entre 40 et 80% suivant les rapports effecteur/cible. Les différentes concentrations de liposomes utilisées pour le marquage donnent des profils de lyse comparables à la condition contrôle. Aucune concentration en liposomes ou pourcentage de phospholipides fluorescents ne semble avoir d'impact significatif sur la lyse spécifique des LT OT-1. Chaque point est réalisé en triplicat, néanmoins si cette méthode de marquage est validée elle devra être réitérée afin de confirmer l'absence d'impact significatif des liposomes sur l'activité cytotoxique.

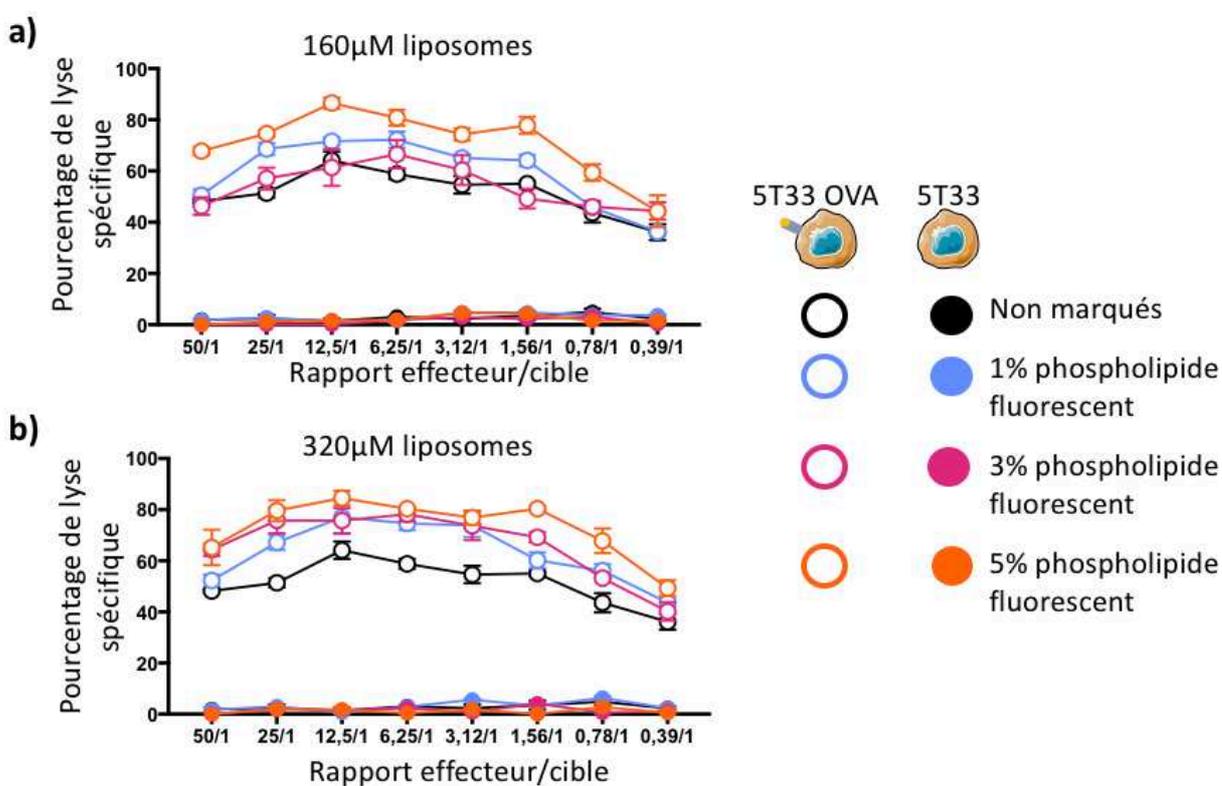


Figure 32: Test de cytotoxicité des LT OT-1 marqués avec des liposomes.

Pourcentage de lyse spécifique des LT OT-1 sur la lignée 5T33 OVA reconnue spécifiquement ou sur la lignée 5T33 non reconnue, en fonction de la concentration en liposomes utilisée : a) 160 µM ou b) 320 µM, et du pourcentage de phospholipides fluorescents contenus dans les liposomes.

#### d) Suivi *in vivo* des LT OT-1

Une fois le marquage mis au point *in vitro*, les LT OT-1 marqués avec des liposomes sont injectés *in vivo* dans des animaux greffés avec la tumeur 5T33 OVA. Le schéma représentant la chronologie des injections et prélèvements réalisés est représenté en Figure 33. Étant donné que 320 µM de liposomes contenant 5% de bodipy n'induisent ni toxicité et n'ont pas d'impact sur l'activité cytotoxique des LT OT-1, cette concentration est conservée pour le marquage des LT OT-1. 48 et 72h après injection des LT OT-1 fluorescents, la rate, la tumeur et les ganglions proximaux sont prélevés et dilacérés, et les suspensions cellulaires résultantes sont analysées. Les tumeurs et organes prélevés 24h après injection n'ont pas

permis de détecter suffisamment d'évènements permettant d'analyser le niveau de fluorescence des LT OT-1.

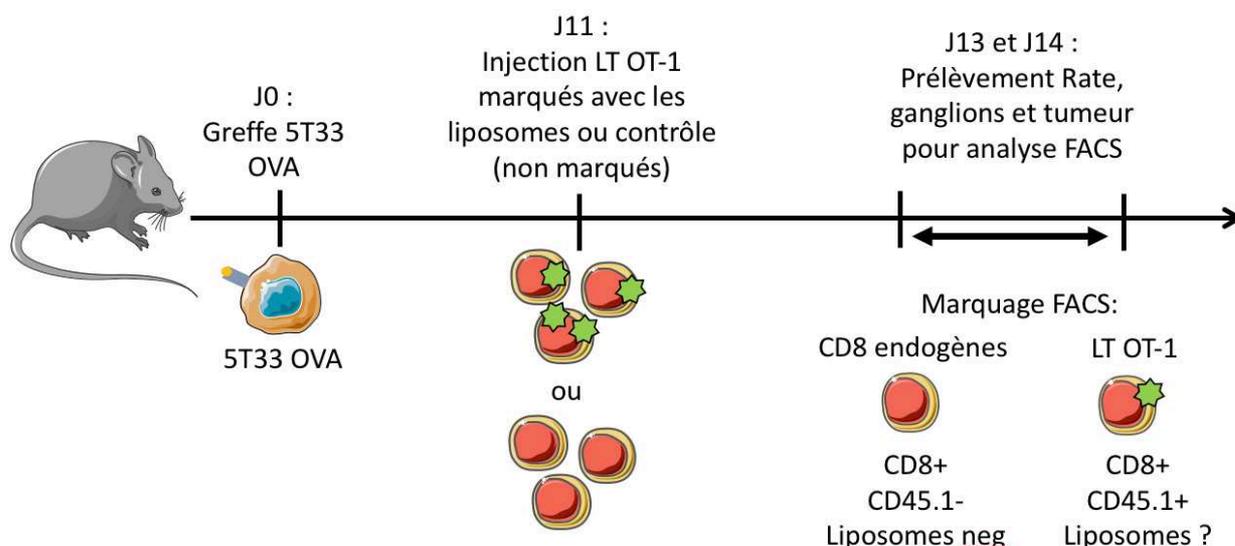


Figure 33: Chronologie des injections et prélèvements pour analyse ex vivo des LT OT-1 marqués avec des liposomes

3 souris sont greffées pour chaque condition.

Les LT OT-1 utilisés pour les expériences de suivi *in vivo* proviennent de souris présentant le marqueur CD45.1, contrairement aux souris C57BL/6KalwRij présentant le marqueur congénique CD45.2. L'utilisation d'un anticorps anti-CD45.1 permet donc de vérifier la présence de LT OT-1 dans le cas où la fluorescence des liposomes ne serait plus détectable. La stratégie d'analyse par cytométrie en flux est détaillée en [Figure 34a](#).

Dans chaque organe, la présence de LT OT-1 est détectée grâce au marqueur congénique CD45.1, et leur fluorescence correspondant au marquage avec les liposomes est évaluée. Des cytogrammes représentatifs des cellules vivantes sont présentés en [Figure 34b](#), avec pour chaque organe l'expression du marqueur congénique CD45.1 spécifique des LT OT-1 et le niveau de fluorescence lié au marquage avec les liposomes qui est détecté. Les RMFI de LT OT-1 sont calculées pour chaque condition et présentées en [Figure 34c](#). A J13, on observe dans tous les organes un décalage de la fluorescence des LT OT-1 pour les souris injectées avec les LT OT-1 marqués, comparé aux organes provenant de souris injectées avec des LT OT-1 contrôles ([Figure 34b, J13](#)).

Les LT OT-1 migrent donc dans la tumeur, la rate et dans une moindre mesure dans les ganglions, et présentent toujours un marquage fluorescent 2 jours après leur injection *in vivo*. Néanmoins, l'intensité de fluorescence est plus faible que celle observée *in vitro*. Les LT OT-1 marqués avec les liposomes présentent une RMFI médiane de 5,8 (+1,3) dans la tumeur, comparé au non marqués qui ont une RMFI de 0,35 (+0,11). Cet écart semble être encore plus prononcé dans la rate, où les LT OT-1 marqués ont une RMFI de 9,3 (+0,23), comparé au non marqués qui ont une RMFI de 1,6 (+0,1). Les prélèvements dans les ganglions ont révélé un faible infiltrat de LT OT-1, présentant également un marquage avec les liposomes détectable, cependant le faible nombre de cellules induit une variance plus élevée dans les résultats.

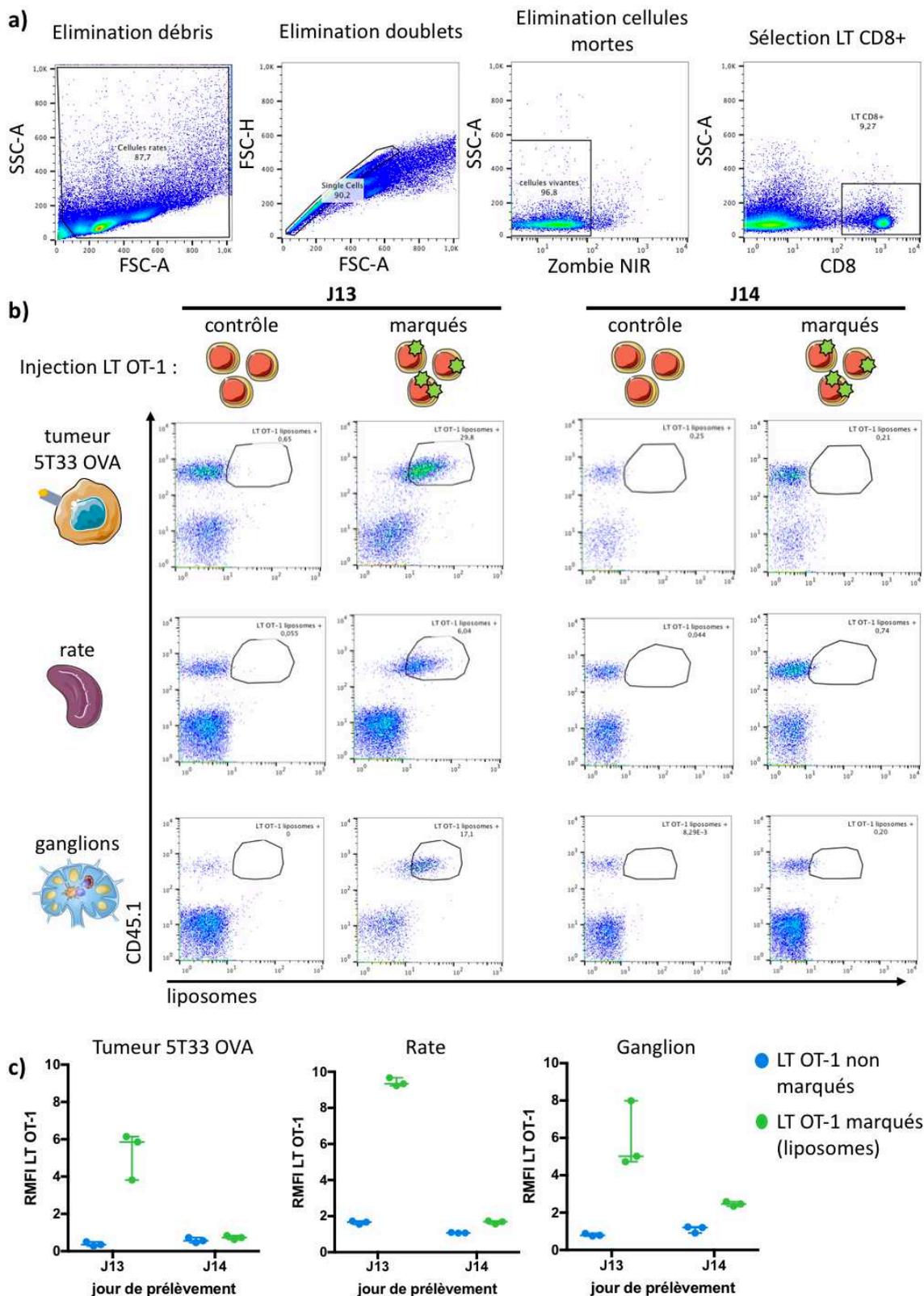


Figure 34 : Suivi in vivo des LT OT-1 marqués avec les liposomes.

a) Stratégie d'analyse des cellules par cytométrie en flux. Les LT CD8 de chaque organe sont ensuite analysés suivant leur expression de CD45.1 et de la fluorescence liée aux liposomes b), pour chaque organe (tumeur, rate ou ganglion), jour de prélèvement et injection de LT OT-1 marqués ou non avec les liposomes (cytogrammes représentatifs de chaque condition,  $n=3$  pour chaque temps de prélèvement). c) quantification du RMFI pour chaque organe et point temps des LT OT-1,  $n=3$  animaux avec représenté la médiane et l'intervalle de confiance 95%.

A J14, on observe également un infiltrat de LT OT-1 dans tous les organes grâce au marqueur CD45.1 (Figure 34b, J14). Néanmoins, il n'y a plus de différence de fluorescence entre les LT OT-1 marqués avec les liposomes et les LT OT-1 contrôles. Des résultats similaires sont observés pour les rates et tumeurs ; avec des RMFI pour les LT OT-1 marqués de 0,7 (+0,1) et 1,7 (+0,1), respectivement, comparés au LT OT-1 non marqués qui présentent des RMFI de 0,56 (+0,13) et 1,07 (+0,02), respectivement. Les échantillons de ganglions semblent montrer un léger marquage des LT OT-1 avec les liposomes, avec une RMFI de 2,47 (+0,12) comparée au LT OT-1 non marqués qui sont à 1,2 (+0,18). Néanmoins cette différence est trop faible pour être visible sur les cytogrammes.

Le marquage des LT OT-1 n'a pas montré d'impact sur la viabilité ou l'activité cytotoxique des lymphocytes *in vitro*, et a permis de les suivre *in vivo* jusqu'à 2 jours après leur injection. Néanmoins, 3 jours après leur injection, la fluorescence liée au marquage avec les liposomes n'est plus détectable dans les différents organes sondés. Le marquage est donc moins stable *in vivo* qu'*in vitro*. Cependant l'utilisation d'une sonde fluorescente impose un bruit de fond non négligeable, de par l'autofluorescence naturelle des tissus. L'utilisation de liposomes marqués avec un radioélément pourrait permettre de détecter les cellules, quand bien même la prolifération entraînerait une dilution du signal, grâce la sensibilité des détecteurs.

## II – Marquage direct au Zirconium-89

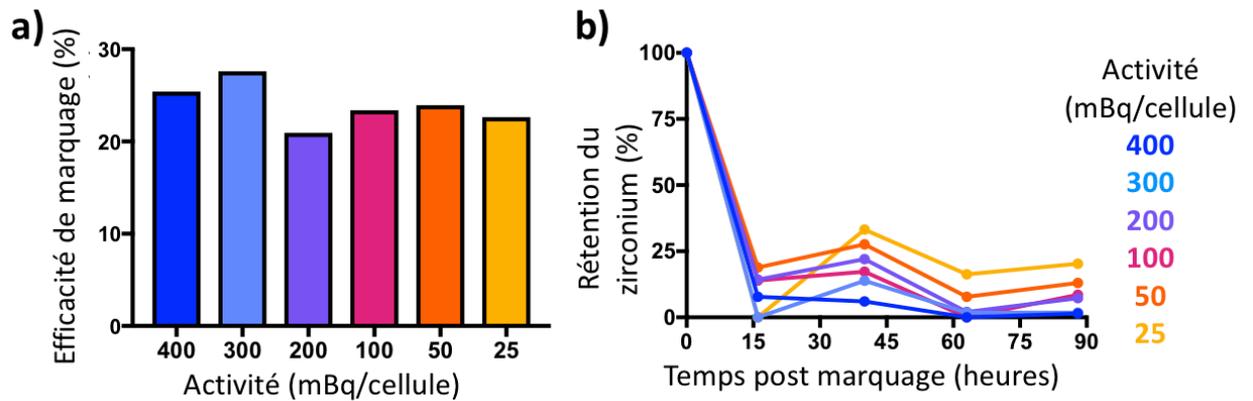
### a) Synthèse du zirconium(oxine)<sub>4</sub>

Parmi les radioéléments compatibles avec un suivi par imagerie TEP, le zirconium-89 présente une demi-vie de 3,2 jours, adaptée à un suivi de cellules injectées sur plusieurs jours. Le marquage de diverses cellules murines et humaines avec du zirconium-89 couplé à l'oxine (zirconium(oxine)<sub>4</sub>) a déjà été décrit dans la littérature (Sato *et al.*, 2015; Gabizon *et al.*, 2018; Weist *et al.*, 2018; Man *et al.*, 2019). Différentes méthodes de synthèse du zirconium(oxinate)<sub>4</sub> à partir du zirconium(oxalate)<sub>4</sub> sont décrites. Nous avons choisi la méthode utilisée par Francis Man et ses collaborateurs, étant donné qu'elle permettait une synthèse en une étape unique suivie d'une purification par extraction et évaporation.

### b) Marquage *in vitro*

En accord avec les activités utilisées dans la littérature, les LT OT-1 sont marqués avec des activités de zirconium-89 allant de 25 à 400 mBq par cellule. L'efficacité de marquage, correspondant au pourcentage de zirconium-89 intégré dans les cellules à l'issue des lavages, est représenté en Figure 35a. Elle est comprise entre 20,9% pour la condition 200 mBq/cellule et 27,6% pour la condition 300 mBq/cellule. Ces premiers résultats semblent indiquer qu'il n'y a pas de relation entre la dose utilisée pour le radiomarquage et l'efficacité de marquage des cellules.

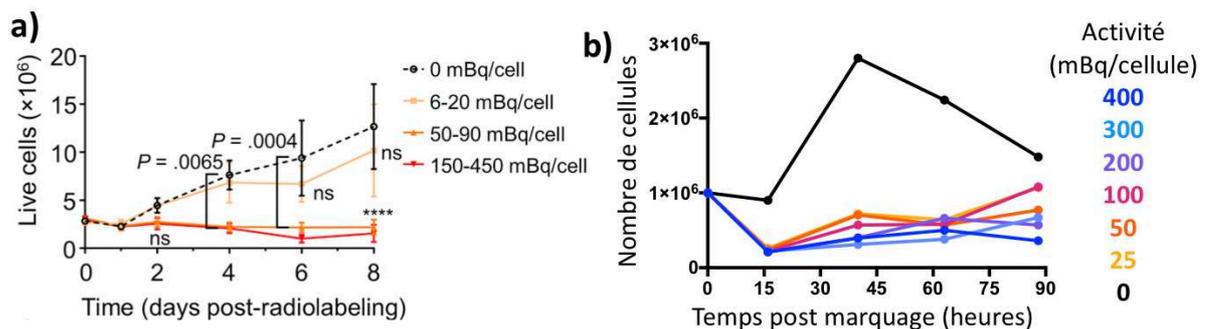
La rétention du zirconium-89 a ensuite été suivie dans le temps, avec un prélèvement quotidien permettant de compter la radioactivité contenue dans les cellules ou le surnageant. Le pourcentage de rétention est rapporté en Figure 35b. La quantité de radioactivité contenue dans les cellules à J0 est considérée comme le 100%, et l'on observe dès 15h une forte diminution de la rétention du zirconium-89 dans les cellules. Les LT OT-1 chargés avec l'activité la plus forte, 400mBq/cellule, ne présentent plus que 7,7% de leur radioactivité initiale 15h après le radiomarquage, et ce pourcentage diminue jusqu'à 90h post-marquage où il atteint 1,4%. Les cellules retenant le mieux le zirconium-89 semblent être celles marqués avec les activités les plus faibles, avec une rétention de 13 à 20,3% de l'activité pour les LT OT-1 incubés avec des activités de 50 et 25 mBq/cellule, respectivement.



**Figure 35: Efficacité du marquage des LT OT-1 au zirconium-89.**

a) Pourcentage de zirconium-89 intégré dans les LT OT-1 à l'issue du marquage b) Pourcentage de zirconium-89 retenu dans les LT OT-1 au cours du temps et par rapport à J0 (corrigé de la décroissance tumorale).

Afin d'évaluer l'impact du radiomarquage sur la prolifération des LT OT-1, une numération quotidienne sur cellule de Malassez a également été effectuée. La Figure 36 présente la comparaison des résultats obtenus par Francis Man et collaborateurs pour des LT  $\gamma\delta$  humains, et ceux obtenus pour les LT OT-1 de notre étude.



**Figure 36 : Comparaison de la prolifération des LT après radiomarquage avec du zirconium-89**

a) Figure extraite de l'article (Man et al., 2019): « *In vitro* growth of radiolabeled  $\gamma\delta$ -T-cells. Mean  $\pm$  SEM of  $n=4$  independent experiments (except 150–450 mBq group,  $N=2$ , not included in statistical analysis). ns:  $p > 0.05$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$  versus unlabeled cells (2-way repeated-measures ANOVA, Dunnett's correction for multiple comparisons). » b) Numération des LT OT-1 après radiomarquage avec du zirconium-89 en fonction de l'activité utilisée pour le radiomarquage (mesures réalisées en duplicat).

Pour les cellules non marquées, bien que l'on compare des LT humains et murins, on observe dans les deux cas une première période de stagnation, suivie d'une reprise de la prolifération. Les LT OT-1 radiomarqués présentent une forte inhibition de la prolifération, dès 25 mBq/cellule, avec une chute du nombre de cellule qui passe de  $1 \times 10^6$  à moins de  $0,27 \times 10^6$ , quelque soit l'activité utilisée. Ces résultats ont été reproduit une seconde fois, et une inhibition de la prolifération similaire a été obtenue de nouveau. Bien que ce soit des résultats préliminaires, l'impact majeur du zirconium-89 sur la prolifération des LT OT-1 ne nous a pas permis de continuer ce type de marquage.

Afin de diminuer la dose reçue par les LT OT-1 et de maintenir leur potentiel prolifératif et pouvoir réaliser une imagerie TEP, nous nous sommes donc tournés vers un système de ciblage *in vivo*, et non de chargement *ex vivo*.

### III – La Chimie click

#### a) Principe

Afin de pouvoir cibler les LT OT-1 *in vivo*, l'utilisation de réactions de chimie click, aussi appelées réactions bio-orthogonales, fut envisagée. Des sucres (glucose, galactose et mannose) présentant une première fonction click, la fonction azide, sont ajoutés au milieu de culture des cellules à marquer (Figure 37a). Après incorporation dans les cellules, ces sucres sont utilisés pour la glycosylation des protéines membranaires, et permettent donc l'expression de fonctions azides à la surface de la cellule. Cette fonction azide n'est pas présente de manière naturelle sur les autres cellules. Un ciblage spécifique de ces cellules est donc possible, grâce à une deuxième fonction click, le DBCO, qui peut être couplé à un fluorochrome pour une détection par cytométrie en flux *in vitro* ou *ex vivo*, ou à un radioélément pour de l'imagerie TEP *in vivo*.

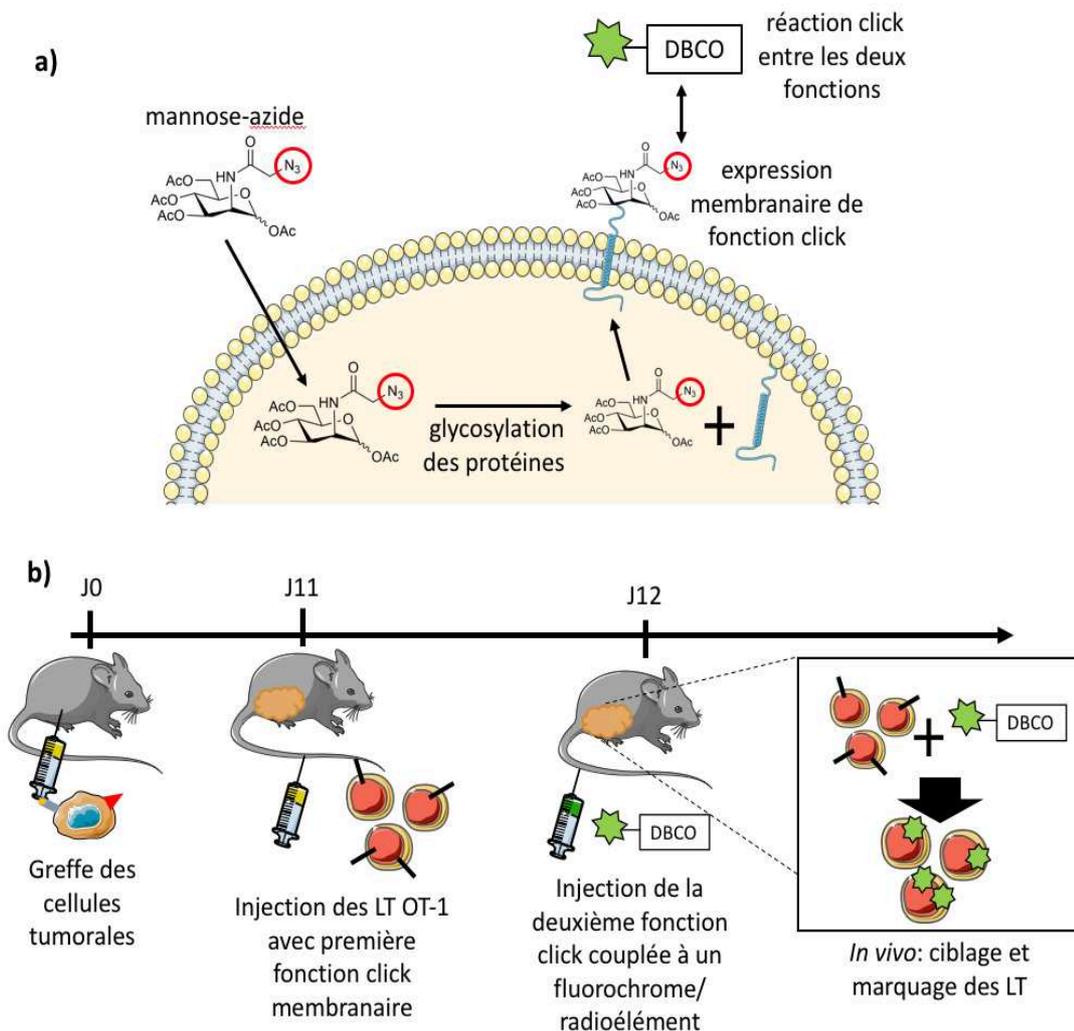


Figure 37: Principe de la chimie click appliquée au suivi *in vivo* des LT OT-1.

a) marquage de cellules grâce à la chimie click : mise en culture des cellules avec un sucre présentant une fonction azide (première fonction click), utilisée par le métabolisme des cellules pour permettre la glycosylation des protéines. Elles sont ensuite révélées avec une deuxième fonction click (DBCO). b) Dans un modèle pré-clinique, l'objectif est d'injecter les cellules pré-marquées avec les sucres azidés, de permettre aux cellules de migrer jusqu'à la tumeur avant d'injecter la deuxième fonction click afin de cibler les cellules *in vivo*.

L'objectif de ce marquage est donc de cultiver les LT OT-1 avec les sucres afin qu'ils expriment les fonctions azides au moment de leur injection chez les souris. La seconde fonction click pourra alors être injectée aux souris, afin de révéler les LT OT-1 *in vivo* (Figure 37b). Cette méthode en double temps permet, dans le cas d'une imagerie TEP, de limiter la dose reçue par les cellules. En effet celles-ci ne sont pas marquées avec le radioélément dès l'injection, mais révélées à un temps plus tardif.

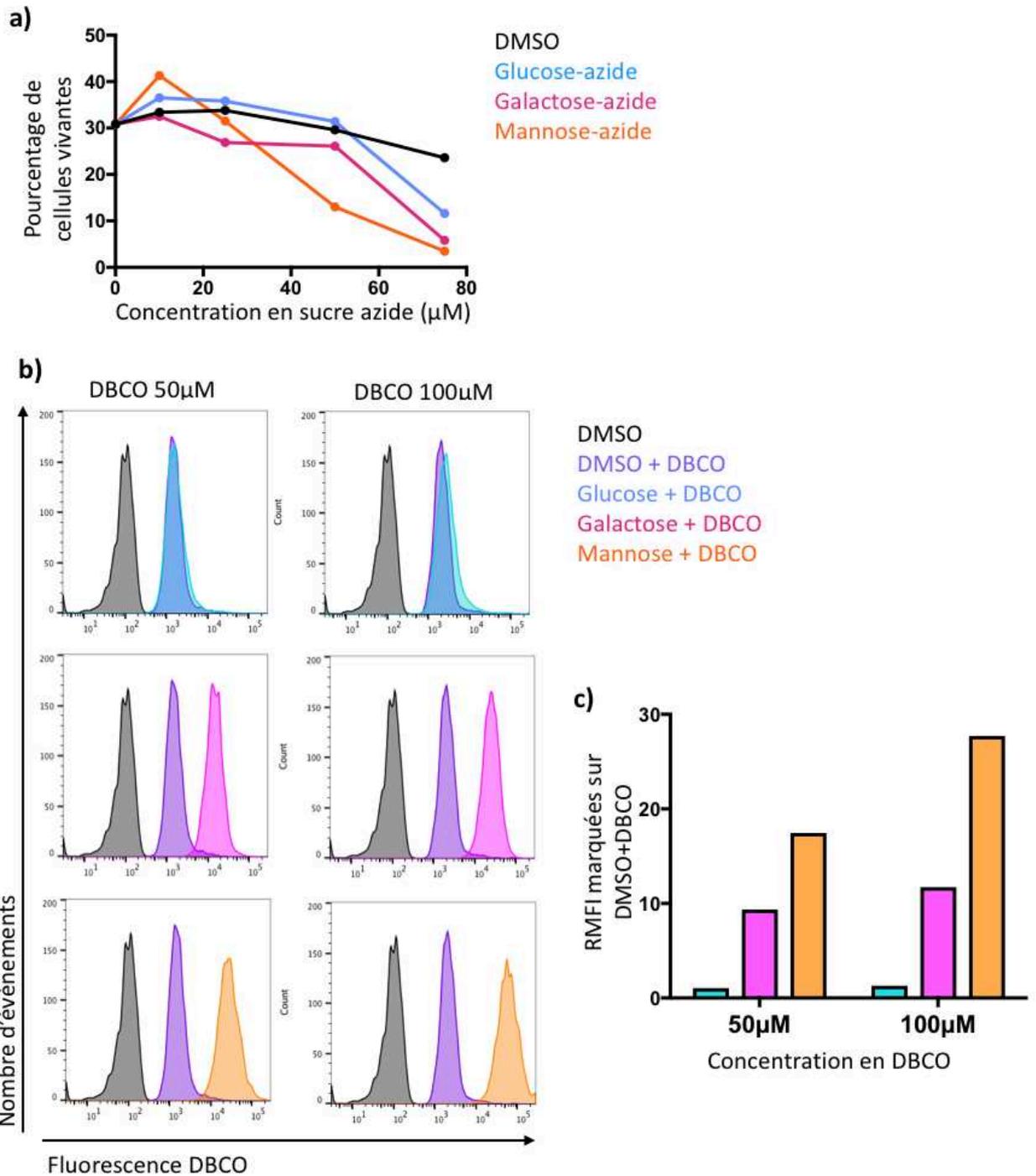
#### b) *In vitro* : optimisation du marquage

3 sucres présentant la fonction azides ont testés sur les LT OT-1 : le glucose, le galactose et le mannose. Les LT OT-1 sont cultivés pendant 48h avec des concentrations croissantes de ces sucres, de 0 à 75  $\mu\text{M}$ . La toxicité est évaluée par cytométrie en flux à l'aide d'un marqueur de viabilité, le Zombie NIR. Les résultats en pourcentage de cellules vivantes sont représentés en Figure 38a, pour chacun des sucres modifiés. Leur toxicité est comparée à un contrôle ayant reçu une concentration équivalente en DMSO, qui est utilisé pour solubiliser les sucres modifiés avec une fonction azide.

Le glucose-azide et galactose-azide présentent tous les deux une toxicité à partir de 75  $\mu\text{M}$ , tandis que le Mannose-azide présente une toxicité cellulaire dès 50  $\mu\text{M}$ . Afin de pouvoir comparer les différents sucres modifiés entre eux, la concentration de 20  $\mu\text{M}$ , non toxique pour tous, fut retenue. Des concentrations croissantes de 0, 50 et 100  $\mu\text{M}$  de DBCO couplé à un fluorochrome sont ajoutées aux LT OT-1, et après lavage la fluorescence est analysée par cytométrie en flux. Des histogrammes représentant la fluorescence des LT OT-1 sont représentés en Figure 38b.

Les LT OT-1 incubés avec du DMSO et révélés avec du DBCO fluorescent montre une fixation non spécifique du DBCO fluorescent sur les LT OT-1 : histogramme violet en Figure 38b, comparé au non marqués (histogramme noir). Plusieurs techniques de lavage des cellules testées (1, 3 à 5 lavages avec du PBS complété avec un faible pourcentage de détergent) n'ont pas permis de retirer cette fixation non spécifique. Néanmoins, les LT OT-1 ayant été cultivés avec les sucres galactose-azide ou mannose-azide révélés avec du DBCO fluorescent montre une fluorescence supérieure, résultant d'une fixation non spécifique et spécifique du DBCO.

Le rapport entre cette intensité de marquage et celle obtenue lors de la fixation non spécifique (sans sucre-azide), est calculé et reporté en Figure 38c. Le sucre-azide permettant un meilleur rapport signal/bruit est le mannose-azide révélé avec 100 $\mu\text{M}$  de DBCO, avec une RMFI de 27,72, suivi du galactose-azide, avec une RMFI de 11,72. Le glucose-azide ne permet pas d'obtenir de marquage spécifique des LT OT-1, et présente une RMFI de 1,29. Ces résultats concordent avec une autre étude (Sangmin, 2017), dans laquelle il est mis en évidence que les fonctions azides générées suite à la culture de cellules souches mésenchymales sont principalement à la surface membranaire si le sucre utilisé est le mannose-azide. A l'inverse, l'utilisation de galactose-azide génère principalement des fonctions azides dans le cytoplasme, les rendant moins accessibles à la deuxième fonction click.

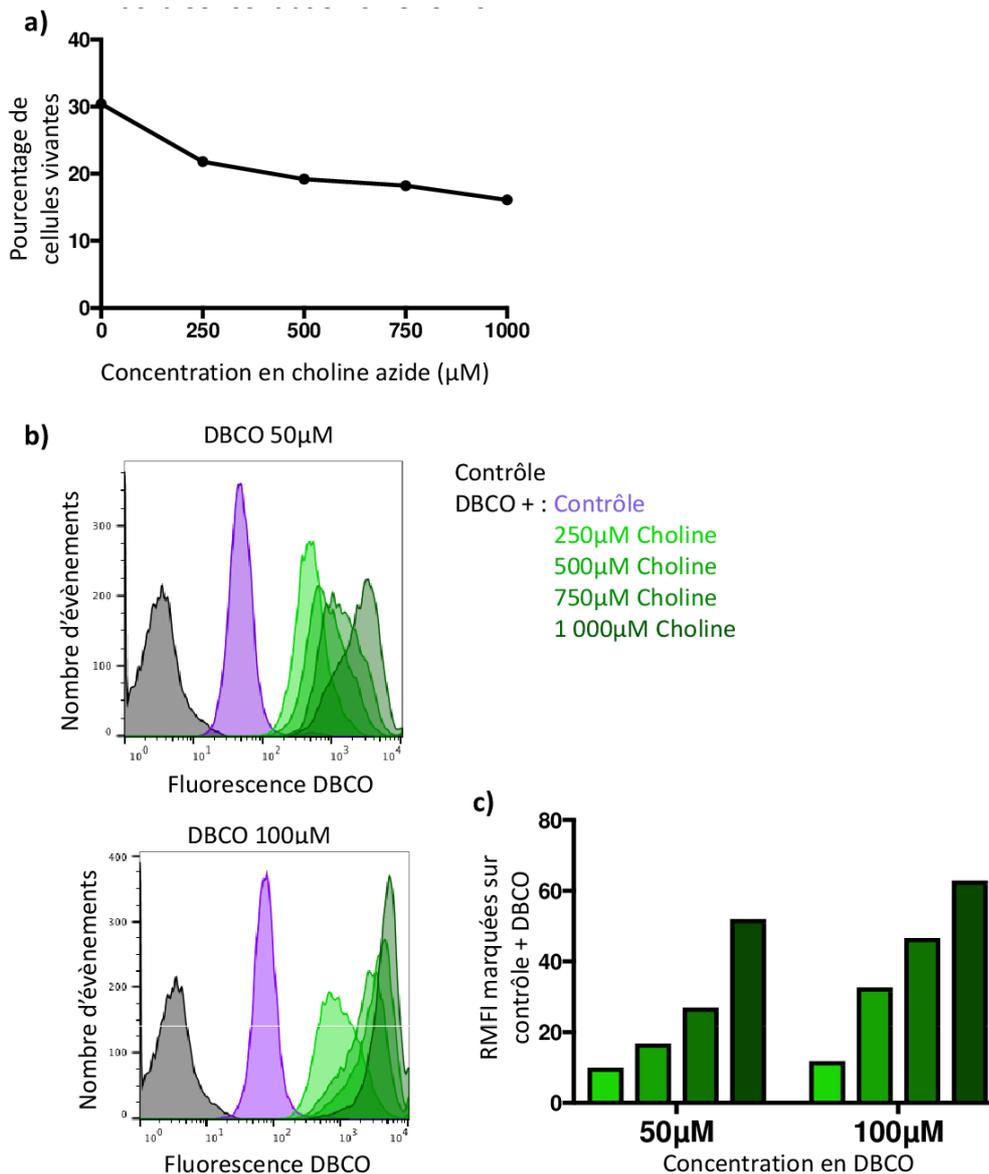


**Figure 38: Toxicité des sucres modifiés par une fonction azide et marquage avec le DBCO fluorescent.**  
 a) Pourcentage de LT OT-1 vivants après incubation avec différentes concentrations de sucres modifiés b) Superposition des LT OT-1 contrôles (noir), incubés avec le DMSO et révélés avec le DBCO (fixation non spécifique, violet), ou incubés avec les différents sucres modifiés et révélés avec le DBCO, à 50 ou 100µM c) Rapport des médianes de fluorescence entre les LT OT-1 marquées avec les sucres modifiés et révélés au DBCO (fixation spécifique), et les LT OT-1 incubés avec le DMSO et révélés avec le DBCO (fixation non spécifique).

Un autre métabolite, la choline-azide, a également été testé. Celui-ci s'intègre dans les phospholipides membranaires et peut également permettre l'expression de fonction azide à la surface cellulaire. Comme pour les sucres modifiés, les LT OT-1 sont cultivés avec une gamme de choline-azide, et la toxicité est évaluée grâce à un marqueur de viabilité par cytométrie en flux. Étant donné que la choline-azide est soluble dans du PBS, contrairement aux sucres modifiés qui sont solubles dans du DMSO, la toxicité a seulement été évaluée sur une gamme de choline-azide allant de 0 à 1000  $\mu\text{M}$ .

Une faible toxicité est constatée dès 250  $\mu\text{M}$  de choline-azide (Figure 39a). Les différentes concentrations sont révélées avec 50 ou 100  $\mu\text{M}$  de DBCO fluorescent (Figure 39b). Comme précédemment, une fixation non spécifique du DBCO est observée sur les cellules n'ayant pas été cultivées avec la choline (Figure 39b, histogramme DBCO + contrôle, violet). Un marquage spécifique et dose-dépendant est observé avec les LT OT-1 cultivés avec la choline-azide et révélés au DBCO. Les rapports de fluorescence entre les LT OT-1 marqués sur la fixation non spécifique sont rapportés en Figure 39c.

Comme pour le mannose-azide, un marquage optimal des LT OT-1 est obtenu pour une concentration en DBCO de 100 $\mu\text{M}$ . Le marquage des lymphocytes dépend également de la concentration en choline-azide utilisée, passant d'un RMFI de 11,8 pour la plus faible concentration (250 $\mu\text{M}$ ) à 62,9 pour la plus élevée (1 mM). Par conséquent, afin d'observer un signal comparable à celui obtenu avec 20 $\mu\text{M}$  de mannose-azide, une quantité 50 fois supérieure de choline-azide est nécessaire.



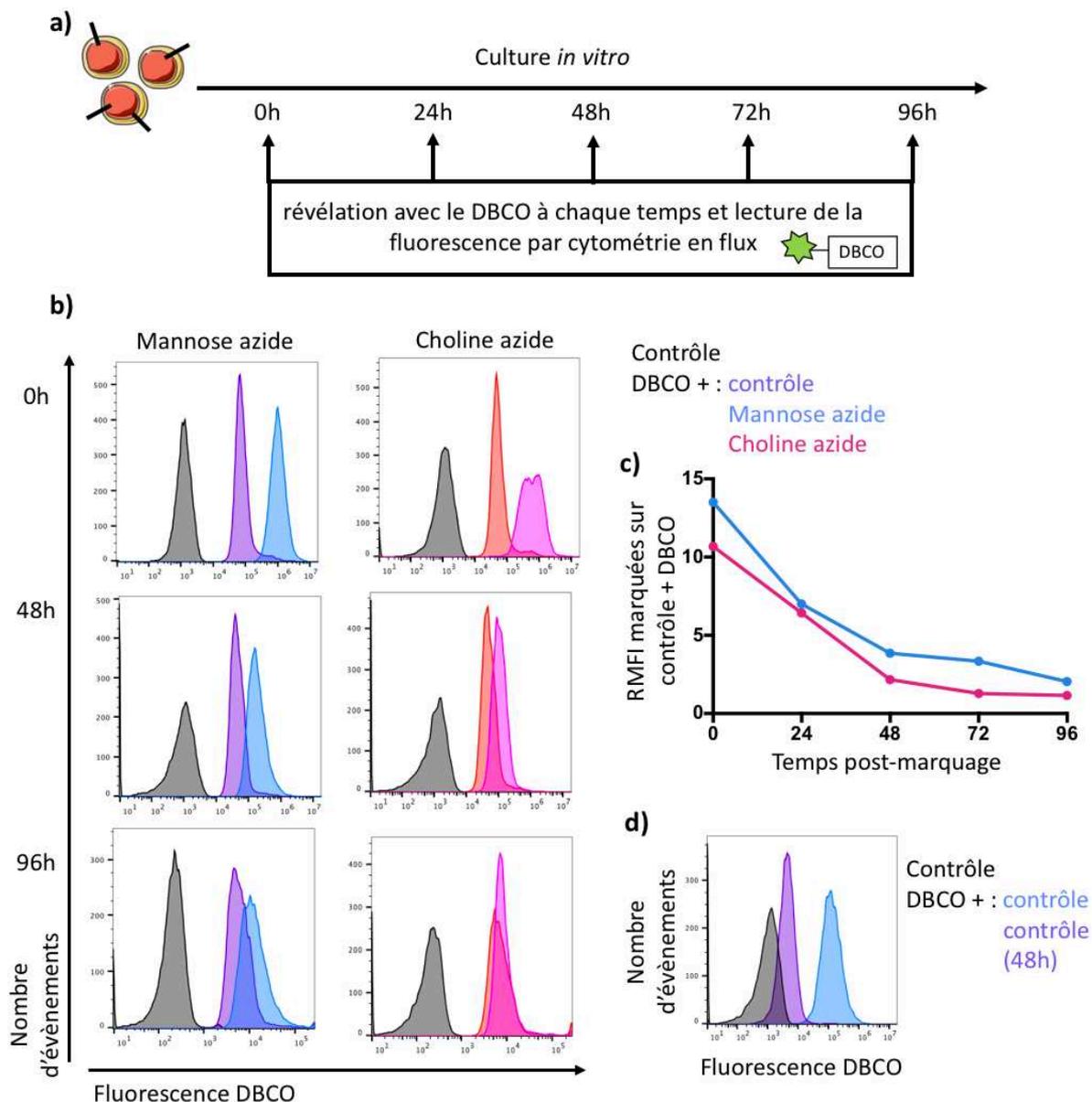
**Figure 39: Toxicité de la choline-azide et marquage avec le DBCO fluorescent.**

a) Pourcentage de LT OT-1 vivants après incubation avec différentes concentrations de choline-azide b) Superposition des LT OT-1 contrôles (noir), contrôles révélés avec le DBCO (fixation non spécifique, violet), ou incubés avec les différentes concentrations de choline-azide et révélés avec le DBCO, à 50 ou 100 μM. c) Rapport des médianes de fluorescence entre les LT OT-1 marqués avec la choline-azide et révélés au DBCO (fixation spécifique), et les LT OT-1 contrôles révélés avec le DBCO (fixation non spécifique).

La stabilité du marquage *in vitro* est ensuite mesurée : les LT OT-1 sont marqués avec la choline-azide (1 mM) ou mannose-azide (20 μM) comme précédemment décrit, puis lavés et remis en culture. Toutes les 24h, une partie des LT OT-1 est révélée avec le DBCO-fluorescent, afin d'évaluer l'intensité du marquage et de le comparer à la fixation non spécifique du DBCO (Figure 40a, schéma d'expérience). La fluorescence est ensuite mesurée par cytométrie en flux. Des cytogrammes des résultats obtenus sont présentés en Figure 40b, à 0, 48 et 96h après la fin de l'incubation avec les métabolites-azide. À chaque temps, le rapport entre la fluorescence spécifique et non spécifique est calculé et rapporté en Figure 40c. Une diminution de l'expression des fonctions azides est observée sur les LT OT-1, dès 24h ou le RMFI passe de 13,5 à 7,0 pour le mannose-azide, et de 10,7 à 6,4 pour la choline-azide. La diminution de la fluorescence se poursuit jusqu'à 48h, ou elle se stabilise pour les deux conditions, avec des RMFI de 3,8

et 2,1 respectivement. Cette diminution semble plus rapide pour les LT OT-1 incubés avec la choline-azide, pour lesquels à 96h après incubation, plus aucun marquage spécifique n'est mis en évidence.

Parallèlement, une forte diminution du marquage non spécifique des cellules est observée dès 24h et se poursuit jusqu'à 48h. Les LT OT-1 contrôles révélés avec le DBCO ont été maintenus en culture, et il semble que le marquage non spécifique ne soit pas stable dans le temps (Figure 40d).



**Figure 40: Stabilité du marquage en chimie click *in vitro* avec du mannose-azide et de la choline-azide des LT OT-1.**

a) plan de l'expérience ; mise en culture *in vitro* des LT OT-1 pré-marqués avec le mannose-azide ou la choline-azide, et révélation à différents temps avec le DBCO fluorescent. b) Histogrammes représentatifs des résultats obtenus par cytométrie en flux, après 0, 48 et 96h de culture c) RMFI des LT OT-1 marqués avec la première fonction click et révélés avec le DBCO (fixation spécifique) sur les LT OT-1 contrôles révélés avec le DBCO (fixation non spécifique). d) suivi du marquage non spécifique des LT OT-1 contrôles révélés au DBCO, superposition des histogrammes obtenus pour les LT OT-1 contrôles (noir), révélés avec le DBCO (bleu) et 48h après révélation (violet).

La fixation non spécifique du DBCO diminue donc fortement à 48h *in vitro*, ce qui pourrait permettre un meilleur rapport signal/bruit *in vivo*. En effet, la dilution du DBCO suite à son injection systémique pourrait permettre une plus faible fixation non spécifique. Pour la suite des expériences, le mannose-azide fut conservé, étant donné la faible concentration nécessaire pour obtenir un marquage (20  $\mu$ M contre 1 mM pour la choline-azide), et la diminution relativement moins rapide du signal observé *in vitro*.

### c) *In vitro* : fonction

De manière similaire au test réalisé avec les liposomes, les LT OT-1 marqués avec la chimie click sont testés pour leurs capacités cytotoxiques vis-à-vis des cellules tumorales 5T33-OVA reconnues spécifiquement et des cellules 5T33 non reconnues. Les cellules 5T33 ne sont reconnues par les LT OT-1 dans aucune condition de marquage. A l'inverse, les 5T33-OVA sont lysées par les LT OT-1, et il ne semble pas y avoir de différences majeures entre l'efficacité de lyse des LT OT-1 marqués ou non marqués (Figure 41). Comme précédemment, chaque point est réalisé en triplicat, et si le marquage est validé *in vivo* ces résultats seront reproduits afin de confirmer l'absence d'impact de la chimie click sur l'activité cytotoxique des LT OT-1.

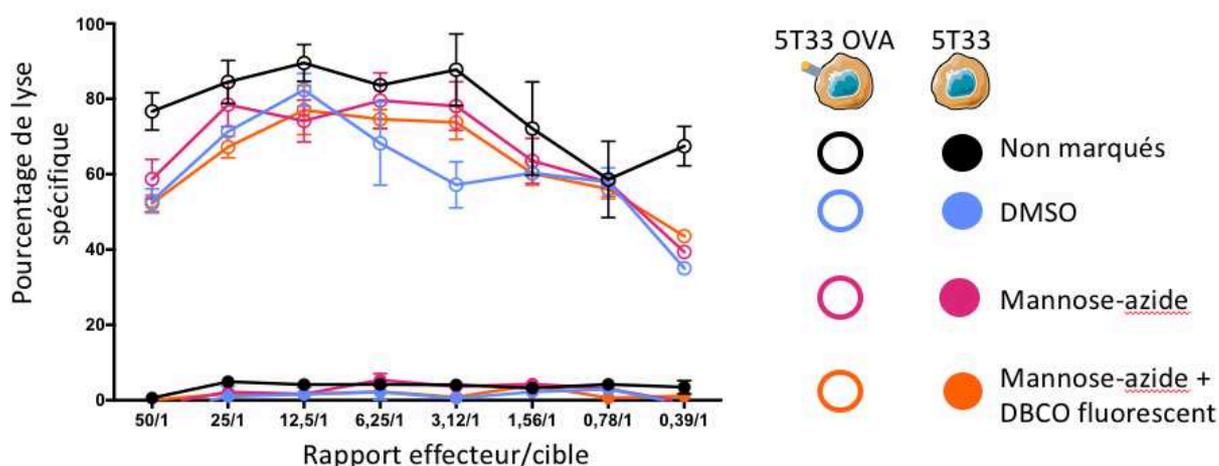
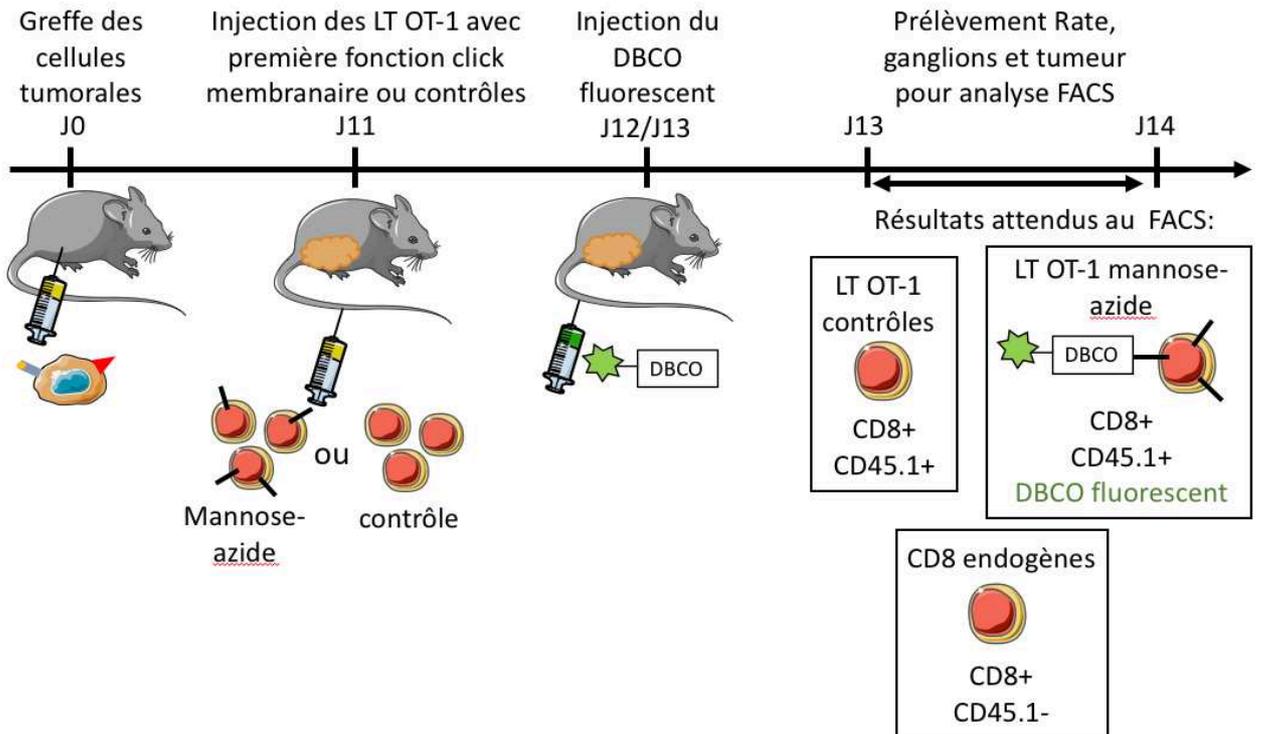


Figure 41: Test de cytotoxicité des LT OT-1 marqués avec la chimie click.

Pourcentage de lyse spécifique de la lignée 5T33 OVA reconnue spécifiquement par les LT OT-1 et la lignée 5T33 non reconnue, en fonction des marquages réalisés : Les LT OT-1 contrôles, incubés avec du DMSO, incubés avec 20  $\mu$ M de mannose-azide et révélés ou non avec le DBCO fluorescent.

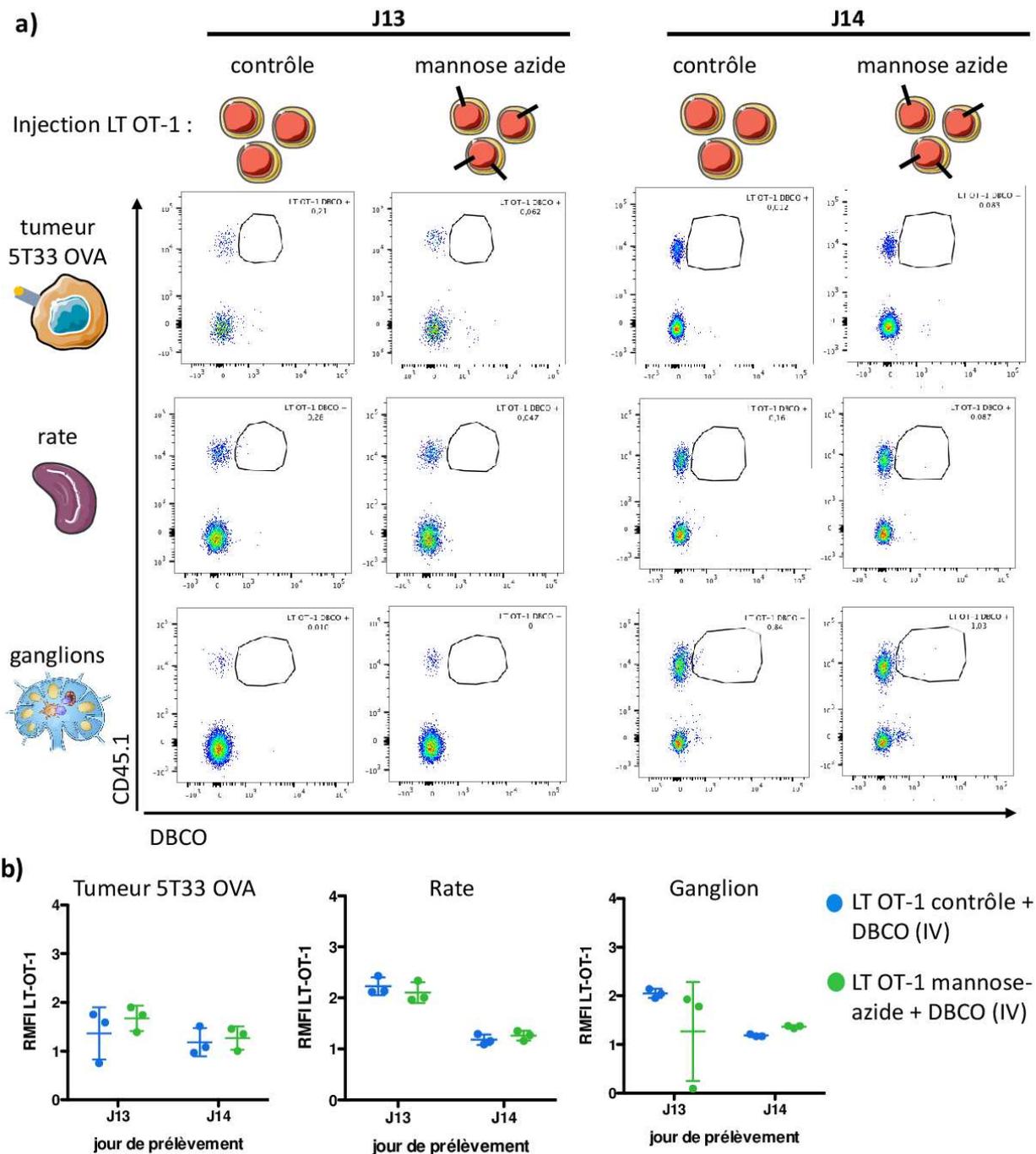
### d) Suivi *in vivo* des LT OT-1

Une fois le marquage des LT OT-1 avec la chimie click mis au point, ils sont injectés *in vivo*. Le plan des injections et prélèvements est présenté ci-dessous en Figure 42. Les souris sont greffées en sous-cutané avec la 5T33 OVA. Les LT OT-1 sont stimulés *in vitro* et mis en culture avec le mannose-azide comme précédemment décrit.  $5 \times 10^6$  LT OT-1 cultivés avec le mannose-azide ou avec du DMSO en contrôle sont ensuite injectés. 24h avant le prélèvement de la rate, la tumeur et les ganglions, une injection de DBCO fluorescent est réalisée en intraveineuse via la veine caudale.



**Figure 42: Plan des injections et prélèvements pour le suivi in vivo après marquage en chimie click**  
 Les souris sont greffées avec la lignée tumorale 5T33-OVA, puis injectées avec les LT OT-1 contrôles ou pré-marqués avec le mannose-azide. 24h avant les prélèvements (J12 pour le prélèvement à J13, ou J13 pour le prélèvement à J14), 100  $\mu$ M de DBCO fluorescent est injecté. La tumeur, la rate et les ganglions sont prélevés et les suspensions cellulaires sont analysées en cytométrie en flux. 3 souris sont utilisées pour chaque condition et temps de prélèvement.

Comme précédemment décrit pour le suivi *in vivo* des LT OT-1 marqués avec les liposomes, les LT OT-1 présentent le marqueur congénique CD45.1, permettant de les différencier des cellules de la souris au cas où la révélation avec le DBCO fluorescent *in vivo* aurait échoué. La stratégie d'analyse par cytométrie en flux est la même que celle décrite en Figure 33a. La Figure 43a montre des exemples de cytogrammes représentatifs obtenus pour chaque organe et chaque jour de prélèvements, dans le cas d'une injection de LT OT-1 contrôles ou présentant des fonctions azides. L'expression du CD45.1 permet de différencier les LT OT-1 des LT CD8 endogènes de la souris, et la fluorescence liée au DBCO est évaluée. Le niveau de fluorescence suite à la révélation au DBCO est exprimé en RMFI en Figure 43b.



*Figure 43: Analyse par cytométrie en flux des LT OT-1 révélés in vivo avec le DBCO fluorescent.*

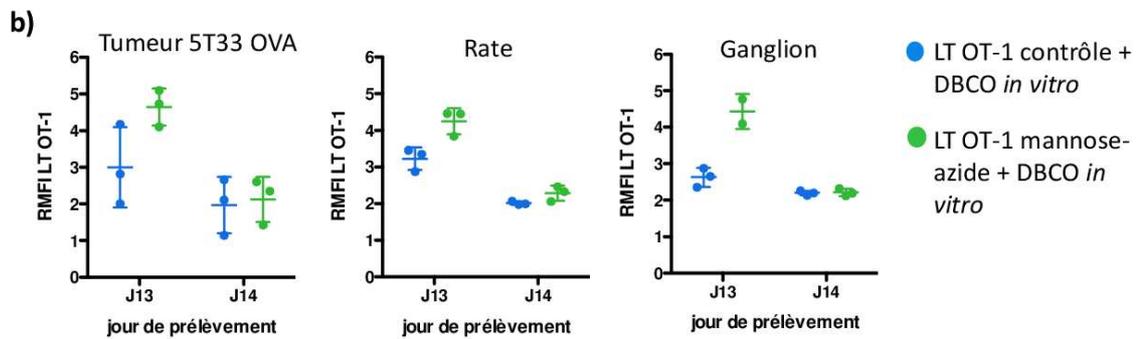
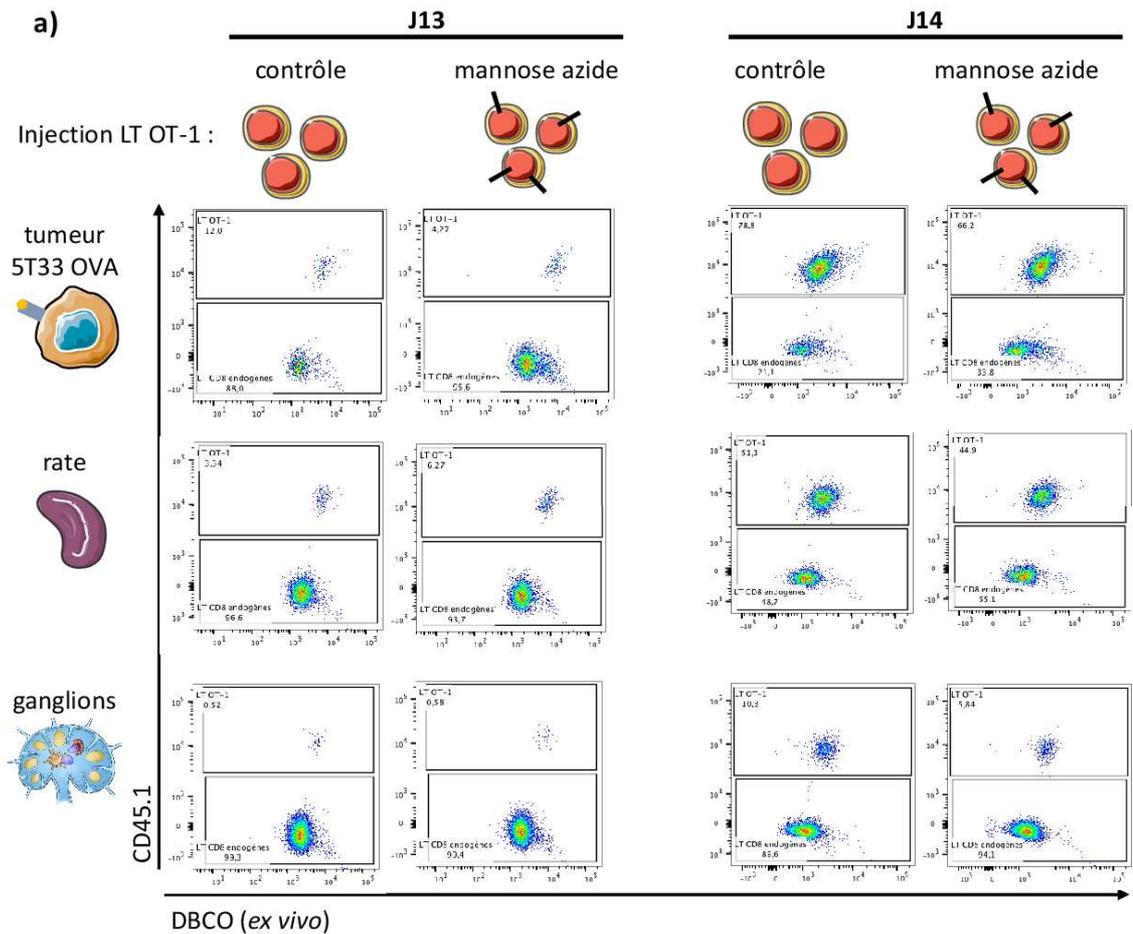
a) Pour chaque organe (tumeur, rate et ganglions), jour de prélèvement (J13 et J14), la fluorescence des LT OT-1 contrôles ou pré-marqués avec le mannose-azide est analysée. Les LT OT-1 sont séparés des LT CD8 endogènes de la souris par leur expression de CD45.1 (cytogrammes représentatifs de chaque condition) b) RMFI des LT OT-1 contrôles ou modifiés avec le mannose-azide, après injection par intraveineuse (IV) de DBCO (n=3 pour chaque temps de prélèvement, médianes et écart-types représentés).

A J13 comme à J14, et pour tous les organes étudiés, aucune augmentation de la fluorescence des LT OT-1 n'est observée entre les conditions LT OT-1 contrôles comparées aux LT OT-1 pré-marqués avec le mannose-azide (Figure 43b). Par exemple, les LT OT-1 cultivés avec le mannose azide infiltrant la tumeur présentent des RMFI de 1,7 (+0,3) à J13 et 1,35 (+0,2) à J14, comparé aux LT OT-1 contrôles qui présentent

des RMFI similaires : 1,6 (+0,5) et 1,1 (+0,3), respectivement. Des résultats similaires sont observés pour les LT OT-1 détectés dans la rate et dans les ganglions.

Par conséquent, soit l'expression des fonctions azides à la surface des cellules est devenue trop faible pour être révélée, soit la quantité de DBCO fluorescent injectée est insuffisante. Afin de vérifier la quantité de fonctions azides toujours présentes à la surface des LT OT-1 *in vivo*, les suspensions cellulaires obtenues après dilacération des organes sont révélées *ex vivo* avec le DBCO fluorescent, afin d'éviter la dilution du DBCO dans la circulation sanguine. L'ensemble des cellules (CD45.1+ ou CD45.1-), présentent une fixation non spécifique du DBCO fluorescent (Figure 44a). Les LT OT-1 (CD45.1+, partie supérieure des cytogrammes) semblent plus marqués par le DBCO fluorescent que les cellules CD45.1-. Les RMFI ont été calculés pour chaque conditions, et le marquage des LT OT-1 cultivés avec le mannose-azide est comparé à celui des LT OT-1 contrôle en figure 44b. Le détail des médianes de RMFI et des écarts-types (SD) est donné en tableau en Figure 44c (médiane sur trois animaux).

A J13, les LT OT-1 cultivés avec le mannose-azide semblent présenter un marquage au DBCO plus important que les LT OT-1 contrôles dans les différents prélèvements : par exemple, dans la tumeur, la médiane des RMFI est de 4,7 (+0,5) pour les LT OT-1 modifiés comparé à 2,8 (+1,1) pour la condition contrôle. Des résultats similaires sont obtenus dans la rate et les ganglions (Figure 44c). Cette faible différence de révélation semble indiquer qu'il reste à la surface cellulaire des groupes azides. Néanmoins, à J14, cette différence n'est plus observable, les LT OT-1 modifiés avec le mannose-azide et les contrôles présentent des RMFI similaires dans tous les organes analysés. L'absence de différence de marquage *ex vivo* entre les LT OT-1 contrôles et les LT OT-1 pré-marqués avec le mannose azide indique que la quantité de fonction azide présente à la surface n'est plus suffisante pour être détectée au-delà du bruit de fond.



c)

		Tumeur		rate		ganglion	
		mannose-azide	contrôle	mannose-azide	contrôle	mannose-azide	contrôle
J13	médiane	4,72	2,82	4,45	3,35	4,42	2,65
	SD	0,5	1,09	0,35	0,31	0,48	0,26
J14	médiane	2,35	2,11	2,33	1,99	2,19	2,196
	SD	0,62	0,77	0,2	0,05	0,1	0,06

Figure 44: Analyse par cytométrie en flux des LT OT-1 révélés ex vivo avec le DBCO fluorescent.

Pour chaque organe (tumeur, rate et ganglions), jour de prélèvement (J13 et J14), la fluorescence des LT OT-1 contrôles ou pré-marqués avec le mannose-azide est analysée suite à la révélation ex vivo avec 100µM de DBCO fluorescent. Les LT OT-1 sont séparés des LT CD8 endogènes de la souris par leur expression de CD45.1 (cytogrammes représentatifs de chaque condition) b) calcul des RMFI des LT OT-1 modifiés avec le mannose-azide ou contrôle, après révélation ex vivo avec le DBCO, dans les différentes conditions (n=3 pour chaque temps de prélèvement) c) détail des médianes et écart-types (SD) obtenus pour les RMFI.

Les LT OT-1 ont pu être modifiés métaboliquement afin de leur faire exprimer des fonctions azides, qui peuvent être révélées *in vitro* avec une seconde fonction click. Ce marquage n'a pas montré d'impact sur leur viabilité ou fonction cytotoxique. Néanmoins, *in vivo* l'expression des fonctions azides s'est révélée instable, déclinant fortement pour ne plus être détectable 3 jours après injection. La modification métabolique ne permettant pas d'obtenir l'expression stable d'une cible sur les LT OT-1, nous nous sommes penchés sur l'étude de marqueurs spécifiques des LT activés connus pour être exprimés à leur surface, afin de les cibler *in vivo* avec un vecteur radiomarqué.

#### IV - Ciblage *in vivo*

##### a) Principe

Suite à la revue de littérature, il ressort globalement que le ciblage des LT est possible à l'aide de divers marqueurs phénotypiques tels que CD8, CD4, CD2, CD7, qui ont permis un suivi des LT par imagerie TEP (Perrin *et al.*, 2020). Cependant ces marqueurs ne permettent pas de différencier les LT naïfs des LT activés et impliqués dans la réponse immunitaire. Afin de suivre des LT lors de transferts adoptifs, ou de manière plus large suivre le développement d'une réaction lymphocytaire T, nous avons focalisé notre recherche sur des marqueurs d'activation. L'objectif est de trouver, dans la littérature, des marqueurs rapportés comme étant exprimés par les LT naïfs, puis exprimés et conservés après activation. Les marqueurs en question doivent également être exprimés, si possible, de manière exclusive par les LT.

Les différents marqueurs que nous avons retenus sont les suivants (Cossarizza *et al.*, 2019) :

- CD25, récepteur de haute affinité de l'IL-2,
- CXCR6, récepteur de la chimiokine CXCL16, impliqué dans la régulation de la circulation des LT,
- CXCR3, récepteur des chimiokines CXCL9, 10 et 11, responsable du recrutement des LT dans les tissus,
- Tim3, un des marqueurs d'« épuisement » présent sur les LT activés,
- CD38, exprimé sur les cellules hématopoïétiques et augmenté sur les LT activés,
- CD69, un des marqueurs d'activation les plus précoces exprimés suite à une stimulation du TCR.

##### b) Sélection de la cible

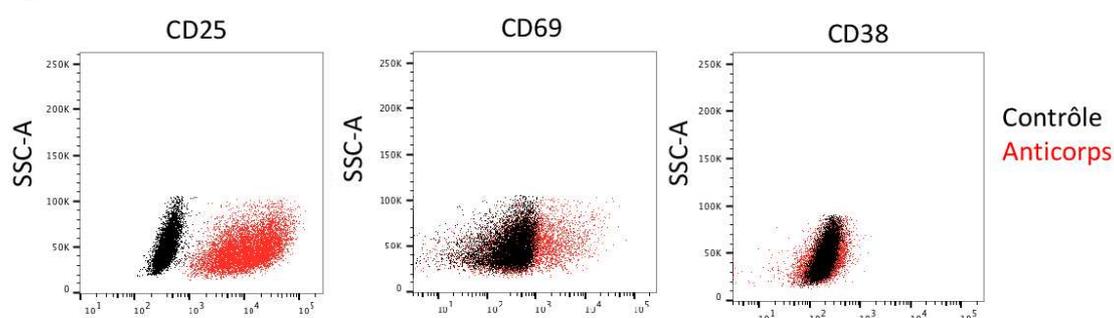
Afin de vérifier si ces marqueurs seraient adaptables à notre modèle *in vivo*, les souris greffées avec la 5T33 ou 5T33 OVA sont injectées avec  $5 \times 10^6$  LT OT-1. La rate, la tumeur et le sang des souris est ensuite prélevé quotidiennement pendant 4 jours. Les suspensions cellulaires obtenues à partir de ces prélèvements sont marquées avec des anticorps spécifiques des différents marqueurs sélectionnés pour évaluer leur niveau d'expression. Avant injection, les LT OT-1 *in vitro* sont également évalués pour leur expression de ces différents marqueurs.

Les prélèvements du premier jour suivant l'injection, trop peu d'évènements correspondants aux LT OT-1 sont observés pour être analysés par cytométrie en flux. L'analyse des différents marqueurs a donc principalement été effectuée sur les temps 2, 3 et 4 jours post-injection. La stratégie d'analyse est la même que celle précédemment décrite en [Figure 33a](#), et consiste à évaluer l'expression des différents marqueurs par les LT CD8 endogènes et LT OT-1. L'objectif est de détecter un marqueur exprimé fortement par les LT OT-1, et non exprimé par les autres cellules des prélèvements, notamment les LT CD8 endogènes. L'ensemble de ces résultats sont obtenus avec un n=3 pour chaque point temps, ne permettant pas d'effectuer une analyse statistique. Néanmoins, des tendances intéressantes sont

observées sur l'expression des différents marqueurs, et cette expérience sera reproduite afin de confirmer ces résultats.

*In vitro*, avant injection, les LT OT-1 montrent une forte expression de CD25, une très faible expression de CD69 et une absence d'expression de CD38 (Figure 45a). *In vivo*, les LT sont séparés en fonction de leur expression de CD8 et un marquage tétramère a permis de mettre en évidence les LT OT-1. Leur niveau d'expression des différents marqueurs est également représenté par une échelle de couleur, et permet de comparer l'expression entre les LT CD8 endogènes et LT OT-1. La Figure 45b présente des cytogrammes représentatifs obtenus pour l'analyse des tumeurs à 2 jours après injection, des résultats similaires ayant été obtenus pour les autres prélèvements aux différents temps. Les LT OT-1 analysés dans les différents prélèvements n'ont montré ni expression de CD38, CD69 ou CD25. L'absence d'expression de CD25 est particulièrement surprenante, étant donné que ce marqueur est fortement exprimé par les cellules au moment de l'injection, contrairement au CD38 et CD69 qui montrent une expression faible après activation *in vitro*. Cette absence d'expression *in vivo* se retrouve dans tous les prélèvements réalisés, à 2, 3 et 4 jours post-injection.

a) *In vitro* (pré-injection)



b) *In vivo*

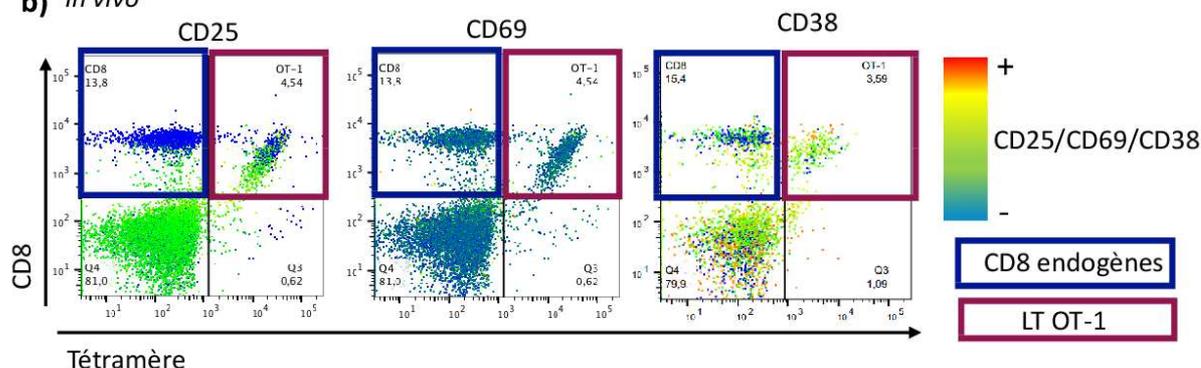


Figure 45: Analyse des marqueurs CD25, CD69 et CD38 *in vitro* et *in vivo* sur les LT-OT-1.

a) Expression *in vitro* de CD25, CD38 et CD69 sur les LT OT-1 avant injection. b) Analyse des LT et séparation des LT CD8 endogènes (cadre bleu) et des LT OT-1 (cadre violet) en fonction du marquage tétramère H-2K<sup>b</sup>-OVA. Chaque cytogramme est représentatif des cellules analysées dans une tumeur 2 jours après injection des LT OT-1, et l'échelle de couleur correspond au niveau d'expression des marqueurs CD25, CD69 ou CD38 (cytogrammes représentatifs de chaque condition, n=3 pour chaque temps de prélèvement).

Les RMFI pour chacun de ces marqueurs sont calculées et représentées en Figure 46 a, b, et c pour le CD25, CD69 et CD38, respectivement. Bien que CD25 soit exprimé par les LT OT-1 *in vitro* avant injection, *in vivo* leur expression passe d'un RMFI de 12,3 à 4,33 (+2,3) à J3 dans les tumeurs 5T33 OVA (Figure 46a). Ce niveau d'expression est proche de celui des LT CD8 endogènes, qui présentent un RMFI de 0,7 (+0,3) dans les mêmes conditions. A J4 dans les mêmes tumeurs 5T33-OVA, plus aucune différence

n'est observée entre les LT OT-1 et les LT CD8 endogènes. Un profil similaire est observé dans la rate et le sang, et la greffe de tumeur non reconnue (5T33) ne semble pas non plus impacter le niveau d'expression de CD25.

L'expression du CD69 par les LT OT-1 présente un profil particulier ; son expression augmente à J2, mais uniquement au site tumoral dans les animaux qui sont greffés avec la lignée 5T33-OVA. Dans cette tumeur, le RMFI est de 22,17 (+4,2) (Figure 46b). En comparaison, les LT OT-1 injectés à des souris présentant des tumeurs 5T33 présentent un RMFI de 8,2 (+1,4). Cette expression plus élevée de CD69 n'est observée que dans les tumeurs 5T33-OVA, et ne se retrouve ni dans le sang, ni dans la rate où le CD69 n'est pas exprimé. Cependant ce pic d'expression est transitoire, dès J3 l'expression de CD69 sur les LT OT-1 infiltrant la tumeur 5T33-OVA redescend à 5,2 (+3,8), un niveau d'expression similaire à celui des LT CD8 endogènes dans la même tumeur.

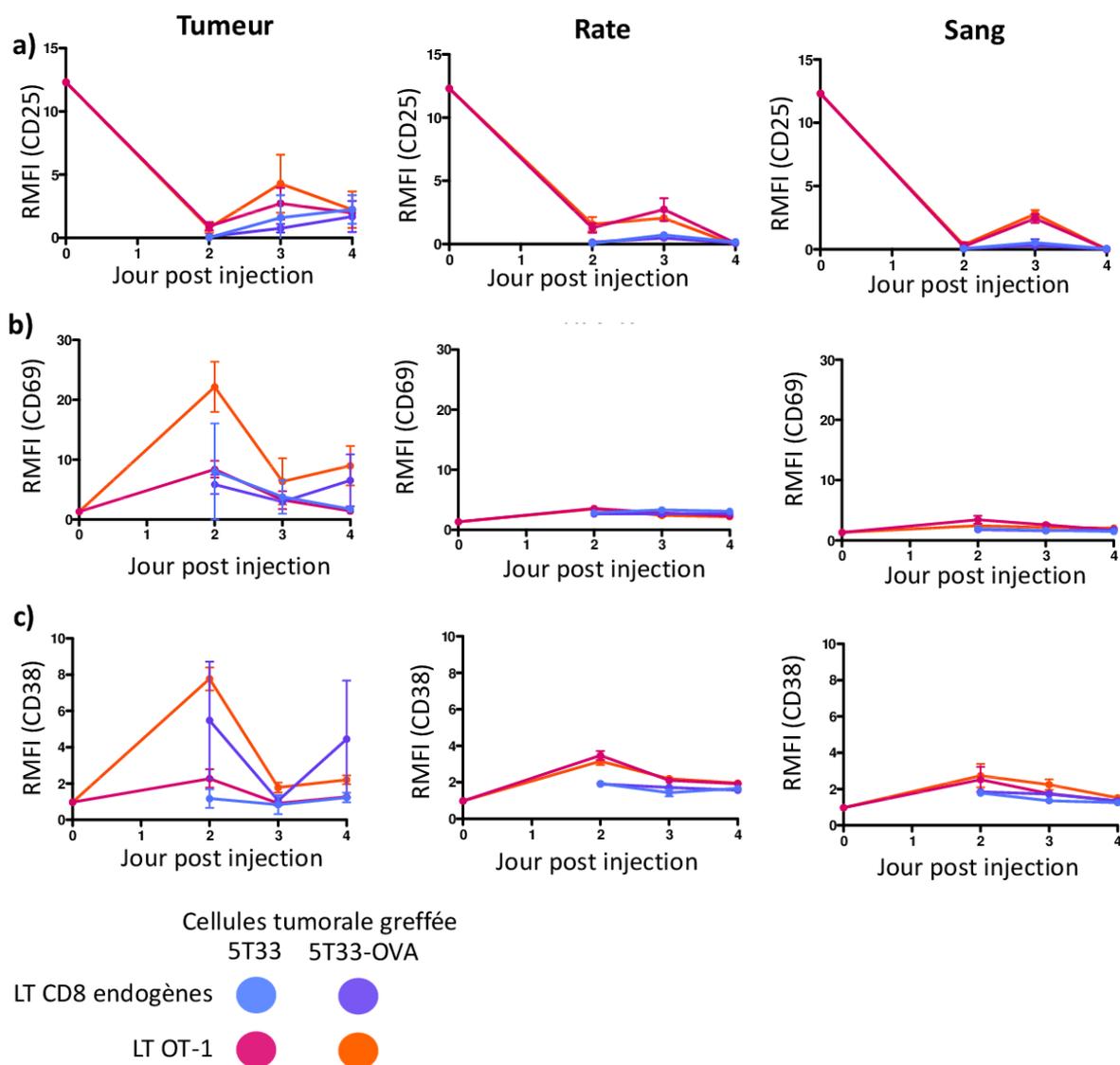
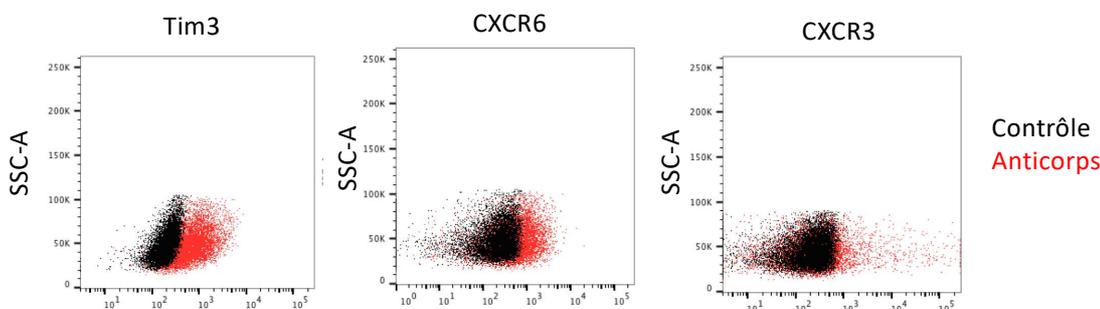


Figure 46: Niveau d'expression de CD25, CD69 et CD38 dans les différents prélèvements au cours du temps. Les RMFI de chaque marqueur a) CD25, b) CD69, c) CD38 dans chaque prélèvement sont calculés pour les LT OT-1 et LT CD8 endogènes et représentés en fonction du temps (moyenne et écart-type représentés, n=1 pour le temps t0 avant injection et n=3 pour chaque temps de prélèvement).

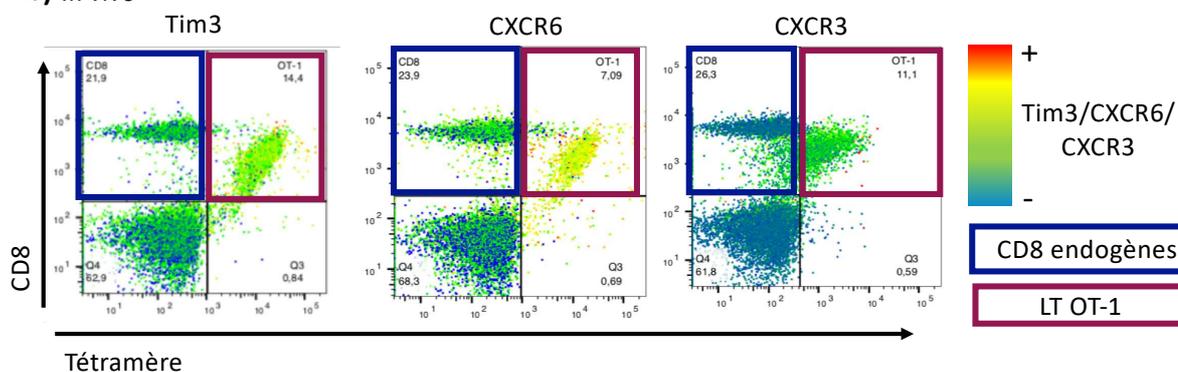
L'expression du CD38 diffère également selon le type de tumeur greffée (Figure 46c). Dans les tumeurs 5T33-OVA à J2, les LT OT-1 ont une expression de 7,9 (+0,6), une expression similaire aux LT CD8 endogènes dans les mêmes tumeurs, de l'ordre de 6,5 (+1,6). A l'inverse, dans les tumeurs 5T33 les LT OT-1 comme les LT CD8 endogènes présentent une expression plus faible, de 2,4 (+0,5) et 1,0 (+0,5), respectivement. Cette différence d'expression, dépendante du type de tumeur greffée, est beaucoup moins marquée dans la rate et n'est pas visible dans le sang. Néanmoins elle semble être transitoire, car à J3 les LT OT-1 infiltrant les tumeurs 5T33-OVA présentent un RMFI similaire à celui observé chez les LT OT-1 infiltrant les tumeurs 5T33 : 1,78 (+0,3) et 0,95 (+0,1), respectivement.

L'expression *in vitro* des marqueurs Tim3, CXCR6 et CXCR3 *in vitro* est présentée en Figure 47a. Tim3 et CXCR6 présentent une faible expression *in vitro* après activation, tandis que CXCR3 ne semble pas exprimé. *In vivo* cependant, ces 3 marqueurs sont plus exprimés par les LT OT-1 que par les LT D8 endogènes. Des cytogrammes représentatifs de tumeurs prélevées à 48h sont représentés en Figure 47b, et montre une absence d'expression de ces marqueurs par les LT CD8 endogènes (encadré bleu), et une expression par les LT OT-1 (encadré violet). Des résultats similaires sont obtenus pour la rate et le sang, aux différents temps de prélèvement.

**a) *In vitro* (pré-injection)**



**b) *In vivo***



**Figure 47: Analyse des marqueurs Tim3, CXCR6 et CXCR3 *in vitro* et *in vivo* sur les LT-OT-1**

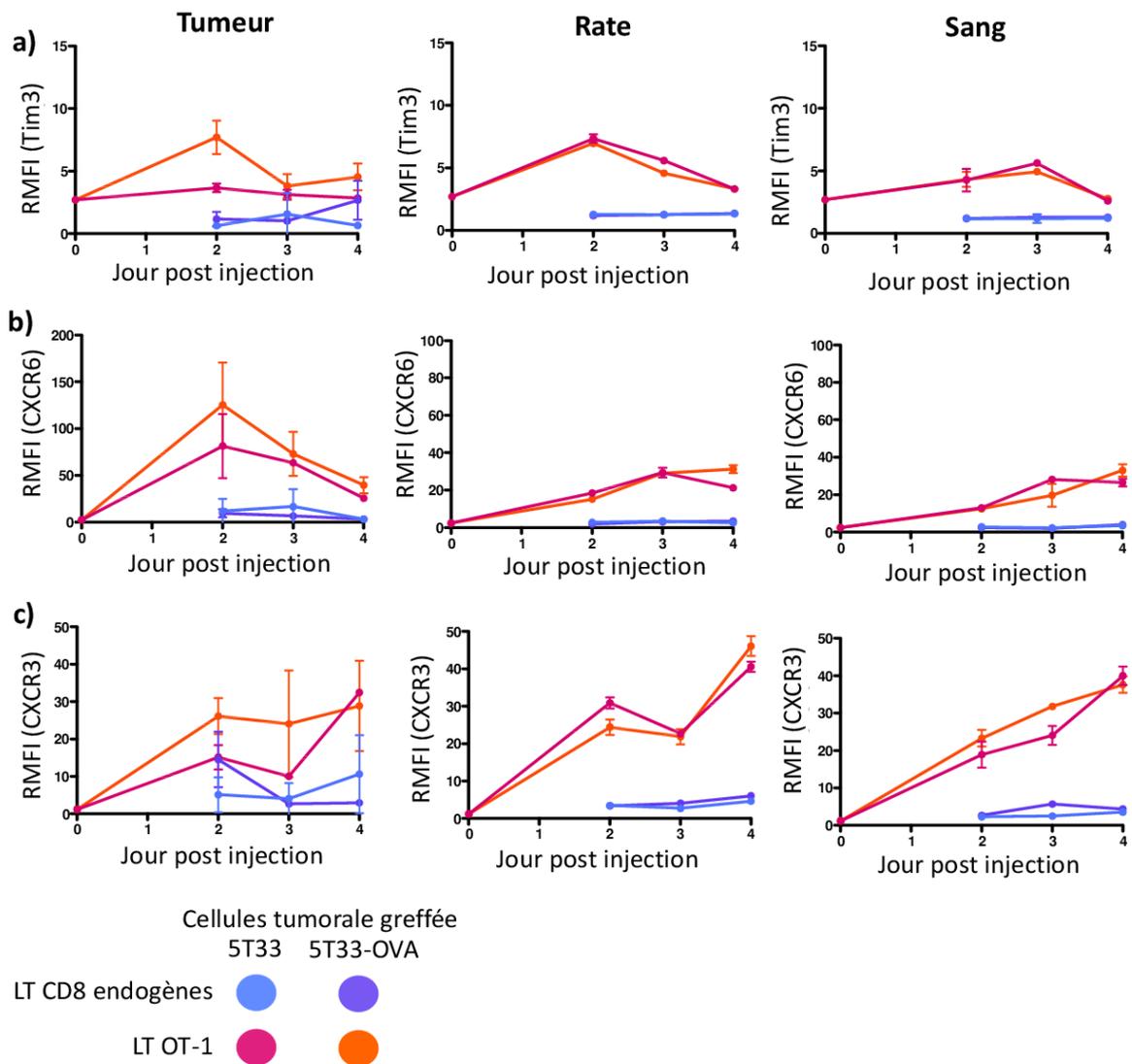
*a) Expression in vitro de Tim3, CXCR6 et CXCR3 sur les LT OT-1 avant injection. b) Analyse des LT et séparation des LT CD8 endogènes (cadre bleu) et des LT OT-1 (cadre violet) en fonction du marquage tétramère H-2K<sup>b</sup>-OVA. Chaque cytogramme est représentatif des cellules analysées dans une tumeur 2 jours après injection des LT OT-1, et l'échelle de couleur correspond au niveau d'expression des marqueurs Tim3, CXCR6 ou CXCR3 (cytogrammes représentatifs de chaque condition, n=3 pour chaque temps de prélèvement).*

Les niveaux d'expression de ces marqueurs sont calculés aux différents temps de prélèvements. Les rapports des médianes de fluorescence sont présentés en [Figure 48](#), pour la tumeur, la rate et le sang. Pour chaque marqueur, le niveau d'expression sur les LT OT-1 est présenté pour les tumeurs 5T33 et 5T33 OVA, et est comparé à son niveau d'expression sur les LT CD8 endogènes.

Parmi ces trois marqueurs, Tim3 présente l'expression la plus faible sur les LT OT-1 ([Figure 48a](#)), avec à la tumeur à J2 un RMFI de 3,7 (+0,3) (5T33) et 7 (+1,3) (5T33-OVA). Elle est néanmoins plus élevée que celle observée chez les LT CD8 endogènes, qui présentent des RMFI de 0,5 (+0,2) et 1,1 (+0,6) dans les tumeurs 5T33 et 5T33-OVA, respectivement. Des expressions similaires sont observées dans la rate et le sang. L'expression de Tim3, bien que faible, semble être très homogène entre les différents organes et stable dans le temps.

Le CXCR6 est très fortement exprimé sur les LT OT-1 infiltrant les tumeurs 5T33 et 5T33-OVA à J2, avec des RMFI de 66,71 (+34,3) et 112,1 (+45,4), respectivement ([Figure 48b](#)). Par comparaison, les LT CD8 endogènes présentent une très faible expression de CXCR6, de 4,9 (+13) pour les tumeurs 5T33 et 7,1 (+4,4) pour les 5T33-OVA. L'expression de CXCR6 sur les LT OT-1 semble ensuite diminuer au niveau de la tumeur, jusqu'à atteindre un RMFI de 25,62 (+2,9) dans les tumeurs 5T33 et 37,39 (+8,7) dans les tumeurs 5T33-OVA. Cette expression est très proche de celle observée sur les LT OT-1 dans le sang et la rate, qui sont de 21,48 (+0,8) et 32,1 (+2,1).

Le CXCR3 présente une expression très hétérogène au niveau des tumeurs ([Figure 48c](#)), qui semble néanmoins augmenter jusqu'à J4 où elle atteint une RMFI de 23 (+12) chez les LT OT-1 infiltrant les tumeurs 5T33 OVA, comparé au LT CD8 endogènes dans les mêmes tumeurs, qui présentent une RMFI de 2,9. L'expression est plus homogène au niveau de la rate, où les LT OT-1 semblent présenter des RMFI similaires peu importe la lignée greffée. Le niveau d'expression passe pour les LT OT-1 de 1,2 avant injection à 25,48 (+2) à J2, puis 45,8 (+2,6) à J4. Par comparaison, les LT CD8 endogènes présentent un très faible niveau d'expression du même marqueur, de l'ordre de 3,2 (+0,4) à J2 et 6,2 (+0,4) à J4 dans le même organe. Dans le sang, des résultats similaires à la rate sont obtenus, avec une augmentation progressive de l'expression chez les LT OT-1.



**Figure 48:** Niveau d'expression de *Tim3*, *CXCR6* et *CXCR3* dans les différents prélèvements au cours du temps.

Les RMFI de chaque marqueur a) *Tim3*, b) *CXCR6*, c) *CXCR3*) dans chaque prélèvement sont calculés pour les LT OT-1 et LT CD8 endogènes et représentés en fonction du temps (moyenne et écart-type représentés,  $n=1$  pour le temps  $t_0$  avant injection et  $n=3$  pour chaque temps de prélèvement).

### c) Conclusion

Contrairement à ce qui était attendu, les LT OT-1 n'expriment pas de CD25 *in vivo*, bien qu'ils montrent une forte expression *in vitro* avant injection. L'expression de CD69 et CD38 est hétérogène entre la tumeur et la rate, et n'est pas suffisante pour réaliser un suivi des cellules. Les récepteurs des chimiokines CXCR6 et CXCR3 semblent particulièrement exprimés, et sont donc des candidats potentiels pour le suivi des LT OT-1 *in vivo*. Avec le marqueur *Tim3*, leur expression sur les LT OT-1 semble être légèrement plus élevée dans le cas où ils se trouvent dans une tumeur 5T33-OVA pour laquelle ils présentent une spécificité, cependant la reproduction de ces résultats sera nécessaire afin de réaliser une analyse statistique. Le CXCR3 et *Tim3* semblent avoir des expressions similaires dans la tumeur, la rate et le sang. Quant au CXCR6, son expression initiale est plus élevée dans la tumeur, mais diminue à J4 pour rejoindre celle observée dans la rate et le sang.

## Discussion

Si le transfert adoptif de cellules est une thérapie prometteuse dans le cas de traitements contre le cancer, les modes d'actions de ces cellules ne sont pas complètement élucidés. La possibilité de suivre les cellules une fois injectées permettrait de mieux comprendre les modes d'action de ces thérapies, ainsi que de prédire leur efficacité. Dans le cadre de cette thèse, différentes approches ont été testées afin de pouvoir suivre les LT OT-1 dans notre modèle pré-clinique de MM sous-cutané, avec l'objectif final d'obtenir une preuve de concept pouvant être transposable en imagerie TEP clinique. Le marquage direct *ex vivo* des cellules avant injection présente notamment l'intérêt d'un marquage très spécifique, étant donné que les seules cellules marquées sont celles injectées. Le marquage des LT OT-1 avec les liposomes s'est révélé efficace, stable *in vitro* sur plusieurs jours et sans impact sur leur activité. Cependant, une fois injectés *in vivo* la diminution du marquage s'est avérée plus rapide qu'*in vitro*. Bien que détectés dans les tumeurs, les LT OT-1 ne présentent plus de fluorescence détectable au bout de 3 jours.

La baisse de fluorescence des LT OT-1 peut s'expliquer par deux hypothèses ; la première serait liée à la prolifération des LT OT-1, entraînant une dilution de la fluorescence à chaque division. *In vitro*, les LT OT-1 murins peuvent être stimulés pendant 5 jours avant de décroître. Néanmoins, l'ajout d'IL-15 permet de les maintenir en culture pendant 5 jours supplémentaires. *In vivo*, il serait envisageable que leur prolifération reprenne, notamment en présence de cellules tumorales pour lesquelles ils présenteraient une spécificité. Il a notamment été décrit une prolifération très rapide des LT lors de leur activation suite à une infection virale, avec un temps de division allant de 2 à 6h suivant les études (Lawrence and Braciale, 2004; Yoon *et al.*, 2007; Yoon, Kim and Braciale, 2010). En se divisant, chaque cellule fille pourrait récupérer la moitié de la fluorescence de la cellule mère, diluant au fur et à mesure l'intensité de fluorescence dans les LT.

La deuxième hypothèse consisterait en une perte du signal fluorescent par relargage passif des cellules. Des images des LT OT-1 marqués avec les liposomes obtenus avec un microscope confocal montrent que les liposomes ne fusionnent pas avec la membrane cellulaire, mais sont internalisés dans les cellules. Étant donné qu'*in vitro*, les LT OT-1 restent dans leur milieu de culture, un équilibre entre les liposomes intracellulaires et ceux présents dans le milieu de culture pourrait se former, permettant une meilleure conservation de la fluorescence au cours du temps. *In vivo*, cet équilibre pourrait être rompu et le relargage des liposomes serait plus important, entraînant une plus forte diminution de la fluorescence.

Si la prolifération des LT OT-1 entraîne une perte du signal fluorescent, l'utilisation d'un marquage radioactif aurait pu permettre de suivre les lymphocytes, même avec une activité faible par cellule. Une étude sur la lignée jurkat a démontré qu'*in vitro*,  $1 \times 10^6$  cellules pouvaient être détectées dans des plaques de culture sous TEP à partir de 3 mBq/cellule (Lechermann *et al.*, 2020). La très faible activité nécessaire à leur détection laisse penser que malgré la dilution du signal, celui-ci pourrait rester suffisant pour être détecté en imagerie.

Nous avons pu synthétiser le [89Zr]tétraoxinate de zirconium(IV), et l'efficacité de marquage des LT OT-1 est comprise entre 20 et 30%. La rétention du marquage par les LT OT-1 est très faible, avec une perte de la majeure partie de la radioactivité dès 15h de culture. L'efficacité de marquage obtenue dans notre étude est similaire à celle observée par Francis Man et collaborateurs, qui est dans leur cas comprise entre 40 et 50%. De plus, leur étude montre une bonne rétention du complexe [89Zr]tétraoxinate de zirconium(IV), car les LT  $\gamma\delta$  humains conservent 50% de leur activité initiale 7 jours après le marquage. Ces différences peuvent s'expliquer par la présence d'impureté dans notre solution de [89Zr]tétraoxinate de

zirconium(IV), étant donné que les chromatographies ont montré une formation de produit comprise entre 40 et 52%.

La numération des cellules a montré une inhibition totale de la prolifération des LT OT-1, dès 25 mBq/cellule. Ces résultats concordent avec les travaux de Francis Man et ses collaborateurs, qui n'ont obtenu une prolifération normale qu'en dessous de 20 mBq/cellule. Néanmoins, des doses plus élevées ont dû être utilisées pour l'imagerie TEP, indiquant que des doses toxiques sont nécessaires pour le marquage des cellules afin d'obtenir un contraste signal/bruit de fond suffisant pour l'imagerie (Man *et al.*, 2019). Les cellules ainsi suivies par imagerie TEP ayant reçu une dose toxique de zirconium-89, leur biodistribution est potentiellement différente de celle de cellules saines, introduisant un biais dans l'expérimentation.

Dans une autre étude est rapportée le marquage de LT OT-1 (Sato *et al.*, 2015), avec lequel une prolifération normale des lymphocytes est observée avec une activité de 37 mBq de zirconium-89 par cellule. Cependant, les LT sont marqués avant leur stimulation, et l'activité par cellule en pourcentage passe de 100% à 50% au bout de 4 jours. Cette division par deux de l'activité par cellule implique une seule division des lymphocytes lors de 4 jours de stimulation *in vitro* ; or lors de nos études les LT OT-1 se divisent 3 à 4 fois dans ce même laps de temps. Cette faible prolifération des cellules lors de leur stimulation semble indiquer un effet cytostatique du marquage. Pour le suivi des LT OT-1 *in vivo* par TEP, Sato et collaborateurs ont donc radiomarké les LT OT-1 avec une activité de 37 mBq/cellule, dose à laquelle ils n'observent pas de toxicité par rapport au contrôle. Cependant nous n'avons pas pu reproduire ces résultats, et avons observé une forte toxicité dès 25 mBq/cellule.

Afin de pallier le problème de toxicité lié au chargement *ex vivo* des LT avec un radioélément, l'utilisation d'un marquage en deux temps, à l'aide de chimie click, fut testée. Le marquage de cellules à l'aide du métabolisme de mannose-azide a déjà été utilisé pour marquer des cellules tumorales (Koo *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2017) et cellules souches (Lee *et al.*, 2016, 2017; Lim *et al.*, 2019). Les cellules ont ensuite été suivies dans le corps entier de l'animal grâce à la fluorescence infrarouge. Plus récemment, des LT OT-1 ont été marqués avec le mannose-azide, révélé au DBCO-Cy5, puis injectés dans un modèle tumoral et suivi par fluorescence NIR (Kim *et al.*, 2021). L'intensité du signal fluorescent dans la tumeur, correspondant à l'infiltrat de LT OT-1, a pu être corrélé au taux de réponse de la tumeur au traitement par ACT. Cependant un fort signal au niveau des reins 7 jours après injection laisse supposer un relargage du complexe fluorescent par les cellules. Cette méthode pose deux problèmes principaux pour le suivi de cellules ; dans un premier temps, l'imagerie grâce à la fluorescence NIR est moins résolutive que celle par TEP. De plus, le marquage des cellules avant l'injection avec un radioélément implique à nouveau une irradiation longue des cellules, dans le cas d'une fonction click radiomarkée.

Afin de diminuer cette irradiation, l'objectif du marquage en chimie click a été de réaliser le ciblage en deux temps : les cellules seront d'abord marquées avec la première fonction click, à l'aide de mannose-azide, puis injectées *in vivo*. Dans un second temps, le radiotracer TEP couplé à une seconde fonction click sera injectée, et la révélation des cellules se fera *in vivo*. Si le marquage a pu être mis au point *in vitro*, une fois injectées les cellules ont montré une très faible expression de cette fonction click à la membrane. De même que pour le marquage avec les liposomes, il est possible que la prolifération des LT OT-1 ait dilué la quantité de mannose-azide disponible au niveau de la membrane cellulaire. Il est également possible que le recyclage des protéines membranaires ait entraîné une internalisation de ces protéines, et qu'elles ne soient plus accessibles pour la seconde fonction Click.

Dans la littérature, peu d'études rapportent l'injection de cellules marquées avec une première fonction click et révélées *in vivo* par l'injection de la deuxième. L'imagerie de cellules tumorales A549 pré-

marquées avec le mannose-azide et injectées dans le foie ont pu être révélées avec le DBCO-Cy5 et permettre une imagerie des cellules tumorales par fluorescence infrarouge (Kang *et al.*, 2014). De même, un gel implanté dans un modèle d'ischémie exprimant une fonction azide a également pu être révélé avec du DBCO-Cy5 (Brudno *et al.*, 2015). Le ciblage d'amas de cellules tumorales, dont la prolifération peut être plus lente que celle de lymphocytes, ou de gel peut permettre de prévenir la perte de l'expression de la première fonction click *in vivo*, qui peut ainsi être révélée. Cependant la lipophilie importante de la fonction DBCO peut être un frein à cette méthode.

Dans notre étude, nous avons observé une fixation non spécifique de la fonction DBCO sur les cellules contrôles. Une fixation non spécifique similaire est également retrouvée dans une étude de Zhang et collaborateur, ou le TCO, une deuxième fonction click similaire au DBCO, se fixe également de manière non spécifique aux cellules tumorales SGC-7901 (X. Zhang *et al.*, 2017). A notre connaissance, aucune étude de biodistribution précise de ces molécules n'est encore rapportée dans la littérature. Néanmoins leur caractère lipophile entraînerait potentiellement une rétention dans certains organes sains, diminuant le nombre de molécules disponibles pour le ciblage. La modification métabolique des LT OT-1 n'étant pas stable dans le temps, leur suivi par TEP à l'aide d'un vecteur radiomarqué a été envisagé. Afin de pouvoir suivre des LT activés, ou de manière plus générale le développement d'une réponse immunitaire après une thérapie, l'expression de marqueurs d'activation a été évaluée *in vivo* dans notre modèle d'ACT. Parmi les marqueurs d'activation rapportés dans la littérature, l'absence de détection d'expression *in vivo* de CD25, la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2, est la plus surprenante.

*In vitro*, l'expression de CD25 est observée après 4 à 5 divisions (Nolz and Richer, 2020), ce qui correspond à nos observations sur l'expression de CD25 sur les LT OT-1 avant injection. *In vivo*, une étude rapporte l'apparition d'une population CD25 low chez des LT murins transférés dans un modèle d'infection virale (Kalia *et al.*, 2010). Cette diminution du CD25 intervient suite à une diminution de l'IL-2 dans la rate, 3 jours après l'injection des LT. 5 jours après injection, tous les LT ont complètement réduit l'expression du CD25. Cependant dans notre cas, la disparition de l'expression de CD25 est observée dès 2 jours après transfert. Il est possible que le faible niveau d'IL-2 *in vivo* soit à l'origine de cette diminution plus rapide. Il a également été observé dans une étude de Yoon et collaborateurs que l'expression du CD25 est lié au type de stimulation, et que des LT naïfs stimulés à l'aide de peptides présentent une expression plus faible du CD25 (Yoon, Kim and Braciale, 2010). Cette méthode étant similaire à celle utilisée dans notre étude pour la stimulation de LT OT-1 (splénocytes chargés avec des peptides reconnus par les LT), il est possible que l'absence d'expression de CD25 observée dans notre cas soit liée à un biais d'expérimentation liée au type de stimulation.

A l'inverse du CD25, les récepteurs de chimiokines CXCR3 et CXCR6 ont montré une très faible expression *in vitro*, fortement augmentée *in vivo*. Le ciblage de ces récepteurs pourrait permettre le suivi d'une réponse immunitaire. En plus de permettre un ciblage à l'aide anticorps radiomarqués, ils ouvrent également la possibilité à un ciblage grâce à leurs ligands radiomarqués. Les cellules ciblées étant diffuses dans l'organisme, l'utilisation d'un ligand de récepteur de chimiokines, de plus petite taille que les anticorps permettrait une biodistribution et une élimination plus rapide. Le nombre de cellules à imager étant faible, une élimination rapide du traceur non fixé permettrait d'augmenter le rapport signal sur bruit. De plus, une biodistribution rapide du vecteur serait plus compatible avec l'utilisation de radioéléments présentant une demi-vie plus courte, permettant ainsi de diminuer l'irradiation des tissus. Dans cette optique, deux études ont ainsi utilisé soit des diabody (Seo *et al.*, 2018), soit des fragments d'anticorps F(ab)'2 (Kristensen *et al.*, 2020) pour l'imagerie du marqueur CD8 dans des modèles murins. Le ciblage de CXCR3 ou CXCR6 avec des peptides radiomarqués pourraient permettre une imagerie similaire, mais permettant de visualiser plus spécifiquement les LT activés et non l'ensemble des LT CD8.

## Bibliographie

- Ahmed, N. *et al.* (2015) 'Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) –Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma', *Journal of Clinical Oncology*, 33(15), pp. 1688–1696. doi: 10.1200/JCO.2014.58.0225.
- Allavena, P. *et al.* (2008) 'The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance', *Immunological Reviews*, 222(1), pp. 155–161. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00607.x.
- Allen, B. J. *et al.* (2005) 'Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma', *Cancer Biology & Therapy*, 4(12), pp. 1318–1324. doi: 10.4161/cbt.4.12.2251.
- André, P. *et al.* (2018) 'Anti-NKG2A mAb Is a Checkpoint Inhibitor that Promotes Anti-tumor Immunity by Unleashing Both T and NK Cells', *Cell*, 175(7), pp. 1731-1743.e13. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.014.
- Andrea, A. D. D. (2018) 'Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance', *DNA Repair*. Elsevier, 71(August), pp. 172–176. doi: 10.1016/j.dnarep.2018.08.021.
- Andtbacka, R. H. I. *et al.* (2015) 'Talimogene laherparepvec improves durable response rate in patients with advanced melanoma', *Journal of Clinical Oncology*, 33(25), pp. 2780–2788. doi: 10.1200/JCO.2014.58.3377.
- Angelin, A. *et al.* (2017) 'Foxp3 Reprograms T Cell Metabolism to Function in Low-Glucose, High-Lactate Environments', *Cell Metabolism*, 25(6), pp. 1282-1293.e7. doi: 10.1016/j.cmet.2016.12.018.
- Apetoh, L. *et al.* (2007) 'Toll-like receptor 4–dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy', *Nature Medicine*, 13(9), pp. 1050–1059. doi: 10.1038/nm1622.
- Baitsch, L. *et al.* (2011) 'Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients', *Journal of Clinical Investigation*, 121(6), pp. 2350–2360. doi: 10.1172/JCI46102.
- Baldo, B. A. (2014) 'Side Effects of Cytokines Approved for Therapy', *Drug Safety*, 37(11), pp. 921–943. doi: 10.1007/s40264-014-0226-z.
- Bangham, A. D. and Horne, R. W. (1964) 'Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope', *Journal of Molecular Biology*. Academic Press Inc. (London) Ltd., 8(5), pp. 660-IN10. doi: 10.1016/S0022-2836(64)80115-7.
- Bankhead, P. *et al.* (2017) 'QuPath: Open source software for digital pathology image analysis', *Scientific Reports*, 7(1), p. 16878. doi: 10.1038/s41598-017-17204-5.
- Barnes, T. A. and Amir, E. (2017) 'HYPE or HOPE: the prognostic value of infiltrating immune cells in cancer', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 117(4), pp. 451–460. doi: 10.1038/bjc.2017.220.
- Barth, P. J. *et al.* (2002) 'CD34+ fibrocytes in neoplastic and inflammatory pancreatic lesions', *Virchows Archiv*, 440(2), pp. 128–133. doi: 10.1007/s00428-001-0551-3.
- Baskar, R. *et al.* (2014) 'Biological response of cancer cells to radiation treatment', *Frontiers in Molecular Biosciences*, 1(NOV), pp. 1–9. doi: 10.3389/fmolb.2014.00024.
- Beauford, S. S., Kumari, A. and Garnett-Benson, C. (2020) 'Ionizing radiation modulates the phenotype and function of human CD4+ induced regulatory T cells', *BMC immunology*. BMC Immunology, 21(1), p. 18. doi: 10.1186/s12865-020-00349-w.
- Becker, D. V. and Sawin, C. T. (1996) 'Radioiodine and thyroid disease: The beginning', *Seminars in Nuclear Medicine*, 26(3), pp. 155–164. doi: 10.1016/S0001-2998(96)80020-1.

- Behling, K., Maguire, W. F., Di Galleonardo, V., *et al.* (2016) 'Remodeling the vascular microenvironment of glioblastoma with  $\alpha$ -particles', *Journal of Nuclear Medicine*, 57(11), pp. 1771–1777. doi: 10.2967/jnumed.116.173559.
- Behling, K., Maguire, W. F., Lopez Puebla, J. C., *et al.* (2016) 'Vascular Targeted Radioimmunotherapy for the Treatment of Glioblastoma', *Journal of Nuclear Medicine*, 57(10), pp. 1576–1582. doi: 10.2967/jnumed.115.171371.
- Besser, M. J. *et al.* (2010) 'Clinical Responses in a Phase II Study Using Adoptive Transfer of Short-term Cultured Tumor Infiltration Lymphocytes in Metastatic Melanoma Patients', *Clinical Cancer Research*, 16(9), pp. 2646–2655. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0041.
- Bethge, W. A. *et al.* (2003) 'Selective T-cell ablation with bismuth-213–labeled anti-TCR $\alpha\beta$  as nonmyeloablative conditioning for allogeneic canine marrow transplantation', *Blood*, 101(12), pp. 5068–5075. doi: 10.1182/blood-2002-12-3867.
- Bethge, W. A. *et al.* (2004) 'Radioimmunotherapy with Bismuth-213 as Conditioning for Nonmyeloablative Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Dogs: A Dose Deescalation Study', *Transplantation*, 78(3), pp. 352–359. doi: 10.1097/01.TP.0000128853.62545.B2.
- Bhat, P. *et al.* (2014) 'The Kinematics of Cytotoxic Lymphocytes Influence Their Ability to Kill Target Cells', *PLoS ONE*. Edited by R. Arens, 9(5), p. e95248. doi: 10.1371/journal.pone.0095248.
- Bicak, M. *et al.* (2020) 'Genetic signature of prostate cancer mouse models resistant to optimized hK2 targeted  $\alpha$ -particle therapy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(26), pp. 15172–15181. doi: 10.1073/pnas.1918744117.
- Billiard, F. *et al.* (2011) 'Abdominal  $\gamma$ -Radiation Induces an Accumulation of Function-Impaired Regulatory T Cells in the Small Intestine', *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 80(3), pp. 869–876. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.12.041.
- Binder, M. *et al.* (2014) 'On the Antiquity of Cancer: Evidence for Metastatic Carcinoma in a Young Man from Ancient Nubia (c. 1200BC)', *PLoS ONE*. Edited by M. D. Petraglia, 9(3), p. e90924. doi: 10.1371/journal.pone.0090924.
- Binnemars-Postma, K. *et al.* (2018) 'Targeting the Stat6 pathway in tumor-associated macrophages reduces tumor growth and metastatic niche formation in breast cancer', *The FASEB Journal*, 32(2), pp. 969–978. doi: 10.1096/fj.201700629R.
- Bol, K. F. *et al.* (2016) 'Dendritic cell-based immunotherapy: State of the art and beyond', *Clinical Cancer Research*, 22(8), pp. 1897–1906. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1399.
- Bono, M. R. *et al.* (2015) 'CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression', *FEBS Letters*, 589(22), pp. 3454–3460. doi: 10.1016/j.febslet.2015.07.027.
- Borriello, L. *et al.* (2020) 'The role of the tumor microenvironment in tumor cell intravasation and dissemination', *European Journal of Cell Biology*, 99(6), p. 151098. doi: 10.1016/j.ejcb.2020.151098.
- Brand, A. *et al.* (2016) 'LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells', *Cell Metabolism*, 24(5), pp. 657–671. doi: 10.1016/j.cmet.2016.08.011.
- Braun, D. A. *et al.* (2021) 'Beyond conventional immune-checkpoint inhibition — novel immunotherapies for renal cell carcinoma', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer US. doi: 10.1038/s41571-020-00455-z.
- Brudno, J. N. *et al.* (2018) 'T cells genetically modified to express an anti-B-Cell maturation antigen chimeric antigen receptor cause remissions of poor-prognosis relapsed multiple myeloma', *Journal of Clinical Oncology*, 36(22), pp. 2267–2280. doi: 10.1200/JCO.2018.77.8084.

- Brudno, Y. *et al.* (2015) 'In Vivo Targeting through Click Chemistry', *ChemMedChem*, 10(4), pp. 617–620. doi: 10.1002/cmdc.201402527.
- Brunner-Weinzierl, M. C. and Rudd, C. E. (2018) 'CTLA-4 and PD-1 control of T-cell motility and migration: Implications for tumor immunotherapy', *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2018.02737.
- Bruno, A. *et al.* (2013) 'The proangiogenic phenotype of natural killer cells in patients with non-small cell lung cancer', *Neoplasia (United States)*, 15(2), pp. 133–142. doi: 10.1593/neo.121758.
- Buckanovich, R. J. *et al.* (2008) 'Endothelin B receptor mediates the endothelial barrier to T cell homing to tumors and disables immune therapy', *Nature Medicine*, 14(1), pp. 28–36. doi: 10.1038/nm1699.
- Callahan, M. K., Wolchok, J. D. and Allison, J. P. (2010) 'Anti-CTLA-4 Antibody Therapy: Immune Monitoring During Clinical Development of a Novel Immunotherapy', *Seminars in Oncology*, 37(5), pp. 473–484. doi: 10.1053/j.seminoncol.2010.09.001.
- Cao, M. *et al.* (2009) 'Gamma irradiation alters the phenotype and function of CD4+CD25+ regulatory T cells', *Cell Biology International*, 33(5), pp. 565–571. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.02.007.
- Capitao, M. *et al.* (2021) 'Anti-tumor efficacy of pd-l1 targeted alpha-particle therapy in a human melanoma xenograft model', *Cancers*, 13(6), pp. 1–16. doi: 10.3390/cancers13061256.
- Catros, V. (2019) 'Les CAR-T cells , des cellules tueuses spécifiques d'antigènes tumoraux', *médecine/sciences*, 35(4), pp. 316–326. doi: 10.1051/medsci/2019067.
- Chang, C. I., Liao, J. C. and Kuo, L. (2001) 'Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity.', *Cancer research*, 61(3), pp. 1100–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11221839>.
- Chatal, J. F. *et al.* (2006) 'Survival improvement in patients with medullary thyroid carcinoma who undergo pretargeted anti-carcinoembryonic-antigen radioimmunotherapy: A collaborative study with the French endocrine tumor group', *Journal of Clinical Oncology*, 24(11), pp. 1705–1711. doi: 10.1200/JCO.2005.04.4917.
- Chatzopoulos, K. *et al.* (2019) 'Tumor Infiltrating Lymphocytes and CD8+ T Cell Subsets as Prognostic Markers in Patients with Surgically Treated Laryngeal Squamous Cell Carcinoma', *Head and Neck Pathology*. Springer US, (0123456789). doi: 10.1007/s12105-019-01101-6.
- Chauhan, H. *et al.* (2003) 'There is more than one kind of myofibroblast: Analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions', *Journal of Clinical Pathology*, 56(4), pp. 271–276. doi: 10.1136/jcp.56.4.271.
- Chen, A. *et al.* (2007) 'Depleting intratumoral CD4+CD25+ regulatory T cells via FasL protein transfer enhances the therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer', *Cancer Research*, 67(3), pp. 1291–1298. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-2622.
- Chen, D. S. and Mellman, I. (2017) 'Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point', *Nature*, 541(7637), pp. 321–330. doi: 10.1038/nature21349.
- Chen, Y. *et al.* (2012) 'Durable donor engraftment after radioimmunotherapy using  $\alpha$ -emitter astatine-211-labeled anti-CD45 antibody for conditioning in allogeneic hematopoietic cell transplantation', *Blood*, 119(5), pp. 1130–1138. doi: 10.1182/blood-2011-09-380436.
- Chérel, M. *et al.* (2013) '213Bi Radioimmunotherapy with an Anti-mCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma', *The Journal of Nuclear Medicine*, 54(9), pp. 1597–1604. doi: <https://doi.org/10.2967/jnumed.112.111997>.

- Chow, M. T. and Luster, A. D. (2014) 'Chemokines in Cancer', *Cancer Immunology Research*, 2(12), pp. 1125–1131. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0160.
- Comito, G. *et al.* (2019) 'Lactate modulates CD4+ T-cell polarization and induces an immunosuppressive environment, which sustains prostate carcinoma progression via TLR8/miR21 axis', *Oncogene*. Springer US, 38(19), pp. 3681–3695. doi: 10.1038/s41388-019-0688-7.
- Condeelis, J. and Pollard, J. W. (2006) 'Macrophages: Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis', *Cell*, 124(2), pp. 263–266. doi: 10.1016/j.cell.2006.01.007.
- Corthay, A. (2014) 'Does the immune system naturally protect against cancer?', *Frontiers in Immunology*, 5(MAY), pp. 1–8. doi: 10.3389/fimmu.2014.00197.
- Cossarizza, A. *et al.* (2019) 'Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition)', *European Journal of Immunology*, In press, pp. 1–528. doi: 10.1016/j.optmat.2011.11.002.
- Dariane, C. *et al.* (2017) 'Tim-3 Expression on Tumor-Infiltrating PD-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T Cells Correlates with Poor Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma', (12). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0274.
- Darvin, P. *et al.* (2018) 'Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers', *Experimental & Molecular Medicine*. Springer US, 50(12), pp. 1–11. doi: 10.1038/s12276-018-0191-1.
- Deaglio, S. *et al.* (2007) 'Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression', *Journal of Experimental Medicine*, 204(6), pp. 1257–1265. doi: 10.1084/jem.20062512.
- Dehghani, M. *et al.* (2020) 'Aberrant peripheral blood CD4+ CD25+ FOXP3+ regulatory T cells/T helper-17 number is associated with the outcome of patients with lymphoma', *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer Berlin Heidelberg, (0123456789). doi: 10.1007/s00262-020-02591-y.
- Dekempeneer, Y. *et al.* (2020) 'Therapeutic Efficacy of 213Bi-labeled sdAbs in a Preclinical Model of Ovarian Cancer', *Molecular Pharmaceutics*, 17(9), pp. 3553–3566. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.0c00580.
- DeVita, V. T. and Chu, E. (2008) 'A history of cancer chemotherapy', *Cancer Research*, 68(21), pp. 8643–8653. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6611.
- Dong, S. *et al.* (2020) 'Oxidative stress: A critical hint in ionizing radiation induced pyroptosis', *Radiation Medicine and Protection*. Elsevier Ltd, (June). doi: 10.1016/j.radmp.2020.10.001.
- Dunn, G. P., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2004) 'The Three Es of Cancer Immunoediting', *Annual Review of Immunology*, 22(1), pp. 329–360. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104803.
- Escorcia, F. E. *et al.* (2010) 'Selective Killing of Tumor Neovasculature Paradoxically Improves Chemotherapy Delivery to Tumors', *Cancer Research*, 70(22), pp. 9277–9286. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2029.
- Evans, E. E. *et al.* (2015) 'Antibody blockade of Semaphorin 4D promotes immune infiltration into tumor and enhances response to other immunomodulatory therapies', *Cancer Immunology Research*, 3(6), pp. 698–701. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0171.
- Faguet, G. B. (2015) 'A brief history of cancer: Age-old milestones underlying our current knowledge database', *International Journal of Cancer*, 136(9), pp. 2022–2036. doi: 10.1002/ijc.29134.
- Falzone, L., Salomone, S. and Libra, M. (2018) 'Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium', *Frontiers in Pharmacology*, 9(NOV). doi: 10.3389/fphar.2018.01300.

- Fan, J. *et al.* (2018) 'Adoptive Cell Transfer: Is it a Promising Immunotherapy for Colorectal Cancer?', *Theranostics*, 8(20), pp. 5784–5800. doi: 10.7150/thno.29035.
- Fang, F., Xiao, W. and Tian, Z. (2017) 'NK cell-based immunotherapy for cancer', *Seminars in Immunology*. Elsevier, 31(June), pp. 37–54. doi: 10.1016/j.smim.2017.07.009.
- Farber, S. *et al.* (1948) 'Temporary Remissions in Acute Leukemia in Children Produced by Folic Acid Antagonist, 4-Aminopteroyl-Glutamic Acid (Aminopterin)', *New England Journal of Medicine*, 238(23), pp. 787–793. doi: 10.1056/NEJM194806032382301.
- Feng, K. *et al.* (2016) 'Chimeric antigen receptor-modified T cells for the immunotherapy of patients with EGFR-expressing advanced relapsed/refractory non-small cell lung cancer', *Science China Life Sciences*, 59(5), pp. 468–479. doi: 10.1007/s11427-016-5023-8.
- Feng, Y. *et al.* (2018) 'Lactate dehydrogenase A: A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy', *Cancer Medicine*, 7(12), pp. 6124–6136. doi: 10.1002/cam4.1820.
- Fessler, J., Matson, V. and Gajewski, T. F. (2019) 'Exploring the emerging role of the microbiome in cancer immunotherapy', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*. Journal for ImmunoTherapy of Cancer, 7(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s40425-019-0574-4.
- Fichou, N. *et al.* (2015) 'Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model', *Frontiers in Medicine*, 2(NOV). doi: 10.3389/fmed.2015.00076.
- Filley, A. C., Henriquez, M. and Dey, M. (2018) 'CART Immunotherapy: Development, Success, and Translation to Malignant Gliomas and Other Solid Tumors', *Frontiers in Oncology*, 8, p. 453. doi: 10.3389/fonc.2018.00453.
- Fischer, K. *et al.* (2007) 'Inhibitory effect of tumor cell-derived lactic acid on human T cells', *Blood*, 109(9), pp. 3812–3819. doi: 10.1182/blood-2006-07-035972.
- Fridman, W. H. *et al.* (2012) 'The immune contexture in human tumours: Impact on clinical outcome', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 12(4), pp. 298–306. doi: 10.1038/nrc3245.
- Friesen, C. *et al.* (2007) 'Breaking chemoresistance and radioresistance with [213Bi]anti-CD45 antibodies in leukemia cells', *Cancer Research*, 67(5), pp. 1950–1958. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3569.
- Friesen, C. *et al.* (2013) 'Anti-CD33-antibodies labelled with the alpha-emitter Bismuth-213 kill CD33-positive acute myeloid leukaemia cells specifically by activation of caspases and break radio- and chemoresistance by inhibition of the anti-apoptotic proteins X-linked inhibitor of apoptosis', *European Journal of Cancer*. Elsevier Ltd, 49(11), pp. 2542–2554. doi: 10.1016/j.ejca.2013.04.008.
- Fuchs, E. (1882) *Das Sarcom des Uvealtractus*. Edited by B. Wien.
- Fuertes Marraco, S. A. *et al.* (2015) 'Inhibitory receptors beyond T cell exhaustion', *Frontiers in Immunology*, 6(JUN), pp. 1–14. doi: 10.3389/fimmu.2015.00310.
- Gabizon, A. *et al.* (2018) 'In Vivo PET Tracking of 89Zr-Labeled V $\alpha$ 9V $\delta$ 2 T Cells to Mouse Xenograft Breast Tumors Activated with Liposomal Alendronate', *Molecular Therapy*, 27(1), pp. 219–229. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.10.006.
- Galmarini, D., Galmarini, C. M. and Galmarini, F. C. (2012) 'Cancer chemotherapy: A critical analysis of its 60 years of history', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. Elsevier Ireland Ltd, 84(2), pp. 181–199. doi: 10.1016/j.critrevonc.2012.03.002.
- Garcia-Diaz, A. *et al.* (2017) 'Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression', *Cell*, 19(6), pp. 549–562. doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.031.

- Garg, A. D. *et al.* (2014) 'Danger signalling during cancer cell death: origins, plasticity and regulation', *Cell Death & Differentiation*. Nature Publishing Group, 21(1), pp. 26–38. doi: 10.1038/cdd.2013.48.
- Garrido, F. and Aptsiauri, N. (2019) 'Cancer immune escape: MHC expression in primary tumours versus metastases', *Immunology*, 158(4), pp. 255–266. doi: 10.1111/imm.13114.
- Gaylin, D. S. and Kates, J. (1997) 'Refocusing the lens: Epidemiologic transition theory, mortality differentials, and the AIDS pandemic', *Social Science & Medicine*, 44(5), pp. 609–621. doi: 10.1016/S0277-9536(96)00212-2.
- Ghiringhelli, F. *et al.* (2005) 'Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF- $\beta$ -secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation', *Journal of Experimental Medicine*, 202(7), pp. 919–929. doi: 10.1084/jem.20050463.
- Gianfaldoni, S. *et al.* (2017) 'An Overview on Radiotherapy: From Its History to Its Current Applications in Dermatology', *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 5(4), pp. 521–525. doi: 10.3889/oamjms.2017.122.
- Goff, S. L. *et al.* (2016) 'Randomized, prospective evaluation comparing intensity of lymphodepletion before adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes for patients with metastatic melanoma', *Journal of Clinical Oncology*, 34(20), pp. 2389–2397. doi: 10.1200/JCO.2016.66.7220.
- Gokuldass, A. *et al.* (2020) 'Qualitative analysis of tumor-infiltrating lymphocytes across human tumor types reveals a higher proportion of bystander CD8+ T cells in non-melanoma cancers compared to melanoma', *Cancers*, 12(11), pp. 1–15. doi: 10.3390/cancers12113344.
- Goldsmith, S. J. (2020) 'Targeted Radionuclide Therapy: A Historical and Personal Review', *Seminars in Nuclear Medicine*. Elsevier Inc., 50(1), pp. 87–97. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2019.07.006.
- Gorin, J.-B. *et al.* (2014) 'Antitumor Immunity Induced after  $\alpha$  Irradiation', *Neoplasia*. Neoplasia Press, Inc., 16(4), pp. 319–328. doi: 10.1016/j.neo.2014.04.002.
- Gorin, J.-B. *et al.* (2015) 'Alpha Particles Induce Autophagy in Multiple Myeloma Cells', *Frontiers in Medicine*, 2(October), pp. 1–11. doi: 10.3389/fmed.2015.00074.
- Gouard, S. *et al.* (2020) 'Targeted-alpha-therapy combining astatine-211 and anti-cd138 antibody in a preclinical syngeneic mouse model of multiple myeloma minimal residual disease', *Cancers*, 12(9), pp. 1–18. doi: 10.3390/cancers12092721.
- Graf, F. *et al.* (2014) 'DNA double strand breaks as predictor of efficacy of the alpha-particle emitter Ac-225 and the electron emitter Lu-177 for somatostatin receptor targeted radiotherapy', *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0088239.
- Green, D. R. *et al.* (2009) 'Immunogenic and tolerogenic cell death', *Nature Reviews Immunology*, 9(5), pp. 353–363. doi: 10.1038/nri2545.
- Gregory, C. D. and Pound, J. D. (2011) 'Cell death in the neighbourhood: direct microenvironmental effects of apoptosis in normal and neoplastic tissues', *The Journal of Pathology*, 223(2), pp. 178–195. doi: 10.1002/path.2792.
- Griffith, T. S. *et al.* (2007) 'Apoptotic Cells Induce Tolerance by Generating Helpless CD8 + T Cells That Produce TRAIL', *The Journal of Immunology*, 178(5), pp. 2679–2687. doi: 10.4049/jimmunol.178.5.2679.
- Gros, A. *et al.* (2014) 'PD-1 identifies the patient-specific CD8+ tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors', *Journal of Clinical Investigation*, 124(5), pp. 2246–2259. doi: 10.1172/JCI73639.
- Gudkov, S. V. *et al.* (2015) 'Targeted radionuclide therapy of human tumors', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1), pp. 1–19. doi: 10.3390/ijms17010033.

- Gupta, A. *et al.* (2012) 'Radiotherapy Promotes Tumor-Specific Effector CD8 + T Cells via Dendritic Cell Activation', *The Journal of Immunology*, 189(2), pp. 558–566. doi: 10.4049/jimmunol.1200563.
- Hartlapp, I. *et al.* (2001) 'Fibrocytes induce an angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and promote angiogenesis in vivo', *The FASEB Journal*, 15(12), pp. 2215–2224. doi: 10.1096/fj.01-0049com.
- Heim, K. *et al.* (2020) 'TOX defines the degree of CD8+ T cell dysfunction in distinct phases of chronic HBV infection', *Gut*, pp. 1–11. doi: 10.1136/gutjnl-2020-322404.
- Heine, A., Juranek, S. and Brossart, P. (2021) 'Clinical and immunological effects of mRNA vaccines in malignant diseases', *Molecular Cancer*. *Molecular Cancer*, 20(1), pp. 1–20. doi: 10.1186/s12943-021-01339-1.
- Henze, A. and Mazzone, M. (2016) 'The impact of hypoxia on tumor-associated macrophages', *Journal of Clinical Investigation*, 126(10), pp. 3672–3679. doi: 10.1172/JCI84427.
- Hida, K. *et al.* (2016) 'Tumor angiogenesis—characteristics of tumor endothelial cells', *International Journal of Clinical Oncology*. Springer Japan, 21(2), pp. 206–212. doi: 10.1007/s10147-016-0957-1.
- Hida, K. and Maishi, N. (2018) 'Abnormalities of tumor endothelial cells and cancer progression', *Oral Science International*. Japanese Stomatological Society, 15(1), pp. 1–6. doi: 10.1016/S1348-8643(17)30041-1.
- Hirayama, A. V. *et al.* (2019) 'High rate of durable complete remission in follicular lymphoma after CD19 CAR-T cell immunotherapy', *Blood*, 134(7), pp. 636–640. doi: 10.1182/blood.2019000905.
- Hofman, M. S. *et al.* (2018) '[ <sup>177</sup> Lu]-PSMA-617 radionuclide treatment in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer (LuPSMA trial): a single-centre, single-arm, phase 2 study', *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 19(6), pp. 825–833. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30198-0.
- Huber, R. *et al.* (2016) 'Tumour hypoxia promotes melanoma growth and metastasis via High Mobility Group Box-1 and M2-like macrophages', *Scientific Reports*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 29914. doi: 10.1038/srep29914.
- Hui, L. and Chen, Y. (2015) 'Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 368(1), pp. 7–13. doi: 10.1016/j.canlet.2015.07.039.
- Im, S. J. and Ha, S. J. (2020) 'Re-defining t-cell exhaustion: Subset, function, and regulation', *Immune Network*, 20(1), pp. 1–19. doi: 10.4110/in.2020.20.e2.
- Imtiyaz, H. Z. *et al.* (2010) 'Hypoxia-inducible factor 2 $\alpha$  regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation', *Journal of Clinical Investigation*, 120(8), pp. 2699–2714. doi: 10.1172/JCI39506.
- Inoue, H. and Tani, K. (2014) 'Multimodal immunogenic cancer cell death as a consequence of anticancer cytotoxic treatments', *Cell Death and Differentiation*. Nature Publishing Group, 21(1), pp. 39–49. doi: 10.1038/cdd.2013.84.
- Ishida, Y. *et al.* (1992) 'Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death', *EMBO Journal*, 11(11), pp. 3887–3895. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
- Janssen, E. M. *et al.* (2005) 'CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death', *Nature*, 434(7029), pp. 88–93. doi: 10.1038/nature03337.
- Jarnicki, A. G. *et al.* (2006) 'Suppression of Antitumor Immunity by IL-10 and TGF- $\beta$ -Producing T Cells Infiltrating the Growing Tumor: Influence of Tumor Environment on the Induction of CD4 + and CD8 + Regulatory T Cells', *The Journal of Immunology*, 177(2), pp. 896–904. doi: 10.4049/jimmunol.177.2.896.

- Johnson, W. C. (1948) 'The university of Chicago', *Journal of Chemical Education*, pp. 318–321. doi: 10.1126/science.26.678.918.
- Jones, W. and Bianchi, K. (2015) 'Aerobic Glycolysis: Beyond Proliferation', *Frontiers in Immunology*, 6(MAY), pp. 1–5. doi: 10.3389/fimmu.2015.00227.
- Jurcic, J. G. *et al.* (2002) 'Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia.', *Blood*, 100(4), pp. 1233–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149203>.
- Kachikwu, E. L. *et al.* (2011) 'Radiation Enhances Regulatory T Cell Representation', *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics\*Physics*, 81(4), pp. 1128–1135. doi: 10.1016/j.ijrobp.2010.09.034.
- Kalantari Khandani, N., Ghahremanloo, A. and Hashemy, S. I. (2020) 'Role of tumor microenvironment in the regulation of PD-L1: A novel role in resistance to cancer immunotherapy', *Journal of Cellular Physiology*, 235(10), pp. 6496–6506. doi: 10.1002/jcp.29671.
- Kalia, V. *et al.* (2010) 'Prolonged Interleukin-2R $\alpha$  Expression on Virus-Specific CD8+ T Cells Favors Terminal-Effector Differentiation In Vivo', *Immunity*. Elsevier Inc., 32(1), pp. 91–103. doi: 10.1016/j.immuni.2009.11.010.
- Kang, S.-W. *et al.* (2014) 'Cell Labeling and Tracking Method without Distorted Signals by Phagocytosis of Macrophages', *Theranostics*, 4(4), pp. 420–431. doi: 10.7150/thno.7265.
- Karagiannis, T. C. (2007) 'Comparison of different classes of radionuclides for potential use in radioimmunotherapy', *Hellenic Journal of Nuclear Medicine*, 10(2), pp. 82–88.
- Karlsson, M. *et al.* (2010) 'Pilot study of sentinel-node-based adoptive immunotherapy in advanced colorectal cancer', *Annals of Surgical Oncology*, 17(7), pp. 1747–1757. doi: 10.1245/s10434-010-0920-8.
- Kawamura, K., Qi, F. and Kobayashi, J. (2018) 'Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production', *Journal of Radiation Research*, 59(suppl\_2), pp. ii91–ii97. doi: 10.1093/jrr/rrx091.
- Kazama, H. *et al.* (2008) 'Induction of Immunological Tolerance by Apoptotic Cells Requires Caspase-Dependent Oxidation of High-Mobility Group Box-1 Protein', *Immunity*, 29(1), pp. 21–32. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.013.
- Kenter, G. G. *et al.* (2009) 'Vaccination against HPV-16 Oncoproteins for Vulvar Intraepithelial Neoplasia', *New England Journal of Medicine*, 361(19), pp. 1838–1847. doi: 10.1056/nejmoa0810097.
- Kesavan, M. *et al.* (2018) 'Salvage Radiopeptide Therapy of Advanced Castrate-Resistant Prostate Cancer with Lutetium-177-Labeled Prostate-Specific Membrane Antigen: Efficacy and Safety in Routine Practice', *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 33(7), pp. 274–281. doi: 10.1089/cbr.2017.2403.
- Khammari, A. *et al.* (2015) 'Adoptive T cell therapy combined with intralesional administrations of TG1042 (adenovirus expressing interferon- $\gamma$ ) in metastatic melanoma patients', *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer Berlin Heidelberg, 64(7), pp. 805–815. doi: 10.1007/s00262-015-1691-7.
- Khan, O. *et al.* (2019) 'TOX transcriptionally and epigenetically programs CD8+ T cell exhaustion', *Nature*. Springer US, 571(7764), pp. 211–218. doi: 10.1038/s41586-019-1325-x.
- Kim, K. *et al.* (2020) 'Single-cell transcriptome analysis reveals TOX as a promoting factor for T cell exhaustion and a predictor for anti-PD-1 responses in human cancer', *Genome Medicine*. Genome Medicine, 12(1), p. 22. doi: 10.1186/s13073-020-00722-9.
- Kim, W. *et al.* (2021) 'In vivo tracking of bioorthogonally labeled T-cells for predicting therapeutic efficacy of adoptive T-cell therapy', *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 329(August 2020), pp. 223–236. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.12.002.

- Klebanoff, C. A. *et al.* (2011) 'Determinants of Successful CD8 + T-Cell Adoptive Immunotherapy for Large Established Tumors in Mice', *Clinical Cancer Research*, 17(16), pp. 5343–5352. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0503.
- Kobayashi, N. *et al.* (2010) 'Hyaluronan Deficiency in Tumor Stroma Impairs Macrophage Trafficking and Tumor Neovascularization', *Cancer Research*, 70(18), pp. 7073–7083. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-4687.
- Kochenderfer, J. N. *et al.* (2015) 'Chemotherapy-refractory diffuse large B-cell lymphoma and indolent B-cell malignancies can be effectively treated with autologous T cells expressing an anti-CD19 chimeric antigen receptor', *Journal of Clinical Oncology*, 33(6), pp. 540–549. doi: 10.1200/JCO.2014.56.2025.
- Koo, H. *et al.* (2012) 'Bioorthogonal Copper-Free Click Chemistry In Vivo for Tumor-Targeted Delivery of Nanoparticles', *Angewandte Chemie International Edition*, 51(47), pp. 11836–11840. doi: 10.1002/anie.201206703.
- Koyama, S. *et al.* (2016) 'STK11/LKB1 Deficiency Promotes Neutrophil Recruitment and Proinflammatory Cytokine Production to Suppress T-cell Activity in the Lung Tumor Microenvironment', *Cancer Research*, 76(5), pp. 999–1008. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1439.
- Kraeber-Bodéré, F. *et al.* (2014) 'Radioimmunoconjugates for the Treatment of Cancer', *Seminars in Oncology*. Elsevier, 41(5), pp. 613–622. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.07.004.
- Kratochwil, C. *et al.* (2014) '<sup>213</sup>Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41(11), pp. 2106–2119. doi: 10.1007/s00259-014-2857-9.
- Kratochwil, C. *et al.* (2017) 'Targeted  $\alpha$ -Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer with <sup>225</sup>Ac-PSMA-617: Dosimetry Estimate and Empiric Dose Finding', *Journal of Nuclear Medicine*, 58(10), pp. 1624–1631. doi: 10.2967/jnumed.117.191395.
- Kristensen, L. K. *et al.* (2020) 'Monitoring CD8a+ T Cell Responses to Radiotherapy and CTLA-4 Blockade Using [64Cu]NOTA-CD8a PET Imaging', *Molecular Imaging and Biology*. doi: 10.1007/s11307-020-01481-0.
- Kroemer, G. *et al.* (2013) 'Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy', *Annual Review of Immunology*, 31(1), pp. 51–72. doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-100008.
- Krumbhaar, E. B. and Krumbhaar, H. D. (1987) 'The blood and bone marrow in yellow cross gas (Mustard gas) poisoning. Changes produced in the bone marrow of fatal cases', *Cancer Journal*, 1(7), pp. 331–334.
- Krummel, M. F., Bartumeus, F. and Gérard, A. (2016) 'T cell migration, search strategies and mechanisms', *Nature Reviews Immunology*, 16(3), pp. 193–201. doi: 10.1038/nri.2015.16.
- Kułakowski, A. (2011) 'The contribution of Marie Skłodowska-Curie to the development of modern oncology', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 400(6), pp. 1583–1586. doi: 10.1007/s00216-011-4712-1.
- Labernadie, A. *et al.* (2017) 'A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion', *Nature Cell Biology*, 19(3), pp. 224–237. doi: 10.1038/ncb3478.
- Laoui, D. *et al.* (2014) 'Tumor Hypoxia Does Not Drive Differentiation of Tumor-Associated Macrophages but Rather Fine-Tunes the M2-like Macrophage Population', *Cancer Research*, 74(1), pp. 24–30. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1196.
- Lawrence, C. W. and Braciale, T. J. (2004) 'Activation, Differentiation, and Migration of Naive Virus-Specific CD8 + T Cells during Pulmonary Influenza Virus Infection', *The Journal of Immunology*, 173(2), pp.

1209–1218. doi: 10.4049/jimmunol.173.2.1209.

Lechermann, L. M. *et al.* (2020) 'Detection limit of <sup>89</sup>Zr-labeled T cells for cellular tracking: an in vitro imaging approach using clinical PET/CT and PET/MRI', *EJNMMI Research*. *EJNMMI Research*, 10(1). doi: 10.1186/s13550-020-00667-5.

Lee, J. S. *et al.* (2018) 'Prognostic role of tumor-infiltrating lymphocytes in gastric cancer', *Medicine*, 97(32), p. e11769. doi: 10.1097/md.00000000000011769.

Lee, S. *et al.* (2014) 'Cell Labeling and Tracking Method without Distorted Signals by Phagocytosis of Macrophages', *Theranostics*, 4(4), pp. 420–431. doi: 10.7150/thno.7265.

Lee, S. Y. *et al.* (2016) 'Non-invasive stem cell tracking in hindlimb ischemia animal model using bio-orthogonal copper-free click chemistry.', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 479(4), pp. 779–786.

Lee, Sangmin *et al.* (2017) 'In vivo stem cell tracking with imageable nanoparticles that bind bioorthogonal chemical receptors on the stem cell surface.', *Biomaterials*, 139, pp. 12–29.

Legat, A. *et al.* (2013) 'Inhibitory receptor expression depends more dominantly on differentiation and activation than "exhaustion" of human CD8 T cells', *Frontiers in Immunology*, 4(DEC), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2013.00455.

Li, H. K. *et al.* (2017) 'Locoregional therapy with  $\alpha$ -emitting trastuzumab against peritoneal metastasis of human epidermal growth factor receptor 2-positive gastric cancer in mice', *Cancer Science*, 108(8), pp. 1648–1656. doi: 10.1111/cas.13282.

Lim, J. Y. H. *et al.* (2014) 'Type I interferons induced by radiation therapy mediate recruitment and effector function of CD8+ T cells', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(3), pp. 259–271. doi: 10.1007/s00262-013-1506-7.

Lim, S. *et al.* (2019) 'Dual-Modal Imaging-Guided Precise Tracking of Bioorthogonally Labeled Mesenchymal Stem Cells in Mouse Brain Stroke', *ACS Nano*, 13(10), pp. 10991–11007. doi: 10.1021/acsnano.9b02173.

Linette, G. P. and Carreno, B. M. (2019) 'Tumor-Infiltrating Lymphocytes in the Checkpoint Inhibitor Era', *Current Hematologic Malignancy Reports*. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 14(4), pp. 286–291. doi: 10.1007/s11899-019-00523-x.

Liu, S. *et al.* (2015) 'Effects of radiation on T regulatory cells in normal states and cancer: Mechanisms and clinical implications', *American Journal of Cancer Research*, 5(11), pp. 3276–3285.

Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.

Loeffler, M. *et al.* (2009) 'Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake', *Journal of Clinical Investigation*, 119(2), pp. 421–421. doi: 10.1172/JCI126532C1.

Di Lonardo, A., Nasi, S. and Pulciani, S. (2015) 'Cancer: We Should Not Forget The Past', *Journal of Cancer*, 6(1), pp. 29–39. doi: 10.7150/jca.10336.

López-Soto, A. *et al.* (2017) 'Control of Metastasis by NK Cells', *Cancer Cell*, 32(2), pp. 135–154. doi: 10.1016/j.ccell.2017.06.009.

Louis, C. U. *et al.* (2011) 'Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma', *Blood*, 118(23), pp. 6050–6056. doi: 10.1182/blood-2011-05-354449.

- Lu, R.-M. *et al.* (2020) 'Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases', *Journal of Biomedical Science*. *Journal of Biomedical Science*, 27(1), p. 1. doi: 10.1186/s12929-019-0592-z.
- Lupo, K. B. and Matosevic, S. (2019) 'Natural Killer Cells as Allogeneic Effectors in Adoptive Cancer Immunotherapy', *Cancers*, 11(6), p. 769. doi: 10.3390/cancers11060769.
- Ma, X. *et al.* (2019) 'Cholesterol Induces CD8+ T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment', *Cell Metabolism*. Elsevier Inc., 30(1), pp. 143-156.e5. doi: 10.1016/j.cmet.2019.04.002.
- Majkowska-Pilip, A. *et al.* (2018) 'In vitro evaluation of 225 Ac-DOTA-substance P for targeted alpha therapy of glioblastoma multiforme', *Chemical Biology & Drug Design*, 92(1), pp. 1344–1356. doi: 10.1111/cbdd.13199.
- Malamas, A. S. *et al.* (2016) 'Sublethal exposure to alpha radiation (223Ra dichloride) enhances various carcinomas' sensitivity to lysis by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes through calreticulin-mediated immunogenic modulation', *Oncotarget*, 7(52), pp. 86937–86947. doi: 10.18632/oncotarget.13520.
- Man, F. *et al.* (2019) 'In Vivo PET Tracking of 89Zr-Labeled V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Cells to Mouse Xenograft Breast Tumors Activated with Liposomal Alendronate', *Molecular Therapy*. Elsevier Inc., 27(1), pp. 219–229. doi: 10.1016/j.ymthe.2018.10.006.
- Manaster, Y. *et al.* (2019) 'Reduced CTL motility and activity in avascular tumor areas', *Cancer Immunology, Immunotherapy*. Springer Berlin Heidelberg, 68(8), pp. 1287–1301. doi: 10.1007/s00262-019-02361-5.
- Mantovani, A. *et al.* (2017) 'Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology', *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(7), pp. 399–416. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217.
- Marotte, L. *et al.* (2020) 'Increased antitumor efficacy of PD-1-deficient melanoma-specific human lymphocytes', *Journal for ImmunoTherapy of Cancer*, 8(1), pp. 1–15. doi: 10.1136/jitc-2019-000311.
- Marron, T. U. *et al.* (2021) 'Considerations for treatment duration in responders to immune checkpoint inhibitors', pp. 1–8. doi: 10.1136/jitc-2020-001901.
- Martino, M. *et al.* (2021) 'A review of clinical outcomes of car t-cell therapies for b-acute lymphoblastic leukemia', *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), pp. 1–18. doi: 10.3390/ijms22042150.
- Maucksch, U. *et al.* (2018) 'Radiotoxicity of alpha particles versus high and low energy electrons in hypoxic cancer cells', *Nuklearmedizin*, 57(02), pp. 56–63. doi: 10.3413/Nukmed-0950-17-12.
- Mayor, P. C. *et al.* (2018) 'Cancer in primary immunodeficiency diseases: Cancer incidence in the United States Immune Deficiency Network Registry', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(3), pp. 1028–1035. doi: 10.1016/j.jaci.2017.05.024.
- Mazzieri, R. *et al.* (2011) 'Targeting the ANG2/TIE2 Axis Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Impairing Angiogenesis and Disabling Rebounds of Proangiogenic Myeloid Cells', *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 19(4), pp. 512–526. doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.005.
- McDevitt, M. R. *et al.* (2018) 'Feed-forward alpha particle radiotherapy ablates androgen receptor-addicted prostate cancer', *Nature Communications*. Springer US, 9(1), p. 1629. doi: 10.1038/s41467-018-04107-w.
- McKeown, R. E. (2009) 'The Epidemiologic Transition: Changing Patterns of Mortality and Population Dynamics', *American Journal of Lifestyle Medicine*, 3(1\_suppl), pp. 19S-26S. doi: 10.1177/1559827609335350.
- McLean, I. W. and Nakane, P. K. (1974) 'Periodate-Lysine-paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 22(12), pp. 1077–83.

Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4374474>.

Melief, C. J. M. and van der Burg, S. H. (2008) 'Immunotherapy of established (pre)malignant disease by synthetic long peptide vaccines', *Nature Reviews Cancer*, 8(5), pp. 351–360. doi: 10.1038/nrc2373.

Ménager, J. *et al.* (2015) 'Combining  $\alpha$ -radioimmunotherapy and adoptive T cell therapy to potentiate tumor destruction', *PLoS ONE*, 10(6), pp. 1–14. doi: 10.1371/journal.pone.0130249.

Miao, L., Zhang, Y. and Huang, L. (2021) 'mRNA vaccine for cancer immunotherapy', *Molecular Cancer*. *Molecular Cancer*, 20(1), p. 41. doi: 10.1186/s12943-021-01335-5.

Michalek, R. D. and Rathmell, J. C. (2010) 'The metabolic life and times of a T-cell', *Immunological Reviews*, 236(1), pp. 190–202. doi: 10.1111/j.1600-065X.2010.00911.x.

Milenic, D. E. *et al.* (2007) 'Potentiation of High-LET Radiation by Gemcitabine: Targeting HER2 with Trastuzumab to Treat Disseminated Peritoneal Disease', *Clinical Cancer Research*, 13(6), pp. 1926–1935. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2300.

Milenic, D. E. *et al.* (2013) 'Evaluation of Platinum Chemotherapy in Combination with HER2-Targeted  $\alpha$ -Particle Radiation', *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28(6), pp. 441–449. doi: 10.1089/cbr.2012.1423.

Moreno-Sánchez, R. *et al.* (2007) 'Energy metabolism in tumor cells', *FEBS Journal*, 274(6), pp. 1393–1418. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.

Murdoch, C., Giannoudis, A. and Lewis, C. E. (2004) 'Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues', *Blood*, 104(8), pp. 2224–2234. doi: 10.1182/blood-2004-03-1109.

Murer, P. and Neri, D. (2019) 'Antibody-cytokine fusion proteins: A novel class of biopharmaceuticals for the therapy of cancer and of chronic inflammation', *New Biotechnology*, 52, pp. 42–53. doi: 10.1016/j.nbt.2019.04.002.

Nicolas-Boluda, A. and Donnadieu, E. (2019) 'Obstacles to T cell migration in the tumor microenvironment', *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. Elsevier, 63(November 2018), pp. 22–30. doi: 10.1016/j.cimid.2018.12.006.

Nolz, J. C. and Richer, M. J. (2020) 'Control of memory CD8+ T cell longevity and effector functions by IL-15', *Molecular Immunology*. Elsevier, 117(November 2019), pp. 180–188. doi: 10.1016/j.molimm.2019.11.011.

Novartis (2017) 'Novartis receives first ever FDA approval for a CAR-T cell therapy , Kymriah™ (tisagenlecleucel, CTL019), for children and young adults with B-cell ALL that is refractory or has relapsed at least twice', *Novartis Global Communications*, p. 7. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L. and Smyth, M. J. (2019) 'Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer US, 16(3), pp. 151–167. doi: 10.1038/s41571-018-0142-8.

Obeid, M. *et al.* (2007) 'Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death', *Nature Medicine*, 13(1), pp. 54–61. doi: 10.1038/nm1523.

Oh, D. Y. *et al.* (2020) 'Intratumoral CD4+ T Cells Mediate Anti-tumor Cytotoxicity in Human Bladder Cancer', *Cell*. Elsevier Inc., pp. 1–14. doi: 10.1016/j.cell.2020.05.017.

Ohshima, Y. *et al.* (2018) 'Antitumor effects of radionuclide treatment using  $\alpha$ -emitting meta-211At-astato-benzylguanidine in a PC12 pheochromocytoma model', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 45(6), pp. 999–1010.

doi: 10.1007/s00259-017-3919-6.

de Oliveira Bravo, M., Carvalho, J. L. and Saldanha-Araujo, F. (2016) 'Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression', *Purinergic Signalling*. *Purinergic Signalling*, 12(4), pp. 595–609. doi: 10.1007/s11302-016-9529-0.

Omran, A. R. (1971) 'The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change', *Milbank Quarterly*, 83(4), pp. 731–757. doi: 10.1111/j.1468-0009.2005.00398.x.

Onizuka, S. *et al.* (1999) 'Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor  $\alpha$ ) monoclonal antibody', *Cancer Research*, 59(13), pp. 3128–3133.

Orozco, J. J. *et al.* (2013) 'Anti-CD45 radioimmunotherapy using <sup>211</sup>At with bone marrow transplantation prolongs survival in a disseminated murine leukemia model', *Blood*, 121(18), pp. 3759–3767. doi: 10.1182/blood-2012-11-467035.

Osborne, M. P. (2007) 'William Stewart Halsted: his life and contributions to surgery', *Lancet Oncology*, 8(3), pp. 256–265. doi: 10.1016/S1470-2045(07)70076-1.

Paget, S. (1889) 'The distribution of secondary growths in cancer of the breast', *The Lancet*, 133(3421), pp. 571–573.

Palma, M. De, Biziato, D. and Petrova, T. V (2017) 'Microenvironmental regulation of tumour angiogenesis', *Nature Publishing Group*. *Nature Publishing Group*, 17(8), pp. 457–474. doi: 10.1038/nrc.2017.51.

Palucka, K. and Banchereau, J. (2013) 'Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines', *Immunity*, 39(1), pp. 38–48. doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.004.

Pardoll, D. M. (2012) 'The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 12(4), pp. 252–264. doi: 10.1038/nrc3239.

Peng, W. *et al.* (2016) 'Loss of PTEN Promotes Resistance to T Cell-Mediated Immunotherapy', *Cancer Discovery*, 6(2), pp. 202–216. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-0283.

Peranzoni, E. *et al.* (2018) 'Macrophages impede CD8 T cells from reaching tumor cells and limit the efficacy of anti-PD-1 treatment', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17), pp. E4041–E4050. doi: 10.1073/pnas.1720948115.

Perrin, J. *et al.* (2020) 'Cell Tracking in Cancer Immunotherapy', *Frontiers in Medicine*, 7(February), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmed.2020.00034.

Perrot, I. *et al.* (2019) 'Blocking Antibodies Targeting the CD39/CD73 Immunosuppressive Pathway Unleash Immune Responses in Combination Cancer Therapies', *Cell Reports*, 27(8), pp. 2411-2425.e9. doi: 10.1016/j.celrep.2019.04.091.

Petrich, T. *et al.* (2006) 'Effective cancer therapy with the  $\alpha$ -particle emitter [<sup>211</sup>At]astatine in a mouse model of genetically modified sodium/iodide symporter-expressing tumors', *Clinical Cancer Research*, 12(4), pp. 1342–1348. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1576.

Pinto, M. L. *et al.* (2017) 'Decellularized human colorectal cancer matrices polarize macrophages towards an anti-inflammatory phenotype promoting cancer cell invasion via CCL18', *Biomaterials*, 124, pp. 211–224. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.02.004.

Pitt, J. M., Kroemer, G. and Zitvogel, L. (2017) 'Immunogenic and non-immunogenic cell death in the tumor microenvironment', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1036, pp. 65–79. doi: 10.1007/978-3-319-67577-0\_5.

- Porter, D. L. *et al.* (2015) 'Chimeric antigen receptor T cells persist and induce sustained remissions in relapsed refractory chronic lymphocytic leukemia', *Science Translational Medicine*, 7(303), pp. 303ra139-303ra139. doi: 10.1126/scitranslmed.aac5415.
- Poschke, I. *et al.* (2014) 'A phase I clinical trial combining dendritic cell vaccination with adoptive T cell transfer in patients with stage IV melanoma', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 63(10), pp. 1061–1071. doi: 10.1007/s00262-014-1575-2.
- Prehn, R. T. and Main, J. M. (1957) 'Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas.', *Journal of the National Cancer Institute*, 18(6), pp. 769–78. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13502695>.
- Raja, C. *et al.* (2007) 'Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha therapy for metastatic melanoma', *Cancer Biology and Therapy*, 6(6), pp. 846–852. doi: 10.4161/cbt.6.6.4089.
- Raje, N. *et al.* (2019) 'Anti-BCMA CAR T-cell therapy bb2121 in relapsed or refractory multiple myeloma', *New England Journal of Medicine*, 380(18), pp. 1726–1737. doi: 10.1056/NEJMoa1817226.
- Ramos, C. A. *et al.* (2016) 'Clinical responses with T lymphocytes targeting malignancy-associated  $\kappa$  light chains', *Journal of Clinical Investigation*, 126(7), pp. 2588–2596. doi: 10.1172/JCI86000.
- Reap, E. A. *et al.* (2018) 'Dendritic Cells Enhance Polyfunctionality of Adoptively Transferred T Cells That Target Cytomegalovirus in Glioblastoma', *Cancer Research*, 78(1), pp. 256–264. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0469.
- Reissig, F. *et al.* (2020) 'The effect of hypoxia on the induction of strand breaks in plasmid DNA by alpha-, beta- and Auger electron-emitters 223Ra, 188Re, 99mTc and DNA-binding 99mTc-labeled pyrene', *Nuclear Medicine and Biology*. Elsevier Inc., 80–81, pp. 65–70. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2020.01.003.
- Reits, E. A. *et al.* (2006) 'Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy', *Journal of Experimental Medicine*, 203(5), pp. 1259–1271. doi: 10.1084/jem.20052494.
- Reynders, K. and De Ruyscher, D. (2015) 'Radiotherapy and Immunotherapy: Improving Cancer Treatment through Synergy', in *Progress in tumor research*, pp. 67–78. doi: 10.1159/000437185.
- Ribas, A. *et al.* (2017) 'Oncolytic Virotherapy Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Anti-PD-1 Immunotherapy', *Cell*. Elsevier, 170(6), pp. 1109-1119.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.027.
- Riegler, J. *et al.* (2019) 'VCAM-1 Density and Tumor Perfusion Predict T-cell Infiltration and Treatment Response in Preclinical Models', *Neoplasia*. Genentech, Inc., 21(10), pp. 1036–1050. doi: 10.1016/j.neo.2019.08.003.
- Roife, D., Fleming, J. B. and Gomer, R. H. (2020) 'Fibrocytes in the Tumor Microenvironment', *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1224, pp. 79–85. doi: 10.1007/978-3-030-35723-8\_6.
- Ronca, R. *et al.* (2017) 'Tumor angiogenesis revisited: Regulators and clinical implications', *Medicinal Research Reviews*, 37(6), pp. 1231–1274. doi: 10.1002/med.21452.
- Roscher, M. *et al.* (2013) 'Targeted alpha-therapy using [Bi-213]anti-CD20 as novel treatment option for radio- and chemoresistant non-Hodgkin lymphoma cells', *Oncotarget*, 4(2), pp. 218–230. doi: 10.18632/oncotarget.817.
- Rosenberg, S. A. *et al.* (1988) 'Use of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Interleukin-2 in the Immunotherapy of Patients with Metastatic Melanoma', *New England Journal of Medicine*, 319(25), pp. 1676–1680. doi: 10.1056/NEJM19881223192527.

- Rosenberg, S. A. and Restifo, N. P. (2015) 'Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer', *Science*, 348(6230), pp. 62–68. doi: 10.1126/science.aaa4967.
- Routy, B., Le Chatelier, E., *et al.* (2018) 'Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors', *Science*, 359(6371), pp. 91–97. doi: 10.1126/science.aan3706.
- Routy, B., Gopalakrishnan, V., *et al.* (2018) 'The gut microbiota influences anticancer immunosurveillance and general health', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer US, 15(6), pp. 382–396. doi: 10.1038/s41571-018-0006-2.
- de Ruyter, E. J. *et al.* (2017) 'The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis', *OncolImmunology*. Taylor & Francis, 6(11), p. e1356148. doi: 10.1080/2162402X.2017.1356148.
- Sahin, U. *et al.* (2020) 'An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma', *Nature*. Springer US, 585(7823), pp. 107–112. doi: 10.1038/s41586-020-2537-9.
- Saint-Jean, M. *et al.* (2018) 'Adoptive cell therapy with tumor-infiltrating lymphocytes in advanced melanoma patients', *Journal of Immunology Research*, 2018. doi: 10.1155/2018/3530148.
- Salaun, P. Y. *et al.* (2012) 'Phase II trial of anticarcinoembryonic antigen pretargeted radioimmunotherapy in progressive metastatic medullary thyroid carcinoma: Biomarker response and survival improvement', *Journal of Nuclear Medicine*, 53(8), pp. 1185–1192. doi: 10.2967/jnumed.111.101865.
- Salmon, H. *et al.* (2012) 'Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors', *Journal of Clinical Investigation*, 122(3), pp. 899–910. doi: 10.1172/JCI45817.
- Salvanou, E. A. *et al.* (2020) 'A proof-of-concept study on the therapeutic potential of au nanoparticles radiolabeled with the alpha-emitter actinium-225', *Pharmaceutics*, 12(2), pp. 1–15. doi: 10.3390/pharmaceutics12020188.
- De Sanctis, F. *et al.* (2018) 'The dark side of tumor-associated endothelial cells', *Seminars in Immunology*. Elsevier, 35(February), pp. 35–47. doi: 10.1016/j.smim.2018.02.002.
- Sandmaier, B. M. *et al.* (2002) 'Bismuth 213–labeled anti-CD45 radioimmunoconjugate to condition dogs for nonmyeloablative allogeneic marrow grafts', *Blood*, 100(1), pp. 318–326. doi: 10.1182/blood-2001-12-0322.
- Sangmin, L. (2017) 'In vivo stem cell tracking with imageable nanoparticles that bind bioorthogonal chemical receptors on the stem cell surface', *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 139(3), pp. 12–29. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.05.050.
- Sathekge, M. *et al.* (2019) '225Ac-PSMA-617 in chemotherapy-naive patients with advanced prostate cancer: a pilot study', *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 46(1), pp. 129–138. doi: 10.1007/s00259-018-4167-0.
- Sato, H. *et al.* (2014) 'HLA class I expression and its alteration by preoperative hyperthermo-chemoradiotherapy in patients with rectal cancer', *PLoS ONE*, 9(9). doi: 10.1371/journal.pone.0108122.
- Sato, H., Okonogi, N. and Nakano, T. (2020) 'Rationale of combination of anti-PD-1/PD-L1 antibody therapy and radiotherapy for cancer treatment', *International Journal of Clinical Oncology*. Springer Singapore, 25(5), pp. 801–809. doi: 10.1007/s10147-020-01666-1.
- Sato, N. *et al.* (2015) '89 Zr-Oxine Complex PET Cell Imaging in Monitoring Cell-based Therapies', *Radiology*, 275(2), pp. 490–500. doi: 10.1148/radiol.15142849.
- Sattiraju, A. *et al.* (2017) 'Alpha Particle Enhanced Blood Brain/Tumor Barrier Permeabilization in

- Glioblastomas Using Integrin Alpha-v Beta-3–Targeted Liposomes’, *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(10), pp. 2191–2200. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0907.
- Saung, M. T. *et al.* (2017) ‘Current Standards of Chemotherapy for Pancreatic Cancer May’, *Clin Ther*, 39(11), pp. 2125–2134. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.08.015.
- Schindelin, J. *et al.* (2009) ‘Fiji - an Open platform for biological image analysis’, *Nature Methods*, 9(7). doi: 10.1038/nmeth.2019.Fiji.
- Scott, A. C. *et al.* (2019) ‘TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation’, *Nature*, 571(7764), pp. 270–274. doi: 10.1038/s41586-019-1324-y.
- Seelige, R., Searles, S. and Bui, J. D. (2018) ‘Mechanisms regulating immune surveillance of cellular stress in cancer’, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Springer International Publishing, 75(2), pp. 225–240. doi: 10.1007/s00018-017-2597-7.
- Sekine, T. *et al.* (2020) ‘TOX is expressed by exhausted and polyfunctional human effector memory CD8 + T cells’, *Science Immunology*, 5(49), p. eaba7918. doi: 10.1126/sciimmunol.aba7918.
- Seo, J. W. *et al.* (2018) ‘CD8 + T-Cell Density Imaging with 64 Cu-Labeled Cys-Diabody Informs Immunotherapy Protocols’, *Clinical Cancer Research*, 17(3), pp. 139–148. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0261.
- Shimizu, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. (1999) ‘Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity.’, *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 163(10), pp. 5211–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10553041>.
- Shinkai, Y. *et al.* (1992) ‘RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement’, *Cell*, 68(5), pp. 855–867. doi: 10.1016/0092-8674(92)90029-C.
- Siegler, E. L. *et al.* (2018) ‘Off-the-Shelf CAR-NK Cells for Cancer Immunotherapy’, *Cell Stem Cell*. Elsevier Inc., 23(2), pp. 160–161. doi: 10.1016/j.stem.2018.07.007.
- Skipper, H. E. (1965) ‘The Effects of Chemotherapy on the Kinetics of Leukemic Cell Behavior’, *Cancer Research*, 25, pp. 1544–1550.
- Solis-Castillo, L. A. *et al.* (2020) ‘Tumor-infiltrating regulatory T cells, CD8/Treg ratio, and cancer stem cells are correlated with lymph node metastasis in patients with early breast cancer’, *Breast Cancer*. Springer Japan, 27(5), pp. 837–849. doi: 10.1007/s12282-020-01079-y.
- Spranger, S., Bao, R. and Gajewski, T. F. (2015) ‘Melanoma-intrinsic  $\beta$ -catenin signalling prevents anti-tumour immunity’, *Nature*, 523(7559), pp. 231–235. doi: 10.1038/nature14404.
- Stovgaard, E. S. *et al.* (2018) ‘Triple negative breast cancer–prognostic role of immune-related factors: a systematic review’, *Acta Oncologica*. Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, 57(1), pp. 74–82. doi: 10.1080/0284186X.2017.1400180.
- Street, S. E. A. *et al.* (2004) ‘Innate Immune Surveillance of Spontaneous B Cell Lymphomas by Natural Killer Cells and  $\gamma\delta$  T Cells’, *Journal of Experimental Medicine*, 199(6), pp. 879–884. doi: 10.1084/jem.20031981.
- Strosberg, J. *et al.* (2017) ‘Phase 3 Trial of 177 Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors’, *New England Journal of Medicine*, 376(2), pp. 125–135. doi: 10.1056/NEJMoa1607427.
- Strouhal, E. and Kritscher, H. (1990) ‘Neolithic case of a multiple myeloma from Mauer (Vienna, Austria)’, *anthropologie*. anthropologie, 28, pp. 79–87.
- Sugiura, A. and Rathmell, J. C. (2018) ‘Metabolic Barriers to T Cell Function in Tumors’, *The Journal of*

- Immunology*, 200(2), pp. 400–407. doi: 10.4049/jimmunol.1701041.
- Supiot, S. *et al.* (2002) 'Comparison of the biologic effects of MA5 and B-B4 monoclonal antibody labeled with iodine-131 and bismuth-213 on multiple myeloma', *Cancer*, 94(S4), pp. 1202–1209. doi: 10.1002/cncr.10286.
- Supiot, S. *et al.* (2007) 'Gemcitabine radiosensitizes multiple myeloma cells to low let, but not high let, irradiation', *Radiotherapy and Oncology*, 83(1), pp. 97–101. doi: 10.1016/j.radonc.2007.02.005.
- Takeuchi, Y. and Nishikawa, H. (2016) 'Roles of regulatory T cells in cancer immunity', *International Immunology*, 28(8), pp. 401–409. doi: 10.1093/intimm/dxw025.
- Tay, M. Z., Wiehe, K. and Pollara, J. (2019) 'Antibody dependent cellular phagocytosis in antiviral immune responses', *Frontiers in Immunology*, 10(FEB), pp. 1–18. doi: 10.3389/fimmu.2019.00332.
- Teng, M. W. L., Kershaw, M. H. and Smyth, M. J. (2013) 'Cancer Immunoediting', in *Cancer Immunotherapy*. Elsevier, pp. 85–99. doi: 10.1016/B978-0-12-394296-8.00007-5.
- Thorek, D. L. J. *et al.* (2019) 'Harnessing Androgen Receptor Pathway Activation for Targeted Alpha Particle Radioimmunotherapy of Breast Cancer', *Clinical Cancer Research*, 25(2), pp. 881–891. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-1521.
- Togashi, Y., Shitara, K. and Nishikawa, H. (2019) 'Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy', *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer US, 16(6), pp. 356–371. doi: 10.1038/s41571-019-0175-7.
- Trzonkowski, P. *et al.* (2004) 'CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction', *Clinical Immunology*, 112(3), pp. 258–267. doi: 10.1016/j.clim.2004.04.003.
- Turnis, M. E. *et al.* (2016) 'Interleukin-35 Limits Anti-Tumor Immunity', *Immunity*, 44(2), pp. 316–329. doi: 10.1016/j.immuni.2016.01.013.
- Turtle, C. J. *et al.* (2016) 'CD19 CAR–T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients', *Journal of Clinical Investigation*, 126(6), pp. 2123–2138. doi: 10.1172/JCI85309.
- Upadhaya, S. *et al.* (2021) 'Combinations take centre stage in PD1/PDL1 inhibitor clinical trials', *Nature Reviews Drug Discovery*. Springer US, 20(3), pp. 168–169. doi: 10.1038/d41573-020-00204-y.
- Urbanska, A. M. *et al.* (2020) 'A Genomic Profile of Local Immunity in the Melanoma Microenvironment Following Treatment with  $\alpha$  Particle-Emitting Ultrasmall Silica Nanoparticles', *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 35(6), pp. 459–473. doi: 10.1089/cbr.2019.3150.
- Valedkarimi, Z. *et al.* (2017) 'Antibody-cytokine fusion proteins for improving efficacy and safety of cancer therapy', *Biomedicine & Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 95, pp. 731–742. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.160.
- Verdeil, G. *et al.* (2016) 'From T cell "exhaustion" to anti-cancer immunity', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V., 1865(1), pp. 49–57. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.06.007.
- Vitale, M. *et al.* (2014) 'Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function', *European Journal of Immunology*, 44(6), pp. 1582–1592. doi: 10.1002/eji.201344272.
- Wang, B. *et al.* (2014) 'Low-dose splenic radiation inhibits liver tumor development of rats through functional changes in CD4+CD25+Treg cells', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. Elsevier Ltd, 55, pp. 98–108. doi: 10.1016/j.biocel.2014.08.014.
- Wang, H. *et al.* (2017) 'Selective in vivo metabolic cell-labeling-mediated cancer targeting', *Nature*

- Chemical Biology*, 13(4), pp. 415–424. doi: 10.1038/nchembio.2297.
- Warburg, O. (1925) 'The Metabolism of Carcinoma Cells', *The Journal of Cancer Research*, 9(1), pp. 148–163. doi: 10.1158/jcr.1925.148.
- Watabe, T. *et al.* (2019) 'Enhancement of <sup>211</sup>At uptake via the sodium iodide symporter by the addition of ascorbic acid in targeted A-therapy of thyroid cancer', *Journal of Nuclear Medicine*, 60(9), pp. 1301–1307. doi: 10.2967/jnumed.118.222638.
- Weaver, B. A. (2014) 'How Taxol / paclitaxel kills cancer cells', *perspective on cell biology and human health*, 25, pp. 2677–2681. doi: 10.1091/mbc.E14-04-0916.
- Weist, M. R. *et al.* (2018) 'PET of Adoptively Transferred Chimeric Antigen Receptor T Cells with <sup>89</sup>Zr-Oxine', *Journal of Nuclear Medicine*, 59(10), pp. 1531–1537. doi: 10.2967/jnumed.117.206714.
- Wenes, M. *et al.* (2016) 'Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis', *Cell Metabolism*, 24(5), pp. 701–715. doi: 10.1016/j.cmet.2016.09.008.
- Wherry, E. J. and Kurachi, M. (2015) 'Molecular and cellular insights into T cell exhaustion', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 15(8), pp. 486–499. doi: 10.1038/nri3862.
- Wing, K. *et al.* (2008) 'CTLA-4 Control over Foxp3+ Regulatory T Cell Function', *Science*, 322(5899), pp. 271–275. doi: 10.1126/science.1160062.
- Xiong, Y. (2015) 'Hematopoietic stem cell-derived adipocytes and fibroblasts in the tumor microenvironment', *World Journal of Stem Cells*, 7(2), p. 253. doi: 10.4252/wjsc.v7.i2.253.
- Xu, Jie *et al.* (2019) 'Exploratory trial of a biepitopic CAR T-targeting B cell maturation antigen in relapsed/refractory multiple myeloma', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), pp. 9543–9551. doi: 10.1073/pnas.1819745116.
- Yang, M. *et al.* (2018) 'Diverse Functions of Macrophages in Different Tumor Microenvironments', *Cancer Research*, 78(19), pp. 5492–5503. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-1367.
- Yang, Z. Z. *et al.* (2017) 'Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1+ T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma', *Oncotarget*, 8(37), pp. 61425–61439. doi: 10.18632/oncotarget.18251.
- Yao, X. *et al.* (2012) 'Levels of peripheral CD4 +FoxP3 + regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer', *Blood*, 119(24), pp. 5688–5696. doi: 10.1182/blood-2011-10-386482.
- Yong, K. J. *et al.* (2013) '<sup>212</sup>Pb-radioimmunotherapy potentiates paclitaxel-induced cell killing efficacy by perturbing the mitotic spindle checkpoint', *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group, 108(10), pp. 2013–2020. doi: 10.1038/bjc.2013.189.
- Yong, Kwon Joong *et al.* (2013) 'Sensitization of Tumor to <sup>212</sup>Pb Radioimmunotherapy by Gemcitabine Involves Initial Abrogation of G2 Arrest and Blocked DNA Damage Repair by Interference With Rad51', *International Journal of Radiation Oncology\*Biophysics*, 85(4), pp. 1119–1126. doi: 10.1016/j.ijrobp.2012.09.015.
- Yoon, H. *et al.* (2007) 'Sequential Activation of CD8 + T Cells in the Draining Lymph Nodes in Response to Pulmonary Virus Infection', *The Journal of Immunology*, 179(1), pp. 391–399. doi: 10.4049/jimmunol.179.1.391.
- Yoon, H., Kim, T. S. and Braciale, T. J. (2010) 'The cell cycle time of CD8+ T cells responding in Vivo is controlled by the type of antigenic stimulus', *PLoS ONE*, 5(11). doi: 10.1371/journal.pone.0015423.

- Yuan, J. *et al.* (2010) 'Erratum: Correlation of clinical and immunological data in a metastatic melanoma patient with heterogeneous tumor responses to ipilimumab therapy (Cancer Immunity (2010) 10, (1))', *Cancer Immunity*, 10(January), pp. 1–7.
- Zander, R. *et al.* (2019) 'CD4+ T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8+ T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer', *Immunity*. Elsevier Inc., 51(6), pp. 1028-1042.e4. doi: 10.1016/j.immuni.2019.10.009.
- Zarour, H. M. (2016) 'Reversing T-cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer', *Clinical Cancer Research*, 22(8), pp. 1856–1864. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-1849.
- Zelle-Rieser, C. *et al.* (2016) 'T cells in multiple myeloma display features of exhaustion and senescence at the tumor site', *Journal of Hematology and Oncology*. Journal of Hematology & Oncology, 9(1), pp. 1–12. doi: 10.1186/s13045-016-0345-3.
- Zhang, C. *et al.* (2017) 'Phase I Escalating-Dose Trial of CAR-T Therapy Targeting CEA + Metastatic Colorectal Cancers', *Molecular Therapy*. Elsevier Ltd., 25(5), pp. 1248–1258. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.010.
- Zhang, X. *et al.* (2017) 'Improved Tumor Targeting and Longer Retention Time of NIR Fluorescent Probes Using Bioorthogonal Chemistry.', *Theranostics*, 7(15), pp. 3794–3802.
- Zhao, Y. *et al.* (2017) 'Targeting vascular endothelial-cadherin in tumor-associated blood vessels promotes T-cell-mediated immunotherapy', *Cancer Research*, 77(16), pp. 4434–4447. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3129.
- Zhen, Y. H. *et al.* (2015) 'Phase I/II study of adjuvant immunotherapy with sentinel lymph node T lymphocytes in patients with colorectal cancer', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(9), pp. 1083–1093. doi: 10.1007/s00262-015-1715-3.
- Zheng, C. *et al.* (2017) 'Landscape of Infiltrating T Cells in Liver Cancer Revealed by Single-Cell Sequencing', *Cell*. Elsevier, 169(7), pp. 1342-1356.e16. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.035.
- Zhu, Y. *et al.* (2019) 'Disruption of tumour-associated macrophage trafficking by the osteopontin-induced colony-stimulating factor-1 signalling sensitises hepatocellular carcinoma to anti-PD-L1 blockade', *Gut*, 68(9), pp. 1653–1666. doi: 10.1136/gutjnl-2019-318419.
- Zitvogel, L., Kepp, O. and Kroemer, G. (2010) 'Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity', *Cell*, 140(6), pp. 798–804. doi: 10.1016/j.cell.2010.02.015.

## Annexes

### Annexe I : Profil UPLC du 9E7.4

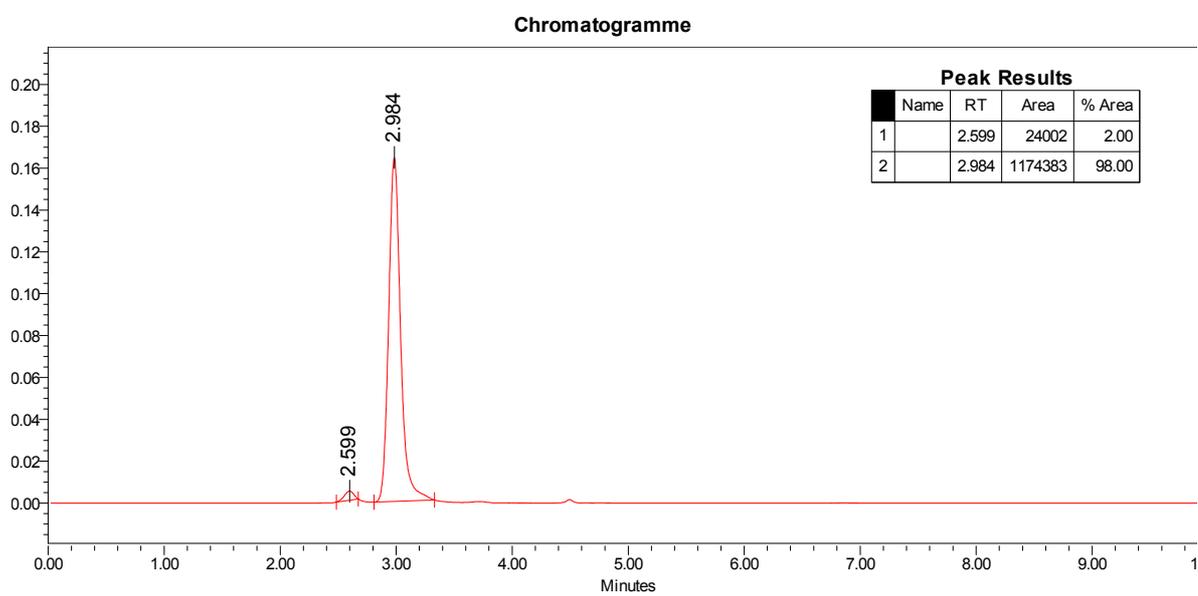


Figure 1 Annexe : Profil UPLC de l'anticorps 9E7.4 couplé au chélate CHX-A-DTPA

## Targeted alpha particle Therapy remodels the tumor microenvironment and improves efficacy of immunotherapy

**Authors :** J. Perrin<sup>1</sup>, M. Capita<sup>1</sup>, M. Allard<sup>1</sup>, S. Guard<sup>1</sup>, S. Marionneau-Lambot<sup>1</sup>, C. Louvet<sup>3</sup>, E. Donnadieu<sup>4</sup>, F. Bruchertseifer<sup>5</sup>, A. Morgenstern<sup>5</sup>, M. Chérel<sup>1,2</sup>, J. Gaschet<sup>1\*</sup> and Y. Guilloux<sup>1\*§</sup>

<sup>1</sup> CRCINA, INSERM, CNRS, Université de Nantes, Université d'Angers, Nantes, France

<sup>2</sup> Nuclear Medicine Unit, ICO Cancer Center Gauducheau, Saint Herblain, France

<sup>3</sup> Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, INSERM, Université de Nantes, Nantes, France

<sup>4</sup> INSERM, U1016, Institut Cochin, CNRS, UMR8104, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75014 Paris, France

<sup>5</sup> European Commission, Joint Research Centre, Directorate for Nuclear Safety and Security, Karlsruhe, Germany

\* The two last authors contributed equally to this work

§ Correspondence to : Yannick Guilloux, CRCINA Inserm U1232, 8 Quai Moncoussu, 44007 Nantes cedex 1

yannick.guilloux@univ-nantes.fr

**Keywords :** Tumor microenvironment ; Targeted alpha therapy ; Immunotherapy ; Multiple Myeloma

### **Abstract**

**Purpose :** Tumor microenvironment (TME) can severely impair immunotherapy efficacy by repressing the immune system. In a Multiple Myeloma (MM) murine model, we investigated the impact of Targeted alpha particle therapy (TAT) on the immune TME. TAT was combined with an adoptive cell transfer of CD8 T-cells (ACT), and the mechanisms of action of this combination was assessed at the tumor site.

**Methods :** This combination treatment was conducted in a syngeneic MM murine model grafted subcutaneously. TAT was delivered by i.v. injection of a 213-bismuth radiolabelled anti-CD138 antibody. To strengthen anti-tumor response, TAT was combined with an ACT of tumor specific OT-1 T-cells. This therapeutic combination resulted in tumor growth delay. The tumors were collected and the immune TME analyzed by flow cytometry, immunohistochemistry and *ex vivo* motility assay on tumor slices. The chemokine and cytokine productions were also assessed by RT-qPCR.

**Results :** OT-1 T-cells infiltrated the tumors after ACT. However only when combined with TAT, it resulted in regulatory CD4 T-cell drop and production of IL-2, CCL-5 and IFN $\gamma$  within the tumor. Moreover, OT-1 T-cell motility was increased on TAT treated tumor slices as observed by *ex vivo* time lapse, contributing to a more homogeneous distribution of OT-1 T-cells in the tumor. Subsequently, the tumor cells increased PD-L1 expression, anti-tumor cytokine production decreased and OT-1 T-cells overexpressed exhaustion markers, implying an exhaustion of the immune response.

**Conclusion :** Combining TAT and ACT seems to turn this “cold” tumor model into a “hot” one, leading to tumor cell resistance mechanisms.

## **Introduction**

Targeted alpha particle therapy (TAT) consists in the injection of a radiolabelled vector targeting tumor cells. It takes advantage of the very high Linear Energy Transfer of alpha particles to irradiate cancer cells, as well as their short path in tissue (around two to three cell diameter) to limit non-specific irradiation.<sup>1</sup> These properties make them suitable for the treatment of hematologic malignancies, characterised by isolated or small cluster of cancer cells. Therefore, the first clinical trial using TAT was performed in acute myeloid leukemia (AML), using an anti-CD33 antibody radiolabelled with bismuth-213.<sup>2</sup> Then, most of the clinical trials were conducted in AML, targeting others epitopes like CD19, CD20, using antibodies radiolabelled with either bismuth-213 or actinium-225.<sup>3</sup>

Although alpha particles have a short path, their scope of application is not limited to hematologic cancers and several phase I clinical trials have proven their potential in the treatment of solid tumors. For instance, treatment with bismuth-213 radiolabelled antibodies<sup>4</sup>, achieved a stable disease and even tumor regression in stage IV melanoma, without noticeable toxicity.<sup>5-7</sup>

To increase TAT efficacy in solid tumors, combination with other therapies, especially immunotherapy, could be considered. There is already a rationale in combining external beam radiation with immunotherapy since the inflammatory signals, increased MHC expression and release of DAMPs induced by ionizing radiation can foster an immune response.<sup>8,9</sup> So far only few studies have looked into combining TAT with immunotherapy. Among them, anti-PD-1 therapy has been combined with bismuth-213 radiolabelled anti-melanin antibody in a melanoma model<sup>10</sup>, and our group also combined an adoptive T-cell transfer (ACT) with TAT in a Multiple Myeloma (MM) model.<sup>11</sup> In these preclinical studies, combined treatment improved therapeutic efficacy, but the underlying mechanisms remain unknown. In order to optimize such combinations, the precise impact of TAT on tumor microenvironment (TME) must be elucidated.

Aside from the direct damages to the tumor cells, impact of TAT is poorly studied. Normalisation of tumor vessels has been reported in a glioblastoma model, with increased accumulation of secondary therapies.<sup>12,13</sup> As for the impact on the immune system, increased expression of calreticulin and MHC molecules, which can support development of an immune response, have been reported on various tumor cell lines irradiated *in vitro*.<sup>14</sup> Furthermore, we demonstrated that vaccination with tumor cells previously irradiated with bismuth-213 could protect the mice from tumor rechallenge.<sup>15</sup>

In this study, we investigated the impact of TAT on the TME immune components in a syngeneic model of MM, treated with TAT and ACT. After treatment with a radiolabelled antibody targeting CD138, mice received tumor-specific CD8 T-cells (OT-1 T-cells). A few days later, we collected the tumors and analysed the immune cell infiltrate, its distribution inside the tumors as well as cell function.

## **Material & methods :**

### *5T33-OVA Multiple Myeloma model*

C57BL6/KaLwRij mice were grafted subcutaneously with 5T33-OVA MM cells as previously described.<sup>11</sup> On day 10 after tumor graft, mice were treated with TAT, and received ACT 24 hours later (See sections below). The mice were sacrificed at day 16 and 19 after tumor graft, and tumors were collected to study TME. All animal experiments were approved by the Animal Experimentation Ethic Committee of the Pays-de-Loire (protocol n°CEEA.2013.2). Animals were housed in the UTE animal facility (University of Nantes, licence number: B-44-278) under conventional conditions.

### *Targeted-Alpha-Therapy*

The anti-CD138 antibody, 9E7.4<sup>16</sup>, was modified and radiolabelled as previously described.<sup>11</sup> Radiochemical purity assessed by ITLC-SG was  $\geq 96\%$ . Treatment was administrated by the injection of 3.7 MBq of purified radioimmunoconjugate in the mice tail vein.

### *ACT treatment*

OT-1 T-cell purification and *in vitro* stimulation were performed as previously described.<sup>11</sup> On day 5 after stimulation, cells were harvested and washed three times with DPBS (ThermoFischerScientific, USA) before injection of  $5 \times 10^6$  OT-1 T-cells in the mice tail vein.

#### *Flow cytometry analysis*

Tumors were collected, reduced into a single cell suspension by mechanical dissociation and red blood cells lysed with lysing buffer (BDbioscience, USA). Cells were stained with antibodies or control isotypes (See [Supplementary Table I for panel details](#)) and Zombie NIR (Biolegend, USA) or Viability (MiltenyiBiotec, Germany) was used to stain dead cells. For intracellular antigens, cells were fixed and permeabilized before incubation with a specific antibody. Stained samples were analyzed on Symphony using Diva Software (BDbioscience, USA) and FlowJo (FlowJo TM software, BDbiosciences, USA) for further analysis. Details of analysis for each panel are provided in [Supplementary Figure 1](#).

#### *Immunofluorescence staining of frozen section*

Tumors were frozen in 2-methylbutan (TCI AMERICA, USA) and 10  $\mu$ M sections were cut using a cryostat (Leica, Germany). Frozen slices were thawed and fixed with Periodate-Lysine-Paraformaldehyde.<sup>17</sup> Non-specific sites were blocked with 0.1 M Tris supplemented with 1% BSA and Fc block (anti CD16/32) (BDbiosciences, USA) prior to incubation with either antibody or isotype control overnight at 4°C (see [Supplementary Table I](#)). After 3 washes with PBS, nuclei were stained with DAPI (Invitrogen, USA) before permanent mounting. Images were acquired on a confocal microscope (Nikon, Japan) with a 40x magnification and analyzed with Fiji.<sup>18</sup>

#### *CD8 T-cell distribution in the tumor*

Formalin-fixed paraffin embedded tumors were sliced at 2 different depths and stained for CD8 or control isotype by the MicroPicell platform. After acquisition of virtual slice with slide scanner (NanozoomerHamamatsu, Massy, France) (x20 magnification), CD8 distribution was analyzed with QuPath v0.2.3.<sup>19</sup> (see Supplemental Material and Methods for detailed staining and analysis).

#### *Lymphocyte motility analysis*

Stimulated OT-1 T-cells were stained with calcein green AM (Invitrogen, USA). Mice were sacrificed 3 days after treatment or not with TAT. Tumor fragments were included in a 5% low gelling temperature agarose at 37°C (Sigma Aldrich, USA). 300  $\mu$ M thick tumor slices were obtained using a vibratome (ThermoFischerScientific, USA). Slices were transferred into culture insert (Merck Millipore, USA) in a culture plate containing 1 mL of culture medium. 300 ng of Alexafluor 647 anti-CD138 antibody (clone 9E7.4) and 200 000 stained OT-1 T-cells were added to each tumor slice for 30 minutes at 37°C, using a stainless ring placed around the tissue to concentrate them. Tumor slices were then washed, maintained in an oxygenated medium and time lapse were acquired on a high-speed confocal microscope (Nikon, Japan). Up to 100  $\mu$ M deep were registered with a 20x magnification (NA : 0.75). Using Z-axis piezo nanopositioner (Mad City Lab, USA), 30 minute time-lapse were performed with an image every 15 seconds. Time-lapse videos were analyzed with the Imaris software (OXFORD Instrument, USA), using the surface module to detect and track OT-1 T-cells.

#### *Analysis of cytokines by RT-qPCR*

Tumor fragments were conserved in RNA later (ThermoFisher Scientific, USA) at -80°C before dissociation in lysis buffer, using lysing matrix tubes and a FastPrep-24 (MP Biomedical, USA). RNA were extracted using Nucleospin RNA Plus kit (Macherey-Nagel, France). Reverse transcription (RT) was conducted using the Superscript III and RNase OUT kit (Invitrogen, USA) on 1 $\mu$ g of RNA. Cytokines expression was measured by qPCR with the Maxima SYBR Green/ROX kit (ThermoScientific, USA). Relative expression of each gene was calculated using the  $2e^{-\Delta\Delta Ct}$  method, as previously described.<sup>20</sup> cDNA from mouse splenocytes stimulated with 5  $\mu$ g/mL Concavalin A (Sigma Aldrich, USA) and 100 ng/mL LPS (Sigma Aldrich, USA) were used as positive controls and GAPDH was used as housekeeping gene reference.

## **Results:**

### **Tumor collection and TME study**

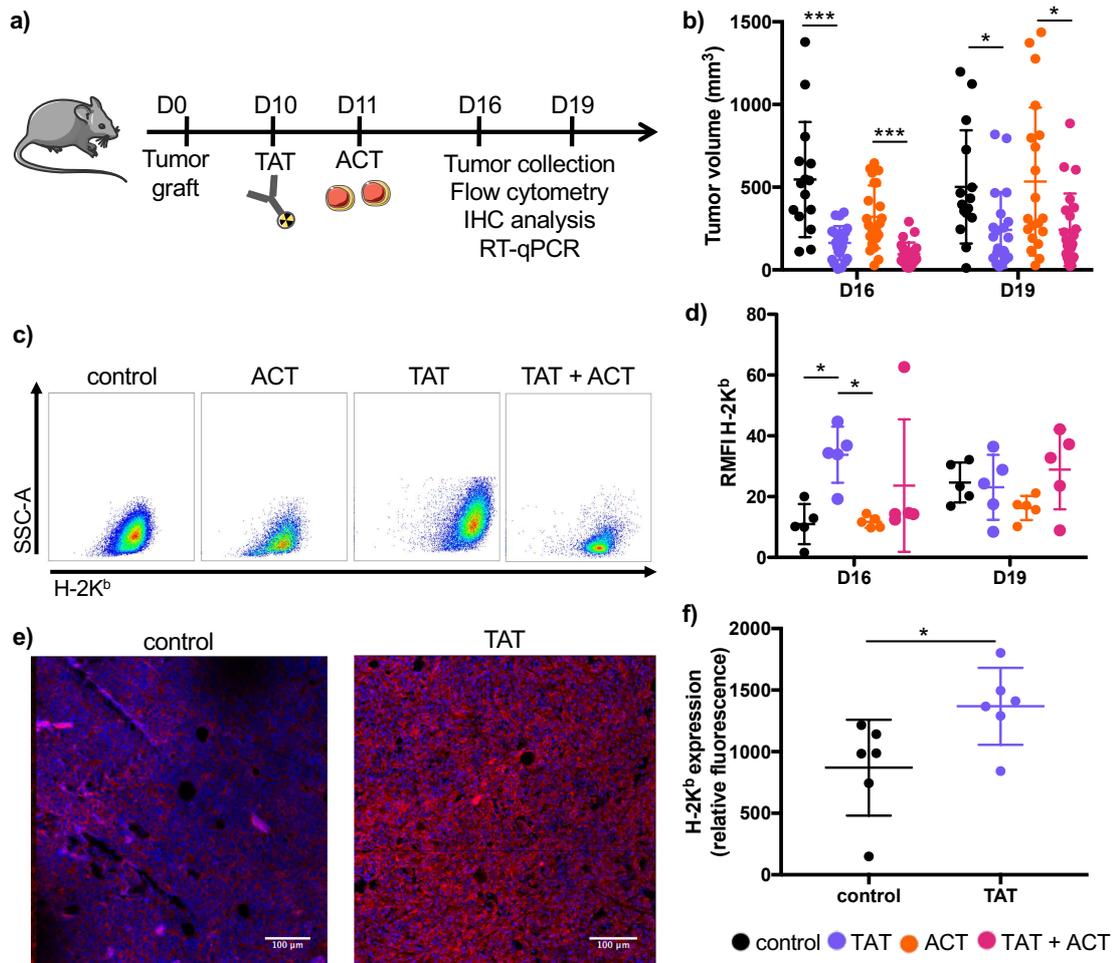
As previously described, mice were injected subcutaneously with the 5T33-OVA MM cell line.<sup>21</sup> TAT was performed at day 10 and ACT at day 11, as presented in [Figure 1a](#). This combination resulted in decreased tumor growth and increased survival compared with the control group. We chose to investigate the TME at day 16 and 19 after tumor graft. According to our previous study, day 16 is the first time point where tumor growth appeared different between the groups that received ACT, TAT or TAT and ACT, and at day 19 mean tumor volume differed the most between the groups. Once collected, tumor volumes were calculated ([Figure 1b](#)). Similar to our previous study, TAT or TAT + ACT significantly reduced tumor volume compared to control or ACT at day 16 and 19.

The tumors were then either frozen or fixed for immunofluorescence or IHC staining. Relative expression of cytokines and chemokines was assessed by RT-qPCR on RNA extracted from frozen tumor samples. Flow cytometry analysis performed on fresh tumors did not reveal any NK cell or macrophage in the infiltrate. B cells and dendritic cells were detected, but no differences were observed between the different groups and days of tumor collection (data not shown). We therefore focused our study on the T-cell infiltrate and tumor phenotype.

### **TAT increases MHC-I tumor cell expression**

In addition to killing the tumor cells, TAT also had an impact on the surviving ones. MHC class I expression was quantified by flow cytometry. Representative tumor cell dot plots from each group are presented in [Figure 1c](#), and relative median fluorescence intensity (RMFI) was obtained based on isotype control. A significant increase in H-2K<sup>b</sup> (5T33-OVA cell line MHC-I haplotype) was observed at day 16 in the TAT-treated group, where it reached a RMFI of 34.4 ( $\pm 9.2$ ), compared to the control or ACT groups, which presented a RMFI of 10.2 ( $\pm 6.6$ ) and 11.6 ( $\pm 1.9$ ), respectively ([Figure 1d](#)). This effect, not visible in the group treated with the combination therapy, appeared however transient since at day 19 the expression of MHC-I between the different groups was no longer observed.

The difference in MHC-I expression in the control and TAT treated groups at day 16 was confirmed by immunofluorescence on frozen tumor slices ([Figure 1e](#), red staining). Quantification of the signal also showed an significant increase of MHC-I expression, which raised from 985.2 ( $\pm 388$ ) in the control group to 1389 ( $\pm 312$ ) in the group treated with TAT ([Figure 1f](#)).



**Figure 1 : TAT increases MHC-I expression on the tumor cells.** a) Treatment administration and tumor collection schedule b) Tumor volumes measured after collection (3 experiments,  $n=5$  for each experiment,  $*=p<0.05$  and  $***=p<0.0005$ , Kruskal-Wallis test). c) Representative dot plot of each group for the MHC-I expression of tumor cells. d) Quantification of the level of expression in each group at day 16 and 19 ( $n=5$  for each treatment and time point,  $*=p<0.05$ , Kruskal-Wallis test). e) Immunofluorescence staining of MHC-I on frozen tumors either control or treated with TAT. f) Quantification of the immunofluorescent signal (analysis of 2 slices from 3 tumors for each treatment,  $*=p<0.05$ , Student test).

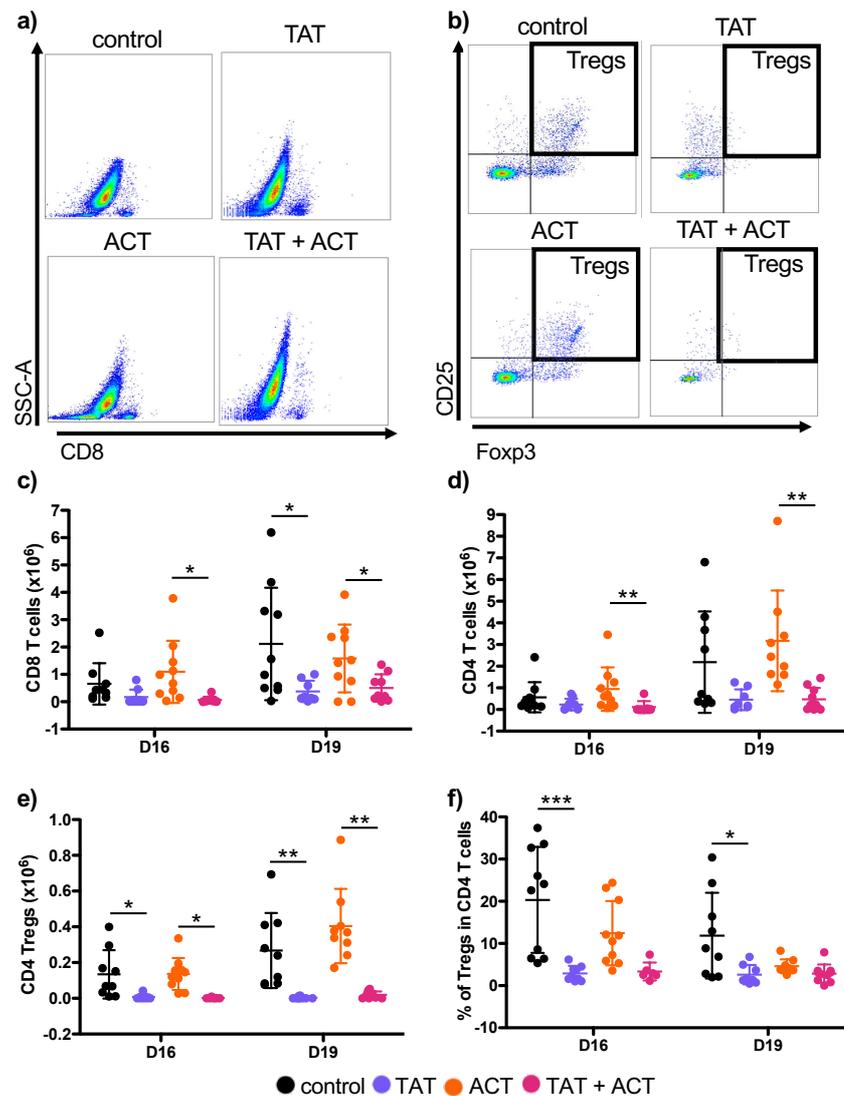
### TAT depletes the infiltrating lymphocytes

Tumor immune infiltrates were analysed for endogenous CD8 and CD4 T-cells including Tregs. Representative dot plots of the cell infiltrates detected by flow cytometry are presented in [Figures 2a](#) and [2b](#), respectively. Quantification of absolute cell numbers showed a significant decrease in endogenous CD8 T-cells at day 16, with a median infiltrate of 831,025 ( $\pm 1,134,806$ ) cells in the ACT group, compared to the TAT + ACT group, which presented an infiltrate of 19,760 ( $\pm 121,953$ ) cells ([Figure 2c](#)). Although not significant, a similar decrease was observed between control group and the groups treated with TAT. At day 19, this depletion was even more pronounced with a significant decrease of CD8 T-cells between control and ACT groups respectively compared to TAT or TAT + ACT treated groups.

Comparable CD4 T-cell depletion was also observed between the ACT and TAT + ACT group at day 16 and 19 ([Figure 2d](#)). A similar trend was observed at day 16 in the TAT compared to the control group at day 16, which became significant at day 19. Among CD4 T-cells, CD4 Tregs (CD4+ CD25+ Foxp3+) were specifically analysed. Quantification of the absolute numbers of CD4 Tregs in [Figure 2e](#) showed a significant depletion: at day 16, the control tumors and the one treated with ACT presented a median number of 68,640 ( $\pm 135,600$ ) and 133,333 ( $\pm 89,280$ ) cells, respectively. In comparison, tumors treated with TAT were infiltrated with 250 ( $\pm 13,540$ ) CD4 Tregs, and those treated with TAT + ACT with 67 ( $\pm$

2,877) CD4 Tregs. This depletion was therefore independent of the ACT, and was only related to TAT. Comparable depletion were observed at day 19.

To better understand if CD4 Tregs were specifically affected by TAT, their percentage among CD4 T-cells was analysed and reported in [Figure 2f](#). CD4 Tregs were specifically depleted by TAT when compared to control group ([supplemental Table III](#) for detailed percentages) at day 16 and 19. Tumors treated with TAT + ACT, although not significant, seemed to present also a depletion of CD4 Tregs at day 16 compared to ACT alone. At day 19 though, they represented a similar percentage of CD4 T-cells in both of these groups.



**Figure 2 : Depletion of CD8 , CD4 and CD4 Treg cells by TAT.** a) and b) Representative dot plots of each group for the infiltration of endogenous CD8 T-cells and CD4 Treg cells at day 16, respectively. c) Absolute number of CD8 and d) CD4 T-cells in each group at day 16 and 19. e) Absolute number of regulatory CD4 T-cells and f) Percent of CD4 Tregs among CD4 T-cells (2 experiments, n=5 for each treatment and time point, \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.005$ , Kruskal-Wallis test).

### TAT increases the effector/target ratio and the motility of OT-1 T-cells when combined with ACT

Unlike endogenous CD8 T-cells, OT-1 T-cells were injected after bismuth-213 decay and therefore are not depleted by irradiation at the tumor site. Absolute numbers of OT-1 T-cells migrating into the tumor site did not appear significantly different at day 16 or 19 in the ACT or TAT + ACT treated groups ([Figure 3a](#)). However, when looking at OT-1 T-cells to tumor cells ratio, it was significantly increased at

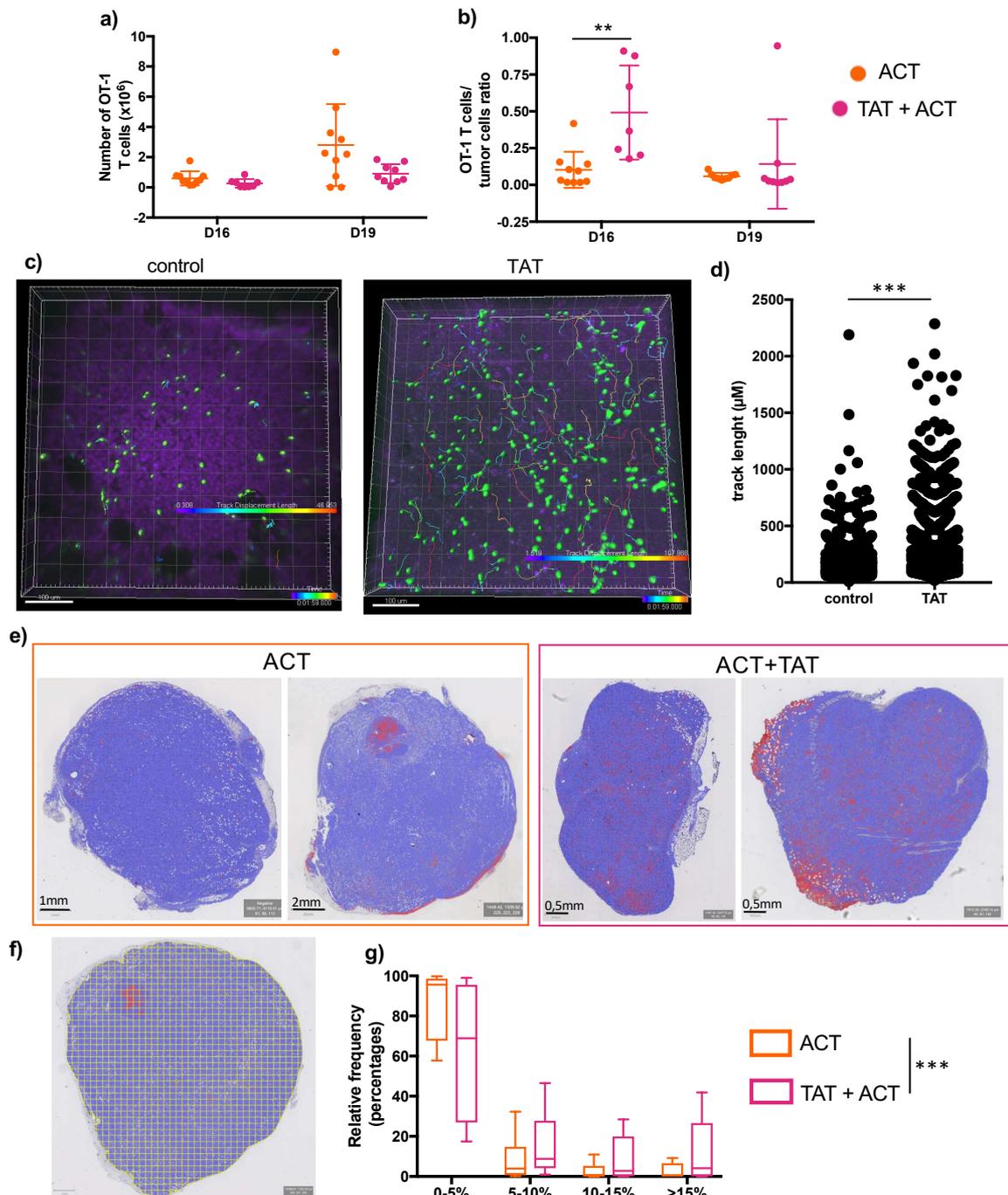
day 16 in the TAT + ACT group ( $0.37 \pm 0.32$ ), compared to the ACT group ( $0.05 \pm 0.02$ ) (Figure 3b, D16). Since no significant difference in the OT-1 T-cell numbers was observed, this increased ratio was not driven by a larger infiltration of OT-1 T-cells. Rather, it was linked to the difference in the tumor size between both groups: at day 16, tumors treated with ACT alone had a median volume of  $205 \text{ mm}^3$ , whereas tumors treated with TAT + ACT had a median volume of  $28 \text{ mm}^3$ . Therefore, even if the same amount of OT-1 T-cells migrated to the tumor, in the case of the combined treatment, they represent a more significant part of the tumor. Unfortunately, this effect was lost by day 19, where even if the absolute number of OT-1 T-cells increased, the OT-1 T-cell to tumor cell ratio actually decreased to  $0.03 (\pm 0.3)$ . In the group treated with ACT alone, this ratio did not change significantly between the two time points.

In addition to the number of infiltrated cells, the motility of OT-1 T-cells was assessed *ex vivo* on a control tumor and a tumor treated with TAT. Thick live tumor slices were stained with a fluorescent anti-CD138 antibody, and calcein-green stained OT-1 T-cells were added. Their motility was measured by time-lapse microscopy during 30 minutes (Figure 3c) and the track lengths were quantified. A marked increase in motility was observed for the OT-1 T-cells on TAT-treated tumors (Figure 3d).

### **TAT combined with ACT improves CD8 T-cell distribution in the tumor**

Since OT-1 T-cells displayed an increased motility on TAT treated tumors, we investigated the potential outcome on cell distribution inside the tumor. QuPath analysis of CD8 stained tumor slices revealed a different pattern in CD8 distribution depending on the treatment. In the case of ACT alone, tumors showed either a low CD8 T-cell infiltrate, or an infiltrate segregated in one part of the tumor. In contrast, after combination therapy a more intense and homogeneous tumor infiltrate was observed, as shown on representative sections in Figure 3e.

To further analyse the distribution of CD8 T-cells, a  $300 \times 300 \mu\text{m}$  grid was generated to fill the ROI, and the percentage of CD8 positive cells in each grid was calculated (Figure 3f). The relative frequency of grid presenting a given percentage of CD8 positive cells is presented in Figure 3g. In ACT treated tumor, a majority of grids presented 5% or less CD8 positive cells. On the other end, ACT + TAT treated tumors demonstrated a more homogeneous distribution of the different relative frequencies, with a significant part of the grids presenting from 5% to more than 15% CD8 positive cells.

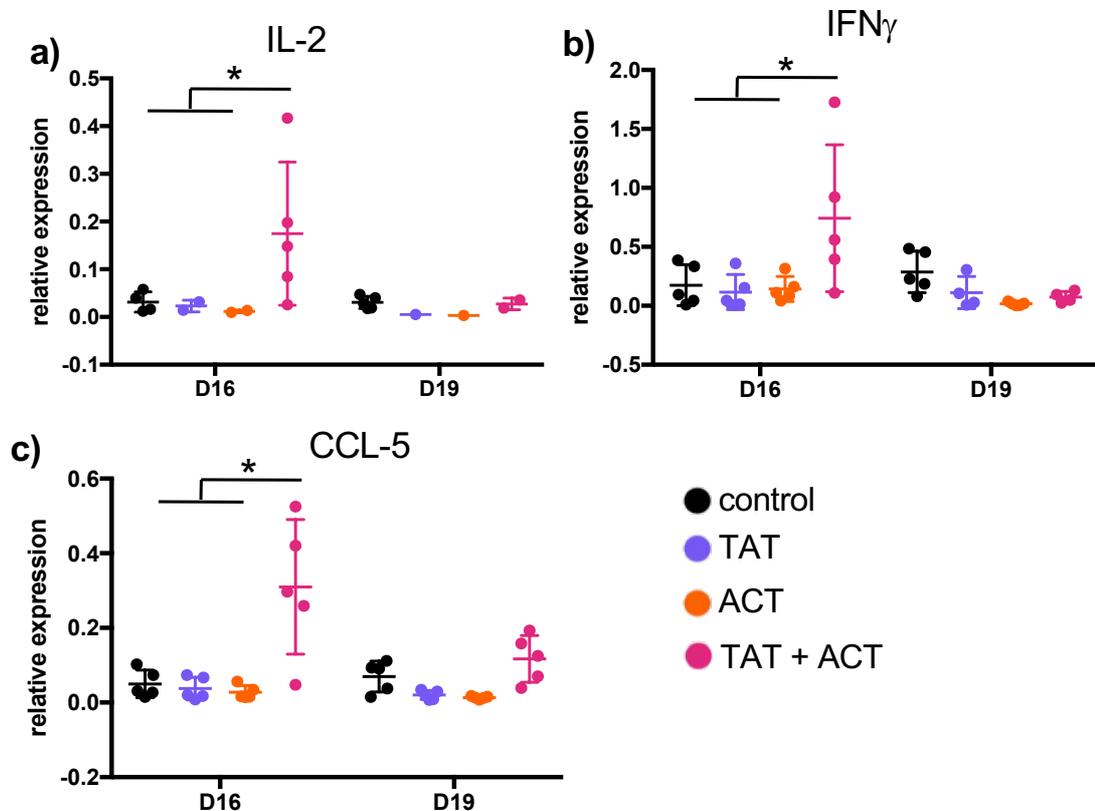


**Figure 3 : Impact of TAT on OT-1 T-cell infiltration and distribution in tumors.** a) Absolute number of OT-1 T-cells at the tumor site. b) Ratio between OT-1 T-cells and tumor cells (2 experiments, n=5, \*\*= $p < 0.005$ , Kruskal-Wallis test). c) Representative screenshots of time-lapse movies: the tumor cells are stained in purple and OT-1 T-cells in green. d) Quantification of track lengths (2 independent experiments of 3 time-lapse each). e) Representative slice after QuPath analysis; nucleus are detected in blue and CD8 T-cells in red. f) Each ROI is divided in  $300 \times 300 \mu\text{m}$  grids. g) Relative frequency of square presenting a given percentage of CD8 positive cells (2 slices of 3 different tumors were analysed) \*\*\*= $p < 0.005$ , Student test.

### Combination therapy induces a transient increase in the expression of anti-tumor cytokines and chemokines

Tumors were then studied for the expression of 17 cytokines and chemokines by RT-qPCR as a first screening approach. Only IL-2, IFN $\gamma$  and CCL-5 expression were modified depending on the treatment administered. A similar pattern was observed corresponding to an increase in production at day 16, only in the group treated with TAT + ACT, compared to the three other groups (Figure 4, a, b and c). Both IL-2

and IFN $\gamma$  have various anti-tumor effects, such as promotion of T-cell proliferation, growth and differentiation, induction of apoptosis and cell cycle arrest. Concerning CCL-5, it is mainly involved in T-cell chemotaxis. However, their expression decreased significantly at day 19, with no significant difference detected between the treated groups. Since these molecules are mainly produced by the immune cells, this decreased production could indicate an exhaustion of the immune response at day 19.



**Figure 4: Increased expression of IL-2, IFN $\gamma$  and CCL-5 in TAT + ACT treated tumors.** Relative expression of a) IL-2, b) IFN $\gamma$  and c) CCL-5 in tumor samples, reported to a housekeeping gene and a positive control (\*= $p < 0.05$ , Kruskal Wallis test,  $n = 5$ ).

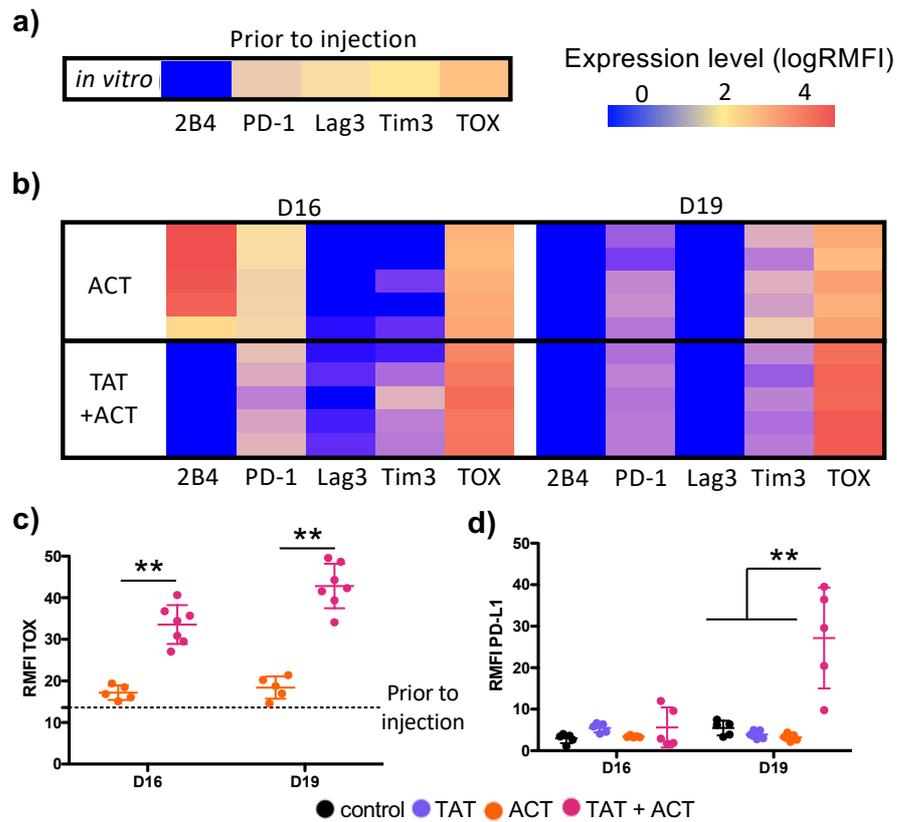
### Combination therapy leads to an exhaustion of the immune response and a resistance mechanism from the tumor cells.

To measure the potential impairment of the immune response, the expression of exhaustion markers by the OT-1 T-cells was evaluated before the injection (*in vitro*) and in the tumors in the ACT and TAT + ACT group by flow cytometry. The relative expression of TOX, Tim3, Lag3, PD-1 and 2B4 on OT-1 T-cells *in vitro*, at day 16 and 19 are reported on a heatmap in [Figure 5a and b](#). Expression of 2B4 was only found on OT-1 T-cells at day 16 in the ACT group, and Lag3 expression was not detected in any condition except *in vitro*. Expressions of both PD-1 and Tim3 were weak. Although not significant, Tim3 seemed to be more strongly expressed in the TAT + ACT group at day 16, while PD-1 seemed more strongly expressed in the ACT condition.

In addition to the global expression of these markers, the evolution of transcription factor TOX is also presented in [Figure 5c](#). A recent study demonstrated that its expression in murine T-cells is sufficient to induce an exhaustion program.<sup>22</sup> In our model, *in vitro* activated OT-1 T-cells indeed presented a weak expression of TOX. Once injected, OT-1 T-cells infiltrating tumors treated first with TAT presented increasing levels of TOX, going from a RMFI of 34.43 ( $\pm 4.68$ ) at day 16 to 42.3 ( $\pm 5.3$ ) at day 19. At the opposite, in the group treated with ACT alone, expression level of TOX on the OT-1 T-cells was stable, around 16.87 ( $\pm 1.74$ ) at day 16 and 18.77 ( $\pm 2.68$ ) at day 19.

Finally, PD-L1 expression was also assessed on the tumor cells and was increased at day 19 in the group treated with the combination therapy, compared to all the other groups ([Figure 5d](#)). The principal

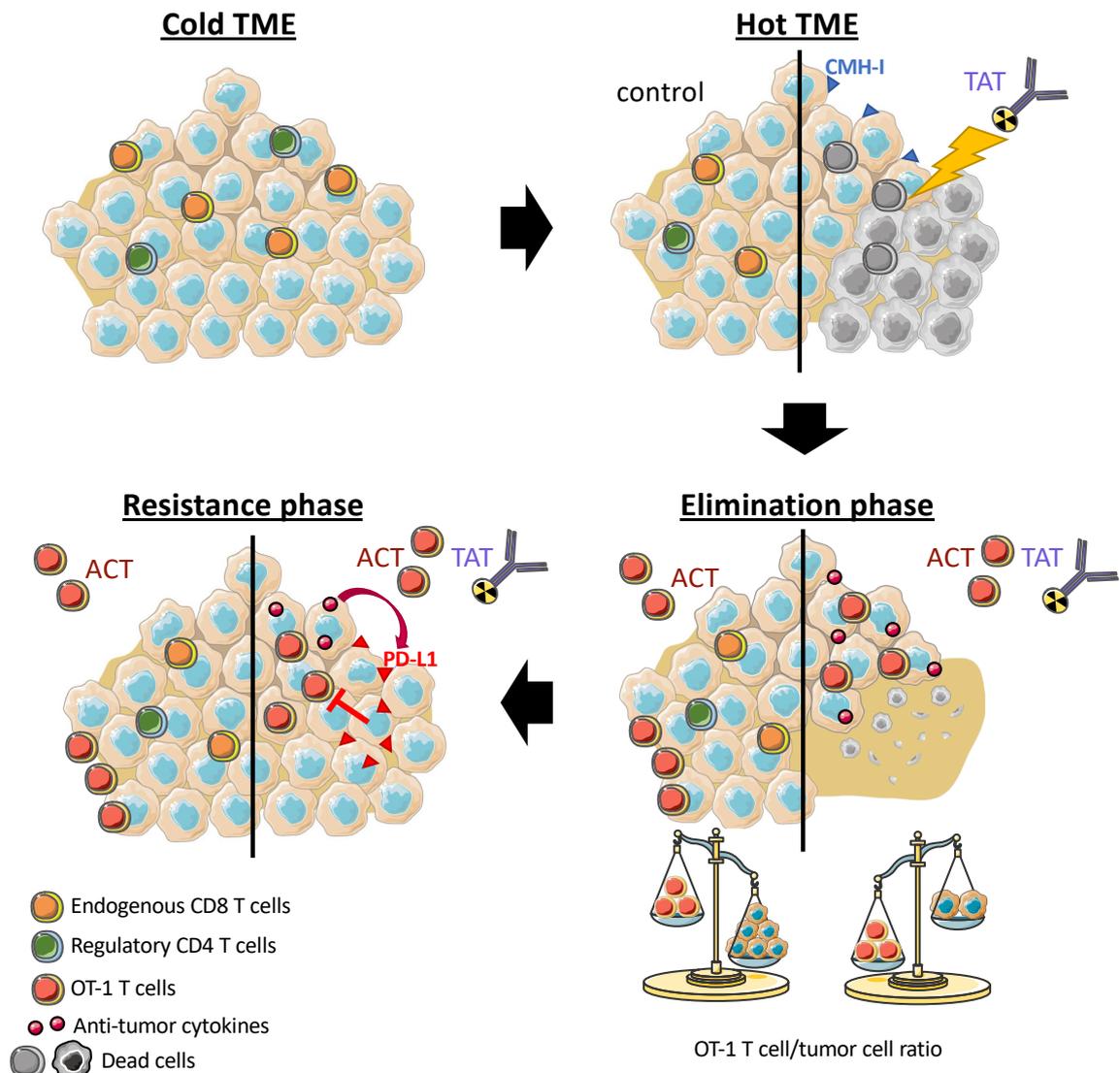
inducer of PD-L1 is IFN $\gamma$ , therefore this PD-L1 overexpression logically follows the IFN $\gamma$  increase observed at day 16 by qPCR in that group (Figure 4a).



**Figure 5: Exhaustion of the immune response.** a) Relative expression of TOX, Tim3, Lag3, PD-1 and 2B4 on OT-1 T-cells, prior to injection and b) at day 16 and 19. Each line corresponds to one tumor c) Expression level of transcription factor TOX, in vivo (n=5). Dotted line shows the expression level prior to injection d) Expression level of PD-L1 by tumor cells after treatment (n=5) \*\*= $p < 0.005$ , Kruskal Wallis test

### Discussion:

TAT is a promising treatment for solid tumors, as it can impact not only the targeted tumor cells, but also the TME. Combination of TAT with other therapies could further improve tumor control. To determine the best therapeutic combination, the precise consequences of TAT on the TME must be elucidated. In the case of immunotherapy, the immune TME plays an important role in treatment efficacy. In our model, neither NK cells, macrophages, B cells or dendritic cells were impacted by the treatments investigated. We therefore focused on the impact of TAT on the T-cell populations in the TME and deciphered some of its mechanisms of action when used either alone or combined with an adoptive cell transfer as summarized in Figure 6.



**Figure 6: Evolution of the TME depending on the treatment.** Control tumors display an infiltrate of endogenous CD8 T-cells and regulatory CD4 T-cells. TAT depletes tumor cells, infiltrating lymphocytes and transiently increases MHC-I expression. After administration of ACT, OT-1 T-cells display different patterns: when injected alone, the cold tumor microenvironment dampens the immune response and a poor infiltrate is observed. When combined with TAT, a homogeneous infiltrate is observed with production of anti-tumor cytokines. The effective immune response then leads to resistance mechanisms, including expression of PD-L1 by the tumor cells.

Aside from tumor cell depletion, the major impact of TAT on TME is the depletion of bystander CD8, CD4 and CD4 Tregs. In the case of solid tumor treatment, ACT efficiency is impacted by many factors. Among them, it has been reported that depletion of CD4 Tregs increases the efficiency of ACT.<sup>23</sup> Moreover, in a clinical trial using TILs, the presence of a weak proportion of CD4 Tregs has been correlated to an increased treatment response.<sup>24</sup> In our model, we observed a decrease in CD4 T-cells, and more specifically in the percentage of CD4 Tregs among them when tumors were treated with TAT. The depletion of this specific cell subtype could indicate an increased sensibility of CD4 Tregs to TAT.

Higher motility of the OT-1 T-cells is also observed on TAT-treated tumors, which was not expected, since CD8 T-cells require prolonged contacts to lyse the target. Since TAT-treated tumors showed increased MHC-I expression, a decrease in OT-1 T-cell motility could be expected. However, long periods of intense motility (5 to 7 hours) have been previously reported before induction of cell lysis.<sup>25</sup> We then reproduced this experiment with prolonged incubation of OT-1 T-cells on tumor slices for 24 hours and observed in both tumor types a decreased motility compared to the 30 minute incubation. As

a result, we observed no significant differences in the path lengths of OT-1 T-cells between control and TAT-treated tumors (data not shown). The treatment with TAT seems therefore to boost the initial motility of OT-1 T-cells.

CD8 T-cell motility can be influenced by intrinsic capacity of the cells and their activation status<sup>26</sup>, but in our case the same OT-1 T-cells were added to the control or TAT-treated tumors, making this hypothesis unlikely. The TME composition, mainly collagen fibers and oxygen level can also influence T-cell motility.<sup>27</sup> However, HES staining of the tumor slices did not reveal any specific organization in the extracellular matrix that could hamper T-cell migration, and oxygen levels were identical in all our *ex vivo* experiments. Finally, chemokines and PD-L1 expression by the tumor cells are also major factors influencing T-cell migration<sup>28</sup>, but TAT alone was not sufficient to induce any detectable modification in chemokines nor PD-L1 expression as assessed by qPCR. A possible explanation could be that tumor cell depletion after TAT results in a lower cell density within the tumors. Even so, this *ex vivo* model does not take into account many important factors which modify CD8 T-cell motility. *In vivo* imaging using biphotonic microscopy would allow a more accurate investigation of the impact of TAT on OT-1 T-cell intra-tumoral motility.

Whether or not this initial increase in motility is a key factor, CD8 T-cells display a more homogeneous and larger infiltration in the tumors after TAT than without, as well as an increase in the OT-1 T-cell to tumor cell ratio. This appears concomitant to an increase in anti-tumor cytokine secretion at the tumor site (IL-2, IFN $\gamma$  and CCL-5). Unfortunately, all these effects are transient and lost at day 19 in our model. Tumor growth impairs OT-1 T-cell expansion, resulting in a reduced OT-1 T-cell to tumor cell ratio.

OT-1 T-cells also displayed expression of various exhaustion markers, which has been frequently observed in solid tumors.<sup>29-31</sup> We investigated the expression of five of these well-described markers; TOX, Tim3, Lag3, 2B4 and PD-1. The main difference observed was a steadily increasing expression of TOX in the TAT + ACT group, while it remains stable in the group treated with ACT alone. If exhaustion markers do not systematically imply a loss of function and can be expressed on terminally-differentiated activated CD8 T-cells<sup>29,32,33</sup>, TOX appears as an interesting transcription factor as its expression alone can induce an exhaustion program. Increasing expression of TOX and decreased secretion of IL-2, CCL-5 and IFN $\gamma$  at the tumor site seem to signal OT-1 T-cell exhaustion in the TAT + ACT group.

This exhaustion may be the outcome of a more intense activation phase and lysis of tumor cells that preceded, due to the favorable TME implemented by TAT. Tumor cells also appear to adapt to the immune response, with increased PD-L1 expression at day 19. Since IFN $\gamma$  is the main inducer of PD-L1 expression, it is possible that the strong immune response in the case of combination therapy led to this increase of PD-L1 expression on the tumor cells.

From these results, combination of TAT with immunotherapies seems promising, as it allows a remodeling of the TME in favor of the anti-tumor immune response. In comparison, there is already a rationale for the combination of external beam radiation and immunotherapy, due to the immunogenic impact of radiotherapy induced tumor cell death.<sup>9</sup> In a colon carcinoma murine model, the association of adoptive cell transfer and external radiotherapy also increased survival and therapeutic efficiency.<sup>34</sup> Nonetheless, radiotherapy may also have an anti-immunogenic impact: it triggers TGF- $\beta$  release which then favors polarization of macrophages in a M2 phenotype and helps recruiting CD4 Tregs.<sup>35</sup> At the opposite, in our model TAT promotes depletion of regulatory CD4 T-cells, and we did not detect any increase in pro-inflammatory cytokines.

Therefore, to increase the efficiency of TAT, cytokines injection could be beneficial to stimulate CD8 T-cell proliferation and expansion after ACT. IL-2 could especially be a great asset, as CD4 T regs, which consume IL-2<sup>36</sup>, have been previously depleted with TAT. Multiple injections of OT-1 T-cells or antibody against immune checkpoint could be performed to maintain a high OT-1 T-cell to tumor cell ratio and prevent exhaustion. However tumor cells could also develop a strong resistance to T-cell lysis, with the expression of various immune checkpoint inhibitors. To counter this resistant phenotype, repeated TAT treatment before each immunotherapy could allow to “reset” the TME and always keep a “hot” tumor microenvironment supporting the immune response.

**Conclusion :** In summary, TAT was able to remodel the cold tumor microenvironment in our model. This allowed an increased efficiency of ACT, with improved effector to target ratio, distribution and cytokine production. This led to tumor resistance mechanism including PD-L1 expression.

**Acknowledgements :** We thank Philippe Hulin, Steven Nedellec and the Micropicell Platform (SFR François Bonamy) for assistance with microscopy and data analysis. We thank the Cytocell platform (SFR François Bonamy). We thank Patricia Le Saëc for technical expertise in radiolabelling. We also thank the radioactivity facility (SFR François Bonamy). We thank Pascal Aumond, Sylvia Lambot, Catherine Maurel for technical expertise in animal experiments and the UTE facility (Unité Thérapeutique Expérimentale, SFR François Bonamy). We thank Melanie Lancien for providing OT-1 transgenic mice spleens and Lene Vimeux for technical advices on CD8 T-cell motility assays. We thank Benedicte Brulin (INSERM UMR1238) for access to the vibratome.

**Conflict of interest statement :** None

**Funding statement :** This study was supported by the Labex IGO (ANR-11-LABX-0016- 01), the Labex IRON (ANR-11-LABX-0018-01) programs, and the ArronaxPlus Equipex (ANR-11- EQPX-0004) funded by the French Government “Investissements d’Avenir” program, managed by the French National Research Agency (ANR). J.P. was supported by a grant from the French ministry of higher education, research and innovation. M.Capitao was supported by a grant from the Labex IGO program (ANR-11-LABX-0016-01). A.M. and F.B. are supported by the European Commission.

**Data availability :**

Research data are stored in an institutional repository and will be shared upon request to the corresponding author

**References:**

1. Kraeber-Bodéré, F. *et al.* Radioimmunoconjugates for the Treatment of Cancer. *Semin. Oncol.* **41**, 613–622 (2014).
2. Jurcic, J. G. *et al.* Targeted alpha particle immunotherapy for myeloid leukemia. *Blood* **100**, 1233–9 (2002).
3. Jurcic, J. G. Targeted Alpha-Particle Therapy for Hematologic Malignancies. *Semin. Nucl. Med.* **50**, 152–161 (2020).
4. Kratochwil, C. *et al.* <sup>213</sup>Bi-DOTATOC receptor-targeted alpha-radionuclide therapy induces remission in neuroendocrine tumours refractory to beta radiation: a first-in-human experience. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **41**, 2106–2119 (2014).
5. Raja, C. *et al.* Interim analysis of toxicity and response in phase 1 trial of systemic targeted alpha

- therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 846–852 (2007).
6. Allen, B. J. *et al.* Intralesional targeted alpha therapy for metastatic melanoma. *Cancer Biol. Ther.* **4**, 1318–1324 (2005).
  7. Allen, B. J. *et al.* Analysis of patient survival in a Phase I trial of systemic targeted  $\alpha$ -therapy for metastatic melanoma. *Immunotherapy* **3**, 1041–1050 (2011).
  8. Hader, M., Frey, B., Fietkau, R., Hecht, M. & Gaipl, U. S. Immune biological rationales for the design of combined radio- and immunotherapies. *Cancer Immunol. Immunother.* **69**, 293–306 (2020).
  9. Reynders, K. & De Ruyscher, D. Radiotherapy and Immunotherapy: Improving Cancer Treatment through Synergy. in *Progress in tumor research* **42**, 67–78 (2015).
  10. Jiao, R., Allen, K. J. H., Malo, M. E., Rickles, D. & Dadachova, E. Evaluating the Combination of Radioimmunotherapy and Immunotherapy in a Melanoma Mouse Model. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 773 (2020).
  11. Ménager, J. *et al.* Combining  $\alpha$ -radioimmunotherapy and adoptive T cell therapy to potentiate tumor destruction. *PLoS One* **10**, 1–14 (2015).
  12. Sattiraju, A. *et al.* Alpha Particle Enhanced Blood Brain/Tumor Barrier Permeabilization in Glioblastomas Using Integrin Alpha-v Beta-3-Targeted Liposomes. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 2191–2200 (2017).
  13. Behling, K. *et al.* Remodeling the vascular microenvironment of glioblastoma with  $\alpha$ -particles. *J. Nucl. Med.* **57**, 1771–1777 (2016).
  14. Malamas, A. S., Gameiro, S. R., Knudson, K. M. & Hodge, J. W. Sublethal exposure to alpha radiation (223Ra dichloride) enhances various carcinomas' sensitivity to lysis by antigen-specific cytotoxic T lymphocytes through calreticulin-mediated immunogenic modulation. *Oncotarget* **7**, 86937–86947 (2016).
  15. Gorin, J. B. *et al.* Antitumor immunity induced after  $\alpha$  irradiation. *Neoplasia (United States)* **16**, 319–328 (2014).
  16. Fichou, N. *et al.* Single-Dose Anti-CD138 Radioimmunotherapy: Bismuth-213 is More Efficient than Lutetium-177 for Treatment of Multiple Myeloma in a Preclinical Model. *Front. Med.* **2**, (2015).
  17. McLean, I. W. & Nakane, P. K. Periodate-Lysine-paraformaldehyde fixative a new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* **22**, 1077–83 (1974).
  18. Schindelin, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
  19. Bankhead, P. *et al.* QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci. Rep.* **7**, 16878 (2017).
  20. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
  21. Ménager, J. *et al.* Combining  $\alpha$ -Radioimmunotherapy and Adoptive T Cell Therapy to Potentiate

- Tumor Destruction. *PLoS One* **10**, e0130249 (2015).
22. Scott, A. C. *et al.* TOX is a critical regulator of tumour-specific T cell differentiation. *Nature* **571**, 270–274 (2019).
  23. Chen, A., Liu, S., Park, D., Kang, Y. & Zheng, G. Depleting intratumoral CD4+CD25+ regulatory T cells via FasL protein transfer enhances the therapeutic efficacy of adoptive T cell transfer. *Cancer Res.* **67**, 1291–1298 (2007).
  24. Yao, X. *et al.* Levels of peripheral CD4 +FoxP3 + regulatory T cells are negatively associated with clinical response to adoptive immunotherapy of human cancer. *Blood* **119**, 5688–5696 (2012).
  25. Bhat, P., Leggatt, G., Matthaei, K. I. & Frazer, I. H. The Kinematics of Cytotoxic Lymphocytes Influence Their Ability to Kill Target Cells. *PLoS One* **9**, e95248 (2014).
  26. Krummel, M. F., Bartumeus, F. & Gérard, A. T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 193–201 (2016).
  27. Nicolas-Boluda, A. & Donnadieu, E. Obstacles to T cell migration in the tumor microenvironment. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **63**, 22–30 (2019).
  28. Brunner-Weinzierl, M. C. & Rudd, C. E. CTLA-4 and PD-1 control of T-cell motility and migration: Implications for tumor immunotherapy. *Front. Immunol.* **9**, 1–8 (2018).
  29. Verdeil, G., Fuertes Marraco, S. A., Murray, T. & Speiser, D. E. From T cell ‘exhaustion’ to anti-cancer immunity. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1865**, 49–57 (2016).
  30. Wherry, E. J. & Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 486–499 (2015).
  31. Baitsch, L. *et al.* Exhaustion of tumor-specific CD8+ T cells in metastases from melanoma patients. *J. Clin. Invest.* **121**, 2350–2360 (2011).
  32. Yang, Z. Z. *et al.* Expression of LAG-3 defines exhaustion of intratumoral PD-1+ T cells and correlates with poor outcome in follicular lymphoma. *Oncotarget* **8**, 61425–61439 (2017).
  33. Legat, A., Speiser, D. E., Pircher, H., Zehn, D. & Fuertes Marraco, S. A. Inhibitory receptor expression depends more dominantly on differentiation and activation than ‘exhaustion’ of human CD8 T cells. *Front. Immunol.* **4**, 1–15 (2013).
  34. Reits, E. A. *et al.* Radiation modulates the peptide repertoire, enhances MHC class I expression, and induces successful antitumor immunotherapy. *J. Exp. Med.* **203**, 1259–1271 (2006).
  35. Sato, H., Okonogi, N. & Nakano, T. Rationale of combination of anti-PD-1/PD-L1 antibody therapy and radiotherapy for cancer treatment. *Int. J. Clin. Oncol.* **25**, 801–809 (2020).
  36. Klebanoff, C. A. *et al.* Determinants of successful CD8 + T-cell adoptive immunotherapy for large established tumors in mice. *Clin. Cancer Res.* **17**, 5343–5352 (2011).

#### Supplementary data:

Supplemental material and methods:

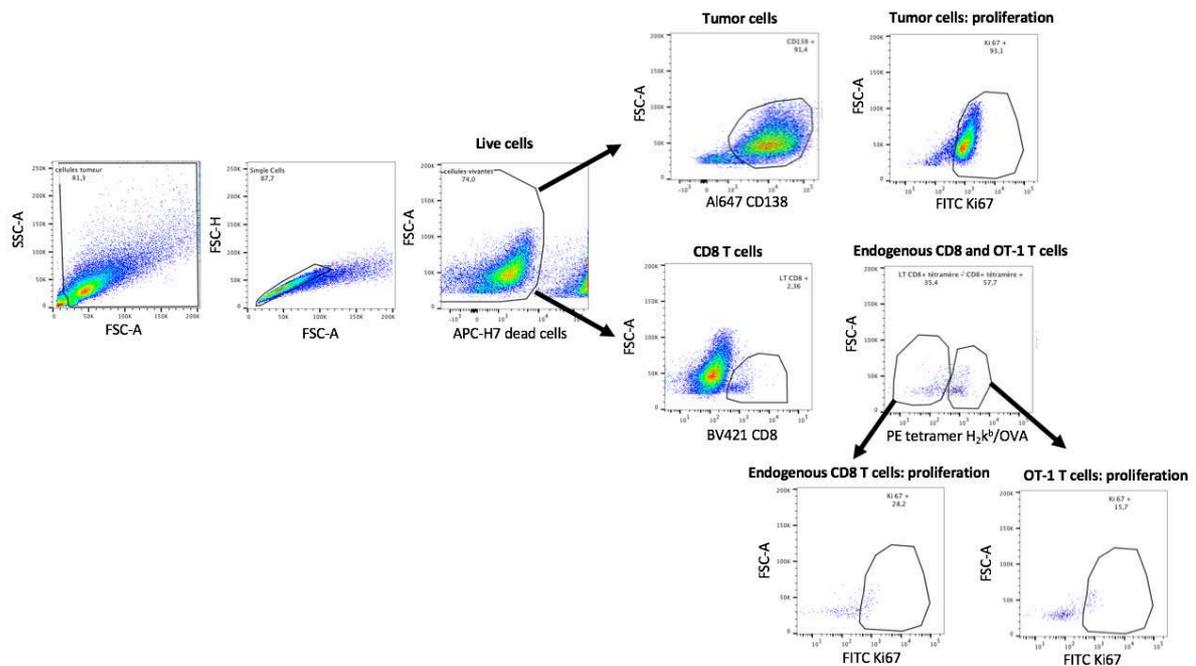
*Histology*

Formalin-fixed paraffin embedded tumors were sliced at 2 different depths. Immunohistochemical staining was performed with the Impath36A.Menarini (A.Menarini, Portugal) by MicroPicell Platform. Each slice was washed twice in xylene then in absolute alcohol for 5 minutes, then rehydrated. After retrieval of antigen with high pH solution for 30 minutes at 97°C (Agilent, USA), endogenous peroxydases were blocked and a blocking solution was applied for 20 minutes (Animal Free blocker) (VectorLaboratories, USA). For staining, anti-mouse CD8 mAb (clone 4SM16) (Invitrogen, USA) or control isotype were used. Slices were then incubated with Histofine rat to mouse–HRP (Nichirei, Netherlands), washed and revealed with DAB (3,3'-Diaminobenzidine) (Impath DAB detection Kit, A.Menarini, Portugal). Counterstaining with hematoxylin was then performed before permanent mounting.

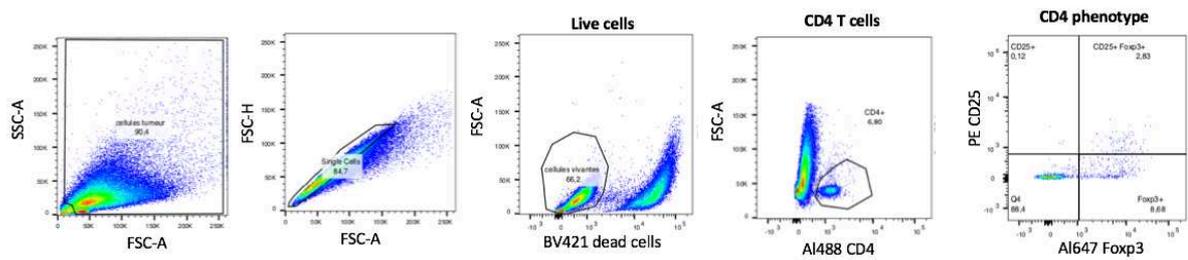
*QuPath analysis*

Virtual slices of CD8-stained slices were obtained using a slide scanner (NanozoomerHamamatsu, Massy, France) (x20 magnification), and were analyzed with QuPath v0.2.3.<sup>19</sup> Simple tissue detection was performed to generate Region of interest (ROI). Cell nucleus detection was performed based on hematoxylin staining. CD8 positive cell was defined with a DAB cytoplasm mean  $\geq$  a threshold of 0.18. Control isotype stained slices showed less than 1% of positive cells with this threshold. For analysis of CD8 positive cell distribution, a 300x300  $\mu$ M grid was generated to fill the ROI, and the percentage of CD8 positive cells was extracted for each grid. Grids containing less than 100 detected cells were removed from analysis.

Supplementary Figure 1 : Gating strategy for flow cytometry data analysis for (a) CD8 T-cell panel (b) CD4 T-cell panel and (c) OT-1 T-cell phenotype



a) CD8 T-cells panel: debris and doublets are removed from the first and second gate respectively, and live cells are discriminated from dead ones with Zombie NIR. Cells are then discriminated depending on their expression of CD138, CD8 and tetramer staining: tumor cells (CD138(+)/cells), endogenous CD8 T-cells (CD8(+)/tetramer(-) cells), OT-1 T-cells (CD8(+)/tetramer(+) cells). Each cell type was analysed for expression of Ki67.



b) CD4 panel: debris and doublets are removed from the first and second gate respectively, and live cells are discriminated from dead ones with Viability. CD4(+) T-cells are assessed for expression of CD25 and Foxp3 to discriminate naïve cells (CD4(+) CD25(-) Foxp3(-)), activated cells (CD4(+) CD25(+) Foxp3(-)) and regulatory T-cells (CD4(+) Foxp3(+))

*Supplementary Table I : Panels and antibodies used for flow cytometry analysis*

Panel name	Antigen	Fluorochrom	reference	Isotype control
CD8 T-cells	CD8	Pacific blue	Biolegend 100728	IgGArmenian hamster
	Tetramer	PE	P2R Platform	Irrelevanttetramer
	CD138	Al647	Biolegend 142526	Rat IgG2a, $\kappa$
	Ki67	Vio515	Miltenyi 130-108-830	REA
Regulatory CD4 T-cells	CD4	Al488	Biolegend 100423	Rat IgG2b, $\kappa$
	CD25	PE	Ebioscience 12-0251-82	Rat IgG1
	Foxp3	Vio667	Miltenyi 130-111-604	REA
Exhaustion marker	CD45	Al700	Biolegend 103127	Rat IgG2b, $\kappa$
	CD8a	Viogreen	Miltenyi 130-122-017	REA
	Tetramer	PE	Plateforme P2R	Irrelevant Tetramer
	PD-1	PercPVio700	Miltenyi 103-111-957	REA
	Tim3	BV711	Biolegend 119727	Rat IgG2a, $\kappa$
	Lag3	Viobright515	Miltenyi 130-111-515	REA
	2B4	APC/Fire750	Biolegend 133515	Mouse IgG1, $\kappa$
	TOX	APC	Miltenyi 130-118-335	REA
	CD127	PE-Vio770	Miltenyi 130-110-257	REA
Tumor cells	CD226	PE/dazzle594	Biolegend 128817	Rat IgG2b, $\kappa$
	CD138	Al647	Biolegend 142526	Rat IgG2a, $\kappa$
	PD-L1	BV650	Biolegend 124336	Rat IgG2b, $\kappa$
	H <sub>2</sub> k <sup>b</sup>	Vioblue	Miltenyi 130-115-592	REA

*Supplementary Table II : Forward and Reverse primers used for cytokine detection*

Gene name	Foward Primer	Reverse primer
$\beta$ -actine	ctgtccctgtatgcctctg	atgtcacgcacgcacgatttcc
GAPDH	ggcattgctctcaatgacaa	tgtgaggagatgctcagt
CXCL10	ggatccctctcgaagga	atcgtggcaatgatctcaaca
IL-10	ataactgcaccacttcca	gggcatcacttctaccaggt
TGF-b	cctgcaagaccatcgacatg	tgtgtacaaagcgagcacc
IL-1 $\alpha$	tgcagcagggttttaggtg	atgaaaggctccaagtgcag
IL-2	gcaggccacagaattgaaag	tccaccacagttgctgactc
VEGF	ctgtaacgatgaagccctggag	tggtgaggtttgatccgcat
IL-12	cgagagaggcagagaactcac	ctctcccaccctatttcc
Csf1	ccaggatgaggacagacagg	ggtagtgggtgtagttcca

IFN $\gamma$	tggctctgcaggatttcatg	tcaagtggcatagatgtggaagaa
CCL-2	tgaagctaatgcaccactacc	catcacagtcaggagtcacac
IL-4	actctttcgggcttttcgatg	tgatgctctttaggctttccag
TNF $\alpha$	tgggagtagacaaggtacaaccc	catcttctcaaaattcgagtgacaa
IL-1 $\beta$	gcactacaggctccgagatgaac	ttgctgtgcttggttctcctgt
LDHA	aaagtctccccgtgtcctagc	Ttccccacaccatctcaacacc
LDHB	tcaagtacagccctgactgcac	Aatccagattgcatccgcttcc
HIF1 $\alpha$	accacaactgccaccactgatg	Agtgccactgtatgctgatgcc
CCL-5	gcttcctgtcattgcttgc	agatgccattttccaggacc

*Supplemental Table III : Percentage of CD4 Tregs in CD4 T-cells*

	control		TAT		ACT		TAT + ACT	
	mean	S.D	mean	S.D	mean	S.D	mean	S.D
D16	<b>23,4</b>	$\pm 12,5$	<b>2,4</b>	$\pm 1,8$	<b>11,2</b>	$\pm 7,6$	<b>2,8</b>	$\pm 2,1$
D19	<b>8,9</b>	$\pm 10,2$	<b>1,5</b>	$\pm 2,3$	<b>4,0</b>	$\pm 1,7$	<b>2,9</b>	$\pm 2,1$

Article

## Anti-Tumor Efficacy of PD-L1 Targeted Alpha-Particle Therapy in a Human Melanoma Xenograft Model

Marisa Capitao <sup>1</sup>, Justine Perrin <sup>1</sup>, Sylvain Simon <sup>1</sup>, Sébastien Gouard <sup>1</sup>, Nicolas Chouin <sup>2</sup>, Frank Bruchertseifer <sup>3</sup>, Alfred Morgenstern <sup>3</sup>, Latifa Rbah-Vidal <sup>1</sup>, Michel Chérel <sup>4</sup>, Emmanuel Scotet <sup>1</sup>, Nathalie Labarrière <sup>1</sup>, Yannick Guilloux <sup>1</sup> and Joëlle Gaschet <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Nantes, CNRS, Inserm, CRCINA, F-44000 Nantes, France; marisa.f.c@orange.fr (M.C.); justine.perrin@univ-nantes.fr (J.P.); sylvain@fredhutch.org (S.S.); sebastien.gouard@univ-nantes.fr (S.G.); Latifa.Rbah-Vidal@univ-nantes.fr (L.R.-V.); Emmanuel.Scotet@univ-nantes.fr (E.S.); Nathalie.Labarriere@univ-nantes.fr (N.L.); yannick.guilloux@univ-nantes.fr (Y.G.)

<sup>2</sup> Université de Nantes, CNRS, Inserm, Oniris, CRCINA, F-44000 Nantes, France; nicolas.chouin@oniris-nantes.fr

<sup>3</sup> European Commission, Joint Research Centre, Directorate for Nuclear Safety and Security, G-76344 Karlsruhe, Germany; frank.BRUCHERTSEIFER@ec.europa.eu (F.B.); Alfred.MORGENSTERN@ec.europa.eu (A.M.)

<sup>4</sup> Université de Nantes, CNRS, Inserm, ICO Gauducheau, GIP Arronax, CRCINA, F-44000 Nantes, France; Michel.Cherel@univ-nantes.fr

\* Correspondence: Joelle.Gaschet@univ-nantes.fr



**Citation:** Capitaio, M.; Perrin, J.; Simon, S.; Gouard, S.; Chouin, N.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Rbah-Vidal, L.; Chérel, M.; Scotet, E.; et al. Anti-Tumor Efficacy of PD-L1 Targeted Alpha-Particle Therapy in a Human Melanoma Xenograft Model. *Cancers* **2021**, *13*, 1256. <https://doi.org/10.3390/cancers13061256>

Academic Editors:

Anne-Marie Schmitt-Verhulst and Brian Gabrielli

Received: 29 December 2020

Accepted: 8 March 2021

Published: 12 March 2021

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



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

**Simple Summary:** In recent years, the development of immune checkpoint inhibitors, such as anti-PD-1 and anti-PD-L1, proved to prolong melanoma patient survival and are now used in routine clinical practice. PD-L1 also represents a potent biomarker for in vivo molecular imaging using radiolabeled anti-PD-L1 mAbs and positron emission tomography and is currently in development to select patients and assess response to treatment. The aim of our study was to investigate in a preclinical model of human melanoma if PD-L1 could also be a good target for treatment using targeted alpha-particle therapy. Our results show that targeting PD-L1 with bismuth-213, an alpha particle emitter, was associated with efficient anti-tumor response, significant tumor growth delay, and improved survival. This demonstrates that anti-PD-L1 antibodies could be used as theranostics in molecular imaging but also in targeted alpha-particle therapy to treat the tumor and its stroma.

**Abstract:** PD-L1 (programmed death-ligand 1, B7-H1, CD274), the ligand for PD-1 inhibitory receptor, is expressed on various tumors, and its expression is correlated with a poor prognosis in melanoma. Anti-PD-L1 mAbs have been developed along with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies for immune checkpoint inhibitor (ICI) therapy, and anti-PD-1 mAbs are now used as first line treatment in melanoma. However, many patients do not respond to ICI therapies, and therefore new treatment alternatives should be developed. Because of its expression on the tumor cells and on immunosuppressive cells within the tumor microenvironment, PD-L1 represents an interesting target for targeted alpha-particle therapy (TAT). We developed a TAT approach in a human melanoma xenograft model that stably expresses PD-L1 using a <sup>213</sup>Bi-anti-human-PD-L1 mAb. Unlike treatment with unlabeled anti-human-PD-L1 mAb, TAT targeting PD-L1 significantly delayed melanoma tumor growth and improved animal survival. A slight decrease in platelets was observed, but no toxicity on red blood cells, bone marrow, liver or kidney was induced. Anti-tumor efficacy was associated with specific tumor targeting since no therapeutic effect was observed in animals bearing PD-L1 negative melanoma tumors. This study demonstrates that anti-PD-L1 antibodies may be used efficiently for TAT treatment in melanoma.

**Keywords:** TAT; PD-L1; melanoma; bismuth-213; theranostics

## 1. Introduction

PD-L1 (programmed death-ligand 1, B7-H1, CD274) is the primary ligand for PD-1 inhibitory receptor [1]. PD-L1 is constitutively expressed among various immune cells such as T-cells, B-cells, macrophages, and dendritic cells (DC) and upregulated upon activation [2,3]. Its function is not limited to inhibiting effector T-cells, as PD-L1 can induce Tregs in the periphery (iTregs) and sustain their suppressive functions [4]. PD-L1 is also expressed by various tumor cells, such as melanoma, non-small-cell lung carcinoma (NSCLC), triple-negative breast cancer (TNBC), as well as within the tumor microenvironment, on tumor-associated macrophages (TAM), and myeloid-derived suppressor cells (MDSC) [5–9]. In this context, PD-L1 expression results from pro-inflammatory stimuli and is subjected to a complex regulation [10,11]. In melanoma, it has been shown that IFN $\gamma$  produced by tumor infiltrating T-lymphocytes (TILs) is the main factor inducing expression of PD-L1 [12,13]. Indeed, in biopsies of melanoma patients, colocalization of PD-L1 expressing tumor cells, CD8+ TILs and IFN $\gamma$ , has been observed, and heterogenous expression of PD-L1 was related to the T-cell infiltrate [14]. In addition, hypoxia, a frequent feature of solid tumors, and hypoxia inducible factor, HIF-1 $\alpha$ , may also contribute to PD-L1 regulation in tumors and their microenvironment [8,15]. PD-L1 expression is considered to be one of the major tumor escape mechanisms and has been correlated with a more aggressive phenotype [16–18]. Several anti-PD-L1 mAbs—atezolizumab, avelumab, and durvalumab—have been developed as immune checkpoint inhibitor (ICI) therapy molecules and, based on their promising results in patients, have been recently approved for clinical use by the FDA and EMA [19–21].

Accordingly, with early clinical trials of ICI therapy using anti-PD-1 mAb, a review by Gandini et al. analyzed the clinical results of 4230 melanoma patients and reported an objective response rate of 48% for patients whose tumors expressed PD-L1 vs. 15% for those whose tumors were negative for PD-L1, supporting PD-L1 as a potent biomarker to select forefront the patients who can benefit from ICI therapy and to evaluate response to treatment [22–25]. However, numerous therapeutic responses have also been observed despite undetectable PD-L1 expression in the tumor [26,27]. So far, PD-L1 is determined by immunohistochemistry (IHC), which has several limitations related to the heterogeneous expression of the molecule [28,29]. IHC analysis has also been done using different mAbs, specific for various epitopes [14]. As a consequence, the relationship between PD-L1 minimum expression rate and therapeutic response is variable across studies, ranging from 1% to 50%, which actually makes PD-L1 not a clear predictive biomarker. To overcome IHC limits, numerous clinical trials are currently awaited or ongoing to assess reliability and sensitivity of *in vivo* molecular imaging using anti-PD-L1 mAbs radiolabeled with positron emitting radionuclides, that is, immuno-PET (positron emission tomography) imaging [30]. In a preclinical study evaluating PD-L1 as target for molecular imaging in an immunocompetent breast cancer model, Josefsson et al. provided biodistribution and dosimetry data supporting the feasibility of using a radiolabeled anti-PD-L1 mAb not only for molecular imaging but also for targeted radionuclide therapy (TRT) [31]. The ideal radionuclide to use for such TRT application would associate high toxicity to kill the tumor cells and the immunosuppressive cells within the tumor microenvironment, a short range of action to preserve surrounding healthy tissues, and the potency of stimulating immunity to provide an immune modulation.

Targeted alpha-particle therapy (TAT) is a TRT modality based on the use of alpha-particle emitters delivered specifically to the tumor by the mean of a vector, usually a mAb or a peptide. The alpha decay energy is comprised between 5 to 9 MeV along a short linear path in the tissues ranging from 50 to 100  $\mu$ m; their linear energy transfer (LET) is therefore very high (50 to 230 keV/ $\mu$ m) and provides a high cytotoxic potential. Moreover, the radiobiological effects of this type of radionuclides are largely independent of dose rate, oxygenation, or cell proliferation [32]. Therefore, alpha-particle emitters are considered as interesting anti-tumor agents for micrometastases, residual tumors, and hematological cancers [33]. TAT in a preclinical immunocompetent melanoma model using anti-melanin

mAb radiolabeled with bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ), an alpha-particle emitter, has been shown to significantly delay tumor growth [34]. In the clinic, promising results have also been obtained in melanoma patients using  $^{213}\text{Bi}$ -anti-MCSP (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan) mAb. In a first clinic trial involving 16 patients, the radiolabeled mAb was delivered locally in melanoma lesions. In this context, TAT induced massive cell death with no toxicity [35]. In a second trial, the same radiopharmaceutical was delivered systemically in 38 patients developing metastatic melanoma. No major toxicity was observed, and the maximum tolerated dose (MTD) was not reached. An objective partial response was observed in 10% of the patients, and 15% survived more than 3 years [36,37].

Considering that PD-L1 expression is correlated with a poor prognostic in melanoma [38,39], that despite very promising clinical results, at best, 40% of metastatic melanoma patients objectively respond to ICI therapy targeting either PD-1 or PD-L1 [40,41], and that PD-L1 expression in the tumor and its stroma makes it a most interesting target for TAT, the aim of this study was to develop and investigate TAT using  $^{213}\text{Bi}$ -anti-PD-L1 mAb in a preclinical model of human melanoma.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cells and Reagents

The M113<sup>WT</sup> and M113<sup>PD-L1+</sup> human melanoma cell lines were kindly provided by Dr. Nathalie Labarrière (CRCINA, Nantes, France). The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/mL penicillin (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 µg/mL streptomycin (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biosera Europe, Nuaille, France). M113<sup>PD-L1+</sup> transfected cells were also supplemented by addition of 0.8 µg/mL of G418. Cells were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, in a humidified-saturated incubator.

The GoInVivo<sup>TM</sup> purified anti-human PD-L1 mouse mAb (anti-hPD-L1 mAb), PE-conjugated anti-hPD-L1 mAb (clone 29E.2A3), GoInVivo<sup>TM</sup> purified mouse IgG2bκ isotype control, and PE-conjugated mouse IgG2bκ isotype control (clone MPC-11) were purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA). PE-conjugated goat anti-mouse IgG, F(ab')<sub>2</sub> was purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, US). Flow cytometry experiments were performed using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and the events were analyzed using the FlowJo software (Treestar, Meerhout, Belgium).

Before bismuth-213 radiolabeling, the anti-hPD-L1 mAb and the mouse IgG2bκ isotype control were modified using 2-(4-isothiocyanato-benzyl)-cyclohexyl-diethylenetriaminepentaacetic acid (SCN-CHX-A''-DTPA; Macrocylics, Plano, TX, USA) with 20 equivalents of CHX-A''-DTPA in carbonate buffer (0.05 M, pH 8.7). After 12h incubation at 25 °C, modified mAbs were purified by high-performance liquid chromatography on a Sephadex G200 gel-filtration column (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The mean chelate number per antibody, assessed as previously described [42], was 2. For bismuth-213 radiolabeling, 100 µg of each immunoconjugate was incubated with bismuth-213 eluted from an actinium-225/bismuth-213 generator (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany) for 10 min at 37 °C in 0.8 M ammonium acetate (pH 5.3), 1.5% ascorbic acid. The resulting  $^{213}\text{Bi}$ -labelled immunoconjugates were separated from unbound bismuth-213 by size-exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Radiochemical purity was  $98.7 \pm 1.1\%$ , as determined by instant thin-layer chromatography silica gel (ITLC-SG) using 0.1 M sodium citrate solution (pH 5.3) as mobile phase.

### 2.2. Mouse Xenograft Model

Female NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) mice were purchased from Charles River laboratory, housed and bred at the UTE animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, license number: B-44-278) under specific pathogen free conditions. Subcutaneous xenograft tumors were established by injection of  $1 \times 10^6$  M113<sup>PD-L1+</sup>

mAb radiolabeled with bismuth-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ), an alpha-particle emitter, has been shown to significantly delay tumor growth [34]. In the clinic, promising results have also been obtained in melanoma patients using  $^{213}\text{Bi}$ -anti-MCSP (melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan) mAb. In a first clinic trial involving 16 patients, the radiolabeled mAb was delivered locally in melanoma lesions. In this context, TAT induced massive cell death with no toxicity [35]. In a second trial, the same radiopharmaceutical was delivered systemically in 38 patients developing metastatic melanoma. No major toxicity was observed, and the maximum tolerated dose (MTD) was not reached. An objective partial response was observed in 10% of the patients, and 15% survived more than 3 years [36,37].

Considering that PD-L1 expression is correlated with a poor prognostic in melanoma [38,39], that despite very promising clinical results, at best, 40% of metastatic melanoma patients objectively respond to ICI therapy targeting either PD-1 or PD-L1 [40,41], and that PD-L1 expression in the tumor and its stroma makes it a most interesting target for TAT, the aim of this study was to develop and investigate TAT using  $^{213}\text{Bi}$ -anti-PD-L1 mAb in a preclinical model of human melanoma.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cells and Reagents

The M113<sup>WT</sup> and M113<sup>PD-L1+</sup> human melanoma cell lines were kindly provided by Dr. Nathalie Labarrière (CRCINA, Nantes, France). The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), supplemented with 2 mM L-glutamine (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/mL penicillin (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 100 µg/mL streptomycin (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Biosera Europe, Nuaille, France). M113<sup>PD-L1+</sup> transfected cells were also supplemented by addition of 0.8 µg/mL of G418. Cells were incubated at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, in a humidified-saturated incubator.

The GoInVivo<sup>TM</sup> purified anti-human PD-L1 mouse mAb (anti-hPD-L1 mAb), PE-conjugated anti-hPD-L1 mAb (clone 29E.2A3), GoInVivo<sup>TM</sup> purified mouse IgG2bκ isotype control, and PE-conjugated mouse IgG2bκ isotype control (clone MPC-11) were purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA). PE-conjugated goat anti-mouse IgG, F(ab')<sub>2</sub> was purchased from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, US). Flow cytometry experiments were performed using a FACS Canto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and the events were analyzed using the FlowJo software (Treestar, Meerhout, Belgium).

Before bismuth-213 radiolabeling, the anti-hPD-L1 mAb and the mouse IgG2bκ isotype control were modified using 2-(4-isothiocyanato-benzyl)-cyclohexyl-diethylenetriaminepentaacetic acid (SCN-CHX-A''-DTPA; Macrocylics, Plano, TX, USA) with 20 equivalents of CHX-A''-DTPA in carbonate buffer (0.05 M, pH 8.7). After 12h incubation at 25 °C, modified mAbs were purified by high-performance liquid chromatography on a Sephadex G200 gel-filtration column (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). The mean chelate number per antibody, assessed as previously described [42], was 2. For bismuth-213 radiolabeling, 100 µg of each immunoconjugate was incubated with bismuth-213 eluted from an actinium-225/bismuth-213 generator (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany) for 10 min at 37 °C in 0.8 M ammonium acetate (pH 5.3), 1.5% ascorbic acid. The resulting  $^{213}\text{Bi}$ -labelled immunoconjugates were separated from unbound bismuth-213 by size-exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Radiochemical purity was  $98.7 \pm 1.1\%$ , as determined by instant thin-layer chromatography silica gel (ITLC-SG) using 0.1 M sodium citrate solution (pH 5.3) as mobile phase.

### 2.2. Mouse Xenograft Model

Female NSG (NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ) mice were purchased from Charles River laboratory, housed and bred at the UTE animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, license number: B-44-278) under specific pathogen free conditions. Subcutaneous xenograft tumors were established by injection of  $1 \times 10^6$  M113<sup>PD-L1+</sup>

or M113<sup>WT</sup> human melanoma cells in 100 µL PBS (DPBS, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), into the flank of 8–9-week-old NSG mice. Seven days later, when tumor volumes reached around 80 mm<sup>3</sup>, mice were randomly allocated into the different experimental groups. For each experiment, frozen M113<sup>PD-L1+</sup> or M113<sup>WT</sup> cells were thawed and grown in culture for 10 days before graft. Meanwhile, the absence of mycoplasma contamination was checked using a HEK-Blue Detection Kit (Invivogen, Toulouse, France), and PD-L1 expression was confirmed by flow cytometry analysis.

### 2.3. Histology and Immunohistochemistry Staining

Tumors were collected, formalin-fixed, and paraffin-embedded. Hematoxylin and eosin or immunohistochemistry staining were performed on 3µm paraffin sections. Expression of PD-L1 was analyzed using rabbit anti-human-PD-L1 (E1L3N<sup>®</sup>, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) or rabbit isotype control (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) primary antibodies and then using HRP-conjugated secondary antibody. Proliferation was analyzed using mouse anti-Ki67 (Clone MIB-1, Dako, Les Ulis, France) or mouse isotype control (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) primary mAbs and HRP-conjugated secondary antibody. Revelation was done using DAB substrate solution and the sections were counterstained with hematoxylin. Acquisitions were performed using a slide scanner (Nanozoomer, Hamamatsu, Massy, France). For quantification, ndpi files were imported in QuPath version 0.2.3, a free software for the analysis of IHC images [43]. Simple tissue detection was performed on each slide, and extra-tumoral vessels were manually removed from the selection. Cell detection was performed by the detection of the nucleus, based on optical density sum. Ki67 positive cell was defined with a nucleus DAB (3,3'-Diaminobenzidine) mean staining equal or above a threshold of 0.3. Control isotypic stained slides showed a maximum of 1.15% positive cells with this threshold.

### 2.4. Immuno-PET Imaging

Copper-64 was obtained from the Arronax cyclotron (GIP Arronax, Saint-Herblain, France) using the reaction  $^{64}\text{Ni}(p,n)^{64}\text{Cu}$  and was delivered as  $^{64}\text{CuCl}_2$  in 0.1N HCl. Before copper-64 radiolabeling, the anti-hPD-L1 mAb was modified using the copper chelating agent p-SCN-Bn-DOTA (Macrocyclics, Plano, TX, USA), purified on gel filtration column, and then radiolabeled for 30 min at 42 °C in 0.1M sodium acetate. The radiolabeling yield and specific activity of the bioconjugate were 100% and 482 MBq/mg, respectively. Each mouse was intravenously injected with 20 µg of  $^{64}\text{Cu}$ -labelled anti-hPD-L1 mAb. Total activity injected for each mouse was 10 MBq. Immuno-PET were realized on a multimodality preclinical imaging system (Inveon<sup>™</sup>, Siemens Healthcare, Erlangen, Germany) at 24h and 48h after  $^{64}\text{Cu}$ -labelled immunoconjugate injection. The reconstructed PET images were analyzed using Inveon Research Workplace (Siemens Healthcare, Erlangen, Germany).

### 2.5. Dose-Escalation Study

Naïve 10–11-week-old NSG mice received an i.v. injection in the vein tail of 125, 165, 210, 335, and 395 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -PD-L1 human mAb ( $n = 3$  per group) and monitored for 100 days. Experiment was approved by the local veterinary committee (APAFIS #7915) and carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Animals were sacrificed in case of marked distress signs or/and a weight loss greater than 20% of initial body weight.

### 2.6. Therapy Studies

TAT studies were performed on mice bearing M113<sup>PD-L1+</sup> or M113<sup>WT</sup> tumors. Seven days after tumor graft, animals were treated by i.v. injection in the tail vein of a single dose of either 125 kBq/g ( $n = 17$ ) or 165 kBq/g ( $n = 10$ )  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb. TAT control groups received either 125 kBq/g ( $n = 10$ ) or 165 kBq/g ( $n = 10$ )  $^{213}\text{Bi}$ -mouse IgG2bκ isotype control. Animals treated with 125 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb or  $^{213}\text{Bi}$ -mouse IgG2bκ isotype control received

around 6  $\mu\text{g}$  of radiolabeled mAb, and those treated with 165 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb or  $^{213}\text{Bi}$ -mouse IgG2b $\kappa$  isotype control received around 10  $\mu\text{g}$  of radiolabeled mAb. Finally, PBS control group received only an injection of 100  $\mu\text{L}$  PBS ( $n = 20$ ).

Experiments were approved by the local veterinary committee (APAFIS #7823) and carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Animals were monitored two to three times a week. Tumor burden was measured using a caliper, and the volume was calculated based the following formula:  $\text{volume} = (\text{L} \times \text{W}^2)/2$ , where L was length and W was width. Mice were sacrificed taking into account the appearance of necrosis in tumors, weight loss greater than 20% of initial body weight, and tumor volume greater than 2000  $\text{mm}^3$ . Statistical analyses of tumor volumes were performed using two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons, and by log-rank test for survivals.

### 2.7. Toxicity Study

Hematological toxicity was assessed by numeration of red blood cells and platelets on an automated hematology analyzer (Nihon Kohden France, Le Plessis-Robinson, France). Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. Bone marrow, liver, and kidney toxicity was assessed on plasma isolated by centrifugation (10 min at  $600 \times g$ ). Each sample was assessed in duplicate. Flt3-ligand concentration was quantified by ELISA (Bio-Techne, Noyal Châtillon sur Seiche, France) following manufacturer's protocol. ASAT (Bioo Scientific, Austin, TX, USA), ALT, (Bioo Scientific, Austin, TX, USA), urea (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA), and creatine (BioAssay Systems, Hayward, CA, USA) were quantified using quantitative colorimetric assays following manufacturer's instructions. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test.

### 2.8. Statistical Analysis

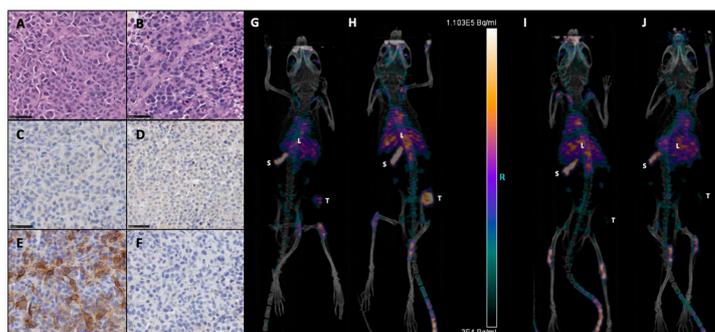
Statistical analysis were performed using Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). A  $p$ -value of 0.05 or less was considered significant.

## 3. Results

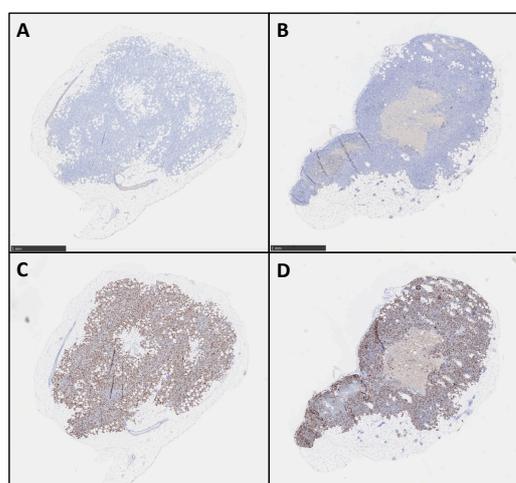
### 3.1. PD-L1 Expression on M113<sup>PD-L1+</sup> and M113<sup>WT</sup> Xenograft Tumors

M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma cells were generated by transfection of M113<sup>WT</sup> parental cells derived from a melanoma patient with *PCDC1* cDNA. PD-L1 expression on both M113<sup>WT</sup> and M113<sup>PD-L1+</sup> cells was checked on in vitro cultures by flow cytometry analysis and showed that 99% of M113<sup>PD-L1+</sup> cells express heterogeneously PD-L1, with 75% expressing high levels and 25% expressing low levels of PD-L1 (Figure S1). M113<sup>WT</sup> cells were negative. After subcutaneous engraftment in NSG mice flank, M113<sup>PD-L1+</sup> and M113<sup>WT</sup> melanoma tumors reached a volume around 80  $\text{mm}^3$  within 7 days. Such tumor volume appeared suitable to investigate TAT efficacy. PD-L1 expression was confirmed on M113<sup>WT</sup> and M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma tumors ex vivo by immunostaining and in vivo by immuno-PET (Figure 1). Hematoxylin and eosin staining demonstrated that cell structure was similar in both type of tumors (Figure 1A,B). Immunohistochemistry staining showed that only M113<sup>PD-L1+</sup> tumors expressed PD-L1 (Figure 1E). PD-L1 expression was not recovered in M113<sup>WT</sup> cells after in vivo implantation (Figure 1F). No stainings were observed with the isotype control (Figure 1C,D). PD-L1 expression was confirmed in vivo by immuno-PET imaging using  $^{64}\text{Cu}$ -radiolabeled anti-PD-L1 mAb, 1 and 2 weeks (Figure 1G,H), respectively, after tumor implantation. M113<sup>WT</sup> tumors remained negative (Figure 1I,J). In parallel to PD-L1 expression, we also insured that M113<sup>PD-L1+</sup> and M113<sup>WT</sup> xenograft tumors were indeed proliferating at the time of TAT treatment. Therefore, a Ki67 immunohistochemistry staining was performed on those tumors, collected 7 days after implantation in NSG mice. The Ki67 staining demonstrated that cells in both types of tumors were in proliferation (>60%) at the time we planned on initiating TAT (Figure 2 and Table S1). Staining also showed a central necrotic zone in the M113<sup>WT</sup> tumor that may have developed early in this xenograft melanoma model (Figure 2B). These results demonstrate that M113<sup>PD-L1+</sup>

melanoma tumors expressed PD-L1 in vivo and confirmed that PD-L1 was a relevant tumor target to assess TAT efficacy, while M113<sup>WT</sup> tumors that did not express PD-L1 represented a suitable control to evaluate targeting specificity. In addition, both tumors were proliferating 7 days after engraftment when TAT was to be performed.



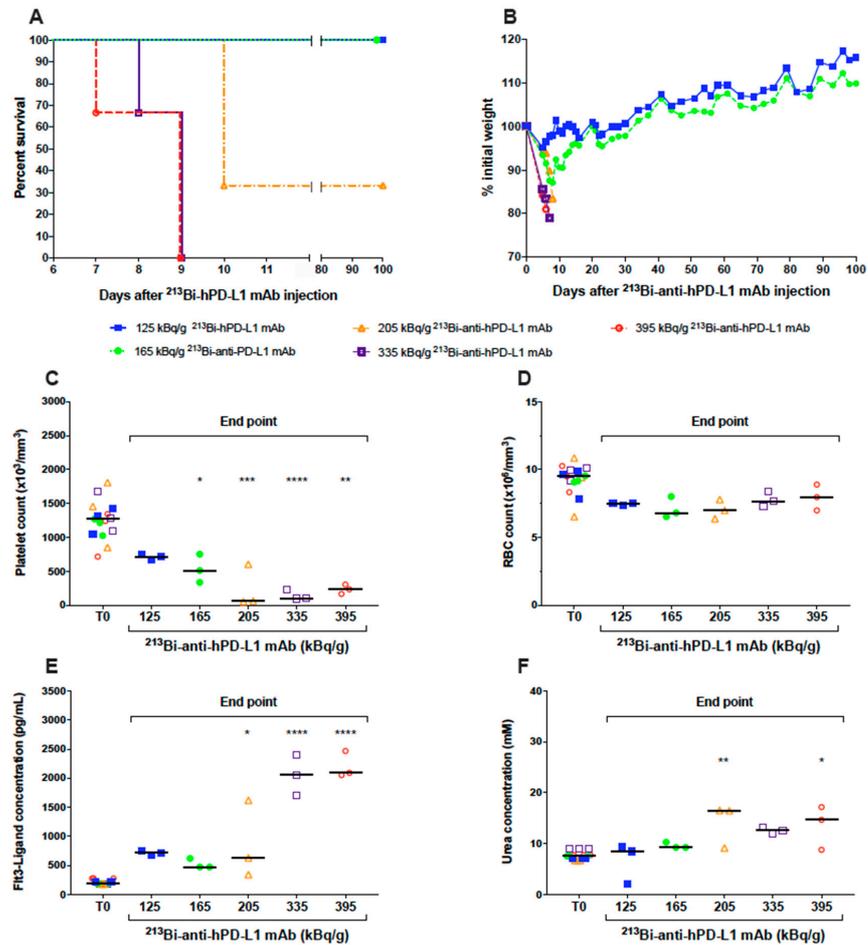
**Figure 1.** Expression of programmed death-ligand 1, B7-H1, CD274 (PD-L1) on M113 melanoma xenograft tumors. Formalin-fixed and paraffin-embedded histologic sections of M113<sup>PD-L1+</sup> (A,C,E) and M113<sup>WT</sup> (B,D,F) melanoma xenograft tumors were examined immunohistochemically after hematoxylin and eosin (A,B), rabbit isotype control (C,D), and anti-hPD-L1 (E,F) staining. All sections were photographed at 40x original magnification, scale bars = 50  $\mu$ m. Data are representative of 4 different M113<sup>PD-L1+</sup> and M113<sup>WT</sup> tumors. Immuno-PET imaging of mice bearing subcutaneous M113<sup>PD-L1+</sup> (G,H) or M113<sup>WT</sup> (I,J) tumors at 1 (G,I) or 2 weeks (H,J) after tumor engraftment and 48 h after injection of 10 MBq <sup>64</sup>Cu-anti-hPD-L1mAb (L: liver, S: spleen, T: tumor). Data are representative of 3 different mice in each group.



**Figure 2.** Ex vivo proliferation analysis of M113 melanoma xenograft tumors. M113<sup>PD-L1+</sup> (A,C) and M113<sup>WT</sup> (B,D) melanoma tumor proliferation was examined on formalin-fixed and paraffin-embedded histologic sections after immunohistochemical staining with mouse anti-human Ki67 mAb (C,D) or mouse IgG1 $\kappa$  isotype control (A,B). Data are representative of 4 different M113<sup>PD-L1+</sup> and M113<sup>WT</sup> tumors. Scale bars = 1 mm.

### 3.2. Dose Escalation Study of $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb

The radiochemical yields of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb were  $98.7 \pm 1.1\%$  in all experiments, and affinity after radiolabeling was slightly decreased compared to unmodified anti-hPD-L1 mAb ( $6.5 \times 10^{-9}$  vs.  $2 \times 10^{-9}$  M, respectively) but remained in the nanomolar range (Figure S2), which was high and suitable for the study. A dose escalation study was then performed on naïve NSG mice to define the best activities for TAT. Groups of three mice received activities of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb ranging from 125 to 395 kBq/g. Kaplan–Meier survival curves showed that activities of 395, 335, and 205 kBq/g were highly toxic, with median survivals of 9 and 10 days, respectively (Figure 3A). In these groups, mice were sacrificed based on weight loss that was extremely rapid and greater than 20% of initial body weight (Figure 3B). Instead, groups receiving 125 and 165 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb survived until the end of the study (Figure 3A). Hematologic and biochemistry parameters were determined at the end point for each mouse and compared to status before injection of the radiopharmaceutical (T0). Hematologic toxicity was assessed by platelet and erythrocyte (RBC) counts. At the end point, all the mice injected with 165 to 395 kBq/g of radiolabeled anti-hPD-L1 mAb exhibited a significant and dose-dependent drop of the platelets compared to T0 (Figure 3C). The group that received 125 kBq/g of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb demonstrated a slight but not significant decrease in platelet count. No significant change was observed in any group for RBC count (Figure 3D). These results indicated that, except with 125 kBq/g of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb, all the other injected activities induced significant thrombocytopenia in the animals. In addition to hematologic parameters, bone marrow toxicity was determined by dosing plasma Flt3-ligand concentration (Figure 3E). At T0, median Flt3-ligand concentration in plasma was 190 pg/mL. A considerable and very significant increase in Flt3-ligand concentration was observed in mice injected with 335 and 395 kBq/g of radiopharmaceuticals, with median concentrations reaching 2058 and 2091 pg/mL, respectively. Plasma Flt3-ligand was also increased in the 205 kBq/g group—in particular, up to 1618 pg/mL in one mouse that developed acute toxicity. These results demonstrate that acute toxicity observed in the mice injected with activities ranging from 205 to 395 kBq/g of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb was associated with bone marrow impairment. Finally, we also observed some increase in Flt3-ligand concentration in the groups that received 125 et 165 kBq/g of radiolabeled mAb. AST, ALT, and urea were also assessed as biochemical parameters of liver and kidney failure. No change was observed for AST or ALT in any group (data not shown). Urea, instead, was increased in all the groups injected the radiopharmaceutical at activities of 205 kBq/g and greater (Figure 3F). No kidney toxicity was observed in the groups that received 125 and 165 kBq/g of radiolabeled mAb. These results suggested that despite a slight hematologic toxicity on platelets and a minor impact on bone marrow, TAT experiments could eventually be investigated with 125 and 165 kBq/g of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb.

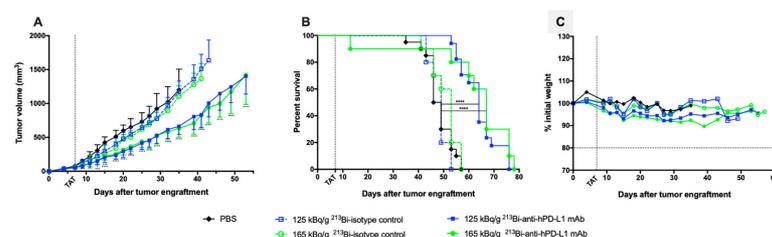


**Figure 3.** Dose-escalation study of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1. Naive NSG mice ( $n = 3$  per group) received an i.v. injection of 125 (■), 165 (●), 205 (△), 335 (□), 395 (○) kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb. (A) Kaplan–Meier survival analysis. (B) Mean weight variation in each group, as expressed as percent of initial weight. Activities ranging from 205 to 395 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb induced acute toxicity as demonstrated by weight loss > 20% of initial weight and resulting in mouse sacrifice. Animals surviving acute toxicity were followed for a 100-day period before euthanasia. (C) Platelet, (D) RBC counts, as well as (E) plasma FLT3-Ligand and (F) urea concentrations were monitored for each animal before injection of radiolabeled anti-hPD-L1 mAb (T0) and at end point. Each sample was assessed in duplicate. Bar represents the median. Activities ranging from 205 to 395 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb induced significant toxicity on platelets (\*  $p = 0.0297$ , \*\*  $p = 0.0023$ , \*\*\*  $p = 0.0001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), bone marrow (\*  $p = 0.0163$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), and kidneys (\*  $p = 0.0297$ , \*\*  $p = 0.0045$ ). Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Sidak’s multiple comparison test.

### 3.3. Assessment of TAT Efficacy Using $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb in M113<sup>PD-L1+</sup> Melanoma Xenograft Model

We first confirmed that anti-hPD-L1 mAb without modification or radiolabeling had no impact on tumor growth or survival in our preclinical melanoma model by treating M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma tumor bearing mice with 20 and 100  $\mu\text{g}$  of mAb, which were, respectively, 3- to 16-fold the amount of mAb used in TAT experiments (Figure S3). Then,

7 days after subcutaneous graft of M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma cells, when tumors reached an average volume of 80 mm<sup>3</sup>, TAT was performed by i.v. injection of 125 or 165 kBq/g of <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb. Control groups included treatment with 125 or 165 kBq/g of IgG2bκ isotype control radiolabeled with bismuth-213 or injection of 100 μL PBS. TAT efficacy was determined based on tumor growth and survival. Mice treated with 125 and 165 kBq/g of <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb demonstrated a significant and similar tumor growth delay compared to mice treated with the radiolabeled isotype control at 125 or 165 kBq/g or to the PBS control mice (Figure 4A). No difference was observed between these 3 control groups with respect to tumor growth.

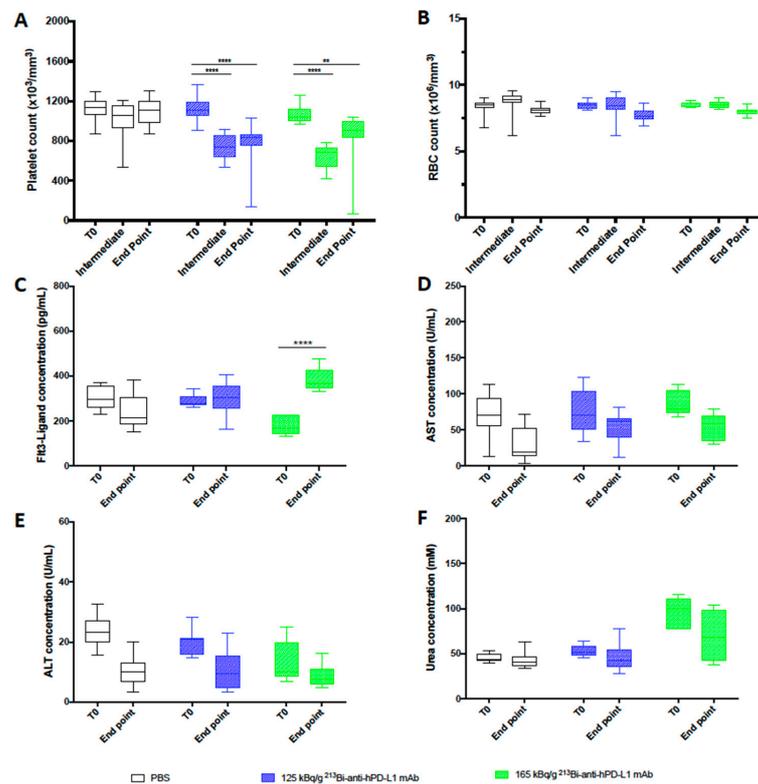


**Figure 4.** Targeted alpha-particle therapy (TAT) efficacy using <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb in M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma xenograft model. At day 0, NSG mice were engrafted subcutaneously with  $1 \times 10^6$  M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma cells. At day 7, TAT was performed by i.v. administration of 125 kBq/g <sup>213</sup>Bi-Anti-hPD-L1 mAb (■,  $n = 17$ ), 165 kBq/g <sup>213</sup>Bi-Anti-hPD-L1 mAb (●,  $n = 10$ ), 125 kBq/g <sup>213</sup>Bi IgG2b isotype control (□,  $n = 10$ ), 165 kBq/g <sup>213</sup>Bi IgG2b isotype control (○,  $n = 10$ ), or PBS for control animals (◆,  $n = 20$ ). (A) Tumor volume, represented by mean and SD, was determined sequentially from engraftment until signs of tumor necrosis or volume reached 2000 mm<sup>3</sup> and animals were sacrificed. Compared to PBS and isotype control groups, TAT significantly delayed tumor growth in mice treated with 125 kBq/g <sup>213</sup>Bi-Anti-hPD-L1 mAb or 165 kBq/g <sup>213</sup>Bi-Anti-hPD-L1 mAb (\*  $p = 0.0313$ , \*\*\*  $p = 0.0007$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparison test. (B) Kaplan–Meier survival analysis. TAT with 125 kBq/g and 165 kBq/g <sup>213</sup>Bi-Anti-hPD-L1 mAb significantly increased survival (MS = 64 and 67 days, respectively) compared to PBS control group (MS = 47.5 days, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). Survival was not significantly different in both isotype control groups compared to PBS control group. The  $p$ -values were determined by log-rank test. (C) Mean weight variation in each group is expressed as percent of initial weight.

More precisely, a few days after TAT and throughout the follow up, M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma development was significantly delayed in mice injected with 125 and 165 kBq/g of <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb compared to PBS control group (\*\*\*\*  $p < 0.0001$  for both groups). This impact on tumor progression resulted in improved survival (Figure 4B). Median survival was indeed 64 and 67 days in the groups treated with TAT at 125 and 165 kBq/g of <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb, respectively, compared to PBS control group (MS = 47.5 days, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) or compared to each relevant <sup>213</sup>Bi-IgG2bκ isotype control group at 125 kBq/g (MS = 49 days, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) or 165 kBq/g (MS = 53 days, \*\*\*  $p = 0.0008$ ). No significant survival difference was observed between the two groups treated with TAT using radiolabeled anti-hPD-L1 mAb. In addition, weight follow up, as assessed by percentage weight variation compared to initial body weight, did not demonstrate any major variation between the groups treated with radiolabeled mAb or receiving only PBS (Figure 4C). However, one mouse died early after injection of 165 kBq/g of <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb due to undefined reasons, which implies that this activity may induce acute toxicity. All these results demonstrate that TAT using bismuth-213 and targeting PD-L1 was efficient in this melanoma preclinical model and suggest that optimal treatment activity was 125 kBq/g.

### 3.4. Toxicity after TAT Using $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb in M113<sup>PD-L1+</sup> Melanoma Xenograft Model

Hematologic toxicity was assessed in animals treated with TAT at 125 and 165 kg/g of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb and in PBS control animals. Platelets and RBC counts were evaluated before tumor engraftment (T0), 20 to 28 days after TAT (intermediate), and at the end point. As already observed during the dose escalation study, we noted a significant decrease in platelet numbers in both groups treated with TAT 20 to 28 days after injection of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), and the amount of platelets was not restored at the end point (\*\*  $p = 0.0023$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) (Figure 5A).



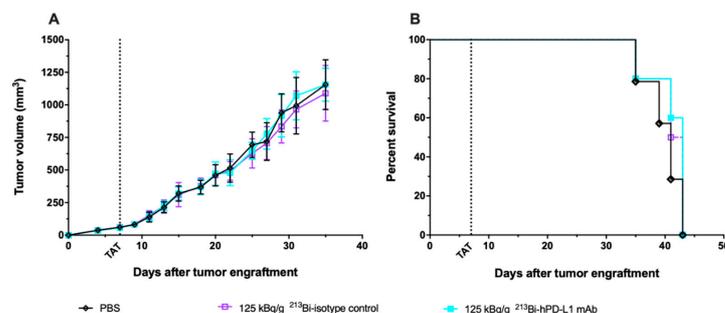
**Figure 5.** Toxicity study after TAT using  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb in M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma xenograft model. (A) Platelet and (B) RBC counts, as well as plasma (C) FLT3-Ligand, (D) AST, (E) ALT, and (F) urea concentrations were assessed in animals receiving TAT treatment with 125 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -Anti-hPD-L1 mAb (■), 165 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -Anti-hPD-L1 mAb (■) or receiving PBS (□). CBC were performed before TAT (T0), 20 to 28 days after TAT (Intermediate), and at end point. Other toxicity parameters were assessed in duplicate before TAT (T0) and at end point. Box extends from the 25th to 75th percentiles, line represents the median and the whiskers go down to the smallest value and up to the largest. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test (\*\*  $p = 0.0023$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

TAT had no impact on RBC count (Figure 5B). Toxicity to bone marrow, liver, and kidneys was also investigated in the mice treated with TAT or receiving only PBS at the end point to compare with status before xenograft (T0). Dosing of Flt3-Ligand in plasma showed a significant increase of its concentration at the end point in animals treated with

165 kBq/g (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ) of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb (Figure 5C). We observed a similar toxicity with 165 kBq/g of  $^{213}\text{Bi}$ -isotype control mAb (data not shown). These data are consistent with the dose escalation study results and confirmed that TAT targeting PD-L1 induced some bone marrow toxicity, especially at 165 kg/g, and reinforced the use of 125 kBq/g for therapy. No increase was observed for AST, ALT, or urea after TAT, attesting that this treatment and the activities selected did not impair liver or kidney function (Figure 5D–F).

### 3.5. Assessment of $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb Efficacy in M113<sup>WT</sup> Melanoma Xenograft Model

Based on anti-tumor response and toxicity study, the previous results demonstrated that TAT should be performed with 125 kBq/g. To confirm that the TAT efficacy we observed was a result of a specific tumor targeting, we repeated the same experiment in mice engrafted with M113<sup>WT</sup> melanoma tumors that did not express PD-L1. Seven days after M113<sup>WT</sup> tumor graft, animals were treated with either 125 kBq/g of  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb or  $^{213}\text{Bi}$ -IgG2b isotype control, and control animals received 100  $\mu\text{L}$  of PBS. In this experiment, tumor growth and survival appeared identical in all the groups independent of the treatment received by the animals (Figure 6). These data demonstrate that TAT efficacy in the M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma xenograft model was indeed achieved because of PD-L1-specific tumor targeting.



**Figure 6.** TAT using  $^{213}\text{Bi}$ -anti-hPD-L1 mAb in PD-L1 negative M113<sup>WT</sup> melanoma xenograft model. At day 0, NSG mice were grafted subcutaneously with  $1 \times 10^6$  M113<sup>WT</sup> melanoma cells that did not express PD-L1. At day 7, TAT was performed by i.v. administration of 125 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -Anti-hPD-L1 mAb (■,  $n = 10$ ), 125 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$  IgG2b isotype control (□,  $n = 10$ ), or PBS for control animals (◇,  $n = 14$ ). (A) Tumor volume, represented by mean and SD, was determined sequentially from engraftment until signs of tumor necrosis or volume reached 2000  $\text{mm}^3$  and animals were sacrificed. No difference was observed in tumor growth between the different groups. (B) Kaplan–Meier survival analysis. Treatment with 125 kBq/g  $^{213}\text{Bi}$ -Anti-hPD-L1 mAb or  $^{213}\text{Bi}$  IgG2b isotype control had no impact on survival (MS = 43 and 42 days, respectively) compared to PBS control group (MS = 41 days).

## 4. Discussion

Melanoma has a high metastatic potential, which makes it the most aggressive and lethal cutaneous cancer. Over the past decade, the development of ICI therapies with blocking antibodies directed against anti-CTLA-4, anti-PD-1, and anti-PD-L1 has totally changed the fate of metastatic melanoma patients thanks to their impressive therapeutic efficacy. However, the objective response rate remains limited to 40%, which means that other therapeutic strategies are still needed [40,41]. TAT is one of the promising treatment strategies currently being developed in oncology [44]. TAT combines the toxicity of an alpha-particle emitter and the specificity of a vector that can be immunologic. Comparison of TAT and TRT with beta particle emitters labelling the same vector, in preclinical and clinical studies, has demonstrated the superiority of alpha-particle emitters in terms of

efficacy [45]. These results are related to the physical characteristics of alpha-particles (high LET, short linear path limiting the toxicity to the surrounding healthy tissues) and the fact that their efficacy is not affected by hypoxia or cell cycle status [33].

In this study, we developed and investigated the efficacy of TAT targeting PD-L1 antigen in a preclinical melanoma xenograft model. PD-L1 appeared indeed a very interesting target, as already mentioned, because of its expression on the cell surface of the tumor cells and within the tumor microenvironment, increasing the amount of antigen to target but also because several antibodies are already available for clinical application [19–21]. For such purpose, we used a human melanoma cell line expressing stable cell surface PD-L1, M113<sup>PD-L1+</sup>, after transfection of a parental cell line derived from a melanoma patient metastasis, M113<sup>WT</sup> [46]. This transfection was indispensable since melanoma cells lose expression of PD-L1 after in vitro culture without IFN $\gamma$ —that is, the main inducer of its expression on tumor cells [13]. PD-L1 expression on M113<sup>PD-L1+</sup> cells and tumors appeared heterogeneous. Such heterogeneity is commonly observed between melanoma patients but also between the different tumor sites within a patient [47]. Despite this heterogeneity, TAT was efficient, which implies that any radiolabeled anti-hPDL1 mAb bound to one cell expressing PD-L1 would be able to destroy the few surrounding tumor cells, and that targeting is feasible regardless of the total amount of antigenic sites in the tumor. In B lymphoma, TRT using radiolabeled anti-CD20 mAbs (Bexxar<sup>®</sup> and Zevalin<sup>®</sup>) have demonstrated high clinical efficacy in relapsed or refractory patients, and Zevalin<sup>®</sup> appeared significantly more efficient than immunotherapy with rituximab, with an overall survival rate of 80 vs. 56% ( $p = 0.002$ ) and a complete response rate of 30 vs. 16% ( $p = 0.04$ ) [48]. Because of TRT's unique mechanisms of action, clinical use of a radiolabeled anti-PD-L1 mAb could be of great interest to overcome the limitations observed with current ICI therapies. Considering the short half-life of alpha emitters, such as bismuth-213 (45 min) or astatine-211 (7 h), anti-PD-L1 TAT could also be used in combination with nivolumab to improve anti-tumor response.

It has been recently shown in vitro and in vivo that PD-L1 expression on a tumor is transiently increased after irradiation and, in particular, when DNA-double strand breaks are induced [49–51]. Therefore, it would be interesting to confirm by molecular imaging or other means if TAT with <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb can induce upregulation of PD-L1 expression and then investigate fractionated TAT to further improve treatment efficacy.

One of the major limitations of our xenograft model is the animal immunodeficiency, which is preventing, on the one hand, analysis of TAT impact on the immune cells that constitutively express PD-L1, and, on the other hand, analysis of endogenous immune response. Concerning TAT toxicity, the study by Josefsson et al. is providing interesting dosimetric data. They demonstrated that the spleen was expected to receive the highest activity deposit, followed by the tumor, liver, and thymus and that the dose-limiting organ would be the bone marrow [31]. This supports the feasibility of targeting PD-L1 with TAT since the spleen is not considered as a vital organ, the liver is quite a radioresistant organ, and thymus function is reduced in adults. Concerning the impact on endogenous immune response, it would be interesting to use an immunocompetent melanoma tumor model. Alternatively, since combination therapies may provide synergistic effects and better tumor control, we are currently investigating the potential of combining TAT with <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb and adoptive transfer of tumor-specific T-cells in the same preclinical human melanoma model.

## 5. Conclusions

This study showed that TAT targeting PD-L1 in a human melanoma xenograft model was associated with efficient anti-tumor response, as demonstrated by significant delay in tumor growth and improved survival with minimal hematologic toxicity. This demonstrates that anti-PD-L1 antibodies could be used as theranostics in molecular imaging to select patients for ICI therapy and assess response to treatment but also in TAT to target the tumor and its stroma.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/6/1256/s1>, Table S1: Analysis of tumor proliferation. Figure S1: PD-L1 expression on M113PD-L1+ and M113WT melanoma cells in vitro, Figure S2: Binding affinity of unlabeled anti-hPD-L1 and 213Bi-anti-hPD-L1 mAbs on M113PD-L1+ melanoma cells. Figure S3: M113PD-L1+ melanoma xenograft tumor growth and survival after immunotherapy with unlabeled anti-hPD-L1 mAb.

**Author Contributions:** Conceptualization, M.C. (Marisa Capitaio), J.P., S.S., E.S., N.L., Y.G., and J.G.; animal experiments, M.C. (Marisa Capitaio), J.P., S.G., N.C., and J.G.; methodology, M.C. (Marisa Capitaio), J.P., S.S., S.G., N.C., and J.G.; resources, F.B. and A.M.; data curation, M.C. (Marisa Capitaio), L.R.-V., and J.G.; writing—original draft preparation, M.C. (Marisa Capitaio) and J.G.; writing—review and editing, M.C. (Marisa Capitaio), J.P., S.S., S.G., N.C., F.B., A.M., L.R.-V., M.C. (Michel Chérel), E.S., N.L., Y.G., and J.G.; supervision, E.S., N.L., Y.G., and J.G.; funding acquisition, M.C. (Michel Chérel), E.S., N.L., Y.G., and J.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was funded by La Ligue Contre le Cancer, the Labex IGO (ANR-11-LABX-0016-01), the Labex IRON (ANR-11-LABX-0018-01) programs, and the ArronaxPlus Equipex (ANR-11-EQPX-0004) funded by the French Government “Investissements d’Avenir” program, managed by the French National Research Agency (ANR). M.C. was supported by a grant from the Labex IGO program (ANR-11-LABX-0016-01). A.M. and F.B. are supported by the European Commission.

**Institutional Review Board Statement:** Animals were housed and bred at the UTE animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, license number: B-44-278). Experiments were approved by the local veterinary committee (APAFIS #7915 and APAFIS #7823) and carried out in accordance with relevant guidelines and regulations.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Acknowledgments:** We thank Noémie Joalland, Catherine Maurel, and Sylvia Lambot for expert assistance in in vivo experiments. We thank Patricia Le Saëc for expert assistance in radiolabeling. We thank Séverine Marionnaud-Lambot, Simon Stute and the CIMA imaging facility for expert technical assistance in PET imaging. We thank the UTE animal facility (SFR Santé), the Cytometry facility “CytoCell” (SFR Santé), the Radioactivity platform (SFR Santé), and the cell and tissue imaging core facility “Micropicell” (Université de Nantes) for expert technical assistance. We thank the cyclotron Arronax for supply of copper-64.

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

## References

- Freeman, G.J.; Long, A.J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L.J.; Malenkovich, N.; Okazaki, T.; Byrne, M.C.; et al. Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1027–1034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Dong, H.; Zhu, G.; Tamada, K.; Chen, L. B7-H1, a Third Member of the B7 Family, Co-Stimulates T-Cell Proliferation and Interleukin-10 Secretion. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 1365–1369. [[CrossRef](#)]
- Yamazaki, T.; Akiba, H.; Iwai, H.; Matsuda, H.; Aoki, M.; Tanno, Y.; Shin, T.; Tsuchiya, H.; Pardoll, D.M.; Okumura, K.; et al. Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC. *J. Immunol.* **2002**, *169*, 5538–5545. [[CrossRef](#)]
- Francisco, L.M.; Salinas, V.H.; Brown, K.E.; Vanguri, V.K.; Freeman, G.J.; Kuchroo, V.K.; Sharpe, A.H. PD-L1 Regulates the Development, Maintenance, and Function of Induced Regulatory T Cells. *J. Exp. Med.* **2009**, *206*, 3015–3029. [[CrossRef](#)]
- Sunshine, J.C.; Nguyen, P.L.; Kaunitz, G.J.; Cottrell, T.R.; Berry, S.; Esandrio, J.; Xu, H.; Ogunrtsova, A.; Bleich, K.B.; Cornish, T.C.; et al. PD-L1 Expression in Melanoma: A Quantitative Immunohistochemical Antibody Comparison. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 4938–4944. [[CrossRef](#)]
- Pawelczyk, K.; Piotrowska, A.; Ciesielska, U.; Jablonska, K.; Gletzel-Plucinska, N.; Grzegorzolka, J.; Podhorska-Okolow, M.; Dziegiel, P.; Nowinska, K. Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance According to Clinicopathological Factors and Diagnostic Markers. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 824. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Mittendorf, E.A.; Philips, A.V.; Meric-Bernstam, F.; Qiao, N.; Wu, Y.; Harrington, S.; Su, X.; Wang, Y.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Akcakanat, A.; et al. PD-L1 Expression in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **2014**, *2*, 361–370. [[CrossRef](#)]
- Noman, M.Z.; Desantis, G.; Janji, B.; Hasmim, M.; Karray, S.; Dessen, P.; Bronte, V.; Chouaib, S. PD-L1 Is a Novel Direct Target of HIF-1 $\alpha$ , and Its Blockade under Hypoxia Enhanced MDSC-Mediated T Cell Activation. *J. Exp. Med.* **2014**, *211*, 781–790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

9. Herbst, R.S.; Soria, J.-C.; Kowanetz, M.; Fine, G.D.; Hamid, O.; Gordon, M.S.; Sosman, J.A.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Gettinger, S.N.; et al. Predictive Correlates of Response to the Anti-PD-L1 Antibody MPDL3280A in Cancer Patients. *Nature* **2014**, *515*, 563–567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Barach, Y.S.; Lee, J.S.; Zang, X. T Cell Coinhibition in Prostate Cancer: New Immune Evasion Pathways and Emerging Therapeutics. *Trends Mol. Med.* **2011**, *17*, 47–55. [[CrossRef](#)]
11. Wu, Y.; Chen, W.; Xu, Z.P.; Gu, W. PD-L1 Distribution and Perspective for Cancer Immunotherapy-Blockade, Knockdown, or Inhibition. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 2022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Spranger, S.; Spaepen, R.M.; Zha, Y.; Williams, J.; Meng, Y.; Ha, T.T.; Gajewski, T.F. Up-Regulation of PD-L1, IDO, and T(Regs) in the Melanoma Tumor Microenvironment Is Driven by CD8(+) T Cells. *Sci. Transl. Med.* **2013**, *5*, 200ra116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Garcia-Diaz, A.; Shin, D.S.; Moreno, B.H.; Saco, J.; Escuin-Ordinas, H.; Rodriguez, G.A.; Zaretsky, J.M.; Sun, L.; Hugo, W.; Wang, X.; et al. Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 1189–1201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Taube, J.M.; Anders, R.A.; Young, G.D.; Xu, H.; Sharma, R.; McMiller, T.L.; Chen, S.; Klein, A.P.; Pardoll, D.M.; Topalian, S.L.; et al. Colocalization of Inflammatory Response with B7-H1 Expression in Human Melanocytic Lesions Supports an Adaptive Resistance Mechanism of Immune Escape. *Sci. Transl. Med.* **2012**, *4*, 127ra37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Barshous, I.B.; Smallwood, C.A.; Siemens, D.R.; Graham, C.H. A Mechanism of Hypoxia-Mediated Escape from Adaptive Immunity in Cancer Cells. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 665–674. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Blank, C.; Gajewski, T.F.; Mackensen, A. Interaction of PD-L1 on Tumor Cells with PD-1 on Tumor-Specific T Cells as a Mechanism of Immune Evasion: Implications for Tumor Immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **2005**, *54*, 307–314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Mu, C.-Y.; Huang, J.-A.; Chen, Y.; Chen, C.; Zhang, X.-G. High Expression of PD-L1 in Lung Cancer May Contribute to Poor Prognosis and Tumor Cells Immune Escape through Suppressing Tumor Infiltrating Dendritic Cells Maturation. *Med. Oncol.* **2011**, *28*, 682–688. [[CrossRef](#)]
18. Gao, Q.; Wang, X.-Y.; Qiu, S.-J.; Yamato, I.; Sho, M.; Nakajima, Y.; Zhou, J.; Li, B.-Z.; Shi, Y.-H.; Xiao, Y.-S.; et al. Overexpression of PD-L1 Significantly Associates with Tumor Aggressiveness and Postoperative Recurrence in Human Hepatocellular Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15*, 971–979. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Socinski, M.A.; Jotte, R.M.; Cappuzzo, F.; Orlandi, F.; Stroyakovskiy, D.; Nogami, N.; Rodríguez-Abreu, D.; Moro-Sibilot, D.; Thomas, C.A.; Barlesi, F.; et al. Atezolizumab for First-Line Treatment of Metastatic Nonsquamous NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *378*, 2288–2301. [[CrossRef](#)]
20. Baker, M.; Cordes, L.; Brownell, I. Avelumab: A New Standard for Treating Metastatic Merkel Cell Carcinoma. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **2018**, *18*, 319–326. [[CrossRef](#)]
21. Antonia, S.J.; Villegas, A.; Daniel, D.; Vicente, D.; Murakami, S.; Hui, R.; Kurata, T.; Chiappori, A.; Lee, K.H.; de Wit, M.; et al. Overall Survival with Durvalumab after Chemoradiotherapy in Stage III NSCLC. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2342–2350. [[CrossRef](#)]
22. Brahmer, J.R.; Tykodi, S.S.; Chow, L.Q.M.; Hwu, W.-J.; Topalian, S.L.; Hwu, P.; Drake, C.G.; Camacho, L.H.; Kauh, J.; Odunsi, K.; et al. Safety and Activity of Anti-PD-L1 Antibody in Patients with Advanced Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2455–2465. [[CrossRef](#)]
23. Topalian, S.L.; Hodi, F.S.; Brahmer, J.R.; Gettinger, S.N.; Smith, D.C.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Carvajal, R.D.; Sosman, J.A.; Atkins, M.B.; et al. Safety, Activity, and Immune Correlates of Anti-PD-1 Antibody in Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2443–2454. [[CrossRef](#)]
24. Topalian, S.L.; Sznol, M.; McDermott, D.F.; Kluger, H.M.; Carvajal, R.D.; Sharfman, W.H.; Brahmer, J.R.; Lawrence, D.P.; Atkins, M.B.; Powderly, J.D.; et al. Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients with Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 1020–1030. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Gandini, S.; Massi, D.; Mandalà, M. PD-L1 Expression in Cancer Patients Receiving Anti PD-1/PD-L1 Antibodies: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2016**, *100*, 88–98. [[CrossRef](#)]
26. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Schadendorf, D.; Dummer, R.; Smylie, M.; Rutkowski, P.; et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 23–34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Hodi, F.S.; Chesney, J.; Pavlick, A.C.; Robert, C.; Grossmann, K.F.; McDermott, D.F.; Linette, G.P.; Meyer, N.; Giguere, J.K.; Agarwala, S.S.; et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab Alone in Patients with Advanced Melanoma: 2-Year Overall Survival Outcomes in a Multicentre, Randomised, Controlled, Phase 2 Trial. *Lancet Oncol.* **2016**, *17*, 1558–1568. [[CrossRef](#)]
28. Rehman, J.A.; Han, G.; Carvajal-Hausdorf, D.E.; Wasserman, B.E.; Pelekanou, V.; Mani, N.L.; McLaughlin, J.; Schalper, K.A.; Rimm, D.L. Quantitative and Pathologist-Read Comparison of the Heterogeneity of Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Mod. Pathol.* **2017**, *30*, 340–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Kluger, H.M.; Zito, C.R.; Turcu, G.; Baine, M.K.; Zhang, H.; Adeniran, A.; Sznol, M.; Rimm, D.L.; Kluger, Y.; Chen, L.; et al. PD-L1 Studies Across Tumor Types, Its Differential Expression and Predictive Value in Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 4270–4279. [[CrossRef](#)]
30. Verhoeff, S.R.; van den Heuvel, M.M.; van Herpen, C.M.L.; Piet, B.; Aarntzen, E.H.J.G.; Heskamp, S. Programmed Cell Death-1/Ligand-1 PET Imaging: A Novel Tool to Optimize Immunotherapy? *PET Clin.* **2020**, *15*, 35–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

31. Josefsson, A.; Nedrow, J.R.; Park, S.; Banerjee, S.R.; Rittenbach, A.; Jammes, F.; Tsui, B.; Sgouros, G. Imaging, Biodistribution, and Dosimetry of Radionuclide-Labeled PD-L1 Antibody in an Immunocompetent Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Res.* **2016**, *76*, 472–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sgouros, G.; Roeske, J.C.; McDevitt, M.R.; Palm, S.; Allen, B.J.; Brill, A.B.; Song, H.; Akabani, G.; Committee, S.M.; Bolch, W.E.; et al. MIRD Pamphlet No. 22 (Abridged): Radiobiology and Dosimetry of Alpha-Particle Emitters for Targeted Radionuclide Therapy. *J. Nucl. Med.* **2010**, *51*, 311–328. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Baidoo, K.E.; Yong, K.; Brechbiel, M.W. Molecular Pathways: Targeted  $\alpha$ -Particle Radiation Therapy. *Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 530–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Allen, K.J.H.; Jiao, R.; Malo, M.E.; Frank, C.; Fisher, D.R.; Rickles, D.; Dadachova, E. Comparative Radioimmunotherapy of Experimental Melanoma with Novel Humanized Antibody to Melanin Labeled with  $^{213}\text{Bi}$  and  $^{177}\text{Lu}$ . *Pharmaceutics* **2019**, *11*, 348. [[CrossRef](#)]
35. Allen, B.J.; Raja, C.; Rizvi, S.; Li, Y.; Tsui, W.; Graham, P.; Thompson, J.F.; Reisfeld, R.A.; Kearsley, J. Intralesional Targeted Alpha Therapy for Metastatic Melanoma. *Cancer Biol. Ther.* **2005**, *4*, 1318–1324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Allen, B.J.; Singla, A.A.; Rizvi, S.M.A.; Graham, P.; Bruchertseifer, F.; Apostolidis, C.; Morgenstern, A. Analysis of Patient Survival in a Phase I Trial of Systemic Targeted  $\alpha$ -Therapy for Metastatic Melanoma. *Immunotherapy* **2011**, *3*, 1041–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Raja, C.; Graham, P.; Rizvi, S.M.A.; Song, E.; Goldsmith, H.; Thompson, J.; Bosserhoff, A.; Morgenstern, A.; Apostolidis, C.; Kearsley, J.; et al. Interim Analysis of Toxicity and Response in Phase 1 Trial of Systemic Targeted Alpha Therapy for Metastatic Melanoma. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 846–852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dong, H.; Strome, S.E.; Salomao, D.R.; Tamura, H.; Hirano, F.; Flies, D.B.; Roche, P.C.; Lu, J.; Zhu, G.; Tamada, K.; et al. Tumor-Associated B7-H1 Promotes T-Cell Apoptosis: A Potential Mechanism of Immune Evasion. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 793–800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hino, R.; Kabashima, K.; Kato, Y.; Yagi, H.; Nakamura, M.; Honjo, T.; Okazaki, T.; Tokura, Y. Tumor Cell Expression of Programmed Cell Death-1 Ligand 1 Is a Prognostic Factor for Malignant Melanoma. *Cancer* **2010**, *116*, 1757–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Hamid, O.; Molinero, L.; Bolen, C.R.; Sosman, J.A.; Muñoz-Couselo, E.; Kluger, H.M.; McDermott, D.F.; Powderly, J.D.; Sarkar, I.; Ballinger, M.; et al. Safety, Clinical Activity, and Biological Correlates of Response in Patients with Metastatic Melanoma: Results from a Phase I Trial of Atezolizumab. *Clin. Cancer Res.* **2019**, *25*, 6061–6072. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Robert, C.; Ribas, A.; Schachter, J.; Arance, A.; Grob, J.-J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M.S.; McNeil, C.M.; Lotem, M.; et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma (KEYNOTE-006): Post-Hoc 5-Year Results from an Open-Label, Multicentre, Randomised, Controlled, Phase 3 Study. *Lancet Oncol.* **2019**, *20*, 1239–1251. [[CrossRef](#)]
42. Chérel, M.; Gouard, S.; Gaschet, J.; Saï-Maurel, C.; Bruchertseifer, F.; Morgenstern, A.; Bourgeois, M.; Gestin, J.-F.; Bodéré, F.K.; Barbet, J.; et al.  $^{213}\text{Bi}$  Radioimmunotherapy with an Anti-MCD138 Monoclonal Antibody in a Murine Model of Multiple Myeloma. *J. Nucl. Med.* **2013**, *54*, 1597–1604. [[CrossRef](#)]
43. Bankhead, P.; Loughrey, M.B.; Fernández, J.A.; Dombrowski, Y.; McArt, D.G.; Dunne, P.D.; McQuaid, S.; Gray, R.T.; Murray, L.J.; Coleman, H.G.; et al. QuPath: Open Source Software for Digital Pathology Image Analysis. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 16878. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Morgenstern, A.; Bruchertseifer, F. Development of Targeted Alpha Therapy from Bench to Bedside. *J. Med. Imaging Radiat. Sci.* **2019**, *50*, S18–S20. [[CrossRef](#)]
45. Marcu, L.; Bezak, E.; Allen, B.J. Global Comparison of Targeted Alpha vs Targeted Beta Therapy for Cancer: In Vitro, in Vivo and Clinical Trials. *Crit. Rev. Oncol. Hemat.* **2018**, *123*, 7–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Marotte, L.; Simon, S.; Vignard, V.; Dupre, E.; Gantier, M.; Cruard, J.; Alberge, J.-B.; Hussong, M.; Deleine, C.; Heslan, J.-M.; et al. Increased Antitumor Efficacy of PD-1-Deficient Melanoma-Specific Human Lymphocytes. *J. Immunother. Cancer* **2020**, *8*, e000311. [[CrossRef](#)]
47. Madore, J.; Vilain, R.E.; Menzies, A.M.; Kakavand, H.; Wilmott, J.S.; Hyman, J.; Yearley, J.H.; Kefford, R.F.; Thompson, J.F.; Long, G.V.; et al. PD-L1 Expression in Melanoma Shows Marked Heterogeneity within and between Patients: Implications for Anti-PD-1/PD-L1 Clinical Trials. *Pigment. Cell Melanoma Res.* **2015**, *28*, 245–253. [[CrossRef](#)]
48. Bodet-Milin, C.; Ferrer, L.; Pallardy, A.; Eugène, T.; Rauscher, A.; Faivre-Chauvet, A.; Barbet, J.; Kraeber-Bodéré, F. Radioimmunotherapy of B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma. *Front. Oncol.* **2013**, *3*, 177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Wu, C.-T.; Chen, W.-C.; Chang, Y.-H.; Lin, W.-Y.; Chen, M.-F. The Role of PD-L1 in the Radiation Response and Clinical Outcome for Bladder Cancer. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 19740–19749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Kikuchi, M.; Clump, D.A.; Srivastava, R.M.; Sun, L.; Zeng, D.; Diaz-Perez, J.A.; Anderson, C.J.; Edwards, W.B.; Ferris, R.L. Preclinical ImmunoPET/CT Imaging Using Zr-89-Labeled Anti-PD-L1 Monoclonal Antibody for Assessing Radiation-Induced PD-L1 Upregulation in Head and Neck Cancer and Melanoma. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, e1329071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Sato, H.; Niimi, A.; Yasuhara, T.; Permata, T.B.M.; Hagiwara, Y.; Isono, M.; Nuryadi, E.; Sekine, R.; Oike, T.; Kakoti, S.; et al. DNA Double-Strand Break Repair Pathway Regulates PD-L1 Expression in Cancer Cells. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Annexe IV : Combinaison thérapeutique RIV-a anti PD-L1 et LT CD8 PD-1 KO (accepté,  
OncolImmunology, 2021)**

**Anti-tumor efficacy of a combination therapy with PD-L1 targeted alpha therapy and adoptive cell transfer of PD-1 deficient melanoma-specific human T-lymphocytes**

L Marotte<sup>1,2\*</sup>, M Capita<sup>1,2\*</sup>, C Deleine<sup>1,2</sup>, T Beauvais<sup>2,3</sup>, G Cadiou<sup>1,2</sup>, J. Perrin<sup>1,2</sup>, M Chérel<sup>4,5,6</sup>, E Scotet<sup>1,2</sup>, Y Guilloux<sup>1,2</sup>, F Bruchertseifer<sup>7</sup>, A Morgenstern<sup>7</sup>, A Jarry<sup>1,2</sup>, J. Gaschet<sup>1,2\*</sup>, N Labarriere<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Université de Nantes, CNRS, INSERM, CRCINA, F-44000 Nantes, France

<sup>2</sup> LabEx IGO “Immunotherapy, Graft, Oncology”, F-44000 Nantes, France

<sup>3</sup> Université de Nantes, CNRS, INSERM, CRCINA, CHU of Nantes, F-44000 Nantes, France

<sup>4</sup> Université de Nantes, CNRS, INSERM, CRCINA, ICO Gauducheau, F-44000 Nantes, France

<sup>5</sup> LabEx IRON “Innovative Radiopharmaceuticals in Oncology and Neurology”, F-44000 Nantes, France

<sup>6</sup> GIP Arronax, F-44800 Saint-Herblain, France

<sup>7</sup> European Commission, Joint Research Centre (JRC), Karlsruhe, Germany

\* The two first and two last authors contributed equally to this work

**\* Correspondence to :**

Nathalie Labarriere and Joëlle Gaschet, CRCINA Inserm U1232, 8 Quai Moncousu, 44007 Nantes cedex 1

nathalie.labARRIERE@inserm.fr

[joelle.gaschet@univ-nantes.fr](mailto:joelle.gaschet@univ-nantes.fr)

## Abstract

**Background:** The optimization of adoptive transfer approaches of anti-tumor T cells requires both the functional improvement of the injected T cells and the modulation of the tumor microenvironment, favoring the recruitment of these T cells and their activation. We have recently shown the therapeutic benefit of two approaches tested individually in a melanoma model: the adoptive transfer of specific T cells deficient for the expression of the inhibitory receptor PD-1, and PD-L1 targeted alpha therapy (TAT). In this study, we sought to investigate the efficacy of these two therapies combined, compared to each monotherapy, in order to evaluate the synergy between these two approaches, in the same melanoma model.

**Methods:** Here we used melanoma-specific T-cell clones, previously validated for the edition of *PDCD1* gene and with previously demonstrated superior anti-tumor activity than their wild-type counterparts, after adoptive transfer in NSG mice engrafted with PD-L1 expressing human melanoma tumors. We also used a previously validated TAT approach, using a <sup>213</sup>Bi-anti-human-PD-L1 mAb, alone or in combination with adoptive cell transfer, in the same mouse model.

**Results:** We confirmed previous results obtained with each monotherapy and documented the safety and the superior ability of a combination between the adoptive transfer of PD-1 deficient T cells and TAT targeting PD-L1 to control the growth of melanoma tumors in NSG mice.

**Conclusion:** This study provides the first proof-of-concept of the efficacy of a combination therapy using TAT, adoptive cell transfer and genomic editing of IC-coding genes.

**Keywords:** PD-1, PD-L1, Targeted alpha therapy, melanoma, adoptive cell transfer, gene editing

## Background

In advanced melanoma patients, anti-PD-1 therapy has been approved as first line of treatment<sup>1</sup>. However, despite unprecedented clinical results, the therapeutic efficacy of such approaches needs to be further improved, as around 60% of patients do not respond to monotherapy<sup>2</sup>. In this context, multiple combination therapies are currently tested in melanoma and other solid tumors, but choosing the most relevant immunotherapy based combinations depend on the presence and status of a pre-existing immune infiltrate<sup>3</sup>. Indeed, the combination of several immune checkpoint inhibitors (ICI) or ICIs with costimulatory checkpoints<sup>4,5</sup> will be more effective for hot tumors (with an active T infiltrate), while for “cold” tumors without T-cell infiltrate or with an altered T-cell infiltrate, adoptive transfer combined with ICIs would be more appropriate. This combination has been clinically tested with CAR T-cells for the treatment of refractory diffuse large B cell lymphoma<sup>6</sup> and refractory neuroblastoma<sup>7</sup>. In metastatic melanoma, the combination of adoptive transfer with cytokine-primed CTL (cytotoxic T lymphocytes)<sup>8</sup> or TIL (tumor infiltrating T lymphocytes)<sup>9</sup> with ICI also offers promising results. However, toxicities associated with the systemic use of ICIs remains a major drawback<sup>10</sup> and in this context, the use of genetically modified therapeutic T lymphocytes, inactivated for IC expression, would allow to circumvent these issues. Enhanced anti-tumor functions have already been reported for CAR-T cells and for tumor specific CTL inactivated using CRISPR/CAS9 for PD-1 expression<sup>11-13</sup>. We recently reported the enhanced anti-tumor efficacy of adoptive transfer of PD-1<sup>KO</sup> melanoma-specific T-cell clones compared to their wild-type counterpart, in a pre-clinical NSG mouse model engrafted with a human melanoma tumor expressing PD-1 ligand, PD-L1<sup>14</sup>. However, the adoptive transfer of such modified lymphocytes delayed tumor growth but did not eradicate the established tumors. Therefore, these results could be further improved by combining this treatment with another therapy, directly targeting the tumor. Among the possible therapeutic combinations, it has been shown that

the immunomodulatory effects of radiotherapy could act synergistically with immunotherapy in an immunocompetent host<sup>15</sup>.

Among radiotherapy treatments, targeted alpha particle therapy (TAT), a targeted radionuclide therapy based on alpha particle emitters delivered specifically to the tumor through a specific target is considered as a relevant anti-cancer treatment. Besides the direct cytotoxicity of ionizing radiation, it has been shown that alpha particle emitter could also modulate the immune system by inducing immunogenic cell death which could potentiate anti-tumor efficacy<sup>16,17</sup>. In a preclinical model of melanoma, the use of <sup>213</sup>Bi-anti-melanin monoclonal antibody (mAb) demonstrated significant therapeutic efficacy<sup>18</sup>. Taking advantage of the same mouse model used to demonstrate the superior efficacy of the adoptive transfer of PD-1<sup>KO</sup> melanoma-specific T-cell clones, we recently showed that TAT targeting PD-L1 significantly delayed tumor growth and improved survival, without inducing severe toxicities<sup>19</sup>.

In the present study, we sought to investigate whether the combination of a TAT therapy targeting PD-L1 with the adoptive transfer of PD-1<sup>KO</sup> melanoma-specific T-cell clones could act synergistically to eradicate established tumors.

As a proof of concept, we use the same model of NSG mice engrafted with PD-L1 expressing melanoma cells, treated with <sup>213</sup>Bi-anti-human-PD-L1 mAb in combination with the adoptive transfer of PD-1<sup>KO</sup> T-cell clones. This combined treatment was compared to each monotherapy and to control mice, and demonstrated its enhanced therapeutic efficacy.

## **Methods**

### ***Cell lines and cell culture***

Wild-type and PD-1<sup>KO</sup> Melan-A specific T-cell clones expressing the same TCR were previously described and compared for their anti-tumor potential in NSG mice<sup>14</sup>. T-cell clones were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 8% human serum, 2 mM L-glutamine (Gibco, France), 100 U/mL penicillin (Gibco, France), 0.1 mg/mL streptomycin (Gibco, France) and 150 U/mL recombinant human IL-2

(Proleukin, Novartis Pharma, France), and were regularly (every 3 weeks) amplified on irradiated feeder cells and PHA-L (1 µg/mL, Sigma, France).

M113 melanoma cell line stably expressing PD-L1<sup>20</sup> was cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Eurobio Scientific, France), 2 mM L-glutamine (Gibco, France), 100 U/mL penicillin (Gibco, France), 0.1 mg/mL streptomycin (Gibco, France) and 0.8 mg/mL of G418 antibiotic.

All the cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub> and a weekly test was performed through a HEK-Blue Detection Kit (hb-det3, Invivogen) to check the absence of mycoplasma contamination.

#### ***Radiolabeling of anti-human-PD-L1 mAb***

The GolinVivo™ purified anti-human PD-L1 mouse mAb (anti-PD-L1 mAb) was purchased from Biolegend (San Diego, CA, USA). Before <sup>213</sup>Bi radiolabeling, the anti-PD-L1 mAb was modified using SCN-CHX-A''-DTPA (Macrocyclics, Plano, TX, USA) in carbonate buffer (0.05 M, pH 8.7). After 12h incubation at 25 °C, the modified mAb was purified by HPLC on a Sephadex G200 gel-filtration column (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK). For <sup>213</sup>Bi radiolabeling, 100µg of modified anti-PD-L1 mAb was incubated with <sup>213</sup>Bi eluted from an <sup>225</sup>Ac/<sup>213</sup>Bi generator (Institute for Transuranium Elements, Karlsruhe, Germany) for 10 min at 37°C in 0.8M ammonium acetate (pH 5.3), 1.5% ascorbic acid. The resulting <sup>213</sup>Bi-labelled immunoconjugate was separated from unbound <sup>213</sup>Bi by size-exclusion chromatography using a PD-10 column (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Radiochemical purity was > 98.9 ± 1.03%, as determined by instant thin-layer chromatography silica gel (ITLC-SG).

#### ***Mouse xenograft model***

Eleven to 13-week-old female NSG mice, purchased from Charles River laboratory, with unrestricted access to food and water were kept under specific pathogen-free conditions in the UTE animal facility (SFR François Bonamy, IRS-UN, University of Nantes, license number: B-44-278). The animal experiments were approved by the local veterinary committee (APAFIS #2468 and APAFIS #7823) and performed in accordance with the recommendations established by the Ethic Committee for Animal Experiments of the University of Nantes and the FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations).

Subcutaneous xenograft tumors were established by injections of  $10^6$  of human melanoma cells (M113<sup>PD-L1+</sup>) in 100 $\mu$ L DPBS (ThermoFisher Scientific, USA) into the flank of NSG mice. Tumor cells were tested for mycoplasma and PD-L1 expression before each graft.

Seven days later, when tumor volumes reached around 80 mm<sup>3</sup>, mice were randomly allocated into the following experimental groups (Figure 1): (1) sterile DPBS, (2) ACT with  $5 \times 10^6$  WT T-cell clones in sterile DPBS, (3) ACT with  $5 \times 10^6$  PD-1<sup>KO</sup> T-cell clones in sterile DPBS, (4) TAT, (5) TAT + ACT with  $5 \times 10^6$  WT T-cell clones in sterile DPBS and (6) TAT + ACT with  $5 \times 10^6$  PD-1<sup>KO</sup> T-cell clones in sterile DPBS. At day seven, mice from groups (4), (5) and (6) were treated with TAT by *i.v.* injections (in tail vein) of 125 kBq/g <sup>213</sup>Bi-anti-hPD-L1 mAb. DPBS control group (1), and mice from groups (2) and (3) received *i.v.* injections of sterile DPBS (100  $\mu$ L). At day eight, mice from groups (2), (3), (5) and (6) were treated by *i.v.* injections (retro-orbital) of  $5 \times 10^6$  WT (groups (2) and (5)) or PD-1<sup>KO</sup> (groups (3) and (6)) T-cell clones. DPBS control group (1), and mice from group (4) received *i.v.* injections of sterile DPBS (100  $\mu$ L).

The absence of residual radioactivity on TAT-treated mice was checked before T-cell injection.

Intravenous injections of T-cell clones were repeated twice at days 15 and 22 after engraftment. Tumor burdens were measured by an electronic caliper, and the tumor volume was calculated based on the following formula: volume = (Length x Width<sup>2</sup>)/2. In addition, animal weight was measured three times a week. Mice were sacrificed taking into account the appearance of tumor necrosis, weight loss (20% of initial weight before tumor transplantation) and tumor size (> 2000 mm<sup>3</sup>), in accordance with national and international policies. Tumors were removed at the time of sacrifice. Statistical analyses were performed using two-way ANOVA multiple comparisons.

### ***Toxicity study***

Hematological toxicity was assessed by numeration of red blood cells and platelets on an automated hematology analyzer (Nihon Kohden, France). Bone marrow toxicity was assessed on plasma isolated by centrifugation (10 min at 600 $\times$  g). Each sample was assessed in duplicate. Flt3-ligand concentration was quantified by ELISA (Bio-Techne, France) following manufacturer's protocol. Statistical analysis was performed with two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.

## ***Immunohistochemistry***

Tumors were collected, formalin-fixed and paraffin-embedded. Immunohistochemistry was performed on 3  $\mu\text{m}$  paraffin sections of each tumor using anti-PD-L1 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , clone E1L3N, Cell Signaling, USA) or anti-CD3 (6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , polyclonal, Agilent, USA) primary antibodies, followed by the Peroxidase/DAB Envision detection system (Agilent, USA) on an automated platform (Dako Autostainer, USA), according to manufacturer's instructions. The sections were counterstained with Mayer's hematoxylin. As negative control, isotype antibody was used. CD3<sup>+</sup> and PD-L1<sup>+</sup> cells were quantified on whole tissue sections, with the open source software Qupath, using automatic classification and positive cell detection workflows<sup>21</sup>. Results are expressed as the percentage of positive cells relative to the total number of cells.

## **Results**

### ***Anti-tumor activity of monotherapies and combination therapies***

Anti-tumor efficacy of ACT with WT and PD-1<sup>KO</sup> T-cell clones and TAT alone or in combination was assessed in NSG mice, previously engrafted with a human melanoma cell line expressing PD-L1 (M113<sup>PD-L1+</sup>). As shown on Figure 2A and 2B, and in accordance with our previous reports<sup>14</sup>, the adoptive transfer of PD-1<sup>KO</sup> T-lymphocytes (yellow dotted lines) but not that of WT T-lymphocytes (grey dotted lines), significantly delayed tumor growth compared to the control group (black lines) ( $p < 0.0001$ ). In addition, confirming our recently published results [19], anti-PD-L1 TAT also significantly delayed tumor growth (red dotted lines,  $p < 0.0001$ ). Monotherapies with either PD-1<sup>KO</sup> T-cells or TAT both exhibited a better anti-tumor efficacy than monotherapy with WT T-cells ( $p = 0.003$  and  $p = 0.027$ , respectively). The treatment combining TAT and adoptive transfer of WT T-cells (solid grey lines) also delayed tumor growth compared to control group ( $p = 0.0002$ ), in a similar way as monotherapies either with adoptive transfer of PD-1<sup>KO</sup> T-cells or with TAT. The best result was obtained with the combination of TAT and adoptive transfer of PD-1<sup>KO</sup> T-cells (yellow solid lines), that delays tumor growth the most, both in comparison to the control group ( $p < 0.0001$ ), to groups receiving monotherapies with either WT ( $p < 0.0001$ ), PD-1<sup>KO</sup> T-cells ( $p = 0.005$ ) or TAT ( $p = 0.0016$ ) and to the group receiving the combination of TAT and WT T-cells ( $p = 0.0003$ ). These results

showed that the combination of anti-PD-L1 targeted- $\alpha$ -therapy and the adoptive transfer of tumor-specific T-lymphocytes with optimized functions resulted in a better anti-tumor efficacy compared to each monotherapy.

### ***Hematologic and bone marrow toxicity after treatment***

Hematologic and bone marrow toxicities were assessed by platelets and RBC counting on one hand and plasma Flt3-Ligand dosing on the other hand. Platelets and RBC counts were evaluated in mice before M113<sup>PD-L1+</sup> tumor graft (T0) and at time of sacrifice (end point). As shown in Figure 3, we observed a significant decrease in platelet counts at end point in all the groups treated with TAT (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). We also observed a significant decrease in RBC counts at end point in all the groups but one. Indeed, RBC drop was observed in control group treated with DPBS (\*\*  $p = 0.0004$ ), in both groups treated with melanoma specific T-cells either WT (\*  $p = 0.0398$ ) or PD-1<sup>KO</sup> (\*\*  $p = 0.0008$ ), in group treated with TAT (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ), and in group treated combination therapy consisting in TAT and PD-1<sup>KO</sup> melanoma-specific T-cells (\*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). No apparent direct relationship to the type of treatment received was observed, although the decrease appeared more pronounced in 2 of the 3 groups that received TAT. Flt3-Ligand plasma levels at T0 and at end point were not significantly different between the groups, a finding showing the absence of bone marrow toxicity.

### ***T-cell infiltration and PD-L1 expression***

Sixty hours after the last T-cell or DPBS injection, tumors were recovered and paraffin-embedded for immunohistochemical analyses.

CD3 infiltration was assessed on two tumors from groups receiving T-lymphocytes alone or in combination with TAT, 60 hours after the third injection of T-cells. As shown on Figure 4A, we observed T-cell infiltration in tumors from each of these 4 groups. Nonetheless, at this time point, no significant differences were detected between mice treated with ACT alone or with the combination therapy.

PD-L1 expression was also analyzed on tumors (n=2) from each group, 60 hours after the third T-cell (or DPBS) injection. As shown on Figure 4B, PD-L1 was homogeneously and strongly expressed on M113<sup>PD-L1+</sup> tumor cells from DPBS mice and from mice treated with adoptive cell transfer (74 to 86% of positive cells, Figure 4C). We observed a significant decrease in PD-L1 expression on tumor cells from TAT-treated mice (31% of positive cells, p=0.078), consistent with the therapy targeting PD-L1-expressing cells. Interestingly, the percentage of PD-L1 positive cells increased in the tumors from mice receiving the combination therapies, compared to TAT alone. Indeed, this percentage was around 61% in the tumors from mice treated with TAT + WT T-cells and reached 70% in the tumors from mice treated with TAT + PD-1<sup>KO</sup> T-cells, significantly higher than that detected in TAT treated mice (p=0.08). We confirmed *in vitro* that this PD-L1 transfected melanoma cell line and its wild-type counterpart were both sensitive to IFN- $\gamma$ , with a marked increase of PD-L1 expression after 48h of treatment with recombinant IFN- $\gamma$  (data not shown).

### **Discussion**

In this study, we demonstrated the better therapeutic efficacy of a treatment combining TAT targeting PD-L1 and ACT of PD-1<sup>KO</sup> T-cells compared to each monotherapy and to the combination of TAT and ACT of WT T-cells expressing PD-1. The specificity of TAT was assessed by immunohistochemical analyses documenting the decreased PD-L1 expression in TAT-treated tumors compared to control tumors (30% and 75% of PD-L1<sup>+</sup> cells, respectively). This decrease in PD-L1 expression demonstrates the specific activity

of TAT therapy on PD-L1<sup>+</sup> tumor cells. Furthermore, we also showed that adoptive transfer of PD-1<sup>KO</sup> T-cells, and to a lesser extent PD-1<sup>+</sup> T-cells (WT), resulted in increased PD-L1 expression in residual tumors after TAT compared to TAT therapy alone. This increased PD-L1 expression could result from the secretion of IFN- $\gamma$  by T lymphocytes in the tumor microenvironment, as previously described in human melanoma tumors<sup>22</sup>, indicating the migration and activation of infused T-cells, especially PD-1<sup>KO</sup> T-cells, within the tumors.

Since TAT is delivered through *i.v.* injection, some hematological toxicity related to ionizing radiation is expected. As already observed in our previous study<sup>19</sup>, platelet counts were significantly decreased in all groups treated with TAT alone or TAT in combination with melanoma specific T-cells. More surprisingly, we also observed some toxicity on RBC in all the groups but the one treated with the combination of TAT and WT melanoma specific T-cells. Although this toxicity does not appear to be directly associated with the treatment, as the same decrease was observed in the control group, it should be considered in future studies. However, this does not appear to be related to erythroblast toxicity since we did not observe any bone marrow toxicity as assessed by Flt3-Ligand levels.

We further sought to formally investigate T-cell infiltration by immunohistochemistry on tumor sections from each group of mice. We confirmed the presence of T-cell infiltration in all tumors that received ACT, but no significant quantitative differences could be shown between mono- and combined therapy conditions. This result resonates with a recent study<sup>23</sup> performed on melanoma-bearing immunocompetent mice with a combination of <sup>177</sup>Lutetium-labelled anti-melanin antibody and anti-PD-1 therapy. In this study, the combination therapy showed a superior anti-tumor efficacy compared to each monotherapy but there was no statistical difference in T-cell infiltration between the different groups. This result together with our observations suggest alternative mechanisms beyond increased T-cell infiltration that could explain the better efficacy of combination therapy, although in our setting, T-cell infiltration only depends on injected T-cells and not on the recruitment of T-cells from the endogenous repertoire. It is therefore possible that, in this setting, the superior efficacy of this combination therapy is the result of the addition of cumulative effects of each of the monotherapies alone.

Nonetheless, a methodological issue may also have contributed to the sub-optimal detection of tumor-infiltrating T-cells. Indeed, tumor removal was performed 60 hours after the last T-cell injection, instead of 48 hours as performed in our previous study<sup>14</sup>, that could be too late regarding T-cell persistence. In addition, and unlike in this first study, T lymphocytes were injected in the retro-orbital venous sinus, since after TAT injection into mice's tail vein, we anticipated that subsequent cell diffusion and circulation through this vein could be compromised. Thus, via the retro-orbital route, the kinetics of T-cell arrival at the tumor site, which was not determined, might be faster than when injected into the tail vein.

Nevertheless, PD-L1 expression level and decreased tumor growth upon combination therapy between TAT and PD-1<sup>KO</sup> T-cells strongly suggest the migration of activated T-cells at the tumor site before tumor removal, and a synergy of this therapeutic combination.

These results should be validated in an immunocompetent mouse model. Indeed, eventhough the feasibility of anti-PD-L1 TAT is supported by dosimetric studies<sup>24</sup> the use of an immunocompetent model would directly address the safety of targeting PD-L1, which is also expressed by immune cells. In this setting PD-L1 targeting could result in adverse effects and toxicity that we could not evaluate in this NSG mouse model.

Furthermore, in an immunocompetent host, it has been showed that melanin-targeted radionuclide therapy induced immune cell death, documented by increased cell surface annexin A1 and calreticulin levels<sup>25</sup>. In addition, the combination of this therapy with immune checkpoint inhibitors resulted to a better therapeutic efficacy than each monotherapy, by breaking immune tolerance. Thus, the efficacy of our combination therapy could be further improved in immunocompetent hosts, inducing an inflamed tumor microenvironment favoring the recruitment of our PD-1 deficient T-cells in a first step. In a second step, this combination therapy could also favor the recruitment of other tumor-specific T-cells, via the antigen spreading phenomenon. Indeed, epitope spreading, defined by the recruitment of endogenous T-cells specific for antigenic epitopes different from the one initially targeted, is a phenomenon already described after anti-tumor vaccination or ACT<sup>26</sup>.

To conclude, this study provides the first proof-of-concept of the efficacy of a combination therapy using TAT, adoptive cell transfer and genomic editing of IC-encoding genes. In an immunocompetent host, the antitumor efficacy of this combination therapy should be further enhanced by the induction of immunogenic cell death and recruitment of an endogenous tumor-specific T repertoire.

**Disclosures :** The authors declare no conflicts of interests

#### **Additional information**

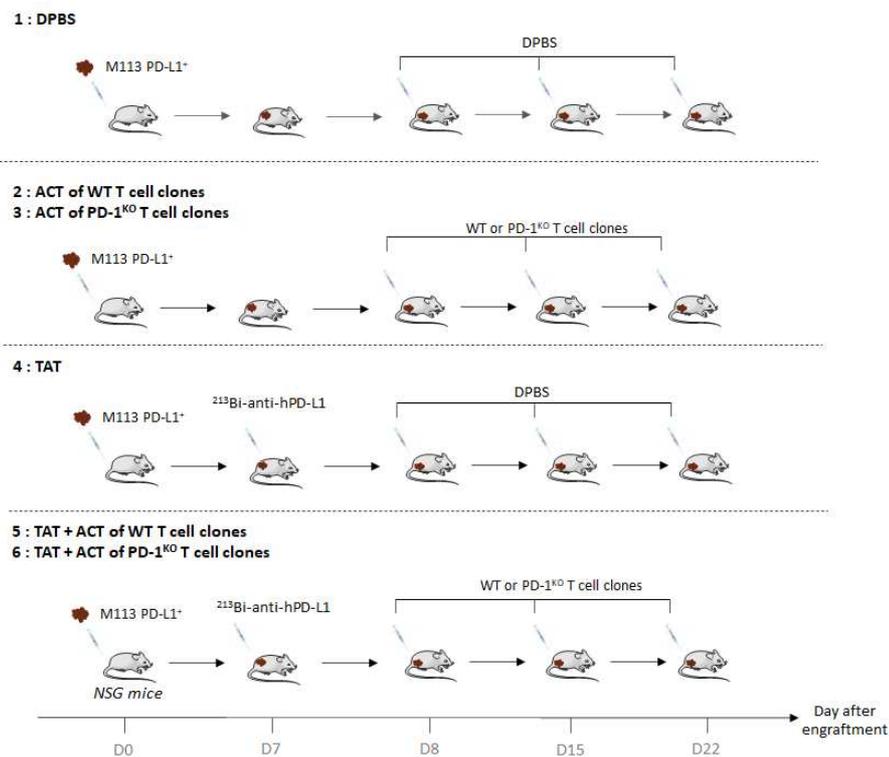
**Funding:** NL, ES and JG received a grant from the LabEX IGO program ANR-11-LABX-0016-01, NL received grants from the Ligue Régionale contre le Cancer and the BMS foundation. JG received a grant from the Ligue Régionale contre le Cancer. LM and GC were supported by a specific thesis allocation from the Ligue Nationale contre le Cancer. MCa was supported by a grant from the Labex IGO program ANR-11-LABX-0016-01. JP was supported by a grant from the French ministry of higher education and research. AM and FB are supported by the European Commission.

**Acknowledgments:** We thank Sylvia Lambot, Sébastien Gouard, Noémie Joalland, Fabienne Haspot, Véronique Daguin, and Séverine Marionnaud-Lambot for expert assistance in *in vivo* experiments. We thank Patricia Le Saec for expert assistance in radiolabeling. We thank the UTE animal facility (SFR Santé), the Cytometry facility “CytoCell” (SFR Santé), the Radioactivity platform (CRCINA - SFR Santé) for expert technical assistance.

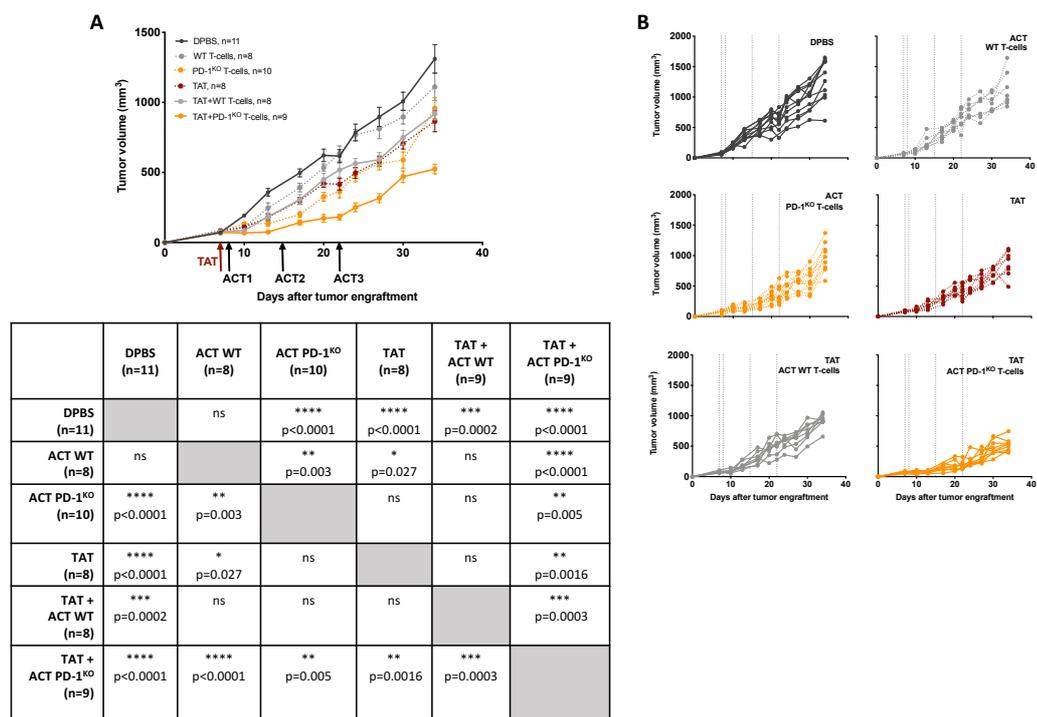
**Contributors:** Conception and design: NL, JG, ES, YG, LM, MC. Development of methodology: LM, MC, NL, JG, AJ, CD, TB, GC, JP, FB, AM. Analysis and interpretation of data: LM, MC, NL, JG, AJ. Writing and review of the manuscript: NL, LM, JG, MC, YG and MC (M. Chérel). All authors read and approved the final manuscript.

## Figure legends

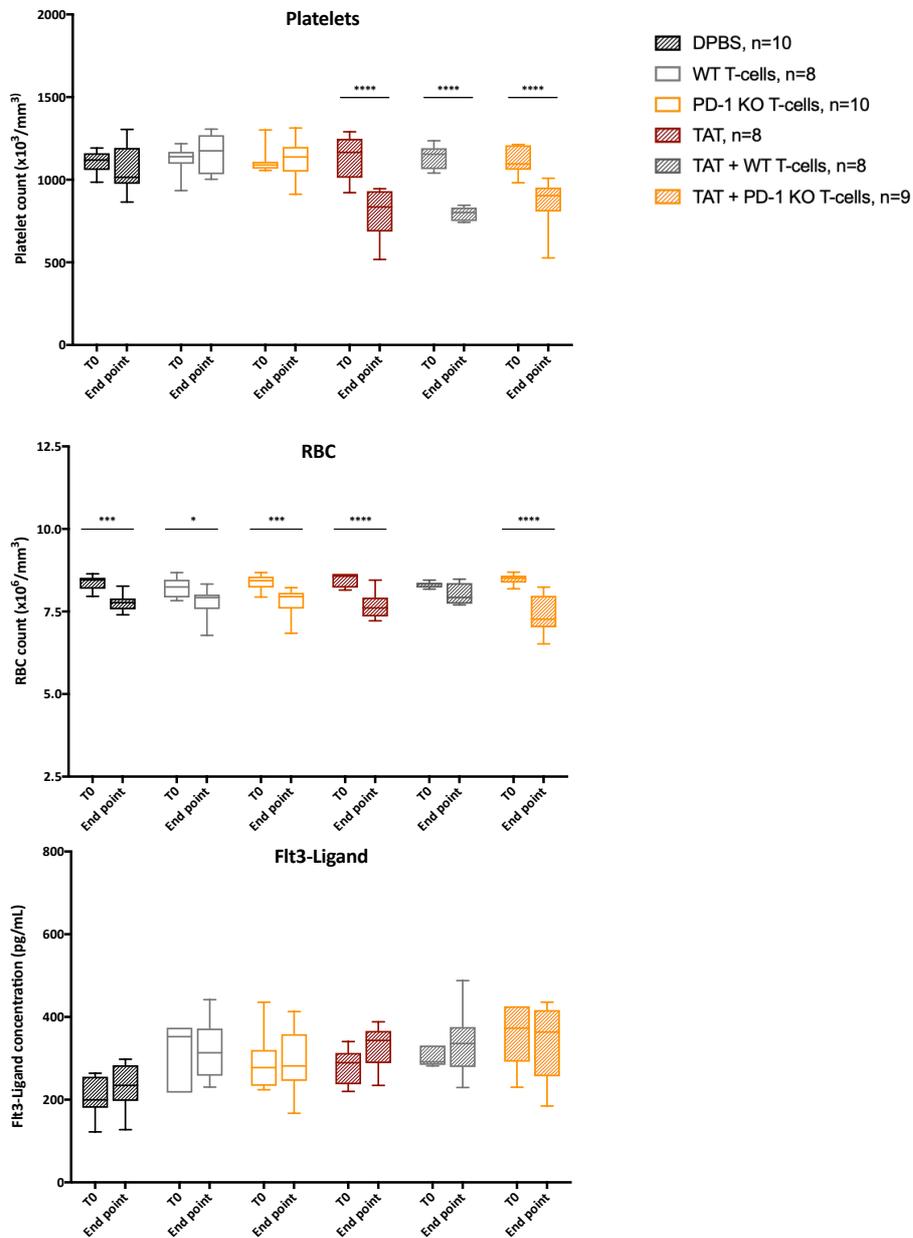
**Figure 1:** Experimental design of adoptive cell transfer, TAT, and combination therapy.



**Figure 2:** Anti-tumor efficacy of mono- and combination therapies. **A.** M113<sup>PD-L1+</sup>melanoma tumor growth curves in NSG mice receiving *i.v.* injection of DPBS (black circles), or monotherapy with either *i.v.* injections of  $5 \times 10^6$  of WT (grey circles, dotted line) or PD-1<sup>KO</sup> (yellow circles, dotted line) melanoma specific T-cells, or TAT (red circles, dotted line), or combination therapies with TAT and WT (grey circles, solid line) or PD-1<sup>KO</sup> T melanoma-specific T-cells (yellow circles, solid line). Table below the figure illustrates statistical comparisons performed using 2way ANOVA, followed by Tukey multiple comparisons test. **B.** Individual curves of M113<sup>PD-L1+</sup> melanoma tumor growth, in each group of NSG mice.

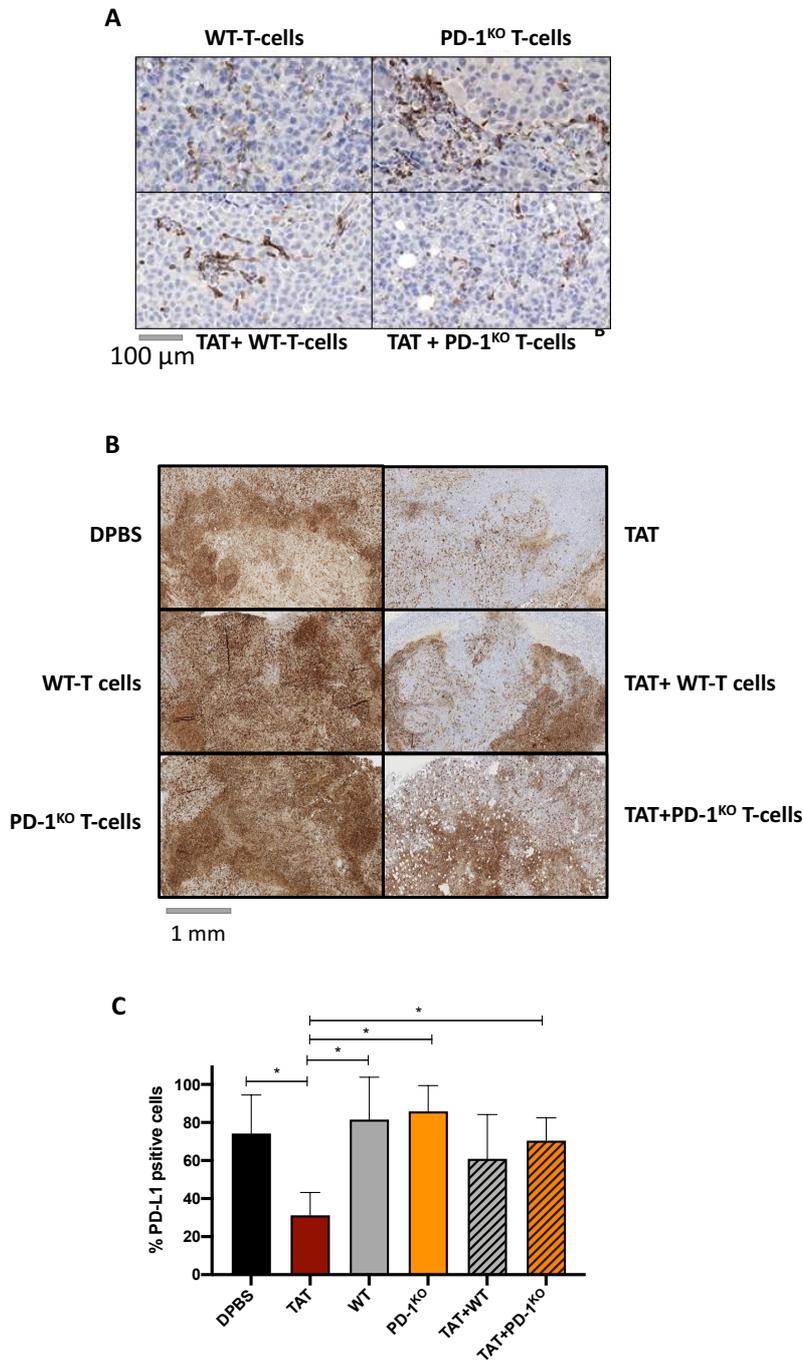


**Figure 3:** Hematologic and bone marrow toxicity after mono- and combination therapies. Platelet counts, RBC counts and plasma Flt3-Ligand concentrations were assessed at T0, before tumor engraftment and at end point, after treatment with DPBS (black boxes) or monotherapy with either *i.v.* injections of  $5 \times 10^6$  of WT (grey boxes) or PD-1<sup>KO</sup> (yellow boxes) melanoma specific T-cells, or TAT (striped red boxes), or combination therapies with TAT and WT (striped grey boxes) or PD-1<sup>KO</sup> T melanoma-specific T-cells (striped yellow boxes). Box extends from the 25th to 75th percentiles, line represents the median and the whiskers go down to the smallest value and up to the largest. Flt3-Ligand concentrations were assessed in duplicates. Statistical analyses were performed with two-way ANOVA followed by Sidak's multiple comparisons test.



**Figure 4:** T-cell infiltration of melanoma tumors. **A.** Example of immunostaining of CD3 of melanoma tumors 60hr after the third injection of T-cells. **B.** Example of PD-L1 staining of M113<sup>PD-L1+</sup> tumors from mice from each treated group. **C.** Mean percentages of PD-L1+ cells, in tumors from each group (quantified with the Qupath open-source software). Statistical comparison was performed using multiple T-tests corrected using the Holm-Sidack method (Prism software). \* p<0.1.

Fig 4



## References

1. Robert C, Schachter J, Long GV, Arance A, Grob JJ, Mortier L, Daud A, Carlino MS, McNeil C, Lotem M, et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med* 2015; 372:2521–32.
2. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med* 2015; 373:23–34.

3. Galon J, Bruni D. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. *Nat Rev Drug Discov* 2019; 18:197–218.
4. Hellmann MD, Friedman CF, Wolchok JD. Combinatorial Cancer Immunotherapies. *Adv Immunol* 2016; 130:251–77.
5. Buchan SL, Rogel A, Al-Shamkhani A. The immunobiology of CD27 and OX40 and their potential as targets for cancer immunotherapy. *Blood* 2018; 131:39–48.
6. Wang H, Kaur G, Sankin AI, Chen F, Guan F, Zang X. Immune checkpoint blockade and CAR-T cell therapy in hematologic malignancies. *J Hematol Oncol* 2019; 12:59–20.
7. Heczey A, Louis CU, Savoldo B, Dakhova O, Durett A, Grilley B, Liu H, Wu MF, Mei Z, Gee A, et al. CAR T Cells Administered in Combination with Lymphodepletion and PD-1 Inhibition to Patients with Neuroblastoma. *Mol Ther* 2017; 25:2214–24.
8. Chapuis AG, Lee SM, Thompson JA, Roberts IM, Margolin KA, Bhatia S, Sloan HL, Lai I, Wagener F, Shibuya K, et al. Combined IL-21-primed polyclonal CTL plus CTLA4 blockade controls refractory metastatic melanoma in a patient. *J Exp Med* 2016; 213:1133–9.
9. Mullinax JE, Hall M, Prabhakaran S, Weber J, Khushalani N, Eroglu Z, Brohl AS, Markowitz J, Royster E, Richards A, et al. Combination of Ipilimumab and Adoptive Cell Therapy with Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients with Metastatic Melanoma. *Front Oncol* 2018; 8:44.
10. Lamichhane P, Deshmukh R, Brown JA, Jakubski S, Parajuli P, Nolan T, Raja D, Badawy M, Yoon T, Zmiyiwsky M, et al. Novel Delivery Systems for Checkpoint Inhibitors. *Medicines (Basel)* 2019; 6:74.
11. Rupp LJ, Schumann K, Roybal KT, Gate RE, Ye CJ, Lim WA, Marson A. CRISPR/Cas9-mediated PD-1 disruption enhances anti-tumor efficacy of human chimeric antigen receptor T cells. *Sci Rep* 2017; 7:737.
12. Guo X, Jiang H, Shi B, Zhou M, Zhang H, Shi Z, Du G, Luo H, Wu X, Wang Y, et al. Disruption of PD-1 Enhanced the Anti-tumor Activity of Chimeric Antigen Receptor T Cells Against Hepatocellular Carcinoma. *Front Pharmacol* 2018; 9:1118.
13. Zhao Z, Shi L, Zhang W, Han J, Zhang S, Fu Z, Cai J. CRISPR knock out of programmed cell death protein 1 enhances anti-tumor activity of cytotoxic T lymphocytes. *Oncotarget* 2018; 9:5208–15.
14. Marotte L, Simon S, Vignard V, Dupré E, Gantier M, Cruard J, Alberge J-B, Hussong M, Deleine C, Heslan J-M, et al. Increased antitumor efficacy of PD-1-deficient melanoma-specific human lymphocytes. *J Immunother Cancer* 2020; 8:e000311.
15. Lhuillier C, Rudqvist N-P, Yamazaki T, Zhang T, Charpentier M, Galluzzi L, Dephoure N, Clement CC, Santambrogio L, Zhou XK, et al. Radiotherapy-exposed CD8+ and CD4+ neoantigens enhance tumor control. *J Clin Invest* 2021; 131.
16. Gorin J-B, Ménager J, Gouard S, Maurel C, Guilloux Y, Faivre-Chauvet A, Morgenstern A, Bruchertseifer F, Chérel M, Davodeau F, et al. Antitumor immunity induced after  $\alpha$  irradiation. *Neoplasia* 2014; 16:319–28.

17. Gorin J-B, Guilloux Y, Morgenstern A, Chérel M, Davodeau F, Gaschet J. Using  $\alpha$  radiation to boost cancer immunity? *Oncoimmunology* 2014; 3:e954925.
18. Allen KJH, Jiao R, Malo ME, Frank C, Fisher DR, Rickles D, Dadachova E. Comparative Radioimmunotherapy of Experimental Melanoma with Novel Humanized Antibody to Melanin Labeled with  $^{213}\text{Bi}$  and  $^{177}\text{Lu}$ . *Pharmaceutics* 2019; 11:348.
19. Capitaio M, Perrin J, Simon S, Gouard S, Chouin N, Bruchertseifer F, Morgenstern A, Rbah-Vidal L, Chérel M, Scotet E, et al. Anti-Tumor Efficacy of PD-L1 Targeted Alpha-Particle Therapy in a Human Melanoma Xenograft Model. *Cancers (Basel)* 2021; 13:1256.
20. Simon S, Vignard V, Florenceau L, Dreno B, Khammari A, Lang F, Labarriere N. PD-1 expression conditions T cell avidity within an antigen-specific repertoire. *Oncoimmunology* 2016; 5:e1104448.
21. Bankhead P, Loughrey MB, Fernández JA, Dombrowski Y, McArt DG, Dunne PD, McQuaid S, Gray RT, Murray LJ, Coleman HG, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. *Sci Rep* 2017; 7:16878.
22. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, Chen S, Klein AP, Pardoll DM, Topalian SL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med* 2012; 4:127ra37–7.
23. Malo ME, Allen KJH, Jiao R, Frank C, Rickles D, Dadachova E. Mechanistic Insights into Synergy between Melanin-Targeting Radioimmunotherapy and Immunotherapy in Experimental Melanoma. *Int J Mol Sci* 2020; 21:8721.
24. Josefsson A, Nedrow JR, Park S, Banerjee SR, Rittenbach A, Jammes F, Tsui B, Sgouros G. Imaging, Biodistribution, and Dosimetry of Radionuclide-Labeled PD-L1 Antibody in an Immunocompetent Mouse Model of Breast Cancer. *Cancer Res* 2016; 76:472–9.
25. Rouanet J, Benboubker V, Akil H, Hennino A, Auzeloux P, Besse S, Pereira B, Delorme S, Mansard S, D'Incan M, et al. Immune checkpoint inhibitors reverse tolerogenic mechanisms induced by melanoma targeted radionuclide therapy. *Cancer Immunol Immunother* 2020; 69:2075–88.
26. Brossart P. The Role of Antigen Spreading in the Efficacy of Immunotherapies. *Clinical Cancer Research* 2020; 26:4442–7.



# Cell Tracking in Cancer Immunotherapy

Justine Perrin<sup>1†</sup>, Marisa Capitaio<sup>1†</sup>, Marie Mougin-Degraef<sup>1,2</sup>, François Guérard<sup>1</sup>, Alain Faivre-Chauvet<sup>1,2</sup>, Latifa Rbah-Vidal<sup>1</sup>, Joëlle Gaschet<sup>1</sup>, Yannick Guilloux<sup>1</sup>, Françoise Kraeber-Bodéré<sup>1,2,3</sup>, Michel Chérel<sup>1,3</sup> and Jacques Barbet<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup> CRCINA, INSERM, CNRS, Université d'Angers, Université de Nantes, Nantes, France, <sup>2</sup> Nuclear Medicine, University Hospital, Nantes, France, <sup>3</sup> Nuclear Medicine, ICO Cancer Center, Saint-Herblain, France, <sup>4</sup> GIP Arronax, Saint-Herblain, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Anil Kumar Mishra,  
Institute of Nuclear Medicine & Allied  
Sciences (DRDO), India

### Reviewed by:

Baljinder Singh,  
Post Graduate Institute of Medical  
Education and Research  
(PGIMER), India  
Puja Panwar Hazari,  
Institute of Nuclear Medicine & Allied  
Sciences (DRDO), India

### \*Correspondence:

Jacques Barbet  
barbet@arronax-nantes.fr

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Nuclear Medicine,  
a section of the journal  
Frontiers in Medicine

**Received:** 04 March 2019

**Accepted:** 23 January 2020

**Published:** 14 February 2020

### Citation:

Perrin J, Capitaio M,  
Mougin-Degraef M, Guérard F,  
Faivre-Chauvet A, Rbah-Vidal L,  
Gaschet J, Guilloux Y,  
Kraeber-Bodéré F, Chérel M and  
Barbet J (2020) Cell Tracking in  
Cancer Immunotherapy.  
Front. Med. 7:34.  
doi: 10.3389/fmed.2020.00034

The impressive development of cancer immunotherapy in the last few years originates from a more precise understanding of control mechanisms in the immune system leading to the discovery of new targets and new therapeutic tools. Since different stages of disease progression elicit different local and systemic inflammatory responses, the ability to longitudinally interrogate the migration and expansion of immune cells throughout the whole body will greatly facilitate disease characterization and guide selection of appropriate treatment regimens. While using radiolabeled white blood cells to detect inflammatory lesions has been a classical nuclear medicine technique for years, new non-invasive methods for monitoring the distribution and migration of biologically active cells in living organisms have emerged. They are designed to improve detection sensitivity and allow for a better preservation of cell activity and integrity. These methods include the monitoring of therapeutic cells but also of all cells related to a specific disease or therapeutic approach. Labeling of therapeutic cells for imaging may be performed *in vitro*, with some limitations on sensitivity and duration of observation. Alternatively, *in vivo* cell tracking may be performed by genetically engineering cells or mice so that may be revealed through imaging. In addition, SPECT or PET imaging based on monoclonal antibodies has been used to detect tumors in the human body for years. They may be used to detect and quantify the presence of specific cells within cancer lesions. These methods have been the object of several recent reviews that have concentrated on technical aspects, stressing the differences between direct and indirect labeling. They are briefly described here by distinguishing *ex vivo* (labeling cells with paramagnetic, radioactive, or fluorescent tracers) and *in vivo* (*in vivo* capture of injected radioactive, fluorescent or luminescent tracers, or by using labeled antibodies, ligands, or pre-targeted clickable substrates) imaging methods. This review focuses on cell tracking in specific therapeutic applications, namely cell therapy, and particularly CAR (Chimeric Antigen Receptor) T-cell therapy, which is a fast-growing research field with various therapeutic indications. The potential impact of imaging on the progress of these new therapeutic modalities is discussed.

**Keywords:** cell tracking, immunotherapy, PET, SPECT, MRI, adoptive transfer, tumor microenvironment, cancer

## INTRODUCTION

The origins of immunotherapy go back to early centuries of history as illustrated by the fight against smallpox. Realization that survivors were immune to the disease eventually led to the practice of inoculation or variolation, that spread throughout Europe in the early eighteenth century. The discovery of cowpox vaccination by Edward Jenner in 1796 ultimately resulted, after a global vaccination campaign, in the eradication of the disease announced by the World Health Organization in 1977. Fighting infectious diseases with vaccines proved successful, but eradication of other diseases remains elusive. While Jonas Salk developed the first poliomyelitis vaccine in the 1950, the disease is not yet considered as eradicated and remains endemic in several African countries (1). In the meantime, the role of immunity in other pathologies has been explored and the immune system is now identified as a general defense system that distinguishes self from non-self or altered self. Its ability to recognize normal cells from infected or tumor cells has implications in cancer immune surveillance, graft rejection, and many other pathologies but can also result in autoimmune, and inflammatory diseases. It was also realized that the immune system uses an incredibly complex network of connected cellular and molecular agents, not yet fully known and understood.

The focus of this review is on anti-cancer immunotherapy as it is making impressive progress. However, the concepts can also be paralleled in other immune-mediated disorders and for conditions requiring immunotherapeutic intervention. Therapeutic antibodies and cell-based therapies, such as adoptive immunotherapy and stem-cell therapy, have been developed years ago, but, in the last few years, a more precise understanding of control mechanisms of the immune system triggered an impressive development of immunotherapy (2). Novel therapeutic approaches have recently emerged that reached clinical practice with remarkable success in a variety of cancers (3, 4). The different types of tissue injuries and the different stages of disease progression are more precisely identified, as well as the different local and systemic inflammatory responses. Monitoring the depletion, migration, and expansion of immune cells throughout the whole body should help characterizing the diseases and guiding selection of appropriate treatment regimens (5). Such methods have an important role in basic cancer research, where they serve to elucidate novel biological mechanisms. The development of effective therapeutic strategies, targeting tumor cells as well as their micro-environment, also requires the ability to determine *in vivo* the location, distribution, and long-term viability of the cell populations as well as their biological fate with respect to cell activation and differentiation.

This process is referred to as cell tracking and is not limited to therapeutic cells but includes all cells related to a specific disease or therapeutic approach, like tumor cells, immune cells or microenvironment. It involves non-invasive methods for monitoring the distribution and migration of biologically active cells in living organisms. In conjunction with various non-invasive imaging modalities, cell-labeling methods, such as exogenous labeling or transfection with a reporter gene, allow visualization of labeled cells *in vivo* in real time, as well as

monitoring and quantifying cell accumulation and function by a variety of imaging approaches. In this Review, we briefly describe the basic principles of cell-tracking methods and explain various approaches to cell tracking. Then we highlight recent examples of application of new technologies in animals, focusing on immune checkpoint inhibitor antibodies and cell-based therapies that use natural or genetically engineered T cells, dendritic cells, macrophages or stem cells, and when documented, the clinical potential of these methods.

## CELL TRACKING METHODS: LOOKING FOR CELLS IN ANIMAL OR HUMAN BODIES

Most earlier reviews on this topic have classified imaging techniques as direct or indirect labeling methods. The distinction between direct and indirect labeling is not entirely clear and here we will discuss *ex vivo* vs. *in vivo* labeling: *ex vivo* labeling include labeling cells with paramagnetic, radioactive or fluorescent tracers before injection, while *in vivo* labeling relates to *in situ* imaging cells by injecting radioactive, fluorescent, or luminescent tracers, or antibodies.

SPECT and PET imaging with labeled monoclonal antibodies has been used for years to detect cancer cells. With the development of immuno-PET, they are now used to detect, quantify and longitudinally monitor *in vivo* a variety of cells in the context of immunotherapy of cancer and other diseases (6). Using radiolabeled tracers for *in vivo* imaging will thus be discussed in this review as one of the possible methods of cell tracking.

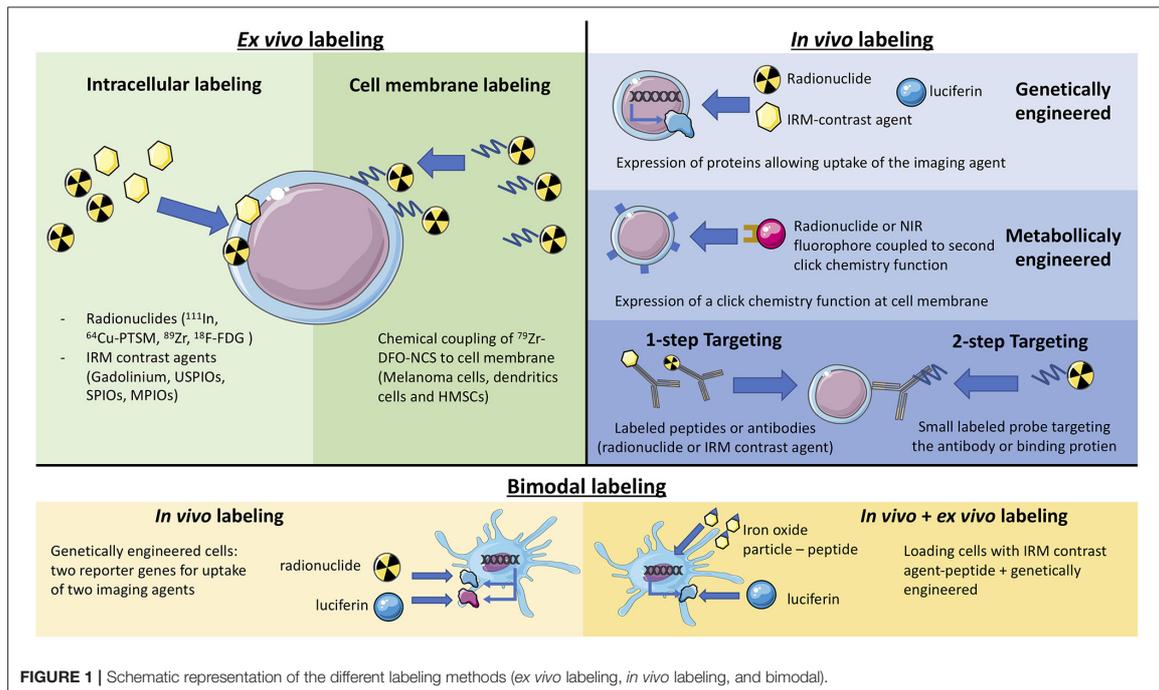
The various labeling techniques discussed in this review are presented schematically in **Figure 1**.

### Ex vivo Cell Labeling

While the administration of radiolabeled white blood cells has been a classical nuclear medicine technique for years to detect inflammatory lesions (7), new non-invasive methods for monitoring the distribution and migration of biologically active cells in living organisms have emerged. They aim at improving the detection sensitivity and allowing for a better preservation of cell activity and integrity. These methods have been the subject of many reviews (8). Labeling therapeutic cells for imaging may now be performed *in vitro* with little impact on cell function nor migration ability, with some limitations on sensitivity and duration of observation (7, 9, 10). Methods based on radioactive imaging or MRI have the highest potential for clinical imaging. They are briefly presented here in this order, highlighting recent progress.

### Radioactive (SPECT, PET)

Labeling cells with long-lived radionuclides before re-injection has been used for years in nuclear medicine routine, as mentioned above, but concerns about cell viability and maintenance of cell functions arose. Typically,  $^{111}\text{In}$ -oxine is used to label leukocytes (11). Cell labeling yield is good, but a significant efflux rate was reported, and image



**FIGURE 1 |** Schematic representation of the different labeling methods (ex vivo labeling, in vivo labeling, and bimodal).

quality is considered suboptimal with this high energy single photon emitter.

Most recent developments relate to cell labeling using positron emitters because, in human, PET imaging offers better resolution and more precise quantification compared to SPECT. Copper-64 is an interesting candidate, with good imaging properties and a relatively long half-life of 12.7 h.  $^{64}\text{Cu}$ -pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone ( $^{64}\text{Cu}$ -PTSM) was thus used to label C6 glioma cells, as the lipophilic complex is readily taken up in cells. A good cell labeling yield, but a significant efflux rate from cells was observed (12). Zirconium-89 has a half-life of 78.4 h, which is quite convenient to monitor cell trafficking over a few days after administration. Myeloma cells were labeled with  $^{89}\text{Zr}$ -oxine using a technique similar to that used for In-111 cell labeling (9). Cell labeling yield was reasonable but contrasting results for efflux rate and cell viability were reported. Sato et al. (10) reported that  $^{89}\text{Zr}$ -oxine complex readily labeled dendritic cells (DC) with an efficiency range of 13.0–43.9 and  $83.5\% \pm 1.8$  retention 5 days after labeling. In this study, it was considered that labeling did not affect the viability of mouse DCs and Cytotoxic T Lymphocytes (CTLs), nor did it affect functionality. More recently  $^{89}\text{Zr}$ -labeled CAR (Chimeric Antigen Receptor) T cells were shown to retain more than 60% of the  $^{89}\text{Zr}$  over 6 days while their capacity of *in vitro* cytokine production, migration, and tumor cytotoxicity, as well as their *in vivo* antitumor activity (13) were preserved. To further reduce efflux rate and improve viability and cell functions, labeling mixed lymphocyte cell

populations with Zr-89 radiolabeled nanoparticles was explored (14, 15).

An alternative approach to loading the radionuclide inside the cells has been proposed. It uses Zr-89-desferrioxamine-NCS, which chemically couples to the membrane of cells. Mouse melanoma cells, dendritic cells and human mesenchymal stem cells were labeled by this method, which was shown to afford stable labeling for 7 days, with little effect of on cell viability and proliferation and to allow for serial PET scans in mouse models (16).

With its fast and efficient uptake and good retention,  $^{18}\text{F}$ -labeled fluoro-2-deoxy-2-D-glucose ( $^{18}\text{F}$ -FDG) may be used to label cells *in vitro* to monitor cell traffic *in vivo*. For instance, cardiac stem cells were labeled and their biodistribution and retention was quantified in a pig model of chronic myocardial infarction (17). A potential drawback of  $^{18}\text{F}$ -FDG for assessing cell therapies following implantation is the local retention of radiotracer released from the cells. Thus, 3'-deoxy-3'-L-[ $^{18}\text{F}$ ]-fluorothymidine ( $^{18}\text{F}$ -FLT) has been proposed to label cells instead of  $^{18}\text{F}$ -FDG. Human Umbilical Endothelial Vein Cells (HUVECs) incubated with  $^{18}\text{F}$ -FLT and injected in mice with hind-limb ischemia were shown to provide a better estimation of HUVECs retention than cells labeled with  $^{18}\text{F}$ -FDG (18).

### Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Gadolinium(III) chelates, such as gadopentetate dimeglumine, are effective paramagnetic contrast agents owing to their unpaired electrons. These electrons confer a magnetic moment

that increases the relaxivity of water protons, shortens the longitudinal relaxation rate (T1) and, therefore, increases the signal by creating a positive contrast in T1-weighted MRI images (19). The amount of gadolinium that may be loaded into cells obviously limits the sensitivity. As an example, rat mesenchymal stem cells (MSC) were loaded *in vitro* with Gd-DTPA using the lipidic transfection agent Effectene. Electron microscopy detected the presence of Gd-DTPA particles in the MSCs and no difference was observed in cell viability or proliferation between the labeled and unlabeled MSCs. T1-weighted MRI was then used to detect the labeled cells *in vitro* and in the rat brain (20).

Superparamagnetic iron-oxide particles have an inherently larger effect on MRI relaxivity than soluble paramagnetic agents. Their core may contain several thousand iron atoms, which increases the local iron concentration and sensitivity. These particles may be coated with dextran, siloxan, citrate, or polymers to improve biodistribution. The superparamagnetic agent results in negative contrast in T2-weighted sequences by causing inhomogeneities in the local magnetic field and spin-spin dephasing, which shortens transverse relaxation times (21). Ultra-small superparamagnetic iron oxide (USPIO) of 10–50 nm, superparamagnetic iron oxide (SPIO) of 50–100 nm and micrometer-sized iron oxide (MPIOs) up to >1 µm particles have been used (8). Again, cell viability limits the intracellular particle concentrations and thus cell detection sensitivity. Phagocytic cells, such as dendritic cells or pancreatic islet cells, can accumulate large amounts of nanoparticles to allow for their detection in animals and patients (22). Macrophages were easily and efficiently labeled with micrometer-sized particles of iron-oxide (MPIO) *in situ* and analyzed via *ex vivo* magnetic resonance microscopy (MRM) and *in vivo* monitoring by magnetic resonance imaging (MRI). The results were confirmed by fluorescence with an anti-macrophage phenotype marker F4/80 antibody (23). Technological improvements in the sensitivity of MRI equipment afforded promising results in detecting smaller numbers of cells that are difficult to label, including T lymphocytes (24).

Chemical exchange saturation transfer has been proposed as a new mechanism for contrast enhancement in MRI (25) in diamagnetic CEST or paramagnetic CEST (PARACEST), exchangeable protons resonate at a chemical shift different from that of water. Radiofrequency applied at their frequency saturates exchangeable protons, which transfer into water and reduce MRI signal in their vicinity. Although the sensitivity is rather low, the possibility of switching the signal “on” and “off” has attracted much interest (26).

Magnetic resonance also allows for high sensitivity detection of non-radioactive fluorine (<sup>19</sup>F). Human NK cells were cultured for 24 or 48 h with a commercially available emulsified PFPE perfluorocarbon (CS-ATM-1000) under conditions where labeling had no measurable effect on cell viability and cytotoxicity against K562 leukemia cells. <sup>19</sup>F-labeled NK cells could then be detected at the site of injection and shown to migrate (27).

### ***In vivo* Labeling**

Even if *in vitro* cell labeling looks rather easy and if progress has been made, direct labeling of cells prior to injection

does not allow for long term *in vivo* imaging. Sensitivity is limited, especially for MRI, when cell viability and functionality is preserved. One drawback has been repeatedly mentioned: macrophages can take up cells or cell debris at the site of injection and migrate. The dilution of the imaging probe during cell division and its release from the cell eventually lead to the disappearance of the signal. Thus, finding alternative routes for tracking cells of interest *in vivo* has been the subject of many technical developments. One such alternative is the *in vitro* cell transfection with genes coding for transporters or enzymes as well as metabolic engineering that allow *in vivo* cell detection using various molecular imaging techniques after injection of a specific tracer.

### **Genetically Engineered Cells for Radioactive, MRI, or Bioluminescence Imaging**

To achieve long term labeling, cells can be genetically engineered to express reporter genes. This reporter gene will allow the targeting of the cells by administering an imaging probe. A stable expression of this reporter allows for a virtually unlimited number of imaging sessions, without any impact of cell division.

#### ***Radioactive imaging***

Iodine is taken up by the thyroid and by a few other tissues through the sodium-iodine symporter (NIS). Thus, cells were transfected with the NIS gene, most often the human gene (hNIS), injected and imaged by SPECT using a variety of radioactive tracers including iodine-123 (sodium iodide) and technetium-99m (sodium pertechnetate) in a variety of animal models (28). NIS may also be used for PET with iodine-124 or <sup>18</sup>F-tetrafluoroborate (29, 30). This approach was used recently to label tumor cells *in vivo* (31) and to monitor dendritic cell traffic from the skin to lymph nodes (32). This approach has some limitations, though. First, as mentioned above, NIS is expressed by a variety of normal cells, particularly in thyroid, salivary glands and stomach. Thus, imaging cells in these organs is excluded due to background signal. Second, sensitivity for the detection and quantification of transfected cells expressing NIS *in vivo* is limited because, in the transfected cells, the radioactive tracer does not become linked to tyrosine as iodine is in the thyroid.

Another reporter gene that has attracted much interest is the herpes simplex virus type 1 thymidine kinase (HSV1-tk). With this kind of genes that code for intracellular proteins, the risk of immune reactions is reduced. HSV1-tk allows for PET and SPECT using a variety of anti-viral agents specific for the virus kinase and not recognized by the human enzyme. They enter cells and become phosphorylated and trapped intracellularly only in HSV1-tk-transfected cells. Compounds such as FIAU (5-iodo-2-fluoro-2-deoxy-1-D-arabino-furanosyl-uracil), FEAU (2-fluoro-2-deoxyarabinofuranosyl-5-ethyluracil) or acycloguanosine derivatives (e.g., FPCV: fluoropenciclovir, FHBG: 9-[4-fluoro-3-(hydroxymethyl) butyl] guanine) may be labeled with <sup>18</sup>F and used for *in vivo* PET imaging. Sensitivity may be improved by using a mutated gene, HSV1-sr39tk, that codes for a more potent enzyme. HSV1-sr39tk may be used with [<sup>18</sup>F]-FHBG as a tracer (33).

In a similar approach to the transfection of cells with viral thymidine kinase, animals may be engineered to express thymidine kinases in specific cells. As an example, Rosa26-mT/sr39tk mice were generated and HSV1-sr39tk expression in platelets, T lymphocytes or cardiomyocytes was induced. Longitudinal PET imaging and quantification of T-cell homing during inflammation and cardiomyocyte viability after myocardial infarction could then be monitored using [ $^{18}\text{F}$ ]-FHBG, a cell-permeable tracer that is phosphorylated by HSV1-tk and retained inside the cells (34).

Alternatively, cells may be transfected to express cell-surface receptors for peptides as, for instance, the human glucagon-like peptide 1 receptor gene and imaged with the peptide labeled with fluorine-18 (35). A similar approach was used to detect transplanted pancreatic islet cells that express glucagon-like peptide 1 receptor (GLP-1R) by PET imaging after the injection of  $^{64}\text{Cu}$ -DO3A-VS-Cys40-Exendin-4, showing persistent and specific uptake in the mouse pancreas (36). The mutated version of the dopamine receptor, D2R80A, that internalize  $^{18}\text{F}$ -Fallypride, has also been proposed for imaging mesenchymal stem cells (37, 38).

#### Magnetic resonance imaging

Reporter-gene transfection has been proposed for MRI. The transferrin receptor has been used to capture transferrin-conjugated SPIO particles (39). Dendritic cells transfected with the ferritin gene show increased iron uptake that may be detected by MRI (40, 41). A very similar approach to the NIS system may be used for MRI, by transfecting cells with the Divalent Metal Transporter 1 (DMT1) that can import manganese (42). In the same setting, radioactive manganese ( $^{52}\text{Mn}$ ), may be used for PET imaging (43).

#### Optical imaging

Bioluminescence imaging (BLI) consists in the use of a luciferase enzyme, which reacts with its substrate, luciferin, and emits light between 480 and 600 nm, depending on the type of enzyme (firefly, Renilla, or bacterial) and substrate (44). This method implies the insertion of the luciferase gene inside the genome of the tracked cells by cell transfection during *in vitro* culture or by engineering mice to express the luciferase in target cells. In this later case, the mouse itself allow for visualizing intrinsic cells during the development of a pathology. In the case of adoptive cellular therapy, the cells can be isolated from the mouse before the adoptive transfer without need for *in vitro* transfection. Although the insertion and expression of luciferase is stable, so far adoptively transferred cells have only been followed up to a week, due to the decay of the signal. This may be linked to the death of transferred cells (45). However, after the disappearance of the BLI signal, mice were sacrificed, and histology or flow cytometry was performed. It has been reported that, although the cells are still present and express luciferase, the BLI signal is no more detectable (46). Metabolic changes may be suspected as luciferases need energy and cofactors. Due to this lack of sensitivity, BLI is very often associated with another reporter gene, like Green Fluorescent Protein (GFP), which allow

the *ex vivo* detection by flow cytometry or immunostaining of the organs.

Indeed, these reporter genes are most of the times not used alone but in association, either to enhance the signal (39) or to confirm its specificity by a different imaging approach (47, 48). Most of these proteins are endogenous and not toxic (dopamine receptor, NIS, ferritin). They can be expressed naturally in some organs of the human body, limiting their use. On the other side, inducing their expression in cells implies a possible impact on the functions of the cells.

Animals may also be made to express fluorescent proteins or luciferase in specific cells. This approach has been extensively developed for many different studies, including oncogenesis and cancer therapy (49). For instance, the photoconvertible fluorescent protein Kikume green-red protein was used to track dendritic cells *in vivo*. The KikGR protein changes its color from green to red upon UV illumination. Then, migration of dendritic cells, specifically CD103<sup>+</sup> dendritic cells, from the skin to lymph nodes could be monitored after UV illumination of the skin of knock-in mice expressing the protein (50).

#### Metabolically Engineered Cells and Click Chemistry

Metabolic engineering and click chemistry (also known as bio-orthogonal chemistry) takes advantage of fast and high yield chemical reactions that may take place in aqueous media and even *in vivo*. A variety of chemical reagents have been developed that allow for highly specific reactions that are not hindered by biological conditions. Cells of interest were labeled by glycoengineering and bioorthogonal click chemistry by incubation *in vitro* with tetra-acetylated N-azidoacetyl-D-mannosamine to generate unnatural sialic acids with azide groups on their surface. The cells may then be injected *in vivo* and detected by the second click chemistry reagent, coupled to a fluorochrome such as dibenzyl cyclooctyne-conjugated Cy5 (DBCO-Cy5) for near-infrared fluorescence imaging or to iron-loaded nanoparticles for MRI (51). This approach was shown to improve labeling efficacy and to reduce false signals generated by macrophage phagocytosis of *in vitro* labeled cell debris. It does not require genetic modifications. So far, this approach has only been used for near-Infrared fluorescence (NIR) with stem cells and tumor cells (52, 53). Although NIR imaging is non-toxic and cheap, its limited spatial resolution and poor penetration through tissue complicate its use in clinical imaging.

#### Indirect Methods: Labeled Antibodies and Tracers

Labeled antibodies may be used to detect cells *in vivo* by SPECT, PET, or NIR fluorescence. They have mainly been used for tumor diagnosis, staging or tumor response monitoring (54). It has been reported that labeled antibodies allow the tracking of T cells *in vivo* (55).

The first step is to choose the target antigen. Ideally, this antigen should be exclusively expressed on target cells, but most of the time other tissue also express it. For T lymphocytes, many targets have been tested, e.g., CD3, CD8, CD2, and CD7 (56–58).

Once the target is chosen, the antibody must be radiolabeled. Ideally, the radionuclide has a half-life compatible with the biological half-life of the antibody. In human,  $^{89}\text{Zr}$  and  $^{64}\text{Cu}$ ,

with half-lives of 78.4 and 12.7 h, respectively, have been used for PET imaging. The radiolabeling method also has an important impact on the quality of the images, since free radionuclide can lead to enhanced background noise, or worse, false positive signal in normal organs, where the target antigen is not expressed. For instance,  $^{89}\text{Zr}$  shows a natural tropism to the bone (59) that can impede the tracking of bone marrow cells.

Multistep labeling techniques using antibodies have been developed to improve target to normal tissues ratio. Among these pretargeting approaches, the affinity enhancement system (AES) has been shown to be an excellent method for *in vivo* tumor imaging by SPECT and PET (60). Recently, new pretargeting approaches have been developed. One is based on the *in vivo* formation of an oligonucleotide duplex. A first oligonucleotide analog (e.g., peptide nucleic acid or PNA) is coupled to an antibody or a small binding protein (e.g., an anti-HER2 Affibody) for pretargeting of a radiolabeled complementary oligonucleotide analog (61). Another approach is based on bio-orthogonal chemistry (62). The CC49 antibody recognizing the tag72 antigen derivatized with trans-cyclooctene (TCO) was used for pretargeting  $^{111}\text{In}$ -labeled DOTA-dipyridyltetrazine, demonstrating fast and high tumor activity uptake and high tumor to muscle ratio in a mouse model. Using small binding proteins such as diabodies or affibodies instead of intact IgG antibodies improves the pretargeting performances for PET (62, 63). Pretargeting may also be applied to NIR fluorescence imaging (63).

The feasibility of detecting cells *in vivo* using MRI and contrast agents targeted using antibodies or antibody fragments has been tested. Magnetic iron oxide nanoparticles were coated with ethylene oxide polymers and coupled to a ScFv targeting the epidermal growth factor receptor. The product showed a long blood circulation time and low accumulation in liver and spleen. Although *in vitro* binding and internalization was specific, 24 h after administration to mice bearing EGFR-positive breast cancer 4T1 mouse mammary tumors, MRI signal reduction resulting from uptake of the reagents in the tumor was observed but this signal reduction was equivalent for the targeted and the control products (64). More recently, the same approach was improved by site-selective scFv conjugation to SPION PEG nanoparticles. *In vivo*, the decrease of MR signals in HER2<sup>+</sup> xenograft tumor was about 30% at 24 h after the injection, while non-targeted SPION PEG nanoparticles showed no effect (65).

### Bi(multi)Modal Imaging

Multimodality approaches deserve specific attention, even if they are generally limited to preclinical studies. Not only can they combine various imaging modalities, such as radioactive, MRI or optical imaging, but also *ex vivo* and *in vivo* labeling as well as post-mortem studies. Thus, bimodal systems have emerged that combine magnetic resonance imaging (MRI) or PET with fluorescence or bioluminescence.

Genetically engineered dendritic cells (DC) have been developed for MRI. Proteins which have an affinity for iron compounds may be used as MRI reporters. In a recent study, DC were engineered to express human ferritin heavy chain (FTH), which chelates iron and acts as an endogenous MRI

contrast agent, and GFP genes to allow both fluorescence and MRI cell tracking (40). Reporter genes can also be an enzyme like the *Drosophila melanogaster* 2'-deoxynucleoside kinase (Dm-dNK) that phosphorylates native deoxynucleosides and a wide range of synthetic nucleoside analogs, including fluorescent nucleosides (66). In this study, the fluorescent nucleoside analog, 2'-deoxycytidine (pyrrolo-dC), generated highly specific CEST MRI signal and fluorescence for bimodal imaging (67).

DC can be loaded by phagocytosis of an antigen labeled with an MRI contrast agent (68). It is possible to effectively load DC with multifunctional polymeric nanoparticles. Nanoparticles composed of iron oxide bearing the OVA antigen coupled to a NIR fluorophore (MNP-OVA) allowed the monitoring of the migration of DCs to lymph nodes in DC adoptive transfer immunotherapy using NIR fluorescence imaging and MRI (69).

PET tracking of genetically engineered DC in combination with bioluminescence has also been developed. In a study, DC were made to express both human NIS and efflux genes. DC migration is then made possible by using  $^{18}\text{F}$ -tetrafluoroborate (TFB), a substrate for the NIS reporter gene. Bioluminescence imaging is performed to confirm PET results (32). A combination of PET and Cerenkov luminescence has also been described (70).

Non-phagocytic regulatory T cells (Tregs) have been imaged *in vivo* after transduction by human NIS and the fluorescent protein mCherry. NIS expressing Tregs were labeled *in vitro* with technetium-99m pertechnetate ( $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ) and imaged *in vivo* in C57BL/6 mice by SPECT/CT. After 24 h, Tregs were detected in the spleen and the bimodal labeling confirmed their localization by organ biodistribution studies and flow cytometry (71). In a similar way, bone marrow stem cells were labeled with gadodiamide (Omniscan), a non-ionic complex of gadolinium, using the fluorescent Arrest-In transfection reagent (72).

Nanoparticle systems can integrate therapeutic and imaging agents in a single formulation. They may be particularly useful as multimodal imaging agents. They have been used to deliver these agents through passive or active targeting to cells *in vitro* and *in vivo*. The different kinds of such nanoparticles, which include polymeric nanoparticles, micelles, liposomes and dendrimers and their potential applications in cancer immunotherapy, and immune cell tracking have been reviewed in detail (73).

### CELL TRACKING ACHIEVEMENTS: WHAT HAPPENED IN CELL TRACKING OVER THE LAST TEN YEARS?

New methods have been developed, but has *in vivo* cell tracking advanced (cancer) immunotherapy? *In vivo* imaging has the potential to contribute as a drug development tool to improve the understanding of complex mechanisms of action, as a tool to improve efficacy, for example, by stratifying patients as possible responders or non-responders, and as a non-invasive treatment response biomarker to guide immunotherapy and recognize early signs of loss of efficacy. In cell therapy, a series of questions are asked about the delivery of the cells, their viability, differentiation of proliferation, as well as about the immune responses they may trigger. At this point, preclinical studies have been numerous,

but transfer to the clinic remains quite limited (74). This part of the review aims at providing a non-exhaustive survey of achievements in cell tracking using the current tracking methods summarized in **Table 1**.

## Investigating the Tumor and Its Microenvironment

The evaluation of tumor volume and demonstration of tumor shrinkage remains the basis for tumor response assessment with the so-called RECIST criteria. It can be easily performed by CT-scans or MRI when the lesions are measurable, which is by far not always the case. In addition, tumor shrinkage may be delayed and some effective treatments (e.g., some kinase inhibitors) do not result in prominent tumor volume changes. Alternative response criteria, PERCIST, have been proposed (86). In addition, new imaging technologies offer possibilities to look at tumor lesions not as a non-descript mass of tumor cells, but as a complex body of interacting cells of different origins.

### Imaging Tumor Cellular Composition

Measuring the relative number of tumor cells in the tumor lesion before and after treatment, may be useful in response assessment. Highly specific markers are needed. For instance, compounds that target melanin biosynthesis (benzamides) (87) and metallopeptides (88) binding to melanocortin type 1 receptor (labeled MSH analogs) have been used in melanoma, but many other labeled molecules, including antibodies, labeled for SPECT and PET, have shown high imaging performances in terms of sensitivity and specificity (89, 90).

### Imaging TILs

Monitoring the phenotype and function of tumor infiltrating lymphocytes has long been recognized to be important in adoptive tumor cell therapy (91). This was achieved, in animals as well as in human, by the administration of radiolabeled tracers, usually antibodies or analogs, and SPECT or PET. For example,  $^{64}\text{Cu}$ -labeled diabody specific for CD8 was used to assess CD8 T cell density in tumors in mice and treatment related changes (92). Whole antibodies, labeled with zirconium-89 afford similar results (56). Many target antigens have been tested in animal models (56, 58) and CD7 seems so far to be the best candidate to target T lymphocytes, with the lowest toxicity (56).

Surprisingly, in patients, immuno-PET has not been used to detect lymphocytes in tumors, other than through their expression of immune checkpoints, as discussed below. However, labeled IL-2 has been used to visualize lymphocyte infiltrating tumors (77, 93). In a pilot study, patients with metastatic melanoma receiving ipilimumab (IPI) or pembrolizumab (PEMBRO) were subjected to SPECT/CT imaging with  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled interleukin-2 in an attempt to detect TILs. In 5 patients (2 treated with IPI and 3 with PEMBRO), metastatic lesions could be visualized with a positive correlation between size and  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-IL2 uptake, both before and after 12 weeks of therapy (93).

Texture analysis and radiomics may also, without administration of tracer, provide molecular information about infiltration of lymphocytes in tumors. In cancer patients,

evidence of for the presence of CD3 T cells in tumors have been obtained by MRI texture analysis (94) and for the presence of CD8 T cells by CT radiomics and Artificial Intelligence analysis (95).

## Macrophages

Macrophages are tissue-resident cells of the innate immune systems that perform a variety of functions in host tissue repair and maintenance of homeostasis. Macrophages are associated with auto-immune and inflammatory diseases and, in oncology, one of the tumor escape factors is the presence of pro-tumor macrophage, tumor-associated macrophages (TAM) that support tumor growth (96). *In vivo* studies have analyzed the biological role and migration of macrophages using different imaging methods such as fluorescent imaging (97), PET, MRI, and multimodal imaging. Macrophages migration to the inflammatory site after an induction of inflammation was analyzed by *in vitro* labeling with radioactive iodide-embedded gold nanoparticles (RIe-AuNPs) and PET imaging (76). During inflammatory disease such as arthritis, atherosclerotic plaques, *in vivo* staining of the macrophage with  $^{111}\text{In}$ - or  $^{64}\text{Cu}$ -labeled antibodies allowed imaging follow-up, evaluation of therapeutic efficacy and therapy adaption (98, 99). For acute or chronic obstructive pulmonary disease, the recruitment of macrophages was monitored by labeling with amine-modified PEGylated dextran-coated SPIO and MRI (81).

In oncology, macrophages are an important part of the tumor microenvironment and thus a therapeutic target. Indeed, the presence of TAM favors tumor escape. In order to assess their presence in tumors and to analyze the efficacy of therapy, these cells were tracked by immuno-SPECT using  $^{111}\text{In}$ -labeled anti F4/80 (100) antibody, by MRI using the contrast agents MPIO (82) and ultra-small iron oxide nanoparticles (USPIO) (101), by BLI in transgenic luciferase mice (84) or by multimodal imaging combining MRI and BLI (85). PET imaging using labeled ligands targeting receptors overexpressed in macrophages, such as the Translocator protein (peripheral benzodiazepine receptor), has also been proposed (80).

## Imaging Tumor Metabolic Activity

$^{18}\text{F}$ -FDG is the most commonly used radiopharmaceutical for imaging tumor metabolism in clinical practice. Its use is based on the increased glycolytic rate in tumors compared to physiologic cells, known as the Warburg effect. However, inflammatory and other metabolically active effector immune cells may contribute to activity uptake in tumor lesions (102). By contrast, lesions with high numbers of proliferative tumor cells are  $^{18}\text{F}$ -FDG avid, whereas low  $^{18}\text{F}$ -FDG avid lesions have been shown by immunohistology to be infiltrated by activated immune cells. As a result,  $^{18}\text{F}$ -FDG is not considered as a marker of immune response and new markers such as amino acids, nucleotides, choline, and receptor ligands have been studied. In hematolymphoid tissues, however, increased levels of deoxycytidine kinase (DCK) expression is found; DCK is the rate-limiting step in the deoxycytidine salvage pathway. The tissue-specific expression of this enzyme allows

**TABLE 1** | Current tracking cell methods in pre-clinic, depending on the type of labeling (direct, indirect, and transgene) and the modality of imaging (TEP/SPECT, MRI, BLI/fluorescence, and multimodal imaging).

	Direct labeling			Indirect labeling				Transgene			
	Radioactive/ contrast agent	Cell type	References	Radioactive/ contrast agent	Targeting molecule	Cell type	References	Transgene	Radioactive/ contrast agent	Cell type	References
TEP/SPECT	Zirconium 89	Dendritic cells	(10)	Copper-64 and Zirconium-89	Radiolabeled antibody anti	Tumor- infiltrated lymphocytes	(56, 77–79)	Transporter NIS GLP-IR	18F -tetra fl uorobora te Copper- 641abeled peptide	Dendritic cells and tumor cells Pancreatic cells	(31, 32) (36)
		T cell	(10, 14– 16, 75)		CDS, CD7, PDI, CD3						
	Indium-111 Cuivre-64 18-FDG	Leukocytes	(11)	Indium-111	anti HER2 affibody rituximab	Tumor cells	(61) (62) (63)	D2R80A HSV-tk	18F-Fallypride Fluor-18	Stem cells T cells and cardiomyocytes	(37, 38) (34)
		Glioma cells	(12)		anti TAG72 diabody						
		Cardiac stem cells	(17) (18)		Diolabeled antibody anti F4						
18F-FLT Rie-AuNPs	HUVECs Macrophages	(76)	Lutetium-177  Carbon-11		Macrophages	(80)					
MRI	SPIO	Dendritic cells	(22)	Iron nanoparticles	Click chemistry	Stem cells	(53)	Transferrin receptor	SPIO particles	Human Mesenchymal Stem Cells Dendritic cells	(39) (40, 41)
		Macrophages	(81)								
	T cells	(24)									
	Gadolinium- DTPA MPIO, USPIO Fluorine-19	MSC Macrophages NK cells	(20) (23, 76, 82) (27)								
BLI/fluorescence				ManNaz and DBCO	Click chemistry	Stem cells  Tumor cells	(52, 53) (63)	Luciferase  Kikume green- red		Stem cells T cells Macrophage Dendritic cells	(34, 46) (83) (84, 85) (50)
Multimodal	Fluorescence+ MRI	Dendritics cells :ex vivo labeling tumor peptide	(69)					Fluorescence+ MRI: DMdNk protein PET+BLI:NIS TEP/IRM: transporteur DMTI PET+ fluorescence: NIS and mcherry gene	CEST MRI  18 tetrafluoroborate Manganese-52	Genetically engineered DC  Human stem cells Regulatory T cells	(66, 67) (32, 70) (43) (71)

more specific targeting by, for example,  $^{18}\text{F}$ -2-fluoro-D-(arabinofuranosyl)cytosine ( $^{18}\text{F}$ -FAC), which has been shown to accumulate preferentially in  $\text{CD8}^+$  T cells and in innate immune cells in mice (103).

$^{18}\text{F}$ -labeled 3-fluoro-3-deoxythymidine ( $^{18}\text{F}$ -FLT) is trapped intracellularly after phosphorylation by thymidine kinase 1 (TK-1) but is not incorporated into DNA since  $^{18}\text{F}$ -FLT-monophosphate is a very poor substrate of thymidylate kinase (TMPK). Imaging with  $^{18}\text{F}$ -FLT has been evaluated to show proliferation more specifically (18), but effector immune cells that infiltrate tumors are mostly of a differentiated phenotype and do not proliferate. Thus,  $^{18}\text{F}$ -FLT uptake in the lymph nodes of vaccinated patients only increased in the presence of antigen-loaded DC, providing the first clinical demonstration that immune responses induced by antigen-specific therapy can be imaged *in vivo* (102).

In bladder cancer, and presumably in other cancers, correlations have been observed between tumor  $^{18}\text{F}$ -FDG uptake and expression of PD-1/PD-L1 (104). Such a correlation may be useful for the selection of appropriate therapeutic strategies.

### Immune Checkpoint Inhibitors: Assessment of Immune Status in Tumor Lesions

Immunotherapy agents do not directly attack tumors but reactivate the immune system by targeting adaptive or innate immunity. Immuno-oncology has been revolutionized by the introduction of immune checkpoint inhibitors (ICI) and the approval of ipilimumab in 2011. ICI are monoclonal antibodies targeting immuno-regulatory molecules on the surface of T cells, antigen-presenting cells, and neoplastic cell populations. Clinical success of reagents blocking the CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4, CD152) and PD-1/PD-L1 checkpoints (programmed cell death protein 1, CD279; programmed death-ligand 1, CD274) has driven rapid regulatory approval for treatment of patients with both solid and hematologic malignancies (105). Patients treated with immune checkpoint inhibitors (ICI) have objective response rates of 20–40% for solid tumors, lymphomas, and malignant melanomas. Thus, 60% of patients do not respond to treatment. It may of course be expected that patients with tumors presenting a higher load of tumor infiltrating lymphocytes (TIL) are more likely to respond to anti-PD-1/PD-L1 check point inhibitors (106).

A detailed understanding of the tumor microenvironment, including the identification and quantification of different immune cell subsets, their spatial context, and the expression of these immune checkpoint markers is obviously required to go further with these new therapies (107). Changes in immune cell infiltration and biomarker expression before and after therapeutic intervention are critical parameters for clinical development (108). Thus, assessment of PD-L1 expression by IHC has emerged as an important predictive biomarker for patients with various cancers including non-small cell lung cancer (NSCLC) and renal cell cancer (78).

Immuno-detection using antibodies labeled with zirconium-89 or copper-64 for PET, as well as indium-111 for SPECT,

has been used to assess the CTLA-4 and PD-1 status of TIL *in vivo* and the expression of PD-L1 by tumor cells in order to predict the therapeutic efficacy of the administration of immune checkpoint inhibitors in mice and in human (79, 109–111). This approach was also proposed in the context of anti CTLA-4 therapy (107). Based on tumor biopsies, it appears that some patients with PD-L1-negative tumors show clinical benefit of anti-PD-L1 treatment. Thus, a zirconium-89-labeled anti-PD-L1 antibody (atezolizumab), was used to image 22 cancer patients before atezolizumab therapy. High PET signal was observed in lymphoid tissues and inflammation sites. In tumors, high but heterogeneous and variable across tumors uptake was observed and clinical responses could be better correlated with PET than with immunohistochemistry or other biomarkers (112).

In mice, the presence of  $\text{CD8}^+$  T-cells was monitored using  $^{89}\text{Zr}$ -labeled an anti-CD8 single domain antibody after treatment of B16 melanoma with an anti-CTLA-4, showing that response correlated with the homogeneity of the distribution of  $\text{CD8}^+$  T-cells through the tumors (58). In mice with B6-F10 syngeneic melanoma, an anti-mouse PD-1 antibody labeled with copper-64 showed tumor uptake (79).

### Monitoring the Activation and Expansion of Immune Effector Cells

Activation and expansion of the immune system may be monitored by imaging changes in the expression of various receptors to cytokines and growth factors as well as changes in the amounts of interstitial water resulting from inflammation. Immune cell trafficking is another aspect of immune system activation.

#### Imaging Immune Cell Activation

Several examples may be found in preclinical and clinical studies. In mice, an antibody against the cytokine  $\text{IFN}\gamma$ , which becomes sequestered at the surface of tumor cells after its production by T lymphocytes, was shown to reflect the activation status of cytotoxic T cells (113).

Reactive lymph nodes also express and secrete chemokines that induce immune cells relocation. Among others, the CCR7 chemokine and chemotactic agents, which play a key role in directing cell trafficking, are suitable imaging targets. For example, CXCL12 is a key chemotaxis factor for lymphocytes with expression of the CXCR4 receptor on their cell membrane (114). PET tracers targeting CXCR4 were thus used in cardiovascular disease and infections. Interestingly, Radiolabeled CXCR4 ligands are also very effective for cancer cell imaging (e.g.,  $^{68}\text{Ga}$ -labeled pentixafor) and CXCR4-trageting therapeutics labeled with  $^{177}\text{Lu}$  are currently under clinical development (114).

Activation of the immune system also results in VEGF release and, subsequently, in significant lymph node volume increase. Lymph node volume can be measured using various techniques including MRI, CT, and ultrasound. Ultrasound imaging using targeted microbubbles improves the evaluation of the microvasculature (115). Dynamic contrast-enhanced (DCE)-MRI using gadolinium (Gd) or USPIO-based contrast agents may also be used to monitor angiogenesis: expansion of lymph

node size, total blood flow and blood volume, permeability of perfused capillaries, and total surface of perfused capillaries. MRI measures of vascularity using iron-based contrast agents have been validated against histology, the gold standard in angiogenesis assessment. Diffusion-weighted (DW)-MRI detects metastatic lymph nodes (116) and may be able to image reactive LNs in immune responses.

Imaging the expression of VEGF receptor may also be a way to monitor the activation of endothelial cells in LN resulting from immunotherapy. This was achieved in preclinical models by using anti-VEGFR (bevacizumab) labeled with indium-111 for SPECT (117) or by using RGD peptides labeled with various radionuclides for SPECT and PET imaging (118, 119). These approaches have shown potential in mice, for instance, to image inflammation-induced expansion and regression of lymphatic networks by PET, they have not yet been translated into human.

Changes that occur in the tumor due to an increased immune response can also be imaged using MRI, for example through changes in relaxation times, contrast, or apparent diffusion coefficient (120). These changes have been shown to correlate with conventional histological measures in mice after treatment by transferred cytotoxic T cells that expressed a modified TCR specific for a tumor antigen.

### Imaging Trafficking of Immune Effector Cells

Antigen presenting cells (APC) are cells of the immune system that present pathogen peptides linked to class I or class II major histocompatibility complex (MHC) molecules to T lymphocytes (TL) to initiate adaptive immune responses. They are dendritic cells (DC), macrophages, and B lymphocytes. Analyzing antigen capture, migration to the lymph nodes and antigen presentation by APC started with fluorescently labeled cells using *in vivo* intravital optical imaging (121, 122). Regardless of the microscope type used, this system remains an invasive process, limited in depth penetration and restricted to a specific area of the body. Thus, APC trafficking has been monitored mostly by MRI and, more recently, tracking methods using PET have been reported. Either the cells or mice are genetically engineered, or labeled antigens are loaded *in vivo* or *ex vivo* into APC thanks to their phagocytic capacity. DC may be loaded *ex vivo* with pathogen peptides or irradiated tumor cells and reinjected to the patient. As an alternative, vaccination using labeled irradiated tumor cells or inactivated pathogens have been used to quantify antigen capture and delivery to lymph nodes by MRI (123).

Imaging lymphocyte trafficking is most easily achieved with *ex vivo* labeled cells. Transfused cells often traffic initially to the lungs, bone marrow, liver, and spleen. In mice, labeling Th1 cells with  $^{64}\text{Cu}$ -PTSM was shown to permit their detection in single LNs and to monitor T-cell homing *in vivo* over 48 h (117). Changes in cell trafficking resulting from treatments with cyclophosphamide or IL-12 may be monitored by *in vivo* imaging. A similar method, using zirconium-89, was used to monitor  $\gamma\delta$  T-cells homing into tumor lesions in mice (75). IL13R $\alpha$ 2-CAR T cells delivered intraventricularly were detectable by PET for at least 6 days throughout the central nervous system and within intracranial tumors. When

intravenously administered, PSCA-CAR T cells also showed tumor tropism, with a nine-fold greater tumor-to-muscle ratio than for CAR-negative T cells. Bone marrow uptake of  $^{89}\text{Zr}$ -labeled hematopoietic stem cells could also be monitored in mice (124) and bone marrow cell uptake in acute fractures in mice could be inhibited, rather than accelerated, by a CXCR4 antagonist, plerixafor (125).

The use of reporter gene expression is another way to study cell trafficking, because imaging is independent of factors lifetime and distribution of the tracer and an enzymatic reporter allows for amplification of a weak signal. Antigen-specific T-cells were made to express a viral Tk gene could be tracked in mice, over a period of 3 weeks, using an  $^{18}\text{F}$ -tagged probe specific to this variant of Tk. Detection of  $10^4$  T cells was claimed (67).

Lymphocytes may also be imaged by targeting cell surface markers.  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled IL-2 was used to detect tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma patients (77, 93). Non-depleting  $^{111}\text{In}$ -labeled anti-CD4 antibodies have been used to track CD4 $^{+}$  T cells by SPECT in mice with good correlation with pathologic measures (126). *In vivo*  $^{19}\text{F}$  MRI was also used to track homing to draining lymph nodes of T cells that were intracellularly labeled *ex vivo* with a perfluoropolyether (PFPE) nanoemulsion (127). Time-lapse  $^{19}\text{F}$  MRI was used to calculate the number of T-cells in lymph nodes over 21 days and correlated with *in vitro* fluorescence measurements to compensate for *in vivo* T-cell division. MRI also allowed visualization of CD8 $^{+}$  cytotoxic T cells, regulatory T cells, and myeloid-derived suppressor cells loaded with to monitor the effect of vaccination. Increased recruitment of cytotoxic T cells and decreased recruitment of myeloid-derived suppressor cells and regulatory T cells to the tumor was observed (128).

## Cell-Based Therapies

### Earlier Results in Cell-Based Therapy

So far, most clinical studies have used  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  or  $^{111}\text{In}$  or superparamagnetic iron oxide to label therapeutic cells for *in vivo* cell tracking using SPECT or MRI, as reviewed by Srinivas et al. (129). Adoptive T-cell therapy (ACT) using expanded autologous tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and tumor antigen-specific T cell expanded from peripheral blood are complex but powerful immunotherapies. Clinical trials that included cell tracking have compared various routes of administration, the effect of the number of injected cells or host pretreatment with cyclophosphamide and compared various therapeutic cell preparation and encapsulation methods.

### Tracking Antigen-Presenting Cells *in vivo*

DC are the most effective professional antigen presenting cells for the priming of naïve T cells *in vitro* and *in vivo*. These properties are the consequence of constitutive expression of MHC molecules class I and II and co-stimulatory molecules (CD80, CD86, CD40) and of their ability to secrete regulatory cytokines such as interleukin 12 upon recognition by the T cell receptor. In the immature stage, DC have the ability to capture the antigen by phagocytosis or endocytosis, migrate to the lymph nodes where they become mature and prime T lymphocytes

inducing the adaptive immunity. This is the reason why, in recent years, immunotherapy targeting dendritic cells has developed.

Imaging demonstrated the ability of intradermally or subcutaneously administered therapeutic DC to migrate from the sites of injection into lymph nodes with about 4% of DC reaching draining lymph nodes (130). Actual contact of the DC with T-cells cannot be demonstrated by *in vivo* imaging, but *ex vivo* only after lymph node resection. By contrast, intravenously injected mature DC are trapped in the lungs and redistribute to the liver, spleen, and bone marrow. No lymph node localization has been detected so far, which does not mean that DC completely fail to reach the lymph nodes. The techniques may not be sufficiently sensitive to detect the small numbers of cells that do reach the lymph nodes. Direct intranodal administration of therapeutic DC is also common in clinical studies. Then *in vivo* imaging has been used to study the migration of DC from the primary injected node to secondary nodes. The large variability in the fraction of injected cells (from 0 to 84%) that was shown to migrate cast doubts on the accuracy of intranodal injections. Labeling the antigen to monitor its fate after DC delivery has been proposed in preclinical *in vivo* models. When DTPA was conjugated to the epsilon NH<sub>2</sub> group of the Lys154 residue, MHC binding of the peptide was preserved and could still be recognized by cytotoxic T cells. These studies allowed the non-invasive determination of the behavior of MHC-peptide complexes expressed by DC in cell vaccination (131) but has not yet been reproduced in the clinic.

### CAR (Chimeric Antigen Receptor) T-Cell Therapy

CAR T-cell therapy is a fast-growing research field with various therapeutic indications in autoimmunity, allotransplantation, infection and cancer. Enhancing the functionality and the safety of the injected cells is an important aspect of the clinical development of this very potent therapy. Therefore, there is a real need to develop *in vivo* molecular imaging to better visualize, predict and improve the efficiency of this type of immunotherapy (5). However, so far, clinical studies of CAR T-cell tracking have only established proofs of concept of its feasibility (74).

SPECT and PET imaging are two possible modalities for tracking the fate of T-cells injected for therapeutic use. Labeling T-cells has been extensively investigated and radiolabeling is possible with little impact on cell function or migration ability (13). However, the radionuclide half-life is a limitation to track the cells more than for a few days after injection.

A variety of solutions to this limitation have been proposed (132). While multimodal imaging has been shown possible (133), CAR T-cell tracking in animals has demonstrated homing and persistence in the tumors and spleen by *ex vivo* MRI of tissue samples after CAR T-cell labeling with perfluorocarbon (134) and in whole animals by immuno-PET (135). Although the context of CAR T-cell therapy would be appropriate to develop genetic modification of the T-cells to express reporter genes as discussed above, the outcome of therapy remains monitored mostly by functional imaging and especially by MRI (136).

### Other Adoptive T-Cell Transfer Therapies

Although BLI is most of the time used to follow tumor and stem cells, T cells could also be monitored thanks to the luciferase gene;

for instance, the migration of CD8 T cells toward tumor site was evaluated in a xenograft mouse model (83), and the migration of tumor associated macrophages has been visualized in a transgenic mouse model of ovarian cancer (84). Also, by optical imaging, but using a fluorophore targeted to NIS-transfected cells, tracking of *ex vivo*-expanded NK cells has been performed *in vitro* and *in vivo* showing fast NK cell accumulation in tumors in triple-negative in breast cancer xenografts (137).

<sup>89</sup>Zr-oxinate labeling was used to track V<sub>γ9</sub>V<sub>δ2</sub> T cells *in vivo* by PET. In a mouse xenograft model of human breast cancer, the V<sub>γ9</sub>V<sub>δ2</sub> T cells could be tracked over 1 week and it was shown that injection of PEGylated liposomal alendronate increased homing of the T cells to the tumors, which was confirmed by histology (75).

### Stem Cell Therapies

Mesenchymal stem cells (MSC) have been proposed for cardiac regeneration after myocardial infarction (MI). Mesenchymal stem cells derived from rat fetal heart have the potential to differentiate into cardiomyocytes, endothelial cells and smooth muscle cells *in vitro*. These cells were labeled with technetium-99m for *in vivo* tracking that revealed a focal uptake of cells in the anterior mid-ventricular region of the heart in line with subsequent ventricular functional recovery (138). Cardiac stem cells were also loaded with <sup>18</sup>F-FDG and imaged by PET to quantify their biodistribution and assess the retention of implanted cells in a model of chronic myocardial infarction in pigs. Acute cell retention was shown not to correlate with cell engraftment, which is improved by IM injection (17).

Stem cells have been tracked in various models with BLI, for instance in acute liver injury or acute kidney injury, to study the migration and persistence of human bone-marrow derived stem cells to the liver and kidney (45, 139). Luciferase-transfected adipose-derived stem cells could be transplanted in liver and brain and monitored *in vivo* by bioluminescence for several days. *Ex vivo*, immunofluorescence detected the continued expression of luciferase for 4 months, demonstrating that the transplanted cells do not die, even if the bioluminescence signal is lost (46).

In a tumor graft model, the migration of mesenchymal stem cells toward the subcutaneous tumor could also be observed (140). This study took advantage of a different type of luciferase that metabolizes different substrate, allowing them to follow the migration of stem cells with the Firefly Luciferase, and the tumor progression with the Renilla Luciferase.

BLI imaging has allowed to investigate the impact of stem cells injection modalities, showing that the intravenous route often leads to sequestration in the lung (141) preventing the migration of stem cells to other organs, while the intracardiac route seems to prevent this phenomenon.

## DISCUSSION

Cell tracking has a long history of routine clinical use in Nuclear Medicine and it serves a purpose in infectious and inflammatory diseases despite its limitations (142). Imaging has an increasing role in the context of personalized medicine, which becomes the approach to take, at least in developed countries. CT-scan,

MRI and ultrasonography are now inescapable and Nuclear Medicine modalities have gained larger recognition, particularly in cancer. However, the number of tracers of frequent, routine use remains quite limited. In addition to bone and thyroid scans,  $^{18}\text{F}$ -FDG is certainly the tracer that has the biggest impact in cancer management, with a few other PET tracers for those cancers in which  $^{18}\text{F}$ -FDG does not perform so well, such as prostate cancer. In view of the incredible number of preclinical and early clinical studies about cancer imaging, this seems not much. There are many obvious reasons, the major one being the difficulty of demonstrating that a new imaging technique has its place in medicine as compared to all existing ones. If the imaging technique needs an injectable tracer, such as a radiopharmaceutical, the situation is worse, because of the cost of developing a product that has the regulatory status of a drug and by far not the sales and price of a therapeutic compound.

Will immunotherapy change this situation? Most of the very large number of original publications and reviews that deal with immunotherapy advocate for more imaging, especially more specific imaging of receptors, antigens and other biomarkers that characterize the function of cells *in vivo*. With the progress of cellular therapies, whether regenerative or cancer-oriented, many papers call for cell tracking *in vivo* as a way to understand their behavior and mechanisms of action and, by the way, to design improved therapies. Indeed, if not all novel immunotherapies are cell therapies, they all bear upon complex cellular interactions at the tumor sites and in immunologic tissues and better knowledge of the nature of cancer and non-cancer cells residing in tumors, their activation, proliferation and migration in living animals and, of course, in humans, must be a way of progress in therapy.

This realization triggered a lot of developments that made possible better cell labeling, mostly to make them visible by MRI and PET, for longer times after re-injection, as well as improved tracers to target specific biomarkers *in vivo*, using SPECT and PET, but also MRI, not only on tumor cells but on those cells that make the tumor microenvironment, e.g., endothelial cells, infiltrating antigen-presenting cells, lymphocytes, macrophages and other cells of the immune system. New techniques have been developed and the use of reporter genes to make cells detectable any time after their inoculation using specific tracers is a particularly elegant and powerful one. This review has rapidly depicted these approaches and it is expected that it convinces the reader that they are feasible and effective.

There is no best technique, though. It depends on the objective and, obviously, the most powerful one, for instance the use of reporter genes, are associated with complex manipulations, cost and regulatory hurdles. Interestingly, radioactive (SPECT, PET) and non-radioactive (MRI, optical imaging, ultrasonography) methods have been proposed, which all have advantages and drawbacks. Of course, bimodal and even multimodal agents have been developed. Multimodal imaging is clearly the way to go, with SPECT and PET now always associated with CT and PET-MRI systems developing. It is also clear that multimodal imaging experiments in animals that allowed for *in vivo* imaging and *ex vivo* in-depth investigation of the fate of injected cells and confirmation of *in vivo* imaging results are most convincing. However, such studies do not necessarily need bifunctional

tracers, which sometimes look more like “tours de force” than candidates for further development.

One question here is: have these developments and studies been useful for the development of immunotherapy? The answer is not obvious. Such studies have pointed out to some problems and they have been mostly confirmatory, when they have not merely been proofs of concept for feasibility. This review has attempted at presenting clinical results in cell tracking and, while it may have missed some, it is in line with other recent reviews on the subject to conclude that the number of clinical studies is quite small. It may be considered that this is only the beginning of a new story and that groundbreaking discoveries in immunotherapy will be made thanks to imaging and that at least some of the approaches reported here will find their application. Very few cell tracking techniques will become routine. The introduction of reporter genes in therapeutic cells is probably the technique with the highest sensitivity for long term monitoring of cell trafficking, proliferation, and persistence. For cell therapies in which the cells are genetically modified, namely CAR-T cells, the addition of a second gene and cell tracking may be considered in the context of clinical trials. Whether this approach will be used in routine clinical practice is not likely. Conversely, tracers for *in vivo* imaging, particularly PET imaging, designed to detect and quantify specific cell populations are being developed and some will find a routine use. It is always difficult to make predictions, but it seems logical that expensive therapies or therapies that may be efficacious but associated with serious side-effects will not be given to patients who have no chance to benefit from them. The imaging of tumor microenvironment may give answers to how the patients will respond to such therapies, especially immunotherapy. Expression of immune checkpoints, like anti-PD-1, is already assessed from biopsies prior to immunotherapy, but the use of PET-imaging or MRI could allow a non-invasive assessment of the immune state of the tumor. This could provide new insights into the prediction of the response to treatment in patients. This is the theragnostic approach, which is not a reality today, but most probably be one in the future. It is also quite probable that future research in immunotherapy will take advantage of all these technological advances, certainly for preclinical studies, but also in the clinic. Indeed, it is time to combine the novel therapeutic approaches, which afford impressive remissions but not yet to all patients and this will call for precise, specific understanding of what is really going on in the living organism.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct and intellectual contribution to the work, and approved it for publication.

## FUNDING

This work was supported in part by grants from the French National Agency for Research called Investissements d’Avenir IRON Labex no ANR-11-LABX-0018-01 and ArronaxPlus Equipex no ANR-11-EQPX-0004.

## REFERENCES

- Baicus A. History of polio vaccination. *World J Virol.* (2012) 1:108. doi: 10.5501/wjv.v1.i4.108
- Khalil DN, Smith EL, Brentjens RJ, Wolchok JD. The future of cancer treatment: Immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. *Nat Rev Clin Oncol.* (2016) 13:273–90. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.25
- Hoos A. Development of immuno-oncology drugs—from CTLA4 to PD1 to the next generations. *Nat Rev Drug Discov.* (2016) 15:235–47. doi: 10.1038/nrd.2015.35
- Maldini CR, Ellis GI, Riley JL. CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat Rev Immunol.* (2018) 18:605–16. doi: 10.1038/s41577-018-0042-2
- Fruhwirth GO, Kneilling M, de Vries IJM, Weigelin B, Srinivas M, Aarntzen EHJG. The potential of *in vivo* imaging for optimization of molecular and cellular anti-cancer immunotherapies. *Mol Imaging Biol.* (2018) 20:696–704. doi: 10.1007/s11307-018-1254-3
- van Dongen GAMS, Visser GWM, Lub-de Hooge MN, de Vries EG, Perk LR. Immuno-PET: a navigator in monoclonal antibody development and applications. *Oncologist.* (2007) 12:1379–89. doi: 10.1634/theoncologist.12-12-1379
- Roca M, de Vries EFJ, Jamar F, Israel O, Signore A. Guidelines for the labelling of leucocytes with <sup>111</sup>In-oxine. Inflammation/Infection Taskgroup of the European Association of Nuclear Medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2010) 37:835–41. doi: 10.1007/s00259-010-1393-5
- Kircher MF, Gambhir SS, Grimm J. Noninvasive cell-tracking methods. *Nat Rev Clin Oncol.* (2011) 8:677–88. doi: 10.1038/nrclinonc.2011.141
- Charoenphun P, Meszaros LK, Chuamsaamarkkee K, Sharif-Paghaleh E, Ballinger JR, Ferris TJ, et al. [<sup>89</sup>Zr]Oxinate4 for long-term *in vivo* cell tracking by positron emission tomography. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2014) 42:278–87. doi: 10.1007/s00259-014-2945-x
- Sato N, Wu H, Asiedu KO, Szajek LP, Griffiths GL, Choyke PL. 89 Zr-Oxine complex PET cell imaging in monitoring cell-based therapies. *Radiology.* (2015) 275:490–500. doi: 10.1148/radiol.15142849
- McAfee JG, Subramanian G, Gagne G. Technique of leukocyte harvesting and labeling: problems and perspectives. *Semin Nucl Med.* (1984) 14:83–106. doi: 10.1016/S0001-2998(84)80023-9
- Phelps ME, Walsh J, McCarthy T, Adonai N, Iyer M, Toyokuni T, et al. *Ex vivo* cell labeling with <sup>64</sup>Cu-pyruvaldehyde-bis(N4-methylthiosemicarbazone) for imaging cell trafficking in mice with positron-emission tomography. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2002) 99:3030–5. doi: 10.1073/pnas.052709599
- Weist MR, Starr R, Aguilar B, Chea J, Miles JK, Poku E, et al. PET of adoptively transferred chimeric antigen receptor T cells with <sup>89</sup>Zr-Oxine. *J Nucl Med.* (2018) 59:1531–7. doi: 10.2967/jnumed.117.206714
- Brown G, Ellis B, Locatelli P, Jones AKP, Fairclough M, Prenant C, et al. A new technique for the radiolabelling of mixed leukocytes with zirconium-89 for inflammation imaging with positron emission tomography. *J Label Compd Radiopharm.* (2016) 59:270–6. doi: 10.1002/jlcr.3392
- Gennari A, Boutin H, Alzabin S, Jones AKP, Prenant C, McMahon A, et al. Development of a method for the preparation of zirconium-89 radiolabelled chitosan nanoparticles as an application for leukocyte trafficking with positron emission tomography. *Appl Radiat Isot.* (2017) 130:7–12. doi: 10.1016/j.apradiso.2017.09.004
- Bansal A, Pandey MK, Demirhan YE, Nesbitt JJ, Crespo-Diaz RJ, Terzic A, et al. Novel <sup>89</sup>Zr cell labeling approach for PET-based cell trafficking studies. *EJNMMI Res.* (2015) 5:19. doi: 10.1186/s13550-015-0098-y
- Collantes M, Pelacho B, García-Velloso MJ, Gavira JJ, Abizanda G, Palacios I, et al. Non-invasive *in vivo* imaging of cardiac stem/progenitor cell biodistribution and retention after intracoronary and intramyocardial delivery in a swine model of chronic ischemia reperfusion injury. *J Transl Med.* (2017) 15:1–11. doi: 10.1186/s12967-017-1157-0
- MacAskill MG, Tavares AS, Wu J, Lucatelli C, Mountford JC, Baker AH, et al. PET cell tracking using <sup>18</sup>F-FLT is not limited by local reuptake of free radiotracer. *Sci Rep.* (2017) 7:44233. doi: 10.1038/srep44233
- Caravan P, Ellison JJ, McMurry TJ, Lauffer RB. Gadolinium(III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics, and applications. *Chem Rev.* (1999) 99:2293–352. doi: 10.1021/cr980440x
- Yang ZX, Cheng X, Jia Y, Geng K, Wu R, Yi M, et al. Tracking of mesenchymal stem cells labeled with gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid by 7T magnetic resonance imaging in a model of cerebral ischemia. *Mol Med Rep.* (2014) 11:954–60. doi: 10.3892/mmr.2014.2805
- Weissleder R, Cheng HC, Bogdanova A, Bogdanov A Jr. Magnetically labeled cells can be detected by MR imaging. *J Magn Reson Imaging.* 7:258–63. doi: 10.1002/jmri.1880070140
- Sipe JC, Filippi M, Martino G, Furlan R, Rocca MA, Rovaris M, et al. Method for intracellular magnetic labeling of human mononuclear cells using approved iron contrast agents. *Magn Reson Imaging.* (1999) 17:1521–3. doi: 10.1016/S0730-725X(99)00085-5
- Foley LM, Hitchens TK, Ho C, Janesko-Feldman KL, Melick JA, Bayir H, et al. Magnetic resonance imaging assessment of macrophage accumulation in mouse brain after experimental traumatic brain injury. *J Neurotrauma.* (2009) 26:1509–19. doi: 10.1089/neu.2008.0747
- Smirnov P. Cellular magnetic resonance imaging using superparamagnetic anionic iron oxide nanoparticles: applications to *in vivo* trafficking of lymphocytes and cell-based anticancer therapy. *Methods Mol Biol.* (2009) 512:333–53. doi: 10.1007/978-1-60327-530-9\_19
- Ward KM, Aletras AH, Balaban RS. A new class of contrast agents for MRI based on proton chemical exchange dependent saturation transfer (CEST). *J Magn Reson.* (2000) 143:79–87. doi: 10.1006/jmre.1999.1956
- Winter PM. Magnetic resonance chemical exchange saturation transfer imaging and nanotechnology. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* (2012) 4:389–98. doi: 10.1002/wnan.1167
- Bouchlaka MN, Ludwig KD, Gordon JW, Kutz MP, Bednarz BP, Fain SB, et al. 19F-MRI for monitoring human NK cells *in vivo*. *Oncimmunology.* (2016) 5:1–12. doi: 10.1080/2162402X.2016.1143996
- Penheiter AR, Russell SJ, Carlson SK. The sodium iodide symporter (NIS) as an imaging reporter for gene, viral, and cell-based therapies. *Curr Gene Ther.* (2012) 12:33–47. doi: 10.2174/156652312799789235
- Jauregui-Osoro M, Sunassee K, Weeks AJ, Berry DJ, Paul RL, Cleij M, et al. Synthesis and biological evaluation of [<sup>18</sup>F]tetrafluoroborate: a PET imaging agent for thyroid disease and reporter gene imaging of the sodium/iodide symporter. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2010) 37:2108–16. doi: 10.1007/s00259-010-1523-0
- Youn H, Jeong JM, Chung J-K. A new PET probe, (18F)-tetrafluoroborate, for the sodium/iodide symporter: possible impacts on nuclear medicine. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2010) 37:2105–7. doi: 10.1007/s00259-010-1601-3
- Diocou S, Volpe A, Jauregui-Osoro M, Boudjemline M, Chuamsaamarkkee K, Man F, et al. [<sup>18</sup>F]tetrafluoroborate-PET/CT enables sensitive tumor and metastasis *in vivo* imaging in a sodium iodide symporter-expressing tumor model. *Sci Rep.* (2017) 7:946. doi: 10.1038/s41598-017-01044-4
- Lee SB, Lee HW, Lee H, Jeon YH, Lee S-W, Ahn B-C, et al. Tracking dendritic cell migration into lymph nodes by using a novel PET probe 18F-tetrafluoroborate for sodium/iodide symporter. *EJNMMI Res.* (2017) 7:32. doi: 10.1186/s13550-017-0280-5
- Collins SA, Hiraoka K, Inagaki A, Kasahara N, Tangney M. PET imaging for gene and cell therapy. *Curr Gene Ther.* (2012) 12:20–32. doi: 10.2174/156652312799789271
- Thunemann M, Schörg BF, Feil S, Lin Y, Voelkl J, Golla M, et al. Cre/lox-assisted non-invasive *in vivo* tracking of specific cell populations by positron emission tomography. *Nat Commun.* (2017) 8:444. doi: 10.1038/s41467-017-00482-y
- Pan Y, Lv J, Pan D, Xu Y, Yang M, Ju H, et al. Evaluating the utility of human glucagon-like peptide 1 receptor gene as a novel radionuclide reporter gene: a promising molecular imaging tool. *Appl Microbiol Biotechnol.* (2019) 103:1311–24. doi: 10.1007/s00253-018-9562-8
- Wu Z, Todorov I, Li L, Bading JR, Li Z, Nair I, et al. *In vivo* imaging of transplanted islets with <sup>64</sup>Cu-DO3A-VS-Cys 40 -exendin-4 by targeting GLP-1 receptor. *Bioconjug Chem.* (2011) 22:1587–94. doi: 10.1021/bc200132t
- Haralampieva D, Betzel T, Dinulovic I, Salemi S, Stoelting M, Kramer SD, et al. Noninvasive PET imaging and tracking of engineered human muscle precursor cells for skeletal muscle tissue engineering. *J Nucl Med.* (2016) 57:1467–73. doi: 10.2967/jnumed.115.170548
- Schönitzer V, Haasters F, Kasbauer S, Ulrich V, Mille E, Gildehaus FJ, et al. *In vivo* mesenchymal stem cell tracking with PET using the

- dopamine type 2 receptor and 18F-fallypride. *J Nucl Med.* (2014) 55:1342–7. doi: 10.2967/jnumed.113.134775
39. Guo R, Li Q, Yang F, Hu X, Jiao J, Guo Y, et al. *In vivo* MR imaging of dual MRI reporter genes and deltex-1 gene-modified human mesenchymal stem cells in the treatment of closed penile fracture. *Mol Imaging Biol.* (2018) 20:417–27. doi: 10.1007/s11307-017-1128-0
  40. Kim HS, Woo J, Lee JH, Joo HJ, Choi YS, Kim H, et al. *In vivo* tracking of dendritic cell using MRI reporter gene, ferritin. *PLoS ONE.* (2015) 10:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0125291
  41. He X, Cai J, Liu B, Zhong Y, Qin Y. Cellular magnetic resonance imaging contrast generated by the ferritin heavy chain genetic reporter under the control of a Tet-On switch. *Stem Cell Res Ther.* (2015) 6:207. doi: 10.1186/s13287-015-0205-z
  42. Bartelle BB, Mana MD, Suenro-Abreu GA, Rodriguez JJ, Turnbull DH. Engineering an effective Mn-binding MRI reporter protein by subcellular targeting. *Magn Reson Med.* (2015) 74:1750–7. doi: 10.1002/mrm.25566
  43. Lewis CM, Graves SA, Hernandez R, Valdovinos HF, Barnhart TE, Cai W, et al. 52Mn production for PET/MRI tracking of human stem cells expressing divalent metal transporter 1 (DMT1). *Theranostics.* (2015) 5:227–39. doi: 10.7150/thno.10185
  44. Kim JE, Kalimuthu S, Ahn B-C. *In vivo* cell tracking with bioluminescence imaging. *Nucl Med Mol Imaging.* (2015) 49:3–10. doi: 10.1007/s13139-014-0309-x
  45. Xie P, Hu X, Li D, Xie S, Zhou Z, Meng X, et al. Bioluminescence imaging of transplanted mesenchymal stem cells by overexpression of hepatocyte nuclear factor4 $\alpha$ : tracking biodistribution and survival. *Mol Imaging Biol.* (2019) 21:44–53. doi: 10.1007/s11307-018-1204-0
  46. Muñoz MF, Argüelles S, Guzman-Chozas M, Guillén-Sanz R, Franco JM, Pintor-Toro JA, et al. Cell tracking, survival, and differentiation capacity of adipose-derived stem cells after engraftment in rat tissue. *J Cell Physiol.* (2018) 233:6317–28. doi: 10.1002/jcp.26439
  47. Qin C, Cheng K, Chen K, Hu X, Liu Y, Lan X, et al. Tyrosinase as a multifunctional reporter gene for Photoacoustic/MRI/PET triple modality molecular imaging. *Sci Rep.* (2013) 3:1490. doi: 10.1038/srep01490
  48. Sanches PG, Peters S, Rossin R, Kaijzel EL, Que I, Löwik CWGM, et al. Bone metastasis imaging with SPECT/CT/MRI: a preclinical toolbox for therapy studies. *Bone.* (2015) 75:62–71. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.002
  49. Kocher B, Piwnicka-Worms D. Illuminating cancer systems with genetically engineered mouse models and coupled luciferase reporters *in vivo*. *Cancer Discov.* (2013) 3:616–29. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0503
  50. Tomura M, Hata A, Matsuoka S, Shand FHW, Nakanishi Y, Ikebuchi R, et al. Tracking and quantification of dendritic cell migration and antigen trafficking between the skin and lymph nodes. *Sci Rep.* (2015) 4:6030. doi: 10.1038/srep06030
  51. Kang S-W, Lee S, Na JH, Yoon HI, Lee D-E, Koo H, et al. Cell labeling and tracking method without distorted signals by phagocytosis of macrophages. *Theranostics.* (2014) 4:420–31. doi: 10.7150/thno.7265
  52. Lee SY, Lee S, Lee J, Yhee JY, Yoon HI, Park S-J, et al. Non-invasive stem cell tracking in hindlimb ischemia animal model using bio-orthogonal copper-free click chemistry. *Biochem Biophys Res Commun.* (2016) 479:779–86. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.09.132
  53. Lee S, Yoon HI, Na JH, Jeon S, Lim S, Koo H, et al. *In vivo* stem cell tracking with imageable nanoparticles that bind bioorthogonal chemical receptors on the stem cell surface. *Biomaterials.* (2017) 139:12–29. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.05.050
  54. Bailly C, Gouard S, Lacombe M, Saëc P, Chalopin B, Bourgeois M, et al. Comparison of Immuno-PET of CD138 and PET imaging with <sup>64</sup>CuCl<sub>2</sub> and 18F-FDG in a preclinical syngeneic model of multiple myeloma. *Oncotarget.* (2018) 9:9061–72. doi: 10.18632/oncotarget.23886
  55. McCracken MN, Tavaré R, Witte ON, Wu AM. Advances in PET detection of the antitumor T cell response. *Adv Immunol.* (2016) 131:187–231. doi: 10.1016/bs.ai.2016.02.004
  56. Beckford Vera DR, Smith CC, Bixby LM, Glatt DM, Dunn SS, Saito R, et al. Immuno-PET imaging of tumor-infiltrating lymphocytes using zirconium-89 radiolabeled anti-CD3 antibody in immune-competent mice bearing syngeneic tumors. *PLoS ONE.* (2018) 13:e0193832. doi: 10.1371/journal.pone.0193832
  57. Mayer KE, Mall S, Yusufi N, Gosmann D, Steiger K, Russell L, et al. T-cell functionality testing is highly relevant to developing novel immuno-tracers monitoring T cells in the context of immunotherapies and revealed CD7 as an attractive target. *Theranostics.* (2018) 8:6070–87. doi: 10.7150/thno.27275
  58. Rashidian M, Ingram JR, Dougan M, Dongre A, Whang KA, LeGall C, et al. Predicting the response to CTLA-4 blockade by longitudinal noninvasive monitoring of CD8 T cells. *J Exp Med.* (2017) 214:2243–55. doi: 10.1084/jem.20161950
  59. Abou DS, Ku T, Smith-Jones PM. *In vivo* biodistribution and accumulation of <sup>89</sup>Zr in mice. HHS public access. *Nucl Med Biol.* (2011) 3812:675–81. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2010.12.011
  60. Bailly C, Bodet-Milin C, Rousseau C, Faivre-Chauvet A, Kraeber-Bodéré F, Barbet J. Pretargeting for imaging and therapy in oncological nuclear medicine. *EJNMMI Radiopharm Chem.* (2017) 2:6. doi: 10.1186/s41181-017-0026-8
  61. Honarvar H, Westerlund K, Altai M, Sandström M, Orlova A, Tolmachev V, et al. Feasibility of affibody molecule-based PNA-mediated radionuclide pretargeting of malignant tumors. *Theranostics.* (2016) 6:93–103. doi: 10.7150/thno.12766
  62. Rossin R, Renart Verkerk P, van den Bosch SM, Vuldere RCM, Verel I, Lub J, et al. *In vivo* chemistry for pretargeted tumor imaging in live mice. *Angew Chemie Int Ed.* (2010) 49:3375–8. doi: 10.1002/anie.200906294
  63. Zhang X, Wang B, Zhao N, Tian Z, Dai Y, Nie Y, et al. Improved tumor targeting and longer retention time of NIR fluorescent probes using bioorthogonal chemistry. *Theranostics.* (2017) 7:20912. doi: 10.7150/thno.20912
  64. Chen H, Wang L, Yu Q, Qian W, Tiwari D, Yi H, et al. Anti-HER2 antibody and ScFvEGFR-conjugated antifouling magnetic iron oxide nanoparticles for targeting and magnetic resonance imaging of breast cancer. *Int J Nanomed.* (2013) 8:3781–94. doi: 10.2147/IJN.S49069
  65. Alric C, Hervé-Aubert K, Aubrey N, Melouk S, Lajoie L, Mème W, et al. Targeting HER2-breast tumors with scFv-decorated bimodal nanoprobe. *J Nanobiotechnol.* (2018) 16:18. doi: 10.1186/s12951-018-0341-6
  66. Li Y, Soni PB, Liu L, Zhang X, Liotta DC, Lutz S. Synthesis of fluorescent nucleoside analogs as probes for 2'-deoxyribonucleoside kinases. *Bioorg Med Chem Lett.* (2010) 20:841–3. doi: 10.1016/j.bmcl.2009.12.097
  67. Bar-Shir A, Alon L, Korror MJ, Lim HS, Yadav NN, Kato Y, et al. Quantification and tracking of genetically engineered dendritic cells for studying immunotherapy. *Magn Reson Med.* (2018) 79:1010–9. doi: 10.1002/mrm.26708
  68. van Krieken JH, Oyen WJG, de Vries IJM, Verdijk P, Figdor CG, Barentsz JO, et al. Magnetic resonance tracking of dendritic cells in melanoma patients for monitoring of cellular therapy. *Nat Biotechnol.* (2005) 23:1407–13. doi: 10.1038/nbt1154
  69. Noh YW, Jang YS, Ahn KJ, Lim YT, Chung BH. Simultaneous *in vivo* tracking of dendritic cells and priming of an antigen-specific immune response. *Biomaterials.* (2011) 32:6254–63. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.05.013
  70. Ahn B-C, Jeong SY, Lee J, Jeong H-J, Ahn SB, Lee SB, et al. Radionuclide-embedded gold nanoparticles for enhanced dendritic cell-based cancer immunotherapy, sensitive and quantitative tracking of dendritic cells with PET and Cerenkov luminescence. *NPG Asia Mater.* (2016) 8:e281. doi: 10.1038/am.2016.80
  71. Sharif-Paghaleh E, Ratnasothy K, Sunassee K, Tavaré R, Alhabbab R, Mullen GE, et al. *In vivo* SPECT reporter gene imaging of regulatory T cells. *PLoS ONE.* (2011) 6:e25857. doi: 10.1371/journal.pone.0025857
  72. Li YQ, Tang Y, Fu R, Meng QH, Zhou X, Ling ZM, et al. Efficient labeling *in vitro* with non-ionic gadolinium magnetic resonance imaging contrast agent and fluorescent transfection agent in bone marrow stromal cells of neonatal rats. *Mol Med Rep.* (2015) 12:913–20. doi: 10.3892/mmr.2015.3532
  73. Connot J, Gaspar R, Silva LC, Florindo HF, Silva JM, Fernandes JG, et al. Cancer immunotherapy: nanodelivery approaches for immune cell targeting and tracking. *Front Chem.* (2014) 2:1–27. doi: 10.3389/fchem.2014.00105
  74. Bulte JWM, Daldrup-Link HE. Clinical tracking of cell transfer and cell transplantation: trials and tribulations. *Radiology.* (2018) 289:604–15. doi: 10.1148/radiol.2018180449
  75. Man F, Lim L, Volpe A, Gabizon A, Shmeeda H, Draper B, et al. *In vivo* PET tracking of <sup>89</sup>Zr-labeled V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T cells to mouse xenograft breast

- tumors activated with liposomal alendronate. *Mol Ther.* (2019) 27:219–29. doi: 10.1016/j.jymthe.2018.10.006
76. Lee SB, Lee HW, Singh TD, Li Y, Kim SK, Cho SJ, et al. Visualization of macrophage recruitment to inflammation lesions using highly sensitive and stable radionuclide-embedded gold nanoparticles as a nuclear bio-imaging platform. *Theranostics.* (2017) 7:926–34. doi: 10.7150/thno.17131
  77. Signore A, Annovazzi A, Barone R, Bonanno E, D'Alessandria C, Chianelli M, et al. <sup>99m</sup>Tc-interleukin-2 scintigraphy as a potential tool for evaluating tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma lesions: a validation study. *J Nucl Med.* (2004) 45:1647–52.
  78. Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 expression as a predictive biomarker in cancer immunotherapy. *Mol Cancer Ther.* (2015) 14:847–56. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0983
  79. Natarajan A, Mayer AT, Xu L, Reeves RE, Gano J, Gambhir SS. Novel radiotracer for immunoPET imaging of PD-1 checkpoint expression on tumor infiltrating lymphocytes. *Bioconjug Chem.* (2015) 26:2062–9. doi: 10.1021/acs.bioconjugchem.5b00318
  80. Lanfranca MP, Lazarus J, Shao X, Nathan H, Di Magliano MP, Zou W, et al. Tracking macrophage infiltration in a mouse model of pancreatic cancer with the positron emission tomography tracer [<sup>11</sup>C]PBR28. *J Surg Res.* (2018) 232:570–7. doi: 10.1016/j.jss.2018.07.015
  81. Al Faraj A, Sultana Shaik A, Pureza MA, Alnafa M, Halwani R. Preferential macrophage recruitment and polarization in LPS-induced animal model for COPD: noninvasive tracking using MRI. *PLoS ONE.* (2014) 9:e90829. doi: 10.1371/journal.pone.0090829
  82. Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, Roussel S, Segebarth C, Petit E, et al. *In vivo* MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage.* (2008) 40:973–83. doi: 10.1016/j.neuroimage.2008.01.005
  83. Perez C, Jukica A, Listopad JJ, Anders K, Kühl AA, Loddenkemper C, et al. Permissive expansion and homing of adoptively transferred T cells in tumor-bearing hosts. *Int J Cancer.* (2015) 137:359–71. doi: 10.1002/ijc.29401
  84. He H, Kanada M, Contag CH, Krishnan V, Schaar BT, Dorigo O, et al. Imaging of tumor-associated macrophages in a transgenic mouse model of orthotopic ovarian cancer. *Mol Imaging Biol.* (2017) 19:694–702. doi: 10.1007/s11307-017-1061-2
  85. Yang R, Sarkar S, Yong VW, Dunn JF. *In vivo* MR imaging of tumor-associated macrophages: the next frontier in cancer imaging. *Magn Reson Insights.* (2018) 11:1178623X1877197. doi: 10.1177/1178623X18771974
  86. Wahl RL, Jacene H, Kasamon Y, Lodge MA. From RECIST to PERCIST: evolving Considerations for PET response criteria in solid tumors. *J Nucl Med.* (2009) 50(Suppl. 1):122S–50S. doi: 10.2967/jnumed.108.057307
  87. Cammilleri S, Labeille B, Kelly A, Isnardi V, D'Incan M, Tychyj C, et al. 123I-BZA2 as a melanin-targeted radiotracer for the identification of melanoma metastases: results and perspectives of a multicenter phase III clinical trial. *J Nucl Med.* (2013) 55:15–22. doi: 10.2967/jnumed.113.123554
  88. Ren G, Liu Z, Miao Z, Liu H, Subbarayan M, Chin FT, et al. PET of malignant melanoma using 18F-labeled metallopeptides. *J Nucl Med.* (2009) 50:1865–72. doi: 10.2967/jnumed.109.062877
  89. Lee ST, Burvenich I, Scott AM. Novel target selection for nuclear medicine studies. *Semin Nucl Med.* (2019) 49:357–68. doi: 10.1053/j.semnuclmed.2019.06.004
  90. Verhoeff SR, van den Heuvel MM, van Herpen CML, Piet B, Aarntzen EHJG, Heskamp S. Programmed cell death-1/ligand-1 PET imaging. *PET Clin.* (2019) 15:35–43. doi: 10.1016/j.cpet.2019.08.008
  91. Hinrichs CS, Turcotte S, Wunderlich JR, Dudley ME, Hogan K, Gros A, et al. Phenotype and function of T cells infiltrating visceral metastases from gastrointestinal cancers and melanoma: implications for adoptive cell transfer therapy. *J Immunol.* (2013) 191:2217–25. doi: 10.4049/jimmunol.1300538
  92. Seo JW, Tavaré R, Mahakian LM, Silvestrini MT, Tam S, Ingham ES, et al. CD8+ T-cell density imaging with <sup>64</sup>Cu-labeled cys-diabody informs immunotherapy protocols. *Clin Cancer Res.* (2018) 24:4976–87. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0261
  93. Markovic S, Galli F, Suman VJ, Nevala WK, Paulsen AM, Hung JC, et al. Non-invasive clinical visualization of tumor infiltrating lymphocytes in patients with metastatic melanoma undergoing immune checkpoint inhibitor therapy: a pilot study. *J Clin Oncol.* (2017) 35:3034. doi: 10.1200/JCO.2017.35.15\_suppl.3034
  94. Narang S, Kim D, Aithala S, Heimberger AB, Ahmed S, Rao D, et al. Tumor image-derived texture features are associated with CD3 T-cell infiltration status in glioblastoma. *Oncotarget.* (2017) 8:101244–54. doi: 10.18632/oncotarget.20643
  95. Sun R, Limkin EJ, Vakalopoulou M, Dercle L, Champiat S, Han SR, et al. A radiomics approach to assess tumour-infiltrating CD8 cells and response to anti-PD-1 or anti-PD-L1 immunotherapy: an imaging biomarker, retrospective multicohort study. *Lancet Oncol.* (2018) 19:1180–91. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30413-3
  96. Mantovani A, Marchesi F, Malesci A, Laghi L, Allavena P. Tumour-associated macrophages as treatment targets in oncology. *Nat Rev Clin Oncol.* (2017) 14:399–416. doi: 10.1038/nrclinonc.2016.217
  97. Eisenblatter M, Ehrchen J, Varga G, Sunderkotter C, Heindel W, Roth J, et al. *In vivo* optical imaging of cellular inflammatory response in granuloma formation using fluorescence-labeled macrophages. *J Nucl Med.* (2009) 50:1676–82. doi: 10.2967/jnumed.108.060707
  98. Terry SYA, Nayak TK, Oyen WJ, Klein C, Laverman P, Koenders MI, et al. Monitoring therapy response of experimental arthritis with radiolabeled tracers targeting fibroblasts, macrophages, or integrin v 3. *J Nucl Med.* (2015) 57:467–72. doi: 10.2967/jnumed.115.162628
  99. Nahrendorf M, Zhang H, Hembrador S, Panizzi P, Sosnovik DE, Aikawa E, et al. Nanoparticle PET-CT imaging of macrophages in inflammatory atherosclerosis. *Circulation.* (2008) 117:379–87. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.741181
  100. Terry SYA, Boerman OC, Gerrits D, Franssen GM, Metselaar JM, Lehmann S, et al. 111In-anti-F4/80-A3-1 antibody: a novel tracer to image macrophages. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2015) 42:1430–8. doi: 10.1007/s00259-015-3084-8
  101. Yang R, Sarkar S, Korchinski DJ, Wu Y, Yong VW, Dunn JF. MRI monitoring of monocytes to detect immune stimulating treatment response in brain tumor. *Neuro Oncol.* (2016) 19:now180. doi: 10.1093/neuonc/now180
  102. Aarntzen EHJG, Srinivas M, Radu CG, Punt CJA, Boerman OC, Figdor CG, et al. *In vivo* imaging of therapy-induced anti-cancer immune responses in humans. *Cell Mol Life Sci.* (2013) 70:2237–57. doi: 10.1007/s00018-012-1159-2
  103. Radu CG, Shu CJ, Nair-Gill E, Shelly SM, Barrio JR, Satyamurthy N, et al. Molecular imaging of lymphoid organs and immune activation by positron emission tomography with a new [<sup>18</sup>F]-labeled 2'-deoxycytidine analog. *Nat Med.* (2008) 14:783–8. doi: 10.1038/nm1724
  104. Chen R, Zhou X, Liu J, Huang G. Relationship between the expression of PD-1/PD-L1 and 18F-FDG uptake in bladder cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2019) 11:12270–7. doi: 10.1007/s00259-018-4208-8
  105. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer.* (2012) 12:252–64. doi: 10.1038/nrc3239
  106. Katz SC, Pillarisetty V, Bamboat ZM, Shia J, Hedvat C, Gonen M, et al. T cell infiltrate predicts long-term survival following resection of colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg Oncol.* (2009) 16:2524–30. doi: 10.1245/s10434-009-0585-3
  107. Eherlting EB, England CG, Majewski RL, Valdovinos HF, Jiang D, Liu G, et al. ImmunoPET imaging of CTLA-4 expression in mouse models of non-small cell lung cancer. *Mol Pharm.* (2017) 14:1782–9. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00056
  108. Buder-Bakhaya K, Hassel JC. Biomarkers for clinical benefit of immune checkpoint inhibitor treatment—a review from the melanoma perspective and beyond. *Front Immunol.* (2018) 9:1474. doi: 10.3389/fimmu.2018.01474
  109. Kikuchi M, Clump DA, Srivastava RM, Sun L, Zeng D, Diaz-Perez JA, et al. Preclinical immunoPET/CT imaging using Zr-89-labeled anti-PD-L1 monoclonal antibody for assessing radiation-induced PD-L1 upregulation in head and neck cancer and melanoma. *Oncimmunology.* (2017) 6:1–13. doi: 10.1080/2162402X.2017.1329071
  110. Broos K, Lecocq Q, Raes G, Devoogdt N, Keyaerts M, Breckpot K. Noninvasive imaging of the PD-1: PD-L1 immune checkpoint: embracing nuclear medicine for the benefit of personalized immunotherapy. *Theranostics.* (2018) 8:3559–70. doi: 10.7150/thno.24762

111. Faure M, Rochigneux P, Olive D, Taix S, Brenot-Rossi I, Gilbert M. Hyperprogressive disease in anorectal melanoma treated by PD-1 inhibitors. *Front Immunol.* (2018) 9:797. doi: 10.3389/fimmu.2018.00797
112. Bensch F, van der Veen EL, Lub-de Hooge MN, Jorritsma-Smit A, Boellaard R, Kok IC, et al. <sup>89</sup>Zr-atezolizumab imaging as a non-invasive approach to assess clinical response to PD-L1 blockade in cancer. *Nat Med.* (2018) 24:1852–8. doi: 10.1038/s41591-018-0255-8
113. Gibson HM, McKnight BN, Malysa A, Dyson G, Wiesend WN, McCarthy CE, et al. IFN $\gamma$  PET imaging as a predictive tool for monitoring response to tumor immunotherapy. *Cancer Res.* (2018) 78:5706–17. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0253
114. Kircher M, Herhaus P, Schottelius M, Buck AK, Werner RA, Wester H-J, et al. CXCR4-directed theranostics in oncology and inflammation. *Ann Nucl Med.* (2018) 32:503–11. doi: 10.1007/s12149-018-1290-8
115. Streeter JE, Gessner RC, Tsuruta J, Feingold S, Dayton PA. Assessment of molecular imaging of angiogenesis with three-dimensional ultrasonography. *Mol Imaging.* (2011) 10:460–8. doi: 10.2310/7290.2011.00015
116. Sui WF, Chen X, Peng ZK, Ye J, Wu JT. The diagnosis of metastatic axillary lymph nodes of breast cancer by diffusion weighted imaging: a meta-analysis and systematic review. *World J Surg Oncol.* (2016) 14:155. doi: 10.1186/s12957-016-0906-5
117. Griessinger CM, Kehlbach R, Bukala D, Wiehr S, Bantleon R, Cay F, et al. *In vivo* tracking of Th1 cells by PET reveals quantitative and temporal distribution and specific homing in lymphatic tissue. *J Nucl Med.* (2014) 55:301–7. doi: 10.2967/jnumed.113.126318
118. Sancey L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, Boturyn D, et al. *In vivo* imaging of tumour angiogenesis in mice with the  $\alpha\beta 3$  integrin-targeted tracer <sup>99m</sup>Tc-RAFT-RGD. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* (2007) 34:2037–47. doi: 10.1007/s00259-007-0497-z
119. Jin Z-H, Furukawa T, Claron M, Boturyn D, Coll J-L, Fukumura T, et al. Positron emission tomography imaging of tumor angiogenesis and monitoring of antiangiogenic efficacy using the novel tetrameric peptide probe <sup>64</sup>Cu-cyclam-RAFT-c-(RGDFK)-4. *Angiogenesis.* (2012) 15:569–80. doi: 10.1007/s10456-012-9281-1
120. Galbán CJ, Hoff BA, Chenevert TL, Ross BD. Diffusion MRI in early cancer therapeutic response assessment. *NMR Biomed.* (2017) 30:e3458. doi: 10.1002/nbm.3458
121. Pham W, Xie J, Gore JC. Tracking the migration of dendritic cells by *in vivo* optical imaging. *Neoplasia.* (2007) 9:1130–7. doi: 10.1593/neo.07586
122. Muccioli M, Pate M, Omosebi O, Benencia F. Generation and labeling of murine bone marrow-derived dendritic cells with Qdot nanocrystals for tracking studies. *J Vis Exp.* (2011) e2785. doi: 10.3791/2785
123. Long CM, van Laarhoven HWM, Bulte JWM, Levitsky HI. Magnetovaccination as a novel method to assess and quantify dendritic cell tumor antigen capture and delivery to lymph nodes. *Cancer Res.* (2009) 69:3180–7. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3691
124. Asiedu KO, Koyasu S, Szajek LP, Choyke PL, Sato N. Bone marrow cell trafficking analyzed by <sup>89</sup>Zr-oxine positron emission tomography in a murine transplantation model. *Clin Cancer Res.* (2017) 23:2759–68. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1561
125. Asiedu KO, Ferdousi M, Ton PT, Adler SS, Choyke PL, Sato N. Bone marrow cell homing to sites of acute tibial fracture: <sup>89</sup>Zr-oxine cell labeling with positron emission tomographic imaging in a mouse model. *EJNMMI Res.* (2018) 8:109. doi: 10.1186/s13550-018-0463-8
126. Kanwar B, Gao DW, Hwang AB, Grenet JP, Williams SP, Franc B, et al. *In vivo* imaging of mucosal CD4<sup>+</sup> T cells using single photon emission computed tomography in a murine model of colitis. *J Immunol Methods.* (2008) 329:21–30. doi: 10.1016/j.jim.2007.09.008
127. Srinivas M, Turner MS, Janjic JM, Morel PA, Laidlaw DH, Ahrens ET. *In vivo* cytometry of antigen-specific T cells using <sup>19</sup>F MRI. *Magn Reson Med.* (2009) 62:747–53. doi: 10.1002/mrm.22063
128. Tremblay M-L, Davis C, Bowen CV, Stanley O, Parsons C, Weir G, et al. Using MRI cell tracking to monitor immune cell recruitment in response to a peptide-based cancer vaccine. *Magn Reson Med.* (2018) 80:304–16. doi: 10.1002/mrm.27018
129. Srinivas M, Aarntzen EHJG, Bulte JWM, Oyen WJ, Heerschap A, de Vries IJM, et al. Imaging of cellular therapies. *Adv Drug Deliv Rev.* (2010) 62:1080–93. doi: 10.1016/j.addr.2010.08.009
130. Verdijk P, Aarntzen EHJG, Lesterhuis WJ, Boullart ACI, Kok E, van Rossum MM, et al. Limited amounts of dendritic cells migrate into the T-cell area of lymph nodes but have high immune activating potential in melanoma patients. *Clin Cancer Res.* (2009) 15:2531–40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2729
131. Laverman P, de Vries IJM, Scharenborg NM, de Boer A, Broekema M, Oyen WJG, et al. Development of <sup>111</sup>In-labeled tumor-associated antigen peptides for monitoring dendritic-cell-based vaccination. *Nucl Med Biol.* (2006) 33:453–8. doi: 10.1016/j.nucmedbio.2006.02.005
132. Emami-Shahri N, Papa S. Dynamic imaging for CAR-T-cell therapy. *Biochem Soc Trans.* (2016) 44:386–90. doi: 10.1042/BST20150257
133. Bhatnagar P, Alauddin M, Bankson JA, Kirui D, Seifi P, Huls H, et al. Tumor lysing genetically engineered T cells loaded with multi-modal imaging agents. *Sci Rep.* (2014) 4:4502. doi: 10.1038/srep04502
134. Chapelin F, Gao S, Okada H, Weber TG, Messer K, Ahrens ET. Fluorine-19 nuclear magnetic resonance of chimeric antigen receptor T cell biodistribution in murine cancer model. *Sci Rep.* (2017) 7:17748. doi: 10.1038/s41598-017-17669-4
135. Mall S, Yusufi N, Wagner R, Klar R, Bianchi H, Steiger K, et al. Immuno-PET imaging of engineered human T cells in tumors. *Cancer Res.* (2016) 76:4113–23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2784
136. Wang S, O'Rourke DM, Chawla S, Verma G, Nasrallah MP, Morrisette JJD, et al. Multiparametric magnetic resonance imaging in the assessment of anti-EGFRvIII chimeric antigen receptor T cell therapy in patients with recurrent glioblastoma. *Br J Cancer.* (2019) 120:54–6. doi: 10.1038/s41416-018-0342-0
137. Uong TNT, Lee KH, Ahn SJ, Kim KW, Min JJ, Hyun H, et al. Real-time tracking of *ex vivo*-expanded natural killer cells toward human triple-negative breast cancers. *Front Immunol.* (2018) 9:1–14. doi: 10.3389/fimmu.2018.00825
138. Garikipati VNS, Jadhav S, Pal L, Prakash P, Dikshit M, Nityanand S. Mesenchymal stem cells from fetal heart attenuate myocardial injury after infarction: an *in vivo* serial pinhole gated SPECT-CT study in rats. *PLoS ONE.* (2014) 9:1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0100982
139. Schubert R, Sann J, Frueh JT, Ullrich E, Geiger H, Baer PC. Tracking of adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells in a model of cisplatin-induced acute kidney injury: comparison of bioluminescence imaging vs. qRT-PCR. *Int J Mol Sci.* (2018) 19:1–12. doi: 10.3390/ijms19092564
140. Kalimuthu S, Zhu L, Oh JM, Gangadaran P, Lee HW, Baek SH, et al. Migration of mesenchymal stem cells to tumor xenograft models and *in vitro* drug delivery by doxorubicin. *Int J Med Sci.* (2018) 15:1051–61. doi: 10.7150/ijms.25760
141. Scarfe L, Taylor A, Sharkey J, Harwood R, Barrow M, Comenge J, et al. Non-invasive imaging reveals conditions that impact distribution and persistence of cells after *in vivo* administration. *bioRxiv [Preprint].* (2018). doi: 10.1101/202101
142. Palestro CJ, Love C, Bhargava KK. Labeled leukocyte imaging: current status and future directions. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* (2009) 53:105–23.

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Perrin, Captao, Mougin-Degraef, Guérard, Faivre-Chauvet, Rbah-Vidal, Gaschet, Guilloux, Kraeber-Bodéré, Chérel and Barbet. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**Titre :** Impact de la radiothérapie interne vectorisée alpha sur le microenvironnement tumoral

**Mots clés :** microenvironnement tumoral, radiothérapie interne vectorisée alpha, transfert adoptif

**Résumé :** Les thérapies anti-cancéreuses actuelles se heurtent à de nombreux obstacles avant de lyser les cellules tumorales : l'hypoxie limite l'efficacité de l'irradiation externe, et la vascularisation déficiente limite l'accès au traitement. De plus, le microenvironnement tumoral (TME) contient des cellules et cytokines immunorégulatrices, empêchant la réponse immunitaire. Les combinaisons thérapeutiques pourraient permettre de modifier ces TME « froid » en « chaud » : plus vascularisés et infiltrés par des cellules immunitaires. Ce travail de thèse s'est concentré sur la combinaison de la radiothérapie interne vectorisée alpha (RIV-a) et du transfert adoptif de LT (ACT), et a permis une diminution de la croissance tumorale dans un modèle de myélome multiple. A partir de ces résultats, le but de ce projet est de comprendre l'impact de la RIV-a sur le TME « froid » et l'efficacité de l'ACT.

Bien que les LT infiltrent la tumeur après l'ACT, seule la combinaison avec la RIV-a permet une déplétion des LT CD4 régulateurs et une production d'IL-2, IFN $\gamma$  et CCL-5 au site tumoral. De plus, la motilité des LT est augmentée dans les tumeur traitées avec la RIV-a. La combinaison RIV-a et ACT semble donc transformer le TME « froid » en « chaud ». Afin de permettre un suivi longitudinal de la réponse tumorale à l'ACT, différentes méthodes de suivi cellulaires ont été développées et comparées. La prolifération rapide des LT n'a pas permis de les marquer avec les méthodes directes, visant à marquer les cellules avant injection. Par conséquent, des cibles potentielles permettant une imagerie avec un anticorps radiomarqué ont été identifiées.

**Title :** Impact of targeted alpha therapy on tumor microenvironment

**Keywords :** tumor microenvironment, targeted alpha therapy, adoptive cell transfer

**Abstract :** Actual cancer therapies are facing numerous challenges towards tumor cell destruction : hypoxia is a limit to optimal efficacy of external irradiation, and poor tumor vascularisation restrains access to tumor cells for treatment like Immunotherapies. Furthermore, tumor microenvironment (TME) involves immunoregulatory cells and cytokines, which prevent anti-tumoral immune response. Therapeutic combination could be the key to turn these « cold » TME into « hot » ones : more vascularised and infiltrated with immune cells. To this end, this PhD project focus on combining Targeted Alpha-Therapy (TAT) and adoptive transfer of T-cells (ACT). This therapeutic combination resulted in a significant tumor growth delay in a multiple myeloma murine model.

Based on these results, the aim of this project was to understand the impact of TAT on the « cold » TME and on ACT efficacy. Although T cells infiltrated the tumor after ACT, only combination with TAT resulted in regulatory CD4 T cell drop and production of IL-2, CCL-5 and IFN $\gamma$  within the tumor. Furthermore, T cells motility was increased on TAT treated tumor. Combining TAT and ACT appears to turn this « cold » tumor model into a « hot » one. To allow a follow-up of the TME and its response to immunotherapy without having to sacrifice the mice, various cell tracking method have been developed and compared. Direct labeling methods, consisting in labeling cells before injection, were not found suitable for fast-proliferating cells like CD8 T cells. Therefore, potential target for imaging with radiolabeled antibody were investigated.