

# Rôle du microbiote intestinal dans la réponse aux thérapies anti-tumorales

Marie Vétizou<sup>1,2,3\*</sup>, Romain Daillère<sup>1,2,3</sup> et Laurence Zitvogel<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Gustave Roussy Cancer Campus, 39 rue Camille Desmoulins, 94800 Villejuif, France

<sup>2</sup> Université Paris Saclay, 63 rue Gabriel Péri, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

<sup>3</sup> Unité INSERM U1015, 114 rue Edouard Vaillant, 94800 Villejuif, France.

Auteur correspondant : Marie Vétizou, [marie.vetizou@gmail.com](mailto:marie.vetizou@gmail.com)

Reçu le 12 novembre 2016

**Résumé** – Le microbiote intestinal est connu pour ses capacités à intervenir dans la digestion, la protection vis-à-vis des pathogènes, la maturation du système immunitaire ou encore le développement du système nerveux entérique. Cette symbiose qu'il forme avec l'hôte ne se limite pas au niveau local et aux conditions physiologiques puisque récemment des rôles dans la modulation des réponses anti-tumorales lui ont été attribués. Qu'elles soient naturelles, ou subséquentes à des traitements par chimio- ou immuno-thérapies, les réponses immunitaires anti-tumorales semblent bénéficier du potentiel de certaines bactéries pour lutter efficacement contre les cellules malignes. Différentes espèces bactériennes et des mécanismes d'actions divers sont impliqués, encourageant la poursuite des recherches dans l'optique d'un développement d'onco-micro-biotiques anti-cancéreux.

**Mots clés** : Microbiote intestinal / cancer / cyclophosphamide / immunothérapies / anticorps anti-CTLA-4

**Abstract** – Gut microbiota and efficacy of cancer therapies.

The gut microbiota is known to affect digestion, protection against pathogens infection, immune system maturation and enteric nervous system development, but others links have also been established with diabetes, obesity, autism and cancer. Lately, bacterial species from the gut have been involved in tumor immunosurveillance. Natural or mediated by treatment such as chemotherapy or immunotherapy, anti-tumoral immune responses seem to rely on gut microbiota. The bacteria involved and their mechanisms of action are different according to the treatment of interest. Nevertheless, modulation of gut microbiota represents a great potential with the development of onco-microbiotics to optimize the response to cancer therapies.

**Key words**: Gut microbiota / cancer / cyclophosphamide / immunotherapy / anti-CTLA-4 antibody

---

Durant des décennies, le cancer était considéré comme une maladie d'origine strictement cellulaire. Les cellules cancéreuses proviennent de l'accumulation de mutations génétiques, altérant l'ADN et

transformant ainsi une cellule normale, le plus souvent de type épithélial, en une cellule maligne. Dernièrement, l'accumulation des connaissances a permis de mettre en évidence de nouvelles propriétés des cellules cancéreuses, dont leur capacité à résister aux fonctions effectrices du système immunitaire (Hanahan & Weinberg, 2011). Le XXème siècle est ainsi marqué par de nombreuses découvertes majeures

\* Les auteurs ont contribué de manière égale à la rédaction de ce manuscrit. Le Prix de la Société de Biologie 2016 a été attribué à Marie Vétizou pour sa thèse de Doctorat de l'Université Paris XI.

## Abréviations

ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
APC :	Cellule présentatrice d'antigène
BM-DC :	Cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse
CD :	Cluster de Différentiation
CMH :	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA :	Cellules présentatrices de l'antigène
CRC :	Cancer colorectal
CTLA-4 :	<i>Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4</i>
CTX :	Cyclophosphamide
DC :	Cellules dendritiques
GF :	<i>Germ Free</i>
IBD :	<i>Inflammatory Bowel Disease</i>
ICB :	<i>Immune Checkpoint Blocker</i>
ICOS :	<i>Inducible T-cell costimulator</i>
IEC :	Cellule intestinale épithéliale
IEL :	Lymphocyte intraépithélial
IFN :	Interféron
IL :	Interleukine
ILF :	<i>Isolated Lymphoid Follicles</i>
IRF :	<i>Interferon Regulatory factors</i>
LPS :	LipoPolySaccharide
LT :	Lymphocyte T
MC38 :	<i>Mouse Colon adenocarcinoma</i>
MCA :	Méthylcholanthrène
MDP :	Muramyl DiPeptide
MDSC :	<i>Myeloid-derived suppressor cells</i>
MO :	Monoxyde d'azote
MyD88 :	<i>Myeloid Differentiation Primary Response88</i>
NaCl :	Chlorure de Sodium
NLR :	<i>NOD-Like Receptors</i>
NOD :	<i>Nucleotide-binding Oligomerization Domain</i>
NSCLC :	Cancer du poumon non à petites cellules
OVA :	Ovalbumine
PBMC :	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCA :	Analyse des composants principaux ( <i>Principle Component Analysis</i> )
PD-1 :	<i>Programmed Death-1</i>
PFS :	<i>Progression Free Survival</i>
PS :	Fraction polysaccharidique de la capsule
pTh17 :	Th17 pathogéniques
REGIII $\gamma$ :	<i>Regenerating Islet-derived protein 3<math>\gamma</math></i>
ROR $\gamma$ t :	<i>Retinoic acid-related Orphan Receptor <math>\gamma</math>t</i>
ROS :	radicaux libres oxygénés
SFB :	<i>Segmented Filamentous Bacteria</i>
SI :	Système Immunitaire
TCR :	Récepteur des cellules T
Th :	<i>Lymphocyte T helper</i>
TIL :	Lymphocytes infiltrant la tumeur
TLR :	<i>Toll-Like Receptor</i>
Treg :	T régulateur
TriDAP :	L-Ala-gamma-D-Glu-mDAP

réalisées par des chercheurs tels que Ehrlich, Burnet et Thomas ou Schreiber, qui montrent que le système immunitaire agit non seulement dans la protection de l'hôte contre des agressions pathogènes mais également dans le contrôle de la prolifération tumorale (Burnet, 1957; Schreiber *et al.*, 2011). L'importance du système immunitaire et du microenvironnement immunitaire tumoral dans la clairance des cellules cancéreuses est alors démontrée. Un changement de paradigme s'est depuis effectué. En effet, le problème n'est plus seulement représenté par la cellule tumorale elle-même, mais également par la tolérance du système immunitaire vis-à-vis de cette cellule. L'objectif de l'immunothérapie est donc de rompre cette tolérance et de stimuler des réponses immunitaires efficaces ciblant la cellule tumorale. Une stratégie récente consiste à inhiber les points de contrôle de la réponse immunitaire par les biais d'anticorps bloquants (ICB, *immune checkpoint blockers*). Ces anticorps, tels que les anti-CTLA-4 ou anti-PD1, ont, par ailleurs, fait preuve d'une efficacité remarquable dans le traitement des mélanomes métastatiques notamment (Hodi *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2011, 2013, 2015; Hamid *et al.*, 2013). Si les réponses anti-tumorales déclenchées par ces molécules sont spectaculaires en termes d'intensité et de durée, malheureusement les ICB ne bénéficient jusqu' alors qu'à une minorité de patients et sont parfois à l'origine d'effets secondaires. En effet, des réponses auto-immunes ont été décrites et furent parfois même à l'origine de décès dans le cas de l'anti-CTLA-4. La localisation principalement digestive et cutanée de ces toxicités, deux sites largement colonisés par la flore microbienne, nous a conduits à étudier le rôle du microbiote intestinal dans l'efficacité de l'anti-CTLA-4 (travaux de thèse de Marie Vétizou). Ces travaux, qui ont été publiés dans *Science* et s'intitulent « *Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota* » (Vétizou *et al.*, 2015), seront développés dans un second temps.

En parallèle, des études ont montré que l'efficacité anti-tumorale de plusieurs agents utilisés en chimiothérapie conventionnelle des cancers est en partie dépendante du système immunitaire (Zitvogel *et al.*, 2008). Cet effet immuno-dépendant de la chimiothérapie peut relever de mécanismes divers parmi lesquels : 1 – L'induction d'une mort cellulaire immunogène caractérisée par l'expression ou la sécrétion de signaux de dangers par la cellule mourante ou 2 – l'action directe sur les cellules immunitaires infiltrant les tumeurs *via* notamment la destruction des cellules immunosuppressives ou l'activation directe des acteurs de la réponse immunitaire anti-cancéreuse. Nous nous sommes intéressés dans notre étude au cyclophosphamide (CTX) (travaux de thèse de Romain Daillère), ces travaux ont été publiés dans les journaux *Science*

et *Immunity* en 2013 et 2016 respectivement (Viaud *et al.*, 2013; Daillère *et al.*, 2016).

## Microbiote intestinal, cancers et chimiothérapies

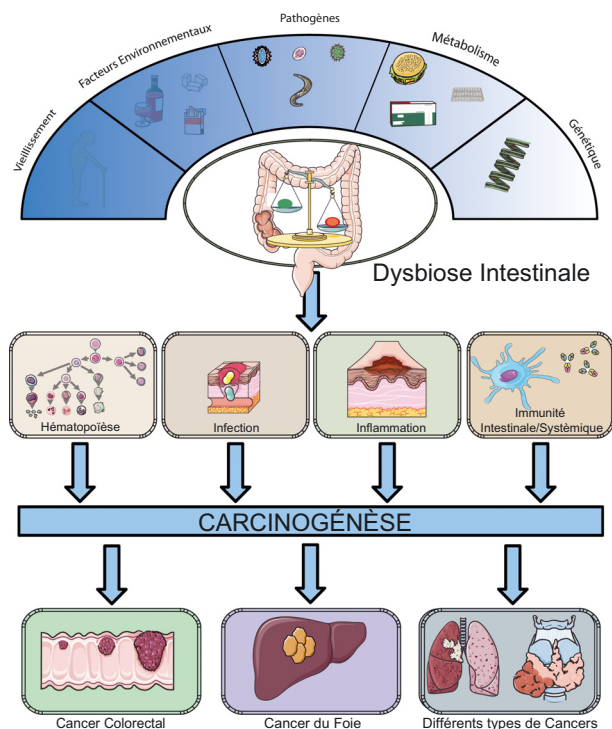
Le CTX est un agent alkylant appartenant à la famille des moutardes azotées, développé par Norbert Brock et la compagnie ASTA en 1946. Cette molécule est devenue, en 1959, le 8<sup>ème</sup> agent cytotoxique approuvé par la FDA (Emadi *et al.*, 2009). Plus de 50 ans après son approbation par les agences réglementaires, le CTX reste une drogue aux propriétés variées et aux effets pléiotropiques couramment utilisée en clinique. Cet agent cytotoxique a des indications très larges et cible différents types de cancers (lymphomes, sarcomes, tumeurs solides : adénocarcinomes mammaires, cancers de l'ovaire). À doses élevées, le CTX a des propriétés cytotoxiques et myéloablatives. Ses propriétés immunosuppressives sont ainsi utilisées dans le cadre de transplantation d'organes ou de maladies auto-immunes telles que l'arthrite rhumatoïde. À des doses métronomiques<sup>1</sup>, le CTX possède des propriétés anti-angiogéniques et immuno-modulatrices (Sistegu *et al.*, 2011). Comme tout agent cytotoxique, le CTX cible les cellules en prolifération, dont les cellules tumorales, mais également les cellules souches qui assurent continuellement le renouvellement des muqueuses, nécessaires au maintien de l'intégrité des tissus. Ainsi, la chimiothérapie est associée à de nombreux effets indésirables tels que les mucosites, qui se caractérisent par une perte de l'intégrité des muqueuses, intestinales notamment (van Vliet *et al.*, 2010). L'épithélium intestinal représente une surface d'échange incroyable d'environ 300 m<sup>2</sup> entre l'hôte et l'environnement extérieur (Movat & Agace, 2014). Il possède une fonction double en agissant à la fois comme barrière physique et biochimique. L'épithélium intestinal contrôle ainsi l'exposition de l'hôte vis-à-vis de la flore intestinale en minimisant le contact entre bactéries et cellules épithéliales et en confinant les bactéries pénétrantes dans le site intestinal afin de limiter l'exposition au compartiment immunitaire sous-jacent (Hooper *et al.*, 2012). Le microbiote humain est composé de 10<sup>14</sup> bactéries et représente une masse d'1 à 2 kg, majoritairement contenue dans notre intestin. La somme totale des génomes, nommée microbiome, représente à elle seule plus de 100 à 150 fois la taille du génome humain (Qin *et al.*, 2010). La colonisation de l'intestin par le microbiote débute à la naissance après exposition au microbiote vaginal maternel et se stabilise vers la troisième année

(Clemente *et al.*, 2012). Il est majoritairement composé des deux *phyla* bactériens que sont les *Firmicutes* et les *Bacteroidetes* (Schloissnig *et al.*, 2013). La composition et la densité du microbiote intestinal dépend de sa localisation chez l'hôte. Dans l'intestin, celle-ci varie tout au long de l'appareil digestif. En effet, la densité du microbiote augmente dans la partie distale de l'intestin alors que les acides gastriques et biliaires, aux effets bactéricides, limitent la croissance des bactéries dans la partie proximale (Costello *et al.*, 2009; Sommer & Bäckhed, 2013). De nombreuses études ont démontré que la composition du microbiote intestinal pouvait être modulée par des facteurs environnementaux tels que le régime alimentaire, la médication, le style de vie, la localisation géographique ainsi que par des facteurs physiologiques intrinsèques à l'hôte que sont notamment l'âge, la génétique ou l'environnement intestinal (*Human Microbiome Project Consortium*, 2012; Ubeda & Pamer, 2012) (Fig. 1). On estime à l'heure actuelle que 30 % de notre microbiote est cultivable par des méthodes classiques de culture *in vitro* ou de culturomique<sup>2</sup> (Lagier *et al.*, 2012). Une relation symbiotique s'est établie entre l'Homme et son microbiote intestinal. L'intestin fournit aux bactéries un microenvironnement riche en nutriments adapté à leur croissance. En contrepartie, le microbiote contribue à de nombreuses fonctions essentielles telles que la digestion des carbohydrates, la colonisation des niches empêchant l'implantation de pathogènes potentiels, le développement et la maturation du système immunitaire (SI) et, découvert plus récemment, le développement du système nerveux entérique (Maynard *et al.*, 2012; Kamada *et al.*, 2013; Collins *et al.*, 2014; El Kaoutari *et al.*, 2014). Ces fonctions sont fortement altérées chez des animaux axéniques, indemnes de tout micro-organisme. On peut ainsi définir l'intestin comme une interface tripartite entre la muqueuse intestinale, le SI et le microbiote dont l'interaction est nécessaire au maintien de l'homéostasie intestinale.

De plus, de récentes études ont établi un lien entre des modifications de la composition du microbiote intestinal, communément appelées dysbioses, et le développement de cancers. Que savons-nous du lien associant le cancer et le microbiote (Fig. 1)? Certaines infections bactériennes, virales, parasitaires ou l'inflammation chronique qui en découle sont identifiées comme d'importants facteurs de risques dans le développement de cancers. En 2012, l'*International Agency for Research on Cancer* (IARC) caractérisait plusieurs microbes comme carcinogènes. Environ 16 % des cancers développés par l'Homme ont été causés

<sup>1</sup> Métronomie : se dit d'un traitement administré à doses réduites et répétées.

<sup>2</sup> Champ créé par l'équipe de Didier Raoult pour exprimer la multiplication des techniques de culture, identification par MALDI-TOF et confirmation par séquençage du 16S RNA.



**Fig. 1.** Liens existants entre dysbiose et carcinogénèse. Facteurs impactant la composition du microbiote et menant à la dysbiose : Vieillesse, facteurs environnementaux, infections pathogènes, traitement, génétique. Mécanismes par lesquels cette dysbiose conduit à la carcinogénèse.

par des agents infectieux (de Martel *et al.*, 2012). La bactérie *Helicobacter pylori* est impliquée dans la carcinogénèse du cancer de l'estomac et du lymphome non Hodgkinien. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est associé au carcinome naso-pharyngé et au lymphome non Hodgkinien, l'herpès virus de type 8 est responsable du développement du sarcome de Kaposi, les virus de l'hépatite B et C sont associés au carcinome hépato-cellulaire. Le papilloma virus humain est responsable de cancers ano-génitaux et de l'utérus. Le virus T lymphotrope humain est à l'origine de lymphomes T. Enfin, le polyomavirus de Merkel est associé à des cancers agressifs de la peau chez des patients immuno-supprimés.

La dysbiose intestinale peut être provoquée non seulement par des organismes pathogènes, mais également à la suite de dysfonctionnements immunitaires et ainsi conduire à un processus inflammatoire carcinogène. C'est le cas par exemple des souris TRUC, déficientes pour les facteurs de transcription T-bet et Rag2 (*Tbet*<sup>-/-</sup> × *Rag2*<sup>-/-</sup>), qui présentent une surreprésentation d'*Enterobacteriaceae* conduisant à une plus grande susceptibilité à la colite induite et aboutissant à la carcinogénèse (Garrett

*et al.*, 2010). D'autres modèles murins déficients pour le TLR5 ou l'IL-10 ont démontré une susceptibilité accrue au développement de colites et de cancers du côlon due à la dysbiose intestinale (Sears & Garrett, 2014).

Si cette dysbiose peut être à l'origine de cancer, elle peut également moduler l'évolution de la maladie, modifiant ainsi son impact sur le pronostic du cancer. Le modèle *Apc*<sup>Min/+</sup> *Msh2*<sup>-/-</sup>, par exemple, présente une mutation dans le gène suppresseur de tumeur *Apc* (*Adenomatous polyposis coli*) et sur le gène *Msh2* (*MutS homolog 2*) appartenant au *DNA Mismatch Repair* (MMR), qui a pour conséquence le développement spontanément de cancers colorectaux (CRC). Il a été démontré que dans ce contexte, le butyrate (appartenant aux *Small Chain Fatty Acids*, SCFA) conduit à l'hyper-prolifération des cellules épithéliales *Msh2*<sup>-/-</sup> du colon et que les régimes sans carbohydrates (sources de butyrate) permettent de réduire le développement de CRC (Belcheva *et al.*, 2014).

Enfin une étude épidémiologique a mis en évidence le rôle de la dysbiose dans le développement de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*), avec une incidence de pathologies inflammatoires trois fois plus importante chez les enfants traités avec au moins cinq cures d'antibiotiques (Hviid *et al.*, 2011). Une analyse basée sur une cohorte de patients diabétiques établit, quant à elle, un lien entre le développement de CRC et le microbiote de ces patients. En effet l'utilisation d'antibiotiques ou le développement d'infections intra-abdominales conduisent à un risque accru de CRC (Wang *et al.*, 2014). Toutes ces observations nous indiquent que le microbiote intestinal influence la carcinogénèse et la progression tumorale locale mais il peut également impacter la progression tumorale à distance. De manière plus surprenante, il semble également moduler la carcinogénèse à distance de l'intestin. En effet, des dysbioses associées à l'obésité ont été liées au développement de carcinomes hépato-cellulaires (induits par un carcinogène) via l'augmentation d'un métabolite bactérien, le DCA (*deoxycholic acid*) (Yoshimoto *et al.*, 2013). Dans une autre étude, Dapito démontre que le microbiote intestinal et le TLR4 participent au développement d'HCC dans le contexte des maladies chroniques du foie (Dapito *et al.*, 2012). L'utilisation d'un antibiotique, la gentamicine, est décrite comme augmentant l'agressivité du cancer du sein dans un modèle murin transgénique proto-neu (Rossini *et al.*, 2006). Il y aurait également une association entre la consommation d'antibiotiques et un risque accru de survenue de cancers du sein selon une méta-analyse de 2010 (Sergentanis *et al.*, 2010). Plus récemment Rutkowski *et al.* (2015) ont décrit le rôle joué par la flore intestinale via le TLR5, les MDSC

(*myeloid-derived suppressor cells*) et les cellules T $\gamma\delta$  dans la croissance des cancers du sein et de l'ovaire.

On se retrouve en présence d'une équation plus complexe quand on considère l'impact des thérapies anti-cancéreuses sur cet équilibre. En effet, certaines chimiothérapies sont capables d'affecter l'intestin en créant des mucosites, des leucopénies, deux complications qui nécessitent des traitements par antibiotiques capables d'induire des dysbioses. Par ailleurs, des travaux ont montré que ces dommages causés à l'épithélium intestinal sont associés à une augmentation de la translocation bactérienne. Dès lors, il est envisageable que tout agent cytotoxique compromettant l'intégrité de la barrière intestinale et l'homéostasie du tractus digestif peut moduler l'immunité intestinale et systémique et ainsi impacter les réponses immunitaires anti-tumorales. Nous avons donc voulu déterminer l'impact du microbiote intestinal sur l'efficacité d'une chimiothérapie par cyclophosphamide (Viaud *et al.*, 2013; Daillère *et al.*, 2016).

### Impact de la flore intestinale dans l'efficacité anti-tumorale du cyclophosphamide

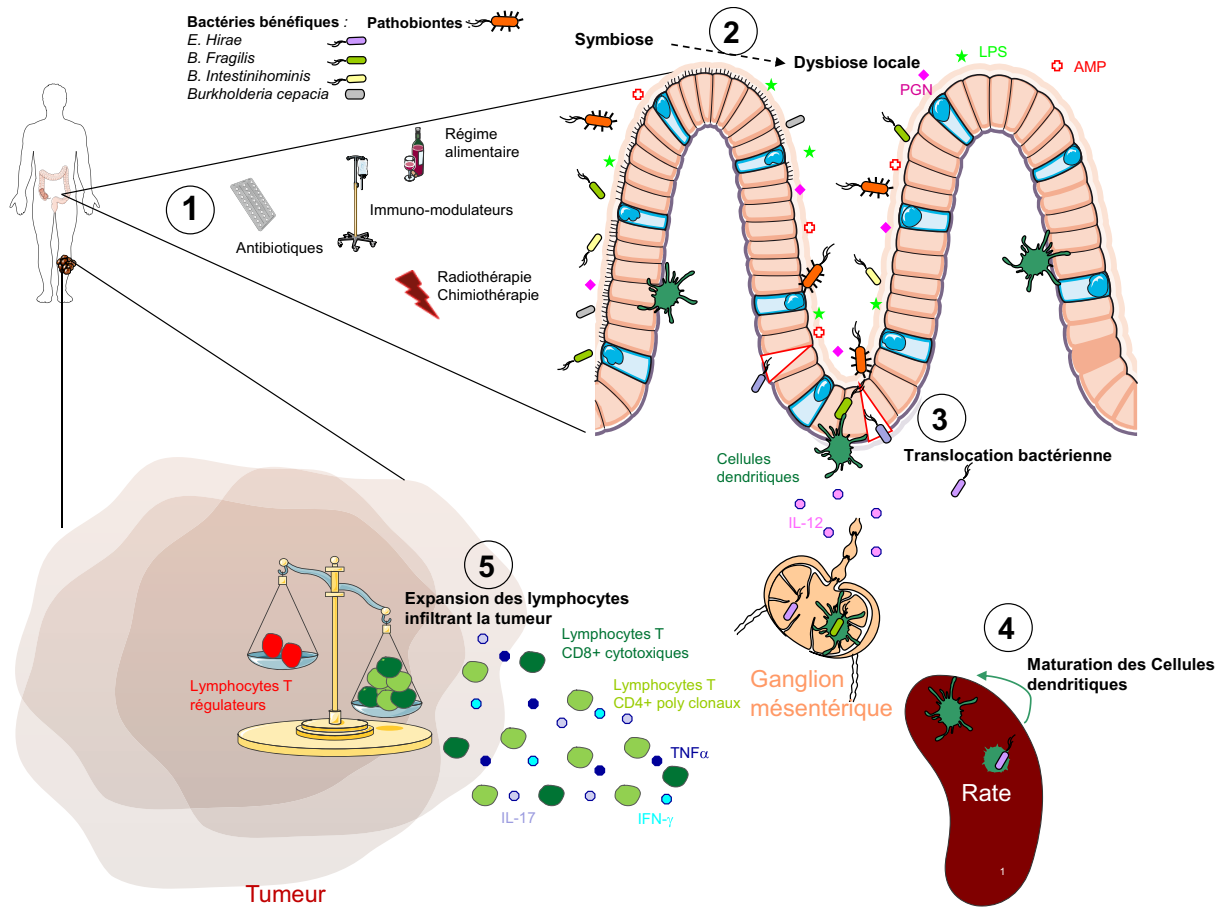
Notre équipe, implantée à l'Institut Gustave Roussy et dirigée par le Pr Zitvogel, en collaboration étroite avec l'Institut Pasteur de Paris (Dr Ivo Gomperts Boneca) et des chercheurs de l'INRA (Dr P. Lepage), a démontré que l'efficacité du CTX repose en partie sur la capacité du CTX à entraîner la translocation de certaines bactéries commensales (*Lactobacillus johnsonii* et *Enterococcus hirae*) dans la circulation et les organes lymphoïdes secondaires (ganglions, rate) (Fig. 2).

Le CTX provoque chez les patients une fragilisation de la barrière intestinale qui permet la rupture de la tolérance de l'individu à sa flore intestinale et son immunisation contre certaines souches bactériennes intestinales. La caractérisation du statut inflammatoire d'intestins de souris recevant du CTX a montré une altération de l'épithélium intestinal marquée par des altérations structurales et une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale. Cette rupture de la fonction de barrière de l'intestin s'accompagne d'une translocation bactérienne dans les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate et les ganglions mésentériques. La mise en culture par des techniques de microbiologie classique a permis d'identifier des bactéries Gram<sup>+</sup> appartenant à la famille des entérocoques ou des lactobacilles (*E. hirae*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*) à partir de ces organes. Des analyses des grandes populations immunitaires résidant dans l'intestin ont montré la capacité du CTX à moduler les cellules dendritiques (CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>)

et les populations lymphocytaires (LT CD3 exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ t) résidant dans la *lamina propria*. En parallèle, la caractérisation du microbiote intestinal par des techniques de pyroséquençage a montré que le CTX module la composition de ce dernier. Ainsi, ces données montrent la capacité du CTX à impacter l'homéostasie du tractus gastro-intestinal en agissant sur les composantes cellulaires, immunitaires et microbiennes.

La chimiothérapie de souris traitées par le CTX s'accompagne d'une polarisation, mesurée dans la rate, de la réponse lymphocytaire de type Th1 (caractérisée par la sécrétion d'IFN $\gamma$ ) ou Th17 (caractérisée par la sécrétion d'IL-17). De façon intéressante, nous avons montré que l'induction de réponses immunitaires est abolie chez des animaux traités par un cocktail d'antibiotiques à large spectre composé de streptomycine, de colistine et d'ampicilline ou chez des souris stériles et sans microbiote, communément appelées axéniques. En parallèle, l'utilisation d'antibiotiques ciblant spécifiquement certaines populations bactériennes (ex : vancomycine) a montré le rôle prépondérant des bactéries Gram<sup>+</sup> dans ce mécanisme. Ces données illustrent ainsi l'association spécifique entre certaines populations bactériennes colonisant l'intestin grêle et/ou se transloquant dans les organes lymphoïdes secondaires et la polarité des réponses lymphocytaires induites par le CTX.

De façon surprenante, nous avons également démontré que l'immunisation anti-bactérienne est composée de lymphocytes effecteurs appelés « Th17 pathogéniques » possédant à la fois les caractéristiques des populations Th1 et Th17. L'augmentation de cette population rare de cellules immunitaires induite par la chimiothérapie est abolie chez des animaux traités par des antibiotiques à large spectre, montrant une fois encore l'implication du microbiote intestinal dans ce phénomène. La caractérisation moléculaire de ce mécanisme, par l'utilisation d'animaux génétiquement déficients en molécules impliquées dans la réponse aux bactéries, a montré l'importance du récepteur Myd88 dans la polarisation pTh17. L'absence de ce récepteur abolit la polarisation pTh17. De plus, le CTX est capable d'induire des réponses immunitaires contre des bactéries commensales normalement ignorées. L'utilisation de LT CD4 exprimant un TCR transgénique restreint au CMH II spécifique de la flagelline CBir1 exprimée par *Clostridium* a montré que la chimiothérapie par CTX augmente l'accumulation des LT CD4 naïves transférées adoptivement dans des souris congéniques et favorise leur différenciation en LT mémoires producteurs d'IFN $\gamma$  et d'IL-17. Ces données montrent la capacité du CTX à induire des pTh17 par un mécanisme dépendant de la flore intestinale et de Myd88.



**Fig. 2.** Rôle de la flore intestinale dans l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses telles que la chimiothérapie par Cyclophosphamide (CTX) et l'immunothérapie par blocage du CTLA-4. En affectant l'intégrité de la paroi intestinale, le CTX provoque une translocation bactérienne vers les organes lymphoïdes secondaires. Ces bactéries vont engendrer la polarisation des réponses effectrices pTh17 (IFN $\gamma$  et IL-17) dans la rate ainsi que des réponses lymphocytaires CD4+ de type Th1 (IFN $\gamma$  et CD8+ Tc1) au sein de la tumeur. L'anti-CTLA-4 entraîne une dysbiose et l'apoptose des cellules épithéliales de la paroi intestinale. Certaines bactéries telles que *Bacteroides fragilis* vont induire des réponses lymphocytaires CD4+ Th1 (IFN $\gamma$ ) via la production d'IL-12 par les cellules dendritiques.

Nous nous sommes ensuite intéressés à déterminer la capacité des bactéries Gram<sup>+</sup> retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires après CTX à polariser les réponses lymphocytaires de type Th1 et Th17. Pour répondre à ces questions, des cellules dendritiques, préalablement chargées avec les bactéries d'intérêts, ont été mises en contact avec des lymphocytes T CD4 spléniques provenant d'animaux naïfs. *E. hirae* et *L. johnsonii* sont capables d'induire des réponses Th17 et Th1 *in vitro*. De façon intéressante, ceci n'est pas retrouvé avec des bactéries contrôles (ex : *E. coli*) ou avec des composants des parois bactériennes tel que le LPS. Ces résultats sont corroborés *in vivo*. En effet, le gavage oral d'animaux sous antibiothérapie et traités par CTX avec *E. hirae* et *L. johnsonii* permet de reconstituer la polarisation pTh17 abolie par les antibiotiques. Cet effet

n'est pas retrouvé lorsque les souris sont gavées avec d'autres bactéries Gram<sup>+</sup> telles que *L. plantarum* ou *L. reuteri*, mais également retrouvé dans les organes lymphoïdes secondaires après CTX. De plus, des réponses mémoires de polarité Th1 sont détectées lorsque des lymphocytes T CD4 spléniques provenant d'animaux préalablement traités par CTX sont restimulés par des cellules dendritiques chargées avec *L. johnsonii* et dans une moindre mesure *E. hirae* mais pas avec *L. plantarum* ni *L. reuteri*. Ces observations montrent que les bactéries colonisant notre intestin sont capables de moduler l'immunité intestinale et systémique après chimiothérapie par CTX.

Nous avons ensuite investigué l'impact des antibiotiques sur l'efficacité anti-tumorale d'une chimiothérapie par CTX. Différents modèles de tumeurs et différents fonds génétiques murins ont été

ainsi utilisés. L'antibiothérapie à large spectre abolit l'efficacité anti-tumorale du CTX chez des souris C57Bl/6 porteuses de sarcomes MCA205 ou des souris DBA2 porteuses de mastocytomes p815 sous-cutanés. L'efficacité du CTX est également diminuée chez des souris axéniques et porteuses de MCA205 comparées à des souris exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (SPF ou EOPS). À l'inverse, en cas de perturbations avancées de l'équilibre de notre flore intestinale (comme celles engendrées par certaines maladies, ou par des antibiothérapies prolongées ou à large spectre), certaines bactéries dominent, nombre d'entre elles étant plutôt tolérogènes et anti-inflammatoires (*P. distasonis*, *Segmented Filamentous Bacteria*, SFB), et de fait, « collaboratrices » de la croissance tumorale. Ainsi, notre équipe a identifié deux espèces bactériennes néfastes pour la réponse aux anthracyclines, autre chimiothérapie pilier utilisée dans de nombreux protocoles. Afin de déterminer l'importance des grands groupes bactériens dans ce mécanisme et ayant démontré la capacité des bactéries Gram<sup>+</sup> à se transloquer vers les organes lymphoïdes secondaires et à polariser les réponses immunitaires vers un profil Th1 et Th17, nous avons décidé de traiter des animaux porteurs de tumeurs avec de la colistine ciblant les Gram<sup>-</sup> ou de la vancomycine ciblant les Gram<sup>+</sup>. La vancomycine et, dans une moindre mesure, la colistine inhibent les effets anti-tumoraux du CTX chez des souris porteuses de sarcomes MCA205. Le rôle délétère de la vancomycine sur l'efficacité du CTX est également observé dans un modèle de tumeur pulmonaire transgénique (adénocarcinomes avec oncogène K-Ras couplé à la délétion p53). En accord avec ces données, nous avons montré que la vancomycine réduit la polarisation des réponses lymphocytaires pTh17 dans la rate après CTX ainsi que l'infiltrat intra-tumoral lymphocytaires CD3 et Th1. Ces données montrent l'association entre la présence de bactéries intestinales commensales Gram<sup>+</sup>, l'induction de réponses lymphocytaires pTh17 et l'efficacité anti-tumorale du CTX chez des souris porteuses de tumeurs.

Afin de valider le potentiel anti-tumoral des pTh17 et de faire un lien causal entre cette population lymphocytaire et l'efficacité anti-tumorale du CTX, nous avons généré *in vitro* des pTh17 à partir d'un cocktail de cytokines (IL-6, IL-23 et IL-1b) et transféré adoptivement ces derniers chez des animaux préalablement traités par antibiotiques et porteurs d'une tumeur. De façon très intéressante, le transfert adoptif de pTh17 permet de restaurer l'efficacité anti-tumorale du CTX.

Cette première étude démontre l'interaction complexe entre le microbiote intestinal, le cancer et les réponses immunitaires anti-tumorales. Nous avons ainsi mis en lumière l'importance du microbiote intestinal dans l'efficacité d'une chimiothérapie par CTX.

L'identification des « bactéries commensales adjuvantes », indispensables à une réponse immunitaire anti-tumorale pendant un traitement cytotoxique et sensibilisant la muqueuse intestinale, permettrait en théorie d'envisager des compensations par probiotiques spécifiques et/ou une alimentation permettant leur ancrage dans les niches intestinales importantes. Une nouvelle ère est née : celle de l'importance du mutualisme hôte-bactéries commensales pendant les traitements du cancer.

La démonstration de l'impact de la flore dans la réponse aux agents chimio-thérapeutiques a été apportée, en parallèle, par une équipe américaine du NIH (Iida *et al.*, 2013). Cette équipe établit que les cellules apparentées aux macrophages présents au sein des tumeurs du côlon de souris répondent aux bactéries commensales par la sécrétion de radicaux libres oxygénés (ROS). Cette synthèse de ROS s'avère nécessaire à l'induction de dommages à l'ADN et permet l'éradication des tumeurs sous chimiothérapie à base de sels de platine (oxaliplatine). La chimiothérapie est rendue inefficace par l'absence de flore intestinale, chez des souris axéniques ou recevant des antibiotiques.

### Identification des bactéries impliquées dans l'efficacité anti-tumorale du cyclophosphamide et mécanismes impliqués

Nous avons, dans la première partie de cette étude, montré l'importance du microbiote intestinal et notamment des bactéries Gram<sup>+</sup> dans l'efficacité anti-tumorale du CTX. L'identification des bactéries capables de jouer le rôle d'adjuvant de la réponse anti-tumorale induite par le CTX restait cependant à démontrer. Ainsi, différents objectifs ont été définis pour répondre à ces nouvelles problématiques : -1. Identifier et mettre en évidence la preuve de principe que certaines bactéries commensales influencent les réponses immunitaires effectrices et mémoires anti-tumorales -2. Montrer que certaines bactéries commensales peuvent être utilisées comme probiotiques anti-tumoraux -3. Identifier les récepteurs inhibiteurs épithéliaux régulant la translocation des bactéries Gram<sup>+</sup> dans un contexte tumoral.

Pour répondre à ces questions, nous avons mis au point un protocole de mono-association des souris avec les bactéries d'intérêts retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires après CTX afin d'étudier leur impact sur l'immunité systémique et anti-tumorale ainsi que sur l'efficacité anticancéreuse du CTX dans des expériences de croissance tumorale. Des souris porteuses de tumeurs MCA205, préalablement traitées par un cocktail d'antibiotiques

à large spectre et du CTX, ont reçu par gavage oral des bactéries Gram<sup>+</sup> retrouvées dans la rate après CTX ou des bactéries Gram<sup>-</sup> comme contrôle. De façon intéressante, seul *Enterococcus hirae*, isolé des rates d'animaux traités par CTX, permet de restaurer l'efficacité de la chimiothérapie perdue avec les antibiotiques contrairement aux autres bactéries testées, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus spp.* ou *Escherichia coli*. Ces données sont corrélées avec la capacité de ces souches bactériennes à induire la polarisation de réponses pTh17 et Th1 après chimiothérapie observées *in vivo* chez des souris naïves. Ainsi, *E. hirae*, par sa capacité à induire des réponses Th1 et pTh17, est associé à l'efficacité anti-tumorale du CTX. De plus, ces données ont été corroborées par des analyses d'expression de gènes caractéristiques de la polarité Th1 (*Tbx21*, *Ifng*) par qPCR de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> triés par cytométrie de flux. Afin de comparer le potentiel immunogène de la souche d'*E. hirae* isolée des rates murines post-CTX avec celui d'autres souches d'origines diverses : environnementales, humaines ou murines, 60 souches ont été comparées par rep-PCR. Ces analyses ont révélé une forte hétérogénéité génomique parmi l'ensemble des souches testées. La capacité à induire des réponses pTh17 et Th1 des différentes souches d'*E. hirae* a été évaluée chez l'animal par le biais d'expériences de mono-association *in vivo*. Deux souches humaines ont été sélectionnées, l'EH17 se révélant incapable d'induire des pTh17 et Th1 contrairement à la souche 708, au potentiel immunogène comparable à la souche murine. Par ailleurs, ces clones sont tous susceptibles aux agents antimicrobiens couramment utilisés en clinique mais se distinguent par leurs propriétés fonctionnelles, notamment la capacité à produire du biofilm ou par leur virulence, évaluée par la mesure de la mortalité à la suite d'infection *in vivo* réalisée dans le modèle du papillon *Galleria mellonella*. De façon intéressante, la souche 708 permet de restaurer l'efficacité de la chimiothérapie perdue à la suite des traitements antibiotiques, contrairement à la souche EH17. Ainsi, cette première partie de l'étude montre l'association entre le caractère immunogène de la souche d'*E. hirae* et sa capacité à restaurer l'efficacité de la chimiothérapie par CTX.

Afin d'élucider le mode d'action de la bactérie, l'implantation d'*E. hirae* au sein de l'intestin a, par la suite, été étudiée par des techniques de culture bactériologique classiques, moléculaires de qPCR et microscopiques de FISH. *E. hirae* possède une localisation préférentielle pour la partie basse de l'intestin grêle, l'iléum et le jejunum. Les bactéries sont retrouvées aussi bien au niveau des muqueuses que dans le contenu de la lumière intestinale. Par ailleurs, des analyses qualitatives par spectrométrie de masse des selles d'animaux mono-associés avec *E. hirae* nous

ont permis de constater que les souris restent majoritairement colonisées avec notre bactérie d'intérêt et ce, jusqu'à 4 jours post-gavage. Par ailleurs, des expériences de cytométrie de flux nous ont permis de déterminer l'impact d'*E. hirae* sur l'homéostasie de l'intestin grêle, notamment sur les compartiments cellulaires et immunitaires. La mono-association des animaux avec *E. hirae* s'accompagne d'une augmentation de la prolifération des populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> et  $\gamma\delta$ T. Par ailleurs, la sécrétion, par les lymphocytes intra-épithéliaux et de la *lamina propria*, de RegIII $\gamma$ , un peptide antimicrobien, est fortement diminuée chez ces souris. En parallèle, la capacité d'*E. hirae* à stimuler la production de mucus par les cellules caliciformes et à moduler la sécrétion de lysozyme par les cellules de Paneth, cellules spécialisées dans la sécrétion de peptides antimicrobiens, a été mise en évidence. Ces données illustrent, qu'en plus de son potentiel à moduler les réponses systémiques et anti-tumorales, *E. hirae* impacte également l'homéostasie intestinale.

Pour déterminer la capacité d'*E. hirae* à stimuler des réponses lymphocytaires dirigées contre des antigènes tumoraux, deux modèles expérimentaux distincts ont été mis en place :

1. Le modèle de tumeur sous-cutanée TC-1 qui exprime l'antigène E7 du papillomavirus humain HPV16. Des régressions tumorales totales sont obtenues chez les souris grâce à la combinaison d'une chimiothérapie par CTX et d'un vaccin, ce dernier étant composé de la sous-unité B de la Shiga toxine couplée à l'antigène E7 et de l' $\alpha$ GalCer comme adjuvant. De plus, les réponses anti-tumorales peuvent être suivies en mesurant l'expansion des populations lymphocytaires T CD8 reconnaissant le peptide tumoral E<sub>739-47</sub>. Le traitement des animaux avec des antibiotiques à large spectre abolit l'efficacité du traitement et l'expansion des lymphocytes dirigés contre l'antigène tumeur. De façon très intéressante, la mono-association des animaux traités par ATBs avec *E. hirae* permet de restaurer l'efficacité du traitement ainsi que la proportion de LT CD8<sup>+</sup> reconnaissant le peptide E<sub>739-47</sub>.
2. Un modèle de tumeur sous-cutanée exprimant l'antigène OVA a été utilisé pour suivre l'activation des populations lymphocytaires CD45.2<sup>+</sup> OTII transgéniques (ayant un TCR restreint reconnaissant le peptide OVA<sub>323-339</sub> présenté par les molécules de CMH II) adoptivement transférées chez des souris porteuses de tumeurs MCA205. Dans ce contexte, *E. hirae* est capable de stimuler la polarisation de réponses Th1 dirigées contre l'antigène tumoral. Ces réponses ne sont pas retrouvées chez des souris traitées par ATBs. Ces travaux démontrent la capacité d'*E. hirae* à stimuler



la mise en place de réponses lymphocytaires CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dirigées contre des antigènes tumoraux.

L'implication de certains récepteurs microbiens dans l'efficacité anti-tumorale du CTX médiée par *E. hirae* a ensuite été étudiée. La reconnaissance des antigènes microbiens est orchestrée par l'expression, dans les cellules épithéliales intestinales et certaines cellules du système immunitaire, d'un panel de récepteurs nommé PRRs (*Pathogen Recognition Receptors*). Ces récepteurs reconnaissent des structures et motifs conservés, tels que les acides nucléiques viraux, les composants des parois bactériennes ou les flagellines. L'engagement de ces cascades de signalisation aboutit à l'activation de facteurs de transcription tels que NFκB et les IRF et à l'expression d'un ensemble de gènes immuno-modulateurs et pro-inflammatoires impliqués dans l'initiation et la régulation des réponses innées et adaptatives, nécessaires au maintien de l'homéostasie et de l'intégrité de la barrière intestinale. Le rôle de certains TLR et NLR a été précisé dans l'étude.

Nous avons montré que la translocation bactérienne après CTX est accrue chez des animaux déficients pour les récepteurs intracellulaires NOD1 et NOD2 lorsque qu'elle est comparée à celle des animaux sauvages. De façon intéressante, l'efficacité anti-tumorale du CTX est augmentée chez ces animaux par rapport à des animaux sauvages. En parallèle, la stimulation des récepteurs NOD1 et NOD2 par leurs agonistes respectifs, le TriDAP et le MDP, permet d'abolir la polarisation pTh17 induite par le CTX et s'accompagne de la sécrétion d'un peptide antimicrobien limitant la croissance bactérienne, la lipocaline 2, retrouvé dans les selles de ces animaux. Ces observations montrent ainsi le rôle inhibiteur des récepteurs NOD dans l'efficacité anti-tumorale du CTX en réduisant translocation bactérienne et polarisation de la réponse pTh17.

L'efficacité anti-tumorale du CTX étant accrue chez les animaux déficients pour NOD1 et NOD2, nous avons décidé de caractériser le microbiote intestinal de la muqueuse de l'intestin grêle et des fèces de ces souris par pyroséquençage. Des analyses en composantes principales ont révélé des différences importantes entre les modèles murins (sauvages et déficients pour les NOD1 et NOD2, NOD1/NOD2 KO) et l'impact du CTX sur la composition du microbiote. Une augmentation significative des *Clostridium* (principalement SFB) dans la muqueuse iléale et des *Porphyromonas* (du genre *Barnesiella*) dans les selles des animaux NOD1/NOD2KO traités par CTX a été mesurée. Des données préliminaires du laboratoire montraient l'impact néfaste de la colistine sur la génération de la mémoire immunitaire dirigée contre l'antigène tumoral OVA, illustrant ainsi le rôle fondamental des bactéries Gram<sup>-</sup> dans ce mécanisme. En

effet, nous avons montré que la colistine abolit la protection de la vaccination avec l'antigène OVA contre un challenge d'une dose létale de cellules tumorales MC38 exprimant OVA. Afin d'identifier une bactérie Gram<sup>-</sup> potentiellement impliquée dans ce mécanisme de mémoire immunitaire, des mono-associations d'animaux traités par colistine avec un panel de bactéries Gram<sup>-</sup> ont été menées et ont démontré le rôle protecteur de *Barnesiella intestinhominis*. Cette bactérie, étonnamment retrouvée augmentée dans les selles des animaux NOD1/NOD2 KO, permet de compenser la perte d'efficacité du vaccin et restaure l'expansion des populations lymphocytaires CD8<sup>+</sup> dirigées contre le peptide OVA. Ceci n'est pas observé avec d'autres bactéries Gram<sup>-</sup> telle qu'*E. coli*.

Par la suite, nous avons comparé la capacité de nos deux bactéries d'intérêts, *E. hirae* et *B. intestinhominis*, à moduler le microenvironnement immunitaire tumoral. Alors qu'*E. hirae* se distingue par sa capacité à réprimer les populations Treg, immunosuppressives, et à stimuler l'infiltrat lymphocytaire CD8<sup>+</sup>, augmentant ainsi le ratio CTL/Treg très important en oncologie, *B. intestinhominis* stimule les réponses γδT productrices d'IFNγ. De plus, ces deux bactéries répriment les réponses γδT productrices d'IL-17, immunosuppressives elles-aussi. Par ailleurs, des gavages répétés avec *E. hirae* et *B. intestinhominis* améliorent l'efficacité de la chimiothérapie chez des souris porteuses de MCA205. Cet effet n'est pas restreint au modèle tumoral étudié puisque *B. intestinhominis* est également capable d'améliorer l'effet du CTX chez des souris porteuses de cellules tumorales Ret, un modèle de mélanome. L'utilisation d'anticorps bloquant ou neutralisant différents composants du système immunitaire a permis de montrer que l'efficacité anti-tumorale de ces deux bactéries était en partie médiée par les LT CD8<sup>+</sup> et l'IFNγ.

Enfin, de manière à déterminer le rôle différentiel des récepteurs NOD1 et NOD2 dans l'efficacité anti-tumorale du CTX, des animaux exprimant une recombinaison transgénique pour le récepteur NOD2 spécifiquement sur les cellules épithéliales intestinales sous le contrôle du promoteur de la villine ont été utilisés (*NOD2 Villin Cre*). Le traitement par tamoxifène de ces animaux induit une perte du gène NOD2 spécifiquement dans les cellules épithéliales intestinales. La translocation d'*E. hirae* dans ce contexte est augmentée chez des animaux monocolonisés avec *E. hirae* en comparaison avec les animaux sauvages. Par ailleurs, les animaux *NOD2 Villin Cre* présentent plus de pTh17 ainsi que de γδT dans leur rate après traitement par CTX. En parallèle, nous avons montré que l'absence de NOD2 améliore significativement l'efficacité du CTX par comparaison avec des animaux WT. Celle-ci n'est pas améliorée chez des animaux déficients pour NOD1. La stimulation

du récepteur NOD2 par son agoniste inhibe l'efficacité anti-tumorale du CTX alors qu'elle demeure inchangée en cas de stimulation de NOD1. Ces données illustrent le potentiel du récepteur NOD2 à inhiber l'efficacité du cyclophosphamide. L'investigation de l'infiltrat immunitaire tumoral conclut que les animaux NOD2 traités par CTX contiennent beaucoup moins de lymphocytes T régulateurs, connus pour leurs propriétés immuno-suppressives et leur soutien à la progression tumorale, que les animaux sauvages. Une augmentation significative des populations  $\gamma\delta$  T producteurs d'IFN $\gamma$  a été mise en évidence chez les animaux déficients pour NOD2 traités par CTX par comparaison aux animaux sauvages. Afin de caractériser l'impact de nos bactéries d'intérêts sur l'épithélium de l'intestin grêle, des entéroïdes (modèle 3D dérivé de cryptes d'intestin grêle) d'animaux sauvages ou déficients pour NOD2 ont été mis au point. Des techniques de microscopie sur ces entéroïdes ont permis de conclure que les deux bactéries d'intérêt, *E. hirae* et *B. intestinhominis*, induisent une mort cellulaire NOD2-dépendante caractérisée par une augmentation du clivage de la caspase 3 dans les entérocytes. Le rôle protecteur de NOD2 en réponse à ces bactéries a été corroboré par des analyses d'expressions de gènes tels que *Bax* et *l'Il18*, qui sont augmentées dans les entérocytes en absence de NOD2. Par ailleurs, la chimiothérapie par CTX chez des animaux ayant une déficience conditionnelle pour le récepteur NOD2 au niveau de l'épithélium intestinal induit une forte augmentation des pTh17 et des  $\gamma\delta$ T comparés aux souris WT. L'ensemble de ces données suggèrent que les récepteurs intra-épithéliaux NOD2 représentent d'importants points de contrôle immunitaires intestinaux en restreignant dans la lumière intestinale les bactéries Gram<sup>+</sup> ayant la capacité de se transloquer dans les organes lymphoïdes secondaires et d'induire la polarisation de pTh17 ainsi que les bactéries Gram<sup>-</sup> présentes dans le côlon.

Enfin nous avons souhaité déterminer si les données précliniques obtenues chez la souris, combinées aux observations ayant montré l'impact du microbiote intestinal sur l'efficacité des chimiothérapies à base de sels de platine, avaient une pertinence clinique dans le cas de patients souffrant de cancer. Pour répondre à cette question, la valeur prédictive des réponses mémoires lymphocytaires CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> Th1 dirigées contre des bactéries commensales sur la survie sans progression (PFS) de 38 patients souffrant d'un cancer du poumon non à petites cellules ou d'un cancer de l'ovaire et préalablement traités par une chimiothérapie à base de sels de platine ou de cyclophosphamide a été évaluée. Les cellules mononucléaires humaines du sang périphérique ont été fournies par l'Institut Gustave Roussy (Villejuif, France) et le département de pathologie et d'immunologie de

l'université de Monash (Victoria, Australie). De façon saisissante, les fortes réponses Th1 induites par *E. hirae* post-chimiothérapie prédisent une survie sans progression de la maladie (PFS) plus longue chez les patients alors que les fortes réponses Th1 dirigées contre les autres bactéries testées sont sans rapport. Par ailleurs, un ratio IFN $\gamma$ /IL-10 élevé après stimulation avec *B. intestinhominis* prédit également une PFS plus longue chez ces patients.

Cette étude montre ainsi la capacité de certaines espèces bactériennes, *E. hirae* et *B. intestinhominis*, à moduler l'efficacité anti-tumorale du CTX. Ces espèces sont capables de stimuler la mise en place de réponses effectrices et mémoires anti-tumorales permettant de compenser la perte d'efficacité du CTX chez des animaux traités par antibiothérapie. Ces résultats constituent un rationnel pour reconstituer une flore diverse et optimale intégrant des espèces importantes telles que des entérocoques et des *Barnesiella* afin d'optimiser les réponses anti-tumorales aux agents alkylants, encore couramment utilisés en clinique contre les sarcomes, cancers du sein ou autres pathologies hématopoïétiques et pédiatriques. Ces espèces représentent ainsi de potentiels probiotiques pouvant améliorer les effets de cette chimiothérapie.

Parallèlement aux études réalisées par notre équipe et celle du Pr Trinchieri au NIH (Iida *et al.*, 2013), démontrant le rôle du microbiote intestinal dans l'efficacité des chimiothérapies, nous nous sommes intéressés aux liens potentiels entre la flore intestinale et les immunothérapies anticancéreuses, et plus particulièrement les *Immune Checkpoint Blockers* (ICB). L'anti-CTLA-4 représente le premier ICB ayant démontré une efficacité chez les patients atteints de mélanome métastatique.

## Impact de la flore intestinale dans l'efficacité anti-tumorale des immunothérapies.

L'activation des lymphocytes T requiert deux signaux distincts, incluant le signal du récepteur des cellules T (TCR), spécifique de l'antigène et un signal de co-stimulation, dont le mieux caractérisé implique la molécule CD28. L'homodimère CD28 est exprimé sur les lymphocytes T au repos. Après activation de ces derniers, il interagit avec le CD80 et le CD86 présents sur les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). L'engagement du CD28 amplifie les effets transcriptionnels du TCR. Le CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*), une glycoprotéine apparentée au CD28 est surexprimée 2 à 3 jours après l'activation des lymphocytes T et se lie aux mêmes

molécules CD80 et CD86 mais avec une affinité environ 20 fois supérieure à celle du CD28 (Linsley *et al.*, 1991; Perkins *et al.*, 1996). L'expression du CTLA-4 à la surface des lymphocytes T va alors entraîner une compétition avec le CD28 pour l'accès aux ligands. Les travaux de Krummel et Allison ont démontré qu'en se liant au CD80 et au CD86, le CTLA-4 déclenche un signal opposé à celui délivré par le CD28. En effet, à la suite de l'engagement de ce récepteur, la progression dans le cycle cellulaire, l'expression du récepteur à l'IL-2 ainsi que la production d'IL-2 des lymphocytes T sont bloquées, identifiant ainsi le CTLA-4 comme un régulateur négatif de leur activation (Krummel & Allison, 1995; Blair *et al.*, 1998). Son expression à la membrane cellulaire après l'activation du TCR résulte de l'exocytose de vésicules intracellulaires. L'exposition du CTLA-4 à la surface permet également d'augmenter la motilité des lymphocytes T, engendrant ainsi la diminution des interactions entre les lymphocytes T et les APC, requises pour une activation T optimale (Schneider *et al.*, 2006, 2008). On parle alors de rétrocontrôle inhibiteur du système immunitaire.

Le blocage de CTLA-4 permet d'augmenter la prolifération des lymphocytes T dans une réaction lymphocytaire mixte allogénique (Valunas *et al.*, 1994, 1996; Krummel & Allison, 1995).

Le rôle vital de ce récepteur dans le maintien de l'homéostasie du système immunitaire est illustré par la mort précoce des souris déficientes pour la protéine (3 à 4 semaines après leur naissance) des suites de nombreux désordres lympho-prolifératifs avec en particulier de sévères myocardites et pancréatites (Tivol *et al.*, 1995; Waterhouse *et al.*, 1995).

L'inhibition de cette voie sera rapidement envisagée comme une stratégie thérapeutique dans la lutte contre le cancer, permettant ainsi d'améliorer les réponses immunitaires effectrices anti-tumorales. L'équipe du Pr Allison a démontré que l'injection d'un anticorps bloquant le CTLA-4 chez des souris de phénotype sauvage permet d'améliorer le contrôle de la tumeur, dans un modèle de carcinome de côlon ainsi que dans un modèle de fibrosarcome (Krummel & Allison, 1995; Leach *et al.*, 1996). Ces résultats ont ensuite été confirmés dans un modèle préclinique de cancer de la prostate (TRAMPC1) (Kwon *et al.*, 1997). Ces travaux précliniques très encourageants conduiront au développement clinique d'anticorps monoclonaux bloquant le CTLA-4 (ipilimumab et tremelimumab).

Deux études cliniques de phase III (Hodi *et al.*, 2010; Robert *et al.*, 2011) ont démontré que l'ipilimumab (un anticorps bloquant le CTLA-4 développé par Bristol-Myers-Squibb) apporte un bénéfice sur la survie globale des patients atteints de mélanome métastatique. Ces résultats ont conduit à son autori-

sation de mise sur le marché en 2011, révolutionnant ainsi la prise en charge de cette pathologie de mauvais pronostic. Par le biais de l'anti-CTLA-4, les stratégies d'immunothérapie ne visent plus seulement les cellules tumorales mais ciblent un système immunitaire rendu incompetent à la lutte anti-tumorale. Depuis 2011, de nombreux autres anticorps inhibant les points de contrôle du système immunitaire sont en cours d'évaluation et d'autorisation (Anti-PD1, -PDL1, -LAG3...). L'anticorps bloquant le CTLA-4 a donc ouvert la voie d'une ère nouvelle en oncologie.

Cependant, le blocage du CTLA-4 est aussi associé au développement d'effets indésirables majoritairement au niveau de la peau et de l'intestin, deux sites colonisés par la flore microbienne. Des colites de grades 3-4 sont déclenchées par la levée de ce point de contrôle du système immunitaire, et ont malheureusement entraîné la mort de patients par perforation digestive. Afin de poursuivre le développement de ces immunothérapies et d'envisager des combinaisons de traitements, de nombreux efforts visent donc à découpler l'efficacité anti-tumorale de la toxicité associée.

Le premier signe d'un rôle éventuel du microbiote dans la modulation des immunothérapies a émergé après l'observation d'une amélioration de l'efficacité du transfert adoptif de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en cas d'association à une irradiation totale du patient. Ce bénéfice est réduit en absence de microbiote intestinal (antibiothérapie) et pourrait s'expliquer par l'induction d'une translocation bactérienne due à l'irradiation; des quantités importantes de lipopolysaccharide (LPS) ont en effet été retrouvées dans le sérum des patients concernés (Paulo *et al.*, 2007; Dudley *et al.*, 2008).

En 2013, deux études (Iida *et al.*, 2013; Viaud *et al.*, 2013) ont démontré le rôle de la flore intestinale dans l'efficacité de certaines chimiothérapies et immunothérapies anti-cancéreuses. Dans leurs travaux, Iida *et al.* abordent l'impact du microbiote intestinal dans l'efficacité de thérapies anticancéreuses basées sur la réactivation du système immunitaire. Dans un modèle préclinique, la croissance tumorale est ralentie par l'administration intra-tumorale de CpG-oligodéoxynucléotides (ligands du *Toll Like Récepteur 9* (TLR9)) combinée à la neutralisation du récepteur à l'IL-10. Cette combinaison entraîne la nécrose de la tumeur *via* la production de TNF $\alpha$  et de monoxyde d'azote (NO) par les cellules myéloïdes du microenvironnement. En l'absence de microbiote intestinal, la production de TNF $\alpha$  est inhibée et l'efficacité anti-tumorale de l'immunothérapie est fortement diminuée.

Afin de déterminer l'éventuel rôle du microbiote intestinal dans l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4, la croissance tumorale dans le modèle MCA205 OVA a été évaluée chez des souris

conventionnelles ou dépourvues de flore intestinale (axéniques ou bien traitées *per os* par un cocktail d'antibiotiques à large spectre). En absence de flore intestinale, l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 est dramatiquement réduite. Ces résultats ont été validés dans deux autres modèles tumoraux, le modèle de mélanome Ret ainsi que le modèle de carcinome de côlon MC38. Les biomarqueurs d'efficacité de l'anti-CTLA4 ont été suivis afin d'évaluer leur dépendance *vis-à-vis* de la flore intestinale. Dans un premier temps nous avons constaté que l'augmentation de la prolifération (monitorée par l'expression du KI67) et de la costimulation (*via* l'expression d'ICOS) sur les lymphocytes CD4<sup>+</sup> était amoindrie dans les rates d'animaux traités par les antibiotiques. Dans un second temps nous avons remarqué que l'augmentation des TIL et la production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  par les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> intra-tumoraux post anti-CTLA-4 étaient aussi dépendantes de la flore intestinale et diminuées chez les souris traitées par antibiotiques.

Par la suite, l'incidence de l'anti-CTLA-4 dans la survenue et la sévérité des lésions intestinales a été estimée. Contrairement à l'Homme, les souris ne développent pas de colites par blocage systémique du CTLA-4. Cependant des lésions intestinales peuvent être observées, témoignant de colites « subcliniques » à des temps tardifs après le début du traitement. La lipocaline 2, un peptide antimicrobien, souvent associé à l'activation des neutrophiles est augmentée dans les fèces et le cæcum d'animaux traités par anti-CTLA-4. Une augmentation des lymphocytes Th17 et Th1 dans la *lamina propria* du côlon a également été constatée. Enfin la longueur des villosités et l'épaisseur de la muqueuse du côlon sont significativement réduites après le blocage du CTLA-4, ces derniers paramètres sont moins importants en absence de flore intestinale, suggérant que ces signes de « colites sub-cliniques » sont dépendants du microbiote.

Dans les 24h suivant le traitement, une augmentation de la mort cellulaire des cellules épithéliales intestinales (IEC) a été observée et semble dépendante des lymphocytes intra-épithéliaux (IEL). En effet la déplétion des lymphocytes abroge l'apoptose des IEC, alors que la co-culture d'IEL provenant de souris traitées par anti-CTLA-4 et d'entéroïdes entraîne l'apoptose de ces derniers. L'anti-CTLA-4 semble donc compromettre l'équilibre homéostatique entre les IEC et les IEL de manière très précoce, pouvant représenter un des événements déclencheurs de l'action du microbiote intestinal dans ce modèle.

Afin d'explorer si ces perturbations locales ont un impact sur la flore intestinale, un pyroséquencage de l'ARN ribosomal 16S a été réalisé à partir des fèces d'animaux avant et après une injection

d'anti-CTLA-4. L'analyse des composants principaux (PCA, *principal component analysis*) a permis de mettre en évidence qu'une injection d'anti-CTLA-4 modifie la composition du microbiote intestinal. Le blocage du CTLA-4 induit une rapide diminution des *Bacteroidales* et des *Burkholderiales* avec une augmentation relative des *Clostridiales*. La sous-représentation des *Bacteroidales* dans les fèces après traitement par anti-CTLA-4 a été validée par PCR quantitative. A l'inverse, la quantification des *Bacteroides* dans la muqueuse de l'intestin grêle semble indiquer un enrichissement de certaines espèces après une injection d'anti-CTLA-4.

Ensuite, de manière à établir une relation de cause à effet entre la dysbiose induite par l'anti-CTLA-4 et l'efficacité anti-tumorale, des expériences de recolonisation bactérienne ont été menées, ainsi des animaux dépourvus de flore intestinale (animaux axéniques ou bien traités par une antibiothérapie à large spectre) ont reçu par gavage oral différents isolats bactériens. La reconstitution d'animaux axéniques avec *B. fragilis* restaure totalement les effets de l'anti-CTLA-4, en induisant une réponse spécifique Th1 dans le ganglion drainant la tumeur, et une augmentation de l'expression de CD80 sur les cellules dendritiques (DC) (CD11c<sup>+</sup>I-A<sup>b+</sup>) intra-tumorales. De même, le gavage oral de souris traitées par *B. fragilis*, *B. thetaïotaomicron* ou du cocktail *B. fragilis* + *Burkholderia cepacia* (*B. c*) permet de rétablir l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4. Ces bactéries n'aggravent pas les signes histo-pathologiques de colites, à l'inverse elles semblent même protéger les animaux. Les autres isolats testés, *Escherichia Coli*, *Lactobacillus plantarum*, *E. hirae* et *Bacteroides distasonis* ne permettent pas d'améliorer les effets anti-tumoraux de l'anti-CTLA-4.

Par ailleurs, nous avons recherché l'existence de réponses T mémoires spécifiques de certains commensaux, en particuliers les Bactéroïdales. Pour cela des cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BM-DC) ont été générées et ont été infectées avec différentes bactéries, puis mises en culture pendant 24 heures en présence de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> issus de rates d'animaux traités ou non par anti-CTLA-4. La réponse mémoire a été mise en évidence en dosant l'IFN $\gamma$  et l'IL-10 des surnageants après 24h de culture. Des réponses mémoires Th1 caractérisées par la production d'IFN $\gamma$  (concomitante à une faible production d'IL-10) ont été obtenues à l'encontre de *B. fragilis* (*B. f*) et de *B. thetaïotaomicron* (*B. t*). Ces réponses sont plus importantes chez les animaux ayant reçu de l'anti-CTLA-4 que chez ceux ayant été traités par l'isotype contrôle. Ces réponses ne sont pas observées avec *B. distasonis* ou *B. uniformis*. Le transfert adoptif de ces lymphocytes T spécifiques de *B.f* chez des animaux axéniques permet de rétablir une réponse anti-tumorale de l'anti-CTLA-4. Ces résultats démontrent

ainsi qu'une réponse immunitaire adaptative dirigée contre certaines bactéries est nécessaire et suffisante pour restaurer l'efficacité de l'anti-CTLA4 en absence de flore intestinale.

La pertinence clinique de ces bactéries a été ensuite évaluée en analysant l'immunisation des patients atteints de mélanome métastatique ou de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) pendant le traitement par ipilimumab contre leurs commensaux intestinaux. Nous avons mis en évidence une immunisation spécifique vis-à-vis de *B.f* et *B.t* dans le mélanome métastatique et de *B.c* dans le cancer du poumon, ces réponses Th1 mémoires productrices d'IFN $\gamma$  étant augmentées sous l'action de l'ipilimumab.

En conclusion, certains *Bacteroides* peuvent stimuler une réponse immunitaire Th1 spécifique qui est requise pour un effet thérapeutique optimal de l'anti-CTLA-4, sans que ces bactéries ne contribuent à la toxicité intestinale associée au traitement. Il semble donc possible de découpler la toxicité et l'efficacité thérapeutique du blocage du CTLA-4 à travers le microbiote intestinal.

Afin d'exploiter au mieux cette hypothèse et envisager une application thérapeutique, le mécanisme de reconnaissance de ces bactéries a été étudié.

Etant donné le rôle du TLR4 et du TLR2 dans la reconnaissance des bactéries Gram négatives et des *Bacteroides* respectivement, leurs rôles ont été explorés dans deux modèles tumoraux, MCA205OVA et le carcinome de côlon CT26, à l'aide de souris déficientes pour ces récepteurs. L'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 disparaît partiellement chez les animaux *Tlr2*<sup>-/-</sup> et *Tlr4*<sup>-/-</sup>. En revanche, l'administration d'agonistes de ces TLR (LPS + LTA) ne permet pas de restaurer l'activité de l'anti-CTLA-4 abolie par des antibiotiques. Ces résultats indiquent que, dans ce contexte, les signaux innés semblent moins essentiels que l'immunité adaptative dirigée contre les membres de la famille des *Bacteroidaceae*. C'est pourquoi la dynamique des cellules dendritiques intestinales après blocage du CTLA-4 a ensuite été examinée. L'analyse par cytométrie de flux révèle une perte des DC plasmacytoïdes accompagnée d'une accumulation des DC CD11b<sup>+</sup> dans le côlon. L'infection de BM-DC avec *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* ou la fraction polysaccharidique (PS) de la capsule de *B. fragilis* sont capables d'induire une production d'IL-12p70. La production d'IL-12 est requise dans le mécanisme d'action de l'anti-CTLA-4 puisque sa neutralisation diminue l'efficacité anti-tumorale de l'anti-CTLA-4. L'efficacité anti-tumorale médiée par *B.f* dans le contexte axénique est également réduite par le blocage de l'IL-12 et la maturation des DC intra-tumorales évaluée par l'expression du CD80 est aussi amoindrie en absence d'IL-12. Ensuite, des BM-DC

ont été infectées avec des fractions polysaccharidiques purifiées à partir de *B. fragilis* ou de *B. distasonis* ou avec des peptides (KD)<sub>20</sub> pendant 24 heures puis réinjectées en intraveineuse à des souris traitées par antibiotiques. Seules les BM-DC stimulées avec les PS de *B. fragilis* sont capables de restaurer partiellement une réponse anti-tumorale de l'anti-CTLA-4 chez des souris pré-conditionnées par antibiotiques. Ces résultats suggèrent que les effets du blocage du CTLA-4, dépendants du microbiote intestinal, requièrent la mobilisation de DC intestinales qui déclenchent des réponses Th1 (IL12 dépendantes) spécifiques de certains commensaux.

Pour démontrer la pertinence clinique de ces observations une analyse, par pyroséquencage, de la composition microbienne des fèces de patients atteints de mélanomes métastatiques (MM) traités par ipilimumab a été réalisée. Trois groupes, A, B et C ont été déterminés par une analyse de forêts d'arbres décisionnels<sup>3</sup> à partir de la composition en *Bacteroides* et *Prevotella*. Le potentiel anti-tumoral de chaque groupe de patients a été évalué par transfert du matériel fécal (FMT) chez des animaux axéniques. Les animaux recevant les fèces du groupe C répondent de manière significative à l'anti-CTLA-4, alors que ceux recevant les fèces du groupe B sont résistants au traitement. Une anti-corrélation entre la taille de la tumeur et la quantité de *B. fragilis* retrouvée chez les animaux du groupe C a pu être mise en évidence. Ainsi, plus l'animal est colonisé avec *B. fragilis* après l'anti-CTLA-4, mieux il contrôle la pousse tumorale.

Ces travaux ont démontré comment l'efficacité anti-tumorale d'une immunothérapie par blocage du CTLA-4 peut être influencée par les bactéries commensales de l'intestin (Fig. 2). Ces résultats suggèrent de considérer l'importance de ces bactéries et de les envisager comme des traitements adjuvants en oncologie. Ainsi, des patients présentant une flore intestinale peu favorable pourraient se voir proposer des compensations soit par des prébiotiques, soit par des probiotiques ou encore par des stratégies de transplantation fécale.

Cette notion est étayée par un article de Sivan *et al.* (2015), où les auteurs démontrent le rôle des *Bifidus longum* et *breve* dans l'immunosurveillance naturelle de la tumeur et dans la réponse au traitement par un autre anticorps ciblant les rétrocontrôles du système immunitaire, l'anti-PDL1.

Notre étude aborde également la capacité de certaines bactéries à participer à l'efficacité de la thérapie sans pour autant accompagner la survenue de toxicités. En effet, la compensation orale avec le cocktail

<sup>3</sup> L'algorithme des forêts d'arbres décisionnels effectue un apprentissage sur de multiples arbres de décision entraînés sur des sous-ensembles de données légèrement différents.

*B. fragilis* + *Burkholderia cepacia* semble même protectrice des dommages de l'intestin provoqués par l'anti-CTLA-4 chez l'animal. Des recherches menées au *Memorial Sloan Kettering Cancer Center* par les Pr Pamer et Wolchok ont décrit le rôle du microbiote intestinal dans la survenue de colites chez les patients. Ils concluent qu'une sur-représentation en bactéries appartenant au phylum des *Bacteroidetes* est associée à une résistance au développement de colites induites par le blocage du CTLA-4 (Dubin *et al.*, 2016). Ces résultats nous confortent dans l'idée qu'une modulation du microbiote pourrait permettre de découpler l'efficacité de cette thérapie de sa toxicité.

## Vers la notion d'onco-micro-biotiques

Ainsi, ces études pionnières ont démontré l'impact de la flore intestinale sur l'efficacité de traitements immuno-modulateurs. On est cependant en droit de s'interroger sur les mécanismes qui suggèrent l'utilisation de bactéries en tant que probiotiques anticancéreux. Différentes observations vont cependant dans ce sens :

1. La géo-distribution des bactéries commensales dans l'intestin pourrait être cruciale pour permettre l'accès des cellules dendritiques contenues dans la *lamina propria* aux bactéries immunogènes. Les bactéries qui résident au niveau de la muqueuse ou dans les cryptes, plutôt que celles résidant dans la lumière intestinale semblent être des candidats évidents pour réguler les réponses immunitaires, locales et systémiques (Pédrón *et al.*, 2012; Farache *et al.*, 2013).
2. Le modèle proposé par Dan Littman et ses collègues corrélant la polarisation des réponses lymphocytaires intestinales avec le contexte antigénique bactérien environnant est logique dans le contexte du CTX. Par exemple, la capacité de l'isolat murin d'*E. hirae* à induire des réponses Th1 et pTh17 a été démontrée et ces réponses sont associées à l'efficacité de la chimiothérapie par CTX.
3. Les composés bactériens sont capables d'influencer l'environnement immunitaire des organes lymphoïdes secondaires ou du lit tumoral comme ceci a été démontré par l'équipe de Giorgio Trinchieri (Iida *et al.*, 2013).
4. Les réponses immunitaires adaptatives dirigées contre les bactéries peuvent résider au niveau des lésions inflammatoires et ainsi ré-initier l'immunité locale, notamment *via* la sécrétion de cytokines et la maturation des DC.
5. Il n'est pas inconcevable de faire un parallèle entre les antigènes microbiens et les antigènes tumoraux ou néoantigènes (Rubio-Godoy *et al.*,

2002; Wang *et al.*, 2014). Dernièrement, des travaux ont révélé que l'efficacité de l'anti-CTLA-4 dépendait des réponses immunitaires dirigées contre les néo-antigènes tumoraux et suggèrent la possible réactivité croisée avec les motifs viraux ou bactériens (Snyder *et al.*, 2014).

L'implication du microbiote intestinal semble donc applicable à différents types de thérapies anti-tumorales et renforce donc l'idée de probiotiques « anti-cancer » ou bactéries adjuvantes de la réponse anti-tumorale. La détection des dysbioses, mesurable par l'avènement des techniques dites « omics » (métagénomique, métatranscriptomique, culturomique), chez ces individus pourrait permettre de compenser la perte de certaines populations bactériennes importantes pour l'efficacité du traitement. Quatre stratégies pourraient être utilisées afin de moduler la composition du microbiote et impacter les réponses immunitaires anti-tumorales : 1- l'utilisation d'antibiotiques, ciblant certaines populations bactériennes spécifiques; 2 - l'utilisation de probiotiques, bactéries vivantes qui lorsque qu'elles sont administrées en quantité adéquate confèrent un effet bénéfique à la santé du consommateur; 3 - l'utilisation de prébiotiques, composés non digestibles qui stimulent la croissance ou les fonctions de certaines populations du microbiote; 4 - l'utilisation de *postbiotiques*, produits non viables de microbiote intestinal exerçant un effet biologique mesurable sur l'hôte.

## Références

- Belcheva A., Irrazabal T., Robertson S.J., Streutker C., Maughan H., Rubino S., Moriyama E.H., Copeland J.K., Surendra A., Kumar S., Green B., Geddes K., Pezo R.C., Navarre W.W., Milosevic M., Wilson B.C., Girardin S.E., Wolever T.M.S., Edelmann W., Guttman D.S., Philpott D.J., Martin A. (2014). Gut Microbial Metabolism Drives Transformation of Msh2-Deficient Colon Epithelial Cells. *Cell*, 158, 288-299.
- Blair P.J., Riley J.L., Levine B.L., Lee K.P., Craighead N., Francomano T., Perfetto S.J., Gray G.S., Carreno B.M., June C.H. (1998). CTLA-4 ligation delivers a unique signal to resting human CD4 T cells that inhibits interleukin-2 secretion but allows Bcl-X(L) induction. *J Immunol*, 160, 12-15.
- Burnet M. (1957). Cancer : a biological approach. III. Viruses associated with neoplastic conditions. IV. Practical applications. *Br Med J.*, 1, 841-847.
- Clemente J.C., Ursell L.K., Parfrey L.W., Knight R. (2012). The impact of the gut microbiota on human health : an integrative view. *Cell*, 148, 1258-1270.
- Collins J., Borojevic R., Verdu E.F., Huizinga J.D., Ratcliffe E.M. (2014). Intestinal microbiota influence the early postnatal development of the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, 26, 98-107.

- Costello E.K., Lauber C.L., Hamady M., Fierer N., Gordon J.I., Knight R. (2009). Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, 326, 1694–1697.
- Daillère R., Vétizou M., Waldschmitt N., Yamazaki T., Isnard C., Poirier-Colame V., Duong C.P.M., Flament C., Lepage P., Roberti M.P., Routy B., Jacquilot N., Apetoh L., Becharef S., Rusakiewicz S., Langella P., Sokol H., Kroemer G., Enot D., Roux A., Eggermont A., Tartour E., Johannes L., Woerther P-L, Chachaty E., Soria J-C, Golden E., Formenti S., Plebanski M., Madondo M., Rosenstiel P., Raoult D., Cattoir V., Boneca I.G., Chamaillard M., Zitvogel L. (2016). *Enterococcus hirae* and *Barnesiella intestinihominis* Facilitate Cyclophosphamide-Induced Therapeutic Immunomodulatory Effects. *Immunity*, 45, 931–943.
- Dapito D.H., Mencin A., Gwak G-Y, Pradere J-P, Jang M-K, Mederacke I, Caviglia J.M., Khiabani H., Adeyemi A., Bataller R., Lefkowitz J.H., Bower M., Friedman R., Sartor R.B., Rabadan R., Schwabe R.F. (2012). Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*, 21, 504–516.
- de Martel C., Ferlay J., Franceschi S., Vignat J., Bray F., Forman D., Plummer M. (2012). Global burden of cancers attributable to infections in 2008 : a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol*, 13, 607–615.
- Dubin K., Callahan M.K., Ren B., Khanin R., Viale A., Ling L., No D., Gobourne A., Littmann E., Huttenhower C., Pamer E.G., Wolchok J.D. (2016) Intestinal microbiome analyses identify melanoma patients at risk for checkpoint-blockade-induced colitis. *Nat. Commun.*, 7, 10391.
- Dudley M.E., Yang J.C., Sherry R., Hughes M.S., Royal R., Kammula U., Robbins P.F., Huang J., Citrin D.E., Leitman S.F., Wunderlich J., Restifo N.P., Thomasian A., Downey S.G., Smith F.O., Klapper J., Morton K., Laurencot C., White D.E., Rosenberg S.A. (2008). Adoptive cell therapy for patients with metastatic melanoma : evaluation of intensive myeloablative chemoradiation preparative regimens. *J Clin Oncol*, 26, 5233–5239.
- El Kaoutari A., Armougom F., Raoult D., Henrissat B. (2014). [Gut microbiota and digestion of polysaccharides]. *Médecine Sci MS*, 30, 259–265.
- Emadi A., Jones R.J., Brodsky R.A. (2009). Cyclophosphamide and cancer : golden anniversary. *Nat Rev Clin Oncol*, 6, 638–647.
- Farache J., Koren I., Milo I., Gurevich I., Kim K.-W., Zigmund E., Furtado G.C., Lira S.A., Shkhar G. (2013) Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity*, 38, 581–595.
- Garrett W.S., Gallini C.A., Yatsunenko T., Michaud M., DuBois A., Delaney M.L., Punit S, Karlsson M., Bry L., Glickman J.N., Gordon J.I., Onderdonk A.B., Glimcher L.H. (2010). Enterobacteriaceae act in concert with the gut microbiota to induce spontaneous and maternally transmitted colitis. *Cell Host Microbe*, 8, 292–300.
- Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W-J, Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P, Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C., Patnaik A., Zarour H., Joshua A.M., Gergich K., Ellassaiss-Schaap J., Algazi A., Mateus C., Boasberg P., Tumei P.C., Chmielowski B., Ebbinghaus S.W., Li X.N., Kang S.P., Ribas A. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*, 369, 134–144.
- Hanahan D., Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer : the next generation. *Cell*, 144, 646–674.
- Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J.M., Lutzky J, Lorigan P, Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I, Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urban W.J. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363, 711–723.
- Hooper L.V., Littman D.R., Macpherson A.J. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268–1273.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. (2012). *Nature*, 486, 207–214.
- Hviid A., Svanström H., Frisch M. (2011). Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut*, 60, 49–54.
- Iida N., Dzutsev A., Stewart C.A., Smith L., Bouladoux N., Weingarten R.A., Molina D.A., Salcedo R., Back T., Cramer S., Dai R-M, Kiu H., Cardone M., Naik S., Patri A.K., Wang E., Marincola F.M., Frank K.M., Belkaid Y., Trinchieri G., Goldszmid R.S. (2013). Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment. *Science*, 342, 967–970.
- Kamada N., Chen G.Y., Inohara N., Núñez G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat. Immunol*, 14, 685–690.
- Krummel M.F., Allison J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*, 182, 459–465.
- Kwon E.D., Hurwitz A.A., Foster B.A., Madias C., Feldhaus A.L., Greenberg N.M., Burg M.B., Allison J.P. (1997). Manipulation of T cell costimulatory and inhibitory signals for immunotherapy of prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94, 8099–8103.
- Lagier J.-C., Armougom F., Million M., Hugon P., Pagnier I., Robert C., Bittar F., Fournous G., Gimenez G., Maraninchi M., Trape J-F, Koonin E.V., La Scola B., Raoult D. (2012). Microbial culturomics : paradigm shift in the human gut microbiome study. *Clin Microbiol Infect*, 18, 1185–1193.
- Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. (1996) Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 271, 1734–1736.

- Linsley P.S., Brady W., Urnes M., Grosmaire L.S., Damle N.K., Ledbetter J.A. (1991). CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*, 174, 561–569.
- Maynard C.L., Elson C.O., Hatton R.D., Weaver C.T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489, 231–241.
- Mowat A.M., Agace W.W. (2014). Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol*, 14, 667–685.
- Paulos C.M., Wrzesinski C., Kaiser A., Hinrichs C.S., Chieppa M., Cassard L., Palmer D.C., Boni A., Muranski P., Yu Z., Gattinoni L., Antony P.A., Rosenberg S.A., Restifo N.P. (2007). Microbial translocation augments the function of adoptively transferred self/tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells via TLR4 signaling. *J Clin Invest*, 117, 2197–2204.
- Pédrón T., Mulet C., Dauga C., Frangeul L., Chervaux C., Grompone G., Sansonetti P.J. (2012) A crypt-specific core microbiota resides in the mouse colon. *MBio*, 3(3). doi :10.1128/mBio.00116-12.
- Perkins D., Wang Z., Donovan C., He H., Mark D., Guan G., Wang Y., Walunas T., Bluestone J., Listman J., Finn P.W. (1996). Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J Immunol*, 156, 4154–4159.
- Qin J., Li R., Raes J., Arumugam M., Burgdorf K.S., Manichanh C., Nielsen T., Pons N., Levenez F., Yamada T., Mende D.R., Li J., Xu J., Li S., Li D., Cao J., Wang B., Liang H., Zheng H., Xie Y., Tap J., Lepage P., Bertalan M., Batto J-M, Hansen T., Le Paslier D., Linneberg A., Nielsen H.B., Pelletier E., Renault P., Sicheritz-Ponten T., Turner K., Zhu H., Yu C., Li S., Jian M., Zhou Y., Li Y., Zhang X, Li S., Qin N., Yang H., Wang J., Brunak S., Doré J., Guarner F., Kristiansen K, Pedersen O., Parkhill J., Weissenbach J., MetaHIT Consortium, Bork P., Ehrlich S.D., Wang J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 59–65.
- Robert C., Thomas L., Bondarenko I., O'Day S., Weber J., Garbe C., Lebbe C., Baurain J.-F., Testori A., Grob J.-J., Davidson N., Richards J., Maio M., Hauschild A., Miller W.H., Gascon P., Lotem M., Harmankaya K., Ibrahim R., Francis S., Chen T.-T., Humphrey R., Hoos A., Wolchok J.D. (2011). Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 364, 2517–2526.
- Robert C., Thomas L., Bondarenko I., O'Day S., Weber J., Garbe C., Lebbe C., Baurain J.-F., Testori A., Grob J.-Hamid O., Robert C., Daud A., Hodi F.S., Hwu W.-J., Kefford R., Wolchok J.D., Hersey P., Joseph R.W., Weber J.S., Dronca R., Gangadhar T.C., Patnaik A., Zarour H., Joshua A.M., Gergich K., Ellassaiss-Schaap J., Algazi A., Mateus C., Boasberg P., Tumeq P.C., Chmielowski B., Ebbinghaus S.W., Li X.N., Kang S.P., Ribas A. (2013). Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N Engl J Med*, 369, 134–144.
- Robert C., Schachter J., Long G.V., Arance A., Grob J.J., Mortier L., Daud A., Carlino M.S., McNeil C., Lotem M., Larkin J., Lorigan P., Neyns B., Blank C.U., Hamid O., Mateus C., Shapira-Frommer R., Kosh M., Zhou H., Ibrahim N., Ebbinghaus S., Ribas A., KEYNOTE-006 investigators. (2015). Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N Engl J Med*, 372, 2521–2532.
- Rossini A., Rumio C., Sfondrini L., Tagliabue E., Morelli D., Miceli R., Mariani L, Palazzo M., Ménard S., Balsari A. (2006). Influence of antibiotic treatment on breast carcinoma development in proto-neu transgenic mice. *Cancer Res*, 66, 6219–6224.
- Rubio-Godoy V., Dutoit V., Zhao Y., Simon R., Guillaume P., Houghten R., Romero P., Cerottini J-C, Pinilla C., Valmori D. (2002). Positional scanning-synthetic peptide library-based analysis of self- and pathogen-derived peptide cross-reactivity with tumor-reactive Melan-A-specific CTL. *J Immunol*, 169, 5696–5707.
- Rutkowski M.R., Stephen T.L., Svoronos N., Allegrezza M.J., Tesone A.J., Perales-Puchalt A., Brencicova E., Escovar-Fadul X., Nguyen J.M., Cadungog M.G., Zhang R., Salatino M., Tchou J., Rabinovich G.A., Conejo-Garcia J.R. (2015). Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation. *Cancer Cell*, 27, 27–40.
- Schloissnig S., Arumugam M., Sunagawa S., Mitreva M., Tap J., Zhu A., Waller A., Mende D.R., Kultima J.R., Martin J., Kota K., Sunyaev S.R., Weinstock G.M., Bork P. (2013). Genomic variation landscape of the human gut microbiome. *Nature*, 493, 45–50.
- Schneider H., Downey J., Smith A., Zinselmeyer B.H., Rush C., Brewer J.M., Wei B., Hogg N., Garside P., Rudd C.E. (2006). Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science*, 313, 1972–1975.
- Schneider H., Smith X., Liu H., Bismuth G., Rudd C.E. (2008). CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur J Immunol*, 38, 40–47.
- Schreiber R.D., Old L.J., Smyth M.J. (2011). Cancer immunoeediting : integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*, 331, 1565–1570.
- Sears C.L., Garrett W.S. (2014). Microbes, Microbiota and Colon Cancer. *Cell Host Microbe*, 15, 317–328.
- Sergentanis T.N., Zagouri F., Zografos G.C. (2010). Is antibiotic use a risk factor for breast cancer? A meta-analysis. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 19, 1101–1107.
- Sistigu A., Viaud S., Chaput N., Bracci L., Proietti E., Zitvogel L. (2011). Immunomodulatory effects of cyclophosphamide and implementations for vaccine design. *Semin Immunopathol*, 33, 369–383.
- Sivan A., Corrales L., Hubert N., Williams J.B., Aquino-Michaels K., Earley Z.M., Benyamin F.W., Lei Y.M., Jabri B., Alegre M.-L., Chang E.B., Gajewski T.F. (2015). Commensal Bifidobacterium promotes anti-tumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science*, 350, 1084–1089.
- Snyder A., Makarov V., Merghoub T., Yuan J., Zaretsky J.M., Desrichard A., Walsh L.A., Postow M.A., Wong P., Ho T.S., Hollmann T.J., Bruggeman C., Kannan



- K., Li Y., Elipenahli C., Liu C., Harbison C.T., Wang L., Ribas A., Wolchok J.D., Chan T.A. (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*, 371, 2189–2199.
- Sommer F., Bäckhed F. (2013). The gut microbiota—masters of host development and physiology. *Nat Rev Microbiol*, 11, 227–238.
- Tivol E.A., Borriello F., Schweitzer A.N., Lynch W.P., Bluestone J.A., Sharpe A.H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*, 3, 541–547.
- Ubeda C., Pamer E.G. (2012). Antibiotics, microbiota, and immune defense. *Trends Immunol*, 33, 459–466.
- van Vliet M.J., Harmsen H.J.M., de Bont E.S.J.M., Tissing W.J.E. (2010). The role of intestinal microbiota in the development and severity of chemotherapy-induced mucositis. *PLoS Pathog*, 6, e1000879.
- Vétizou M., Pitt J.M., Daillère R., Lepage P., Waldschmitt N., Flament C., Rusakiewicz S., Routy B., Roberti M.P., Duong C.P.M., Poirier-Colame V., Roux A., Becharaf S., Formenti S., Golden E., Cording S., Eberl G., Schlitzer A., Ginhoux F., Mani S., Yamazaki T., Jacquilot N., Enot D.P., Bérard M., Nigou J., Opolon P., Eggermont A., Woerther P-L, Chachaty E., Chaput N., Robert C., Mateus C., Kroemer G., Raoult D., Boneca I.G., Carbonnel F., Chamainard M., Zitvogel L. (2015). Anticancer immunotherapy by CTLA-4 blockade relies on the gut microbiota. *Science*, 350, 1079–1084.
- Viaud S., Saccheri F., Mignot G., Yamazaki T., Daillère R., Hannani D., Enot D.P., Pfirschke C., Engblom C., Pittet M.J., Schlitzer A., Ginhoux F., Apetoh L., Chachaty E., Woerther P-L, Eberl G., Bérard M., Ecobichon C., Clermont D., Bizet C., Gaboriau-Routhiau V., Cerf-Bensussan N., Opolon P., Yessaad N., Vivier E., Ryffel B., Elson C.O., Doré J., Kroemer G., Lepage P., Boneca I.G., Ghiringhelli F., Zitvogel L. (2013). The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science*, 342, 971–976.
- Walunas T.L., Bakker C.Y., Bluestone J.A. (1996). CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med*, 183, 2541–2550.
- Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. (1994). CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity*, 1, 405–413.
- Wang J.-L., Chang C.-H., Lin J.-W., Wu L.-C., Chuang L.-M., Lai M.-S. (2014). Infection, antibiotic therapy and risk of colorectal cancer : a nationwide nested case-control study in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Int J Cancer*, 135, 956–967.
- Wang L., Ribas A., Wolchok J.D., Chan T.A. (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. *N Engl J Med*, 371, 2189–2199.
- Waterhouse P., Penninger J.M., Timms E., Wakeham A., Shahinian A., Lee K.P., Thompson C.B., Griesser H., Mak T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*, 270, 985–988.
- Yoshimoto S., Loo T.M., Atarashi K., Kanda H., Sato S., Oyadomari S., Iwakura Y., Oshima K., Morita H., Hattori M., Hattori M., Honda K., Ishikawa Y., Hara E., Ohtani N. (2013). Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature*, 499, 97–101.
- Zitvogel L., Apetoh L., Ghiringhelli F., Kroemer G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nat Rev Immunol*, 8, 59–73.