

Université de Montréal

**CD73 :**  
**Cible thérapeutique dans le cancer de l’ovaire et le cancer**  
**du sein HER2<sup>+</sup>**

par  
Martin Turcotte

Faculté de Pharmacie

Thèse présentée à la faculté des études supérieures  
en vue de l’obtention du grade de Philosophiæ Doctor (Ph.D.)  
en Sciences Pharmaceutique  
option Pharmacologie

Janvier 2018

© Martin Turcotte, 2018

## Résumé

Plusieurs mécanismes sont mis en place dans le microenvironnement tumoral pour restreindre l'activité anti-tumorale médiée par les composantes du système immunitaire. L'identification de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans le phénomène de redondance des mécanismes d'immunosuppression est nécessaire dans le développement de stratégies d'immunothérapies permettant de rétablir un système immunitaire anti-tumorale efficace. L'un des facteurs responsables du microenvironnement immunosuppresseur tumoral est l'adénosine extracellulaire générée par l'enzyme membranaire CD73.

Dans le but d'évaluer le rôle de l'axe CD73 / adénosine dans un contexte d'immunothérapie, des corrélations ont été effectuées sur des cohortes de patientes. Ces résultats ont été confirmés par le biais de modèles de cancer de souris syngéniques et knockouts ainsi que par des modèles *in vitro* de cancers de souris et humains déficients ou compétents en CD73. Dans le cancer séreux de haut grade, cette thèse démontre que CD73 agit en tant que biomarqueur pronostique en association avec les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et favorise la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo*. Les résultats démontrent également que l'expression de CD73 sur les cellules fibroblastiques favorise l'échappement immunitaire et la croissance tumorale. Dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup>, cette thèse présente CD73 comme mécanisme de résistance où l'expression de cette enzyme par les cellules tumorales ou les cellules de l'hôte diminuent la réponse immunitaire anti-tumorale médiée par un anti-ErbB2. Les résultats démontrent également que l'inhibition de cette enzyme augmente l'efficacité thérapeutique d'un anti-ErbB2 dans un modèle greffé, un modèle spontané et un modèle de métastases pulmonaires.

Les travaux présentés dans cette thèse démontrent l'importance de l'axe adénosinergique dans deux types de cancers où le microenvironnement tumoral immunosuppresseur est un frein à une thérapie optimale. Cette thèse explore les propriétés de CD73 en tant que nouvelle cible en immunothérapie du cancer.

**Mots-clés :** CD73, Adénosine, Immunothérapie, Cancer du sein, ErbB2/HER2, Trastuzumab, Cancer de l'ovaire, EMT, Microenvironnement tumorale

# Abstract

Many mechanisms are laid in the tumor microenvironment to restrict the anti-tumor activity by the immune system. Identification of novel molecular targets responsible of redundancy phenomenon is necessary in developing innovative immunotherapy strategies that will restore the anti-tumor immune system efficacy. One of the factor responsible of the immunosuppressive tumor microenvironment is the extracellular adenosine generated by the ecto-enzyme CD73. This thesis explores the properties of CD73 as a novel target in cancer immunotherapy.

To evaluate the role of CD73 / adenosine axis in an immunotherapy context, correlations has been made on patient cohorts. These results have been confirm with relevant syngeneic and knockout mouse models. *In vitro* models of mouse and human cancer deficient or proficient in CD73 has also been use. In the high-grade serous ovarian cancer, this thesis shows that CD73 acts as a prognostic marker associated with intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells and promote *in vitro* and *in vivo* tumor proliferation. Results from this thesis also show CD73 expression on fibroblasts that promote immune escape and tumor proliferation. In the HER2<sup>+</sup> breast cancer, this thesis investigates CD73 as a resistance mechanism where this enzyme expression on tumor cells and host cells decrease the anti-tumor immune response mediated by anti-ErbB2 mAb therapy. Results from this thesis also show that anti-CD73 mAb enhance anti-ErbB2 activity to treat engrafted and spontaneous tumors as well as lung metastasis.

This work highlights the adenosinergic pathway in two types of cancers where the immunosuppressive tumor microenvironment is a brake for an optimal therapy. CD73 is presented as a novel target candidate in cancer immunotherapy.

**Keywords** : CD73, Adenosine, Immunotherapy, Breast cancer, ErbB2/HER2, Trastuzumab, Ovarian cancer, EMT, Tumor microenvironment

# Table des matières

Résumé .....	I
Abstract.....	II
Table des matières.....	III
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures .....	VIII
Liste des sigles .....	XI
Remerciements.....	XVI
Chapitre 1 - Système adénoenergique .....	1
1.1    Vue d'ensemble .....	1
1.2    Récepteurs ATP .....	2
1.2.1    Types de récepteurs.....	3
1.2.2    Traitements anticancer .....	6
1.3    CD39 .....	7
1.3.1    Structure .....	7
1.3.2    Implication dans le système immunitaire.....	8
1.4    CD73 .....	9
1.4.1    Structure .....	9
1.4.2    Localisation physiologique.....	11
1.4.3    Implication dans le système immunitaire.....	13
1.4.4    Régulation .....	16
1.4.5    Rôle dans le cancer .....	17
1.4.6    Rôle dans le système vasculaire .....	23
1.5    Récepteurs adénoenergiques .....	24
1.5.1    Adénoergine dans le système immunitaire .....	26
1.5.2    Rôle dans l'auto-immunité .....	29
1.5.3    Autres rôles physiologiques .....	31
1.5.4    Rôle de A2A dans le cancer .....	32

Chapitre 2 - Cancer de l’ovaire.....	34
2.1    Pathophysiologie .....	34
2.1.1  Ascites.....	35
2.2    Classification moléculaire.....	37
2.3    Immunologie .....	39
2.3.1  Infiltration immunitaire tumorale .....	40
2.3.2  Ascites.....	42
2.3.3  Points de contrôle immunitaire .....	43
2.4    Immunothérapies .....	43
2.4.1  Bloqueurs de points de contrôles .....	43
2.4.2  Vaccins.....	46
2.4.3  Transfert de cellules T.....	47
Chapitre 3 – Cancer du sein.....	48
3.1    Classification moléculaire.....	48
3.2    Sous-type HER2 <sup>+</sup> .....	48
3.2.1  Récepteur ErbB2/HER2 .....	48
3.2.2  Traitements.....	51
3.2.3  Mécanismes de résistance au trastuzumab .....	57
3.2.4  Immunité anti-tumorale.....	59
Chapitre 4 - Présentation du projet .....	62
4.1    Hypothèses de recherche.....	62
4.2    Objectifs spécifiques.....	63
4.3    Présentations des articles .....	64
4.3.1  Premier article.....	64
4.3.2  Deuxième article.....	65
Chapitre 5 - CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer .....	66
5.1    Abstract .....	67
5.2    Introduction .....	67
5.3    Materials and methods .....	69
5.4    Results.....	74

5.5	Discussion .....	86
5.6	Grant support.....	88
5.7	Acknowledgments .....	88
5.8	References .....	89
5.9	Supplementary figures .....	94
Chapitre 6 – CD73 promotes resistance to HER2/ErbB2 antibody therapy .....		102
6.1	Abstract.....	103
6.2	Introduction .....	104
6.3	Materials & Methods .....	105
6.4	Results.....	110
6.5	Discussion .....	122
6.6	Acknowledgments .....	124
6.7	References .....	124
6.8	Supplementary figures .....	129
Chapitre 7 – Discussion, Perspectives & Conclusion .....		138
7.1	Réflexion sur la thérapie du cancer .....	138
7.2	Modèles in vivo .....	139
7.2.1	Cancer de l’ovaire.....	139
7.2.2	Cancer du sein .....	143
7.3	Modèles in vitro.....	147
7.3.1	Cancer de l’ovaire.....	147
7.3.2	Cancer du sein .....	147
7.4	Infiltration lymphocytaire .....	149
7.5	CD73 : Biomarqueur en cancer de l’ovaire.....	150
7.5.1	Exosomes .....	150
7.5.2	CD73 soluble .....	151
7.6	CD73 : Cible thérapeutique.....	152
7.6.1	Cancer de l’ovaire.....	152
7.6.2	Cancer du sein HER2 <sup>+</sup> .....	155
7.7	Rôle de CD73 dans l’EMT.....	156

7.8	CD73 mécanisme de résistance au trastuzumab.....	157
7.9	Conclusion.....	159
	Bibliographie .....	160

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 – Affinité des sous-unités des récepteurs P2X. ....	4
Tableau 1.2 – Niveau d’expression de CD73 sur le système immunitaire humain. ....	13
Tableau 1.3 – Fonctions de l’adénosine dans diverses maladies auto-immunes. ....	30
Tableau 2.1 – Caractéristiques des sous-types moléculaires agressifs du cancer de l’ovaire séreux de haut grade. ....	38
Tableau 2.2 – Études cliniques actives testant des bloqueurs de points de contrôles immunologique dans le cancer de l’ovaire. ....	44
Tableau 2.3 – Études cliniques actives testant des combinaisons d’immunothérapies dans le cancer de l’ovaire. ....	44
Tableau 2.4 – Antigènes associés aux tumeurs ovariennes. ....	47
Tableau 3.1 – Résumé des mécanismes d’action du trastuzumab, du pertuzumab et du lapatinib. ....	51
Table 5.1 – Clinicopathological characteristics of the TMA sample set (n=208). ....	78
Table 5.2 – Disease-free survival Cox regression analysis. ....	80
Table 6.1 – CD73 Gene Ontology enrichment and Top genes correlated to CD73. ....	120
Tableau 7.1 – Traitement monothérapie anti-PD-1 dans le modèle ID8. ....	153



## Liste des figures

Figure 1.1 – Structure de la molécule d’ATP. ....	1
Figure 1.2 – Vue d’ensemble du système adénoenergique.....	2
Figure 1.3 – Ligands des récepteurs P2Y. ....	5
Figure 1.4 – Structure cristallographique de CD39. ....	8
Figure 1.5 – Structure cristallographique de CD73 humain. ....	10
Figure 1.6 – Distribution de CD73 chez la souris.....	12
Figure 1.7 – Expression CD39 – CD73 dans l’activation des lymphocytes T. ....	14
Figure 1.8 – CD73 est associé à une mauvaise survie globale chez les patients atteints de tumeurs solides.....	18
Figure 1.9 – Récepteurs à l’adénosine. ....	25
Figure 1.10 – Effet de l’adénosine sur les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. ....	26
Figure 2.1 – Modèle proposé pour la dissémination intraperitonéale du cancer de l’ovaire.....	35
Figure 2.2 – Survie des sous-groupes moléculaire du cancer de l’ovaire. ....	39
Figure 2.3 – Modèle d’immunité anti-tumorale dans le cancer de l’ovaire. ....	40
Figure 2.4 – Associations des infiltrations lymphocytaires T intra-tumoral avec la survie globale dans le cancer de l’ovaire. ....	41
Figure 3.1 – Homo- et hétéro-dimérisation des récepteurs ErbB avec leurs ligands.....	49
Figure 3.2 – Signalisation intracellulaire du récepteur ErbB2. ....	50
Figure 3.3 – Historique du trastuzumab. ....	52
Figure 3.4 – Mécanismes d’action du trastuzumab.....	54
Figure 3.5 – Liaison du trastuzumab vs pertuzumab. ....	55
Figure 3.6 – Mécanismes de résistance du T-DM1. ....	56
Figure 5.1 – CD73 gene expression is associated with poor prognosis in HGS ovarian cancer. ....	76
Figure 5.2 – CD73 protein expression in ovarian tumor cells is associated with poor prognosis. ....	79

Figure 5.3 – CD73 expression in ovarian tumor cells enhances the prognostic value of intraepithelial CD8 <sup>+</sup> cells.....	81
Figure 5.4 – CD73 promotes ovarian tumor cell proliferation. ....	83
Figure 5.5 – CD73-expressing cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote ovarian cancer. ....	85
Figure S5.1 – CD73 and CD39 gene expression analysis in HGS ovarian cancer. ....	94
Figure S5.2 – Analysis of CD73 and CD8 protein expression on tissue microarray.....	95
Figure S5.3 – Flow cytometry analysis of CD73 expression on 12 human ovarian cancer cell lines. ....	96
Figure S5.4 – CD73 expression hinders the prognostic impact of intraepithelial CD8 <sup>+</sup> cells. .	97
Figure S5.5 – OV4485 cell line analysis. ....	98
Figure S5.6 – Adenosine receptors on ovarian cancer cell lines. ....	99
Figure S5.7 – CD73 expression analysis in the in vitro and tumor proliferation. ....	100
Figure S5.8 – Flow cytometry analysis of ID8-OVA. ....	101
Figure 6.1 – High CD73 gene expression is associated with poor clinical benefit from trastuzumab in HER2 <sup>+</sup> breast cancer.....	112
Figure 6.2 – CD73 interaction with trastuzumab in FinHER clinical trial.....	113
Figure 6.3 – PD-1 and PD-L1, but not CD73, correlate with tumor-immune infiltrates in HER2 <sup>+</sup> breast cancer. ....	114
Figure 6.4 – CD73 expression by breast tumor cells inhibits anti-ErbB2 mAb activity.....	115
Figure 6.5 – Anti-CD73 mAb enhances anti-ErbB2 mAb therapy.....	117
Figure 6.6 – Host CD73 inhibits anti-ErbB2 mAb activity.....	118
Figure 6.7 – Association between CD73 and HIF-1, TGF-β and epithelial-to-mesenchymal transition. ....	121
Figure S6.1 – CD73 gene expression and survival in untreated breast cancer.....	130
Figure S6.2 – Prognosis of CD73 gene expression in METABRIC.....	132
Figure S6.3 – Multivariate analysis. ....	133
Figure S6.4 – CD73 expression and activity. ....	134
Figure S6.5 – Survival of mice bearing H2N100 or TUBO tumors. ....	135
Figure S6.6 – Synergy between anti-CD73 and anti-ErbB2 mAb therapy is dependant on the immune system. ....	136

Figure S6.7 – CD73 is associated with EMT marker.....	137
Figure 7.1 – Équilibre immunologique de la tumeur. ....	139
Figure 7.2 – Morphologie des MOSEC in vitro. ....	140
Figure 7.3 – Analyse in vivo des ID8.....	141
Figure 7.4 – Expression de CD73 des cellules ID8 in vitro vs ascites.....	142
Figure 7.5 – Expression du CMH classe I des lignées cellulaires H2N100 et TUBO.....	144
Figure 7.6 – Niveau d’expression de CD73 des lignées cellulaires TUBO et TUBO-P2J. ....	146
Figure 7.7 – Twist1 supprime indirectement la transcription d’E-cadherin pour promouvoir l’EMT. ....	148
Figure 7.8 – Knockdown de l’expression de CD73 augmente la survie globale des souris portant des tumeurs ID8. ....	152
Figure 7.9 – Survie globale des souris avec une combinaison anti-PD-1 et anti-CD73. ....	154
Figure 7.10 – Augmentation de l’expression de CD73 NF-κB dépendant suite au trastuzumab. ....	158

*L’intégralité des figures et tableaux inclus dans cette thèse sont reproduites avec l’autorisation préalable des détenteurs du droit d’auteur.*

## Liste des sigles

ACDC	Arterial Calcification due to Deficiency of CD73
ADA	Adénosine Déminase
ADC	Antibody-Drug Conjugate
ADCC	Antibody-Dependant Cell Cytotoxicity
ADP	Adénosine Diphosphate
ATP	Adénosine Triphosphate
ADN	Acide Désoxiribonucléique
AKT	Protéine Kinase B
AMP	Adénosine Monophosphate
AMPc	AMP Cyclique
AMPCP	Adenosine 5'-[alpha,beta-methylene] Diphosphate
APCP	$\alpha$ , $\beta$ -methylene ADP
ApoE	Apolipoprotéine E
AR	Amphiregulin
BCR	B-Cell Receptor
BTC	Betacellulin
CALJA	Calcification of Joints and Arteries
CAR	Chimeric Antigen Receptor
CD	Cluster of Differentiation
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CNT	Concentrative Nucleoside Transporter
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSC	Cancer Stem Cell
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
Cx40	Connexin40
DC	Cellules Dendritiques
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EAU	Experimental Autoimmune Uveitis

EBV	Epstein-Barr Virus
EGF	Epithelial Growth Factor
ELISPOT	Enzyme-Linked ImmunoSpot
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
ENT	Equilibrative Nucleoside Transporter
EPR	Epiregulin
ErbB2	Human Epidermal Receptor 2
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FISH	Fluorescence <i>in Situ</i> Hybridization
FoxP3	Forkhead box Protein 3
GITR	Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor Receptor
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
GPI	Glycophosphatidylinositol
GSEp53	Gene Silencing Element p53
GVAX	Vaccin GM-CSF
GVHD	Graft-Versus-Host Disease
HB-EGF	Heparin binding EGF
HER2	Human Epidermal Receptor 2
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-Inducible Factor 1-alpha
HMLE	Human Mammary Epithelial Cell
ICAM	Intracellular Adhesion Molecule
ICD	Immunogenic Cell Death
IHC	Immunohistochemie
IKK- $\alpha$	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit alpha1555155
IL	Interleukine
INF- $\gamma$	Interféron Gamma
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MDSC	Myeloid-Derived Stem Cell
MEF	Mesenchymal Embryonic Fibroblast

MIF	Macrophage migration Inhibitory Factor
MOSEC	Mouse Ovarian Surface Epithelial Cell
Mrp-1	Multiple Drug Resistance Protein 1
MSCS	Mesenchymal Stem Cells
mTOR	mechanistic Target of Rapamicin
NDP	Nucléoside Diphosphate
NF- $\kappa$ B	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
NKT	Natural Killer T cell
NLRP	Nod-like Receptor Protein
NRG	Neuregulin
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
NSG	Nod-SCID Gamma
NTP	Nucléoside Triphosphate
OPG	Osteoprotegerin
PD-1	Program Death 1
pDC	plasmacytoïd Dendritic Cell
PDX	Patient-Derived Xenograft
PFS	Progression-Free Survival
PI3K	Phosphatidylinositol 3'-Kinase
Pi	Phosphate inorganique
PPi	Pyrophosphate inorganique
PYCARD	Apoptosis-associated Speck-like Protein containing a CARD
STAR-FISH	Specific-to-allele PCR FISH
TGF $\alpha$	Transforming Growth Factor alpha
TGF- $\beta$ 1	Tumor Growth Factor Beta 1
TIMP-2	Tissue Inhibitor of Metalloproteases 2
TMA	Tumor Micro-Array
TME	Tumor MicroEnvironment
TNAP	Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase

TNF- $\alpha$	Tumor Necrosis Factor Alpha
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Tregs	Lymphocytes T Régulateur
uPAR	Récepteur Urokinase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
ZAP-70	Zeta-chain-associated Protein Kinase 70

*Pour ma femme, Pour Liam, Pour les futurs*



## Remerciements

Mon aventure dans la recherche fondamentale a débuté par un simple stage à la fin de mon baccalauréat dans le laboratoire du Dr Stagg. À ce moment, je ne me doutais aucunement que cela m'amènerait à commencer une maîtrise qui se transformerait plus tard en doctorat. Je franchissais ces étapes une à une sans me remettre en question grâce à l'environnement de travail formidable du laboratoire Stagg. Avec maintenant quelques années de recul, je réalise la chance incroyable que j'ai eu d'atterrir par hasard dans ce laboratoire lors de mon stage de fin de baccalauréat.

Mes premiers remerciements vont sans hésiter à mon directeur de recherche John Stagg. J'ai débuté dans un tout petit laboratoire incluant seulement une autre personne à temps plein et tu as su bâtir un laboratoire de plus d'une dizaine de personnes en créant un environnement de travail formidable. En tant que directeur de recherche tu as su trouver un juste milieu entre l'encadrement et la liberté dans mon quotidien. Tes encouragements m'ont également aidé dans ce marathon qu'a été mes études graduées. J'aimerais également te remercier pour tous les congrès auxquels j'ai pu participer. Particulièrement celui du CRI à New York en 2014. J'aimerais également te remercier de m'avoir offert des projets de recherche des plus intéressants.

Mon doctorat aurait été beaucoup plus difficile à compléter sans l'équipe de recherche formidable du laboratoire. Premièrement, merci infiniment à Bertrand Allard, un étudiant au postdoctorat qui a été une source d'informations impressionnantes autant théorique que pratique avec toujours un brin de pédagogie. Merci également à David Allard et Marjorie Berjeron, deux étudiants qui ont toujours été disponibles pour donner un coup de main ainsi que pour partager les hauts et les bas d'un étudiant au doctorat. Mille mercis à Loïse Gilbert, une super technicienne en santé animale pour sa disponibilité pratiquement 24/7 et pour ces talents cachés d'infirmière en prélèvements sanguins. *Huge thanks to Pavel Chrobak for all the small talks and the sharing of his immunology knowledge.* Merci également à Isabelle Cousineau pour tous les conseils techniques. Finalement, merci à la personne la plus importante du laboratoire, Sandra Pommey, qui a été la personne qui m'a tenu la main lors de mon initiation à la science

expérimentale. Outre l'aspect professionnel, Sandra a été une personne des plus agréable à côtoyer au quotidien, presque une mère.

Un merci également aux organismes pour le soutien financier tout au long de mes études graduées : la faculté de pharmacie de l'Université de Montréal, l'Institut du Cancer de Montréal, le Centre de Recherche du CHUM, les magasins La Vie en Rose et le Fonds de Recherche du Québec en Santé.

Un clin d'œil à mon beau-frère Alexandre Bourgeois qui m'a permis d'utiliser son code d'accès de l'Université McGill facilitant grandement la recherche bibliographique pour l'écriture de cette thèse.

J'aimerais également remercier les personnes qui ont participé dans mes comités d'évaluation : Marc Servant, Jean-François Cailhier et Réjean Lapointe. Outre l'aspect administratif, vos conseils ont grandement amélioré mes projets de recherche et moi-même en tant que scientifique. Un grand merci à tous les collaborateurs qui ont permis la publication de mes deux articles de doctorat. Un merci également à mon comité d'évaluation pour cette thèse.

Finalement, le merci le plus important de tous à ma femme. Où commencer... Le doctorat a été un défi plus difficile que ce que j'anticipais. Tu as été présente à chacune des étapes; tu as partagé les moments heureux avec moi, mais également m'encourager dans les moments plus difficiles. Je réalise que toutes les soirées, toutes les fins de semaine et tous les jours fériés passés au laboratoire ont été difficiles pour toi. Tu as su être patiente avec moi et faire des sacrifices lorsque j'avais besoin de temps pour mes études que ce soit pour mon examen de synthèse ou pour le dernier sprint d'écriture de cette thèse. J'ai comme philosophie de toujours terminer ce que j'entreprends dans la vie, mais en toute honnêteté ce doctorat aurait été très difficile sans toi. L'année 2018 offre plein de défi : l'achat d'une maison, la naissance de notre 2<sup>e</sup> enfant et le début de ma carrière professionnelle. Avec ce diplôme de doctorat, j'ai hâte de construire notre futur ensemble.

# Chapitre 1 - Système adénoenergique

## 1.1 Vue d'ensemble

La molécule d'adénosine triphosphate (ATP) est au cœur du système adénoenergique. Cette molécule consiste en une adénosine (adénine + ribose) suivit de l'attachement de trois phosphates en position  $\gamma$ ,  $\beta$  et  $\alpha$  (Figure 1.1). Cette voie de signalisation est un système conservé à travers l'évolution étant donnée la découverte de récepteurs à l'ATP chez les invertébrés (1) et les plantes (2).

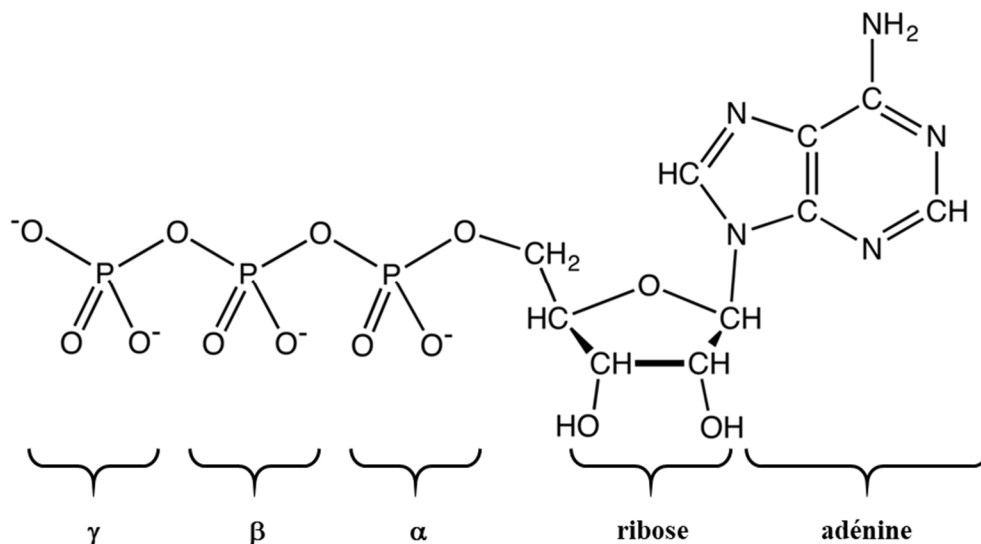


Figure 1.1 – Structure de la molécule d'ATP.

Le système adénoenergique inclue l'enzyme CD39 et CD73 qui ont pour fonction d'hydrolyser l'ATP extracellulaire en adénosine (Figure 1.2) (3). Alors que la conversion de l'ATP vers l'adénosine monophosphate (AMP) est réversible par l'action de l'adenylate kinase, la conversion de l'AMP en adénosine est irréversible de manière extracellulaire (4). Le tandem CD39-CD73 est considéré comme la voie canonique de la génération d'adénosine extracellulaire, alors que l'ATP peut emprunter une voie de conversion secondaire médiée par le tandem enzymatique CD38-CD203a (5).

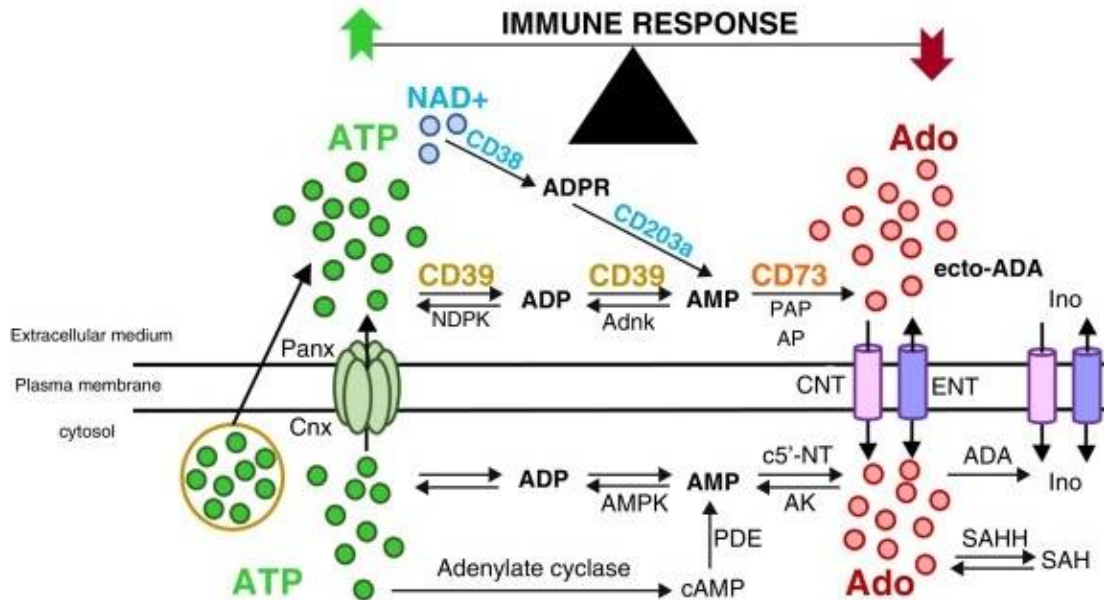


Figure 1.2 – Vue d’ensemble du système adénosinergique. ©Allard et al. Curr Opin Pharmacol, 2016. With permission from Elsevier.

Plusieurs évidences claires démontrent que le système adénosinergique joue un rôle primordial dans la régulation de l’épuisement du système immunitaire (6,7).

## 1.2 Récepteurs ATP

L’ATP est une molécule fondamentale dans le système énergétique de la cellule (8). Historiquement, cette molécule a été décrite comme ayant un rôle fondamental intracellulaire avec un certain scepticisme quant à un effet extracellulaire (9). Finalement, en 1970 l’ATP a été bien décrite par une série de travaux comme une molécule avec une fonction extracellulaire de neurotransmetteur (10-12). Dans un tissu sain, l’ATP est presque exclusivement intracellulaire avec des concentrations dans les millimolaires, alors que la concentration d’ATP extracellulaire est de l’ordre du nanomolaire (13). Dans le tissu interstitiel, ces concentrations sont dans les centaines de micromolaires (14). Plusieurs mécanismes sont identifiés étant responsable de la relâche d’ATP vers le milieu extracellulaire (15). Dans le cas d’un dommage physiologique, la

lyse cellulaire et le dommage tissulaire mène également à un relâchement massif du contenu nucléotidique de la cellule vers l'espace extracellulaire menant ainsi à la transmission de signaux nociceptifs et au début de l'inflammation (16,17). Il a également été rapporté que l'ATP peut être relâché par les lymphocytes T et les neutrophiles suivant leur activation (18,19). L'ATP extracellulaire est maintenant acceptée comme un transmetteur autocrine et paracrine impliqué dans des mécanismes physiologiques via une panoplie de récepteurs (16,20).

## **1.2.1 Types de récepteurs**

Les récepteurs ATP font partie des récepteurs aux purines et sont regroupés en deux catégories basées selon leurs fonctions pharmacologiques : les récepteurs ionotropiques P2X ou couplés aux protéines G P2Y (21-23).

### **1.2.1.1 Les récepteurs P2X**

Les P2X sont des récepteurs homo- ou hétéro-trimériques ou hexamériques et incluent 7 types de sous-unités (P2X<sub>1</sub> à P2X<sub>7</sub>) (20). Ces récepteurs sont activés par l'ATP et sont des canaux ioniques perméables aux ions Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup>. L'ADN complémentaire encodant une sous-unité du premier récepteur de la famille des P2X a été isolé pour la première fois en 1994 (20). Chaque sous-unité contient entre 384 et 595 acides aminés et contient deux régions hydrophobiques assez longues pour permettre de traverser la membrane cytoplasmique (24,25). Toutes les sous-unités P2X humaines ont de 2 à 6 séquences consensus pouvant être glycosylées (20,26,27). Chaque sous-unité a une affinité particulière pour s'assembler avec d'autres sous-unités (Tableau 1.1) (28,29). La sous-unité P2X<sub>7</sub> est atypique et possède une queue cytoplasmique du côté de la queue terminale COOH plus longue indiquant un rôle possible de signalisation intracellulaire (30,31).

	P2X1	P2X2	P2X3	P2X4	P2X5	P2X6	P2X7
P2X1	+	+	+	-	+	+	-
P2X2		+	+	-	+	+	-
P2X3			+	-	+	-	-
P2X4				+	+	+	-
P2X5					+	+	-
P2X6						-	-
P2X7							+

Tableau 1.1 – Affinité des sous-unités des récepteurs P2X. Co-assemblage possible entre les différentes sous-unités des récepteurs P2X par immuno-précipitation (+) ou non (-).

Les récepteurs P2X sont présents dans la majorité sinon tous les tissus (20). En ce qui concerne le système immunitaire, des analyses d’immunohistochimies suggèrent que les lymphocytes B expriment les sous-unités P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>4</sub> et P2X<sub>7</sub> (32). Alors que pour les thymocytes, ce sont davantage les récepteurs P2X<sub>1</sub>, P2X<sub>2</sub>, P2X<sub>6</sub> et P2X<sub>7</sub> qui sont exprimés et auraient un rôle dans la maturation de ces cellules (33,34). Des sept sous-types P2X, c’est le récepteur P2X<sub>7</sub> qui est le plus impliqué dans l’inflammation (35). En effet, l’activation du récepteur P2X<sub>7</sub> est nécessaire à l’activation de l’inflammasome un complexe protéique incluant caspase-1, PYCARD et NLRP1 ou NLRP3 (36). L’inflammasome est responsable de la promotion de la modification post-translationnel des cytokines pro-inflammatoires IL-1 $\beta$  et IL-18 dans l’initiation du phénomène inflammatoire (37-39).

De manière spécifique, l’ATP extracellulaire a été observée comme un stimulant de la mitogénèse sur les lymphocytes T périphériques de manière récepteur P2X<sub>7</sub> dépendant (40,41). Quant à eux, les macrophages augmentent leur capacité de phagocytose lorsque le récepteur P2X<sub>7</sub> est activé (42).

### 1.2.1.2 Les récepteurs P2Y

Les P2Y sont des récepteurs couplés aux protéines G et incluent 8 sous-types avec différents ligands (Figure 1.3) (16). Le premier de ces récepteurs a été cloné en 1993 (43,44)

alors que les derniers à ce jour ont été clonés en 2001 (45,46). Chaque récepteur P2Y a une distribution physiologique différente et très détaillée (révisée dans (47)).

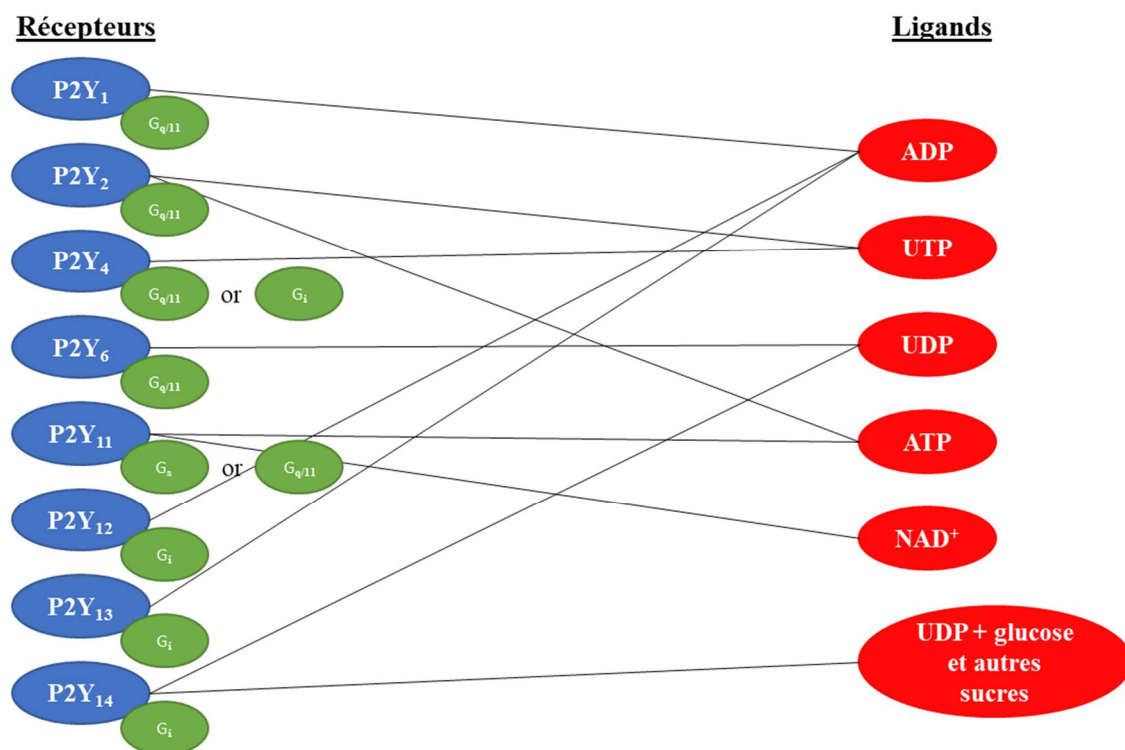


Figure 1.3 – Ligands des récepteurs P2Y.

Plusieurs sous-types de récepteurs P2Y sont exprimés sur plusieurs types cellulaires du système immunitaire. En effet, les récepteurs P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>2</sub> ont démontré joué un rôle dans la régulation de la réponse inflammatoire dans un modèle de rat (48). Plus spécifiquement, l'ATP a démontré un pouvoir de chimiotaxis sur les macrophages et les neutrophiles via le récepteur P2Y<sub>2</sub> et P2Y<sub>14</sub> (17,18,49). Les cellules dendritiques (DC) immature sont également soumises à une chimiotaxie via l'activation de plusieurs sous-types de récepteurs P2Y (50). En ce qui concerne les monocytes, le récepteur P2Y<sub>6</sub> a démontré la capacité à induire la production d'IL-8 (51) et le récepteur P2Y<sub>11</sub> joue également un rôle dans leur maturation (52-54). Conjointement,

P2Y<sub>1</sub> et P2Y<sub>12</sub> sont exprimés sur les plaquettes où chacun a un rôle spécifique dans l'activation plaquettaire (55,56).

### 1.2.2 Traitements anticancer

Plusieurs études démontrent que l'ATP inhibe la croissance de modèles tumoraux *in vitro* (57-62) et *in vivo* (62-67). Démontrant ainsi un certain intérêt de considérer l'ATP comme traitement anti-cancéreux.

Un traitement thérapeutique à base d'ATP a déjà été investigué dans le NSCLC. Une première étude clinique de phase II a démontré une inefficacité d'un traitement de 3 infusions de 96 heures à 50 mcg/kg/min chez une cohorte de 15 patients avec une cessation du traitement chez 5 patients du aux effets secondaires (68). L'inefficacité de ce traitement a été confirmé par 2 autres étude cliniques (69,70).

Dans la leucémie aiguë myéloblastique, un traitement à l'ATP semble pouvoir induire l'apoptose via l'activation du récepteur P2X<sub>7</sub> (71). Outre l'activation de l'inflammasome, le récepteur P2X<sub>7</sub> à la propriété de former des pores non-sélectifs menant vers une mort cellulaire par apoptose (72,73).

Le récepteur P2Y<sub>2</sub> a également un certain potentiel en tant que cible thérapeutique dans le cancer. Ce récepteur est fortement exprimé et activé tout en favorisant la prolifération et la migration dans plusieurs lignées cellulaires de cancer endométriale, carcinome colorectal, cancer du sein, cancer de la prostate, cancer épithélial biliaire et cancer du pancréas (74-88). Un agoniste thérapeutique a été développé et étudié dans la fibrose kystique avec des résultats encourageants d'une étude clinique de phase I/II (89). Cependant, 2 études cliniques de phase III ont démontré cet agent thérapeutique inefficace (90,91). Aucune étude clinique n'est présentement en cours pour évaluer le potentiel thérapeutique en oncologie.



## 1.3 CD39

CD39, ou E-NTPDase 1, fait partie de la famille des ecto-nucléoside triphosphate diphosphohydrolase (92). CD39, CD39L2, CD39L3 et CD39L4 sont 4 isoformes et hydrolysent les molécules NTPs et NDPs selon des ratios différents (93). En effet, CD39 hydrolyse les NTPs/NDPs selon un ratio 1:1 alors que CD39L1 hydrolyse sélectivement les NTPs avec un ratio de 1 : 0,03 et CD39L3 a une sélectivité plus intermédiaire avec un ratio de 1 : 0,3 (16). Dans le système adénoenergique, CD39 catalyse la conversion de l'ATP en AMP en enlevant spécifiquement les phosphates  $\gamma$  et  $\beta$  (94). Tous les membres de cette famille partagent 5 domaines très similaires essentiels pour l'activité catalytique de ces enzymes apyrase (95,96). CD39 a également une courte région cytoplasmique indiquant une possibilité de signalisation intracellulaire. Il a déjà été démontré que cette région intracellulaire peut se lier avec la protéine RAN (97). Cette molécule est une petite protéine G membre de la superfamille RAS qui est impliquée dans plusieurs processus de transport nucléaire (98).

L'expression de CD39 peut être induit par le facteur de transcription SP1 en condition hypoxique (99). L'augmentation du facteur de transcription Stat3 par IL-6 ainsi qu'une diminution de Gfi-1 par le TGF- $\beta$  permet également d'augmenter l'expression de CD39 (100).

### 1.3.1 Structure

CD39 est une enzyme dimérique ancrée à la membrane par 2 hélices transmembranaires à proximité des domaines N et C terminales flanquant son site actif extracellulaire (Figure 1.4) (92,101,102). Lors de l'activation par son substrat, les deux domaines transmembranaires effectuent une rotation d'environ 15 degrés permettant ainsi le changement de conformation (101). La présence d'ions  $Zn^{2+}$  permet l'activité enzymatique maximale de l'ecto-domaine (103).

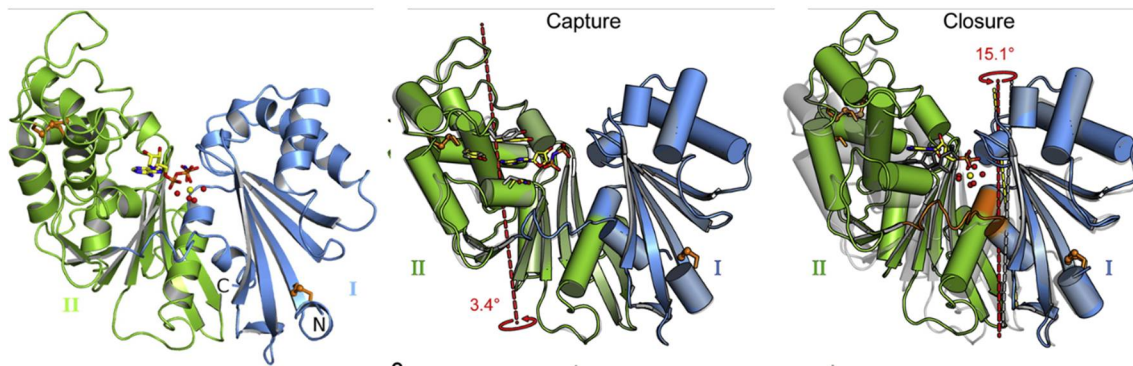


Figure 1.4 – Structure cristallographique de CD39. © Zebisch et al. Structure, 2013. With permission from Elsevier.

Cette enzyme est exprimée majoritairement sur les cellules endothéliales ainsi que quelques cellules du système immunitaire (104).

### 1.3.2 Implication dans le système immunitaire

L'activité enzymatique de CD39, avec la co-expression de PD-1, a été identifiée comme étant un marqueur de la fraction lymphocytaire CD8<sup>+</sup> épuisé (6). Cependant, cette propriété semble être spécifique seulement lors d'une infection au VIH et non lors d'une infection au virus Epstein-Barr (EBV) ou au cytomégalovirus (CMV) (105). CD39 semble également jouer un rôle important dans la mémoire des lymphocytes T étant donné leur forte expression dans cette sous-population (106,107).

CD39 est impliqué dans la maladie de Crohn (108). Plus spécifiquement, cette enzyme est co-exprimée avec CD161 sur la fraction des lymphocytes Th17 pathogéniques (109). Suite à ces études, CD39 a été proposé comme biomarqueur pour mesurer la réponse des Th17. CD39 a également été étudié dans la sepsie microbienne où cette enzyme augmente la survie via une diminution de l'inflammation systémique démontrée avec la souris knock-out (110).

## 1.4 CD73

Suivant l'hydrolyse de l'ATP en AMP par CD39, CD73 catalyse la conversion de l'AMP extracellulaire en adénosine (111). De cette cascade enzymatique, CD73 est considéré comme l'enzyme limitante (112).

### 1.4.1 Structure

CD73 ou Ecto-5'-nucléotidase est une glycoprotéine glycosyl-phosphatidylinositol ancrée sur la surface apicale de la cellule et fait partie de la super famille des métalloprotéases (111). Un cDNA de rat a été cloné pour une première fois en 1989 où la structure primaire en a été déduite avec une homologie à 84 % avec l'homme (113) alors que le cDNA de la souris à une homologie de séquence à 94 % (114). Le clonage de la forme humaine en provenance du placenta a été la suite logique avec la démonstration d'une séquence de 574 acides aminés avec 4 sites possibles de glycosylation (115). Cette enzyme est composée de 2 sous-unités identiques de 70 à 74 kDa (116). La majorité des membres de la famille des ecto-nucléotidases ont un site catalytique commun et sont présents du côté extracellulaire de la membrane plasmique avec un attachement à la membrane par un domaine hydrophobe (117). CD73 ne fait pas exception, où l'attachement à la membrane se fait par sa partie COOH terminale.

En 2012 un laboratoire a démontré la structure cristallographique de CD73 (Figure 1.5) (118). La cristallographie ainsi que des analyses préliminaires de rayons X ont permis de déterminer la présence d'un ion métallique de zinc, de calcium ou de chlore nécessaire à son activité enzymatique (119,120).

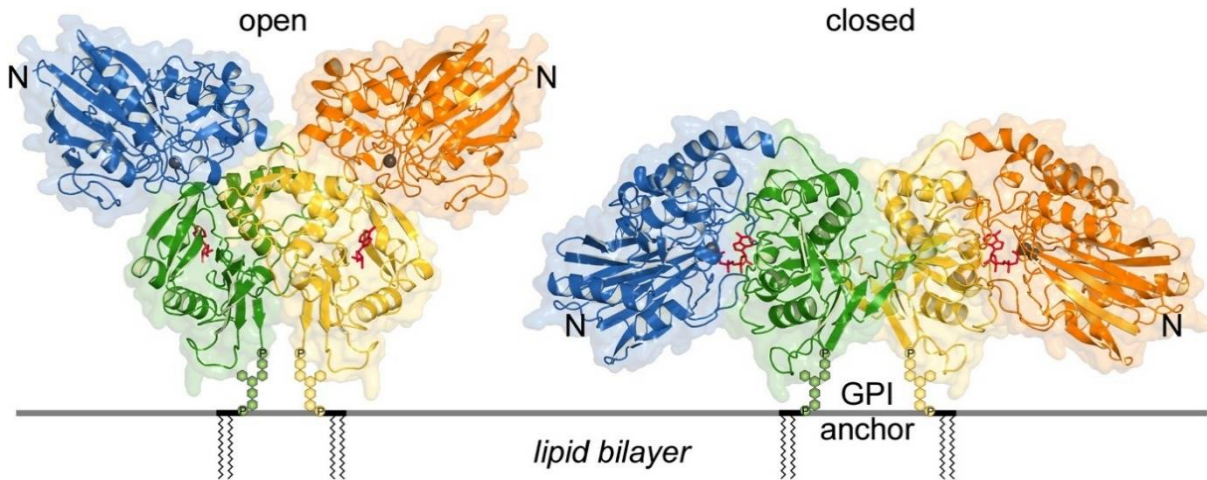


Figure 1.5 – Structure cristallographique de CD73 humain. © Knapp et al. Structure, 2012. With permission from Elsevier.

#### 1.4.1.1 Fonctions non-enzymatiques

CD73 est principalement étudié par rapport à son activité enzymatique responsable de générer de l'adénosine extracellulaire immunosuppressive (3). Cependant, quelques articles ont suggéré certains rôles non-enzymatiques. Terp *et al.* ont utilisé l'anticorps monoclonal anti-CD73 (clone AD2) et observé que celui-ci inhibe la prolifération de la tumeur primaire ainsi que la formation de métastases de manière indépendante de l'activité enzymatique (121). Le mécanisme d'action proposé est que cet anticorps induirait un clustering et une internalisation de CD73 menant à une inhibition de l'extravasation et de la colonisation de cellules tumorales circulantes.

Mikhailov *et al.* ont observé que CD73 était le gène avec l'expression la plus augmentée dans un clone de leucémie résistant à l'apoptose (122). L'investigation de ce clone a démontré une corrélation inverse avec l'ancrage de CD73 à la membrane et la sensibilité à TRAIL. Une co-immunoprécipitation de CD73 et du *death receptor 5* a permis d'émettre l'hypothèse d'un rôle non-enzymatique de CD73.

Un autre rôle non-enzymatique de CD73 de mieux en mieux décrit est l'adhésion cellulaire. En effet, l'expression de CD73 par les cellules endothéliales peut inhiber la liaison des lymphocytes à l'endothélium (123). Plus spécifiquement, l'engagement de CD73 par un

anticorps augmente la liaison des lymphocytes T aux cellules endothéliales CD73 de manière dépendante de LFA-1 (124). Finalement, CD73 peut également médier l'adhésion entre les lymphocytes B et les cellules dendritiques folliculaires (125).

CD73 semble également jouer un rôle dans l'activation des lymphocytes T. Une étude a rapporté une synergie entre l'interaction de CD73 avec l'anticorps monoclonal (clone 1E9) et l'activation des lymphocytes T par un anti-CD3 / anti-CD2 (126). Une observation similaire a été effectuée pour la prolifération des lymphocytes (127). Suggérant ainsi que CD73 pourrait agir comme molécule de co-signalisation tel d'autre protéine GPI (e.g. Thy-1 ou Ly-6) (128,129). Une autre hypothèse du rôle non-enzymatique de CD73 sur l'activation des lymphocytes T serait la diminution du seuil d'activation des lymphocytes T naïfs lors de l'engagement de cette enzyme (112).

#### **1.4.2 Localisation physiologique**

Une première étude de l'expression physiologique de CD73 chez la souris a été effectuée en 1993 où il a été déterminé que l'activité enzymatique était très variable entre les différents type de tissus (114). Plus tard, la souris CD73<sup>-/-</sup> dans un background C57BL/6 a permis de déterminer la distribution physiologique de CD73 ainsi que son expression leukocytaire dans divers compartiment (Figure 1.6) (130). De façons intéressantes, ces niveaux corrélerent inversement avec les concentrations physiologiques d'adénosine déaminase (ADA), une enzyme responsable de la dégradation de l'adénosine (114,131).

**A**

Tissue activity	APCP-inhibitable 5'-NT activity	
	CD73 +/+	CD73 -/-
	Nmol/h/mg $\pm$ SEM	
Colon	1 523 $\pm$ 116	9 $\pm$ 3
Lung	248 $\pm$ 56	14 $\pm$ 4
Heart	171 $\pm$ 64	1 $\pm$ 0.1
Muscle	33 $\pm$ 5	6 $\pm$ 0.9
Brain	891 $\pm$ 128	10 $\pm$ 6
Liver	347 $\pm$ 26	1 $\pm$ 0.1
Kidney	799 $\pm$ 158	6 $\pm$ 4

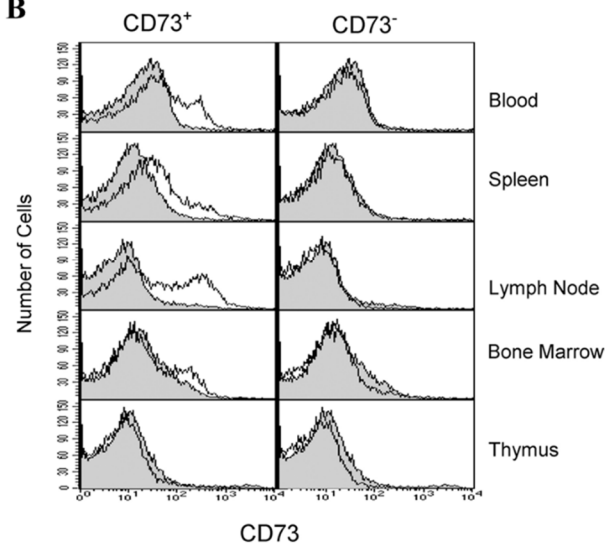
**B**

Figure 1.6 – Distribution de CD73 chez la souris. (A) Distribution physiologique de CD73 chez la C57BL/6 sauvage. (B) Expression de CD73 sur les leukocytes de divers organes. © Thompson et al. JEM, 2004. With permission from The Rockefeller University Press

Chez l'homme, CD73 est exprimé sur divers types cellulaires incluant certains lymphocytes, cellules endothéliales et cellules épithéliales (132). CD73 est très présent au niveau des vaisseaux sanguins étant donné son rôle primordial dans l'extravasation des lymphocytes sanguins et le contrôle de la réponse inflammatoire (130). Étonnamment, l'activité CD73 est la plus forte dans le corps humain au niveau des valves aortiques (133).

#### 1.4.2.2 Facteur soluble

En 1987, une forme relâchée d'un CD73 purifié a été démontré pour la première fois comme étant facilement soluble (134). Une hypothèse a été émise que la fraction ancrée à la membrane serait relâchée sous l'action endogène de la phospholipase C. 3 ans plus tard, le laboratoire de Linda Thompson a confirmé que CD73 pouvait être présent sous forme soluble et ainsi confirmer l'hypothèse précédente d'une ecto-5'-nucléotidase relâcher de son ancrage glycosylphosphatidylinositol (135). Depuis, la forme soluble de CD73 est de plus en plus étudiée dans divers contextes pathologiques chez l'homme (136-138) et chez les rongeurs (139,140).

Finalement, la structure cristalline de la forme soluble de CD73 a été identifiée en 2012 où un léger changement dans la structure secondaire de la protéine avec une absence de lien disulfure pour relier les 2 sous-unités tout en gardant la glycosylation a été observé comparativement à l'enzyme ancrée à la membrane (141).

### 1.4.3 Implication dans le système immunitaire

Utilisant un anticorps anti-CD73 polyclonal de chèvre fabriqué dans leur propre laboratoire, Thompson *et al.* ont été les premiers à caractériser les niveaux d'expression de CD73 sur divers sous-types de lymphocytes T (Tableau 1.2) (142). Ces niveaux concordent avec ceux observé par marquage histochimique (143,144).

Fraction cellulaire	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD16 <sup>+</sup>	Adult peripheral blood B cells
Pourcentage de cellules CD73 <sup>+</sup> (%)	32 ± 7	19 ± 6	50 ± 21	0	81 ± 8

Tableau 1.2 – Niveau d'expression de CD73 sur le système immunitaire humain. Pourcentage de cellules CD73<sup>+</sup> du total de lymphocytes T selon les sous-types CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> ainsi que les CD16<sup>+</sup> et les lymphocytes B périphériques.

#### 1.4.3.1 Lymphocytes T

Chez la souris, CD73 est fortement exprimé au niveau des lymphocytes T mémoires et une expression diminuée au niveau des lymphocytes T différenciés démontrant un rôle de CD73 dans la différenciation des lymphocytes T (145). Cependant, cette étude a été réalisée dans un contexte oncogénique où certains artéfacts présents dans le microenvironnement doivent être considérés. D'un autre point de vue, aucune évidence claire démontre un rôle de CD73 dans la différenciation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>. Cependant, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs expriment CD73 et son expression diminue en corrélation avec leur état activation (146). La somme de ces

résultats permet de poser l'hypothèse que la diminution de l'expression de CD73 peut être nécessaire pour empêcher un signal autocrine de l'adénosine durant l'activation des lymphocytes T (Figure 1.7) (147). Une hypothèse qui a été possible grâce aux travaux fondateurs du Dr Thompson dans les années 80 (Tableau 1.2) (142).

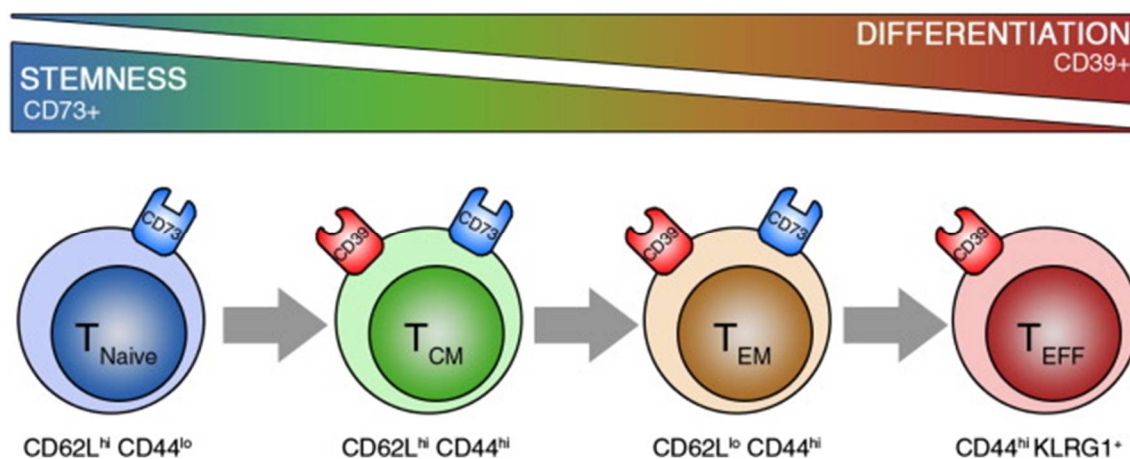


Figure 1.7 – Expression CD39 – CD73 dans l'activation des lymphocytes T. © Rosa Bono et al. FESB Letters, 2015. With permission of John Wiley and Sons.

CD73 a également été identifié comme un marqueur des progéniteurs de lymphocytes T  $\gamma\delta$ . En effet, ces progéniteurs sont dirigés vers le phénotype  $\alpha\beta$  lorsque CD73 n'est pas exprimé (148).

CD73 est également très exprimé au niveau des précurseurs des lymphocytes T  $CD4^+$  *helper* (149). Plus spécifiquement, CD73 a démontré comme ayant un potentiel de marqueur de lymphocytes Th17 (100). L'importance de l'expression de CD73 sur les Th17 a été étudiée dans un contexte de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (150) et dans un contexte préclinique de EAE (151).

#### 1.4.3.2 Lymphocytes T régulateurs

De nombreuses évidences démontrent que l'axe adénosinergique CD39 – CD73 – A2A est un des mécanismes d'immunosuppressions employé par les lymphocytes T régulateurs (Tregs) (152-155). En effet, l'expression de CD73 conjointement avec CD39 sur les Tregs a été



démontrée comme ayant une forte activité enzymatique menant à la création d'une immunosuppression des lymphocytes T effecteurs via le récepteur A2A (156). En plus de son rôle d'immunosuppression, CD73 peut également agir comme marqueur des Tregs (153).

#### **1.4.3.3 Lymphocytes B**

Les lymphocytes B ont le pouvoir d'accumuler l'ATP dans des vésicules sensibles aux changements de calcium intracellulaire et de relâcher celles-ci lors de l'activation du récepteur des cellules B (BCR) (157). L'ATP extracellulaire est ensuite prise en charge par CD39 – CD73 et induit un signal adénosinergique autocrine nécessaire pour la commutation de classe isotypique (157).

#### **1.4.3.4 Macrophages**

CD73 a démontré des niveaux d'expressions variables dépendamment de l'état d'activation des macrophages. En effet, une faible expression et activité de CD73 ainsi que de CD39 a été observée sur les macrophages de type M1 contrairement aux macrophages de types M2 (158,159). Cependant, la présence de CD73 n'est pas nécessaire pour la polarisation des macrophages vers le type M2 que ce soit par un inhibiteur chimique tel l'AMPCP ou chez les macrophages en provenance d'une souris CD73 knock-out (159).

#### **1.4.3.5 Cellules NK**

Les cellules *natural killer* (NK) humaines sont définies selon les marqueurs CD16 et CD56 qui peuvent être exprimés à différentes intensités dépendamment de leur état d'activation (160,161). Récemment, un possible rôle de régulation par CD73 a été démontré sur la fraction cellulaire de cellules NK non-cytotoxiques produisant beaucoup de cytokines (CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup>) (162-164). L'axe adénosinergique semble jouer un rôle dans cette régulation immunitaire où le tandem CD39 – CD73 a été démontré être plus fortement exprimé sur les cellules NK CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> que sur les cellules NK cytotoxiques (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup>) (165).

## 1.4.4 Régulation

### 1.4.4.1 Facteurs de transcription

Plusieurs études démontrent clairement une augmentation de l'expression de CD73 en condition hypoxique (130,166-168). Dans cette condition, la fonction enzymatique du tandem CD39 – CD73 augmente jusqu'à 6 fois comparativement en condition de normoxie (166). Dans un même ordre d'idée, un site de liaison au facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  a été identifié dans le promoteur du gène de CD73 (166). De manière redondante, HIF-2 $\alpha$  régule le récepteur à l'adénosine A2A (169).

La voie de signalisation Wnt/ $\beta$  – catenin a également été identifié comme pouvant réguler l'expression de CD73 (170). En effet, quelques études ont clairement démontré une augmentation de l'expression de CD73 lors d'une exposition au TGF- $\beta$  dans différents modèles cellulaires (171-174). Cette augmentation de l'expression de CD73 en réponse au TGF- $\beta$  indique un rôle potentiel de cette enzyme dans la transition épithéliale-mésenchymateuse (175). En effet, des études préliminaires, incluant l'article présenté au chapitre 6, suggèrent un rôle de CD73 dans la transition épithéliale-mésenchymateuse en démontrant une corrélation de l'expression de CD73 avec l'état mésenchymateux (175,176).

Plusieurs facteurs de transcription ont été observés comme pouvant augmenter l'expression de CD73 : IFN- $\alpha$  (177) et Stat3 (100). D'un autre point de vue, l'INF- $\gamma$  ainsi que les cytokines inflammatoires IL-4, IL-12 et IL-21 diminuent l'expression de CD73 sur des cellules mononuclées sanguines (174,178). La diminution de Gfi-1 par le TGF- $\beta$  est également responsable d'une diminution de l'expression de CD73 (100).

### 1.4.4.2 Épissage alternatif

Une autre méthode sous-estimée de la régulation de CD73 est l'épissage alternatif. Ce phénomène biologique est connu pour être un régulateur de l'expression génique majeur chez les mammifères (179,180). Un variant de CD73, dénommé CD73S, qui est une enzyme tronquée de 50 acides aminés a été observé en faible abondance dans les tissus normaux humains, mais significativement augmentée dans des tissus cirrhotiques ainsi que de carcinomes hépatocellulaires (181). Ce variant a été démontré comme étant catalytiquement inactif,

incapable de dimériser et complexe avec le système de chaperones dans le réticulum endoplasmique tout conservant le pouvoir d'être glycosylé (181). De manière intéressante, le variant CD73S n'a pas été observé chez la souris.

Cette méthode de régulation a été émise comme hypothèse comme cause du syndrome de la calcification des jointures et des artères (CALJA) qui est la seule pathologie identifiée reliée à une déficience en CD73 (181,182). Cependant, cette pathologie a été démontrée comme ayant une origine causée par des mutations résultant en une protéine non-fonctionnelle menant vers une déficience dans le trafic de l'enzyme (182,183). D'un point de vue mécanistique, une déficience enzymatique de CD73 au site périphérique de la calcification des tissus mous empêche l'adénosine d'inhiber la TNAP une enzyme responsable de cliver la molécule PPI (pyrophosphate inorganique) en 2 Pi (phosphate inorganique) (184). Ce déséquilibre provoque une élévation du ratio Pi/PPi et mène ultimement à la calcification. La condition humaine d'une CALJA peut être associée à une déficience en CD73 (ACDC) (182). La souris déficiente en CD73 est un bon modèle pour l'ACDC avec une élévation du ratio Pi/PPi sanguin et une minéralisation dans le système vasculaire et des jointures (185). Cependant, aucune calcification n'a été observée démontrant que la souris CD73<sup>-/-</sup> ne récapitule pas tous les phénotypes de la pathologie humaine (185).

### **1.4.5 Rôle dans le cancer**

L'inhibition de CD73 a déjà été identifiée comme très prometteuse dans de nombreux types de cancer (révisé dans (3)). Dans le microenvironnement tumoral, les concentrations d'adénosine peuvent atteindre des niveaux jusqu'à 20 fois plus élevés comparativement aux tissus sains (186). Ce qui va par la suite diminuer la réponse anti-tumorale des lymphocytes T (187,188).

Malgré un certain consensus dans la communauté scientifique que CD73 est exprimé dans de nombreux cancers et que cette enzyme favorise la progression tumorale, quelques articles mentionnent une corrélation avec de bons pronostics. Par exemple, une étude chez des souris immunodéficientes injectées avec un médulloblastome exprimant artificiellement CD73 par un vecteur ont eu une prolifération tumorale diminuée comparativement à un groupe

contrôle injecté avec un médulloblastome contenant un vecteur vide (189). Une autre étude sur une cohorte de 174 patients atteints du cancer urothélial a démontré qu'une forte expression de CD73 était associée à un meilleur pronostic (190). Un article a également démontré que l'expression de CD73 était associée à un bon pronostic dans une cohorte de 167 patientes incluant une panoplie de type de cancer de l'ovaire (191). En général, ces dernières études sont publiées dans des journaux à petits facteurs d'impact avec peu d'échantillons dans leurs groupes expérimentaux. D'un autre point de vue, relativement peu de recherche a été effectuée à ce jour sur CD73, donc un potentiel rôle anti-tumorale peut dépendre d'un type de cancer ou d'un stade de la pathologie.

Finalement, une méta-analyse a déterminé la valeur pronostique de CD73 dans des tumeurs solides avec une inclusion de 13 études – 12,533 patients qui ont permis de déterminer qu'une haute expression de CD73 est corrélée avec une faible survie globale (Figure 1.8) (192).

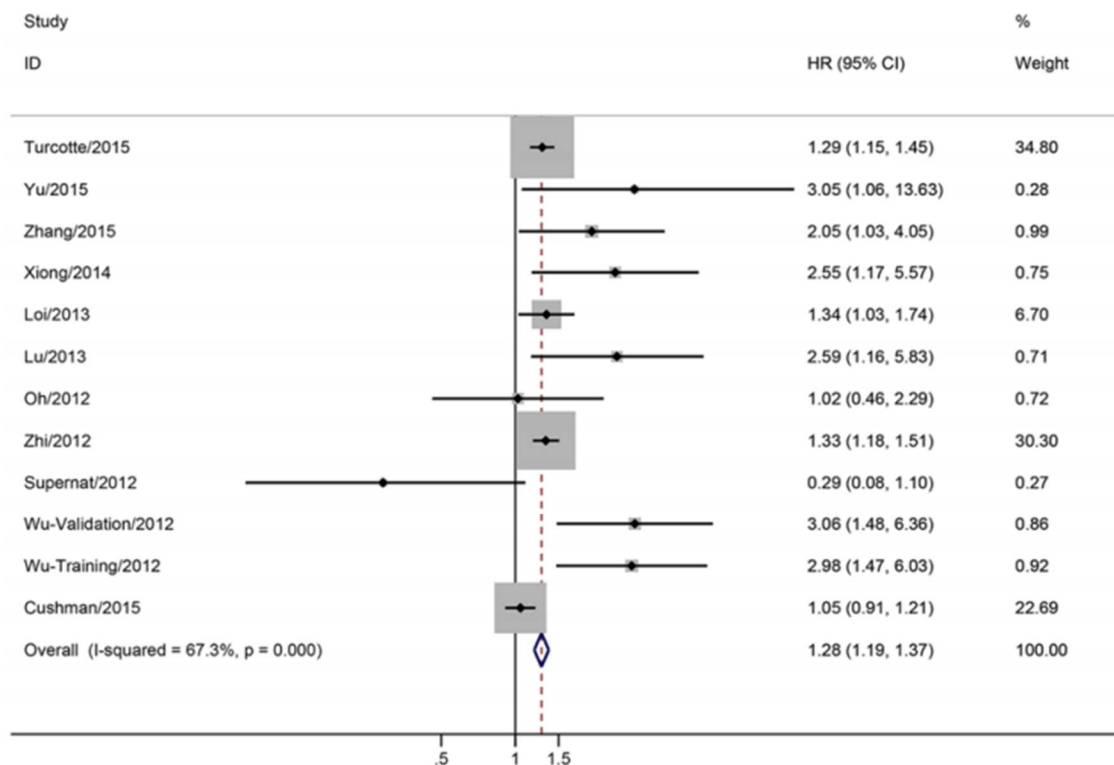


Figure 1.8 – CD73 est associé à une mauvaise survie globale chez les patients atteints de tumeurs solides. © Wang et al. Oncotarget, 2017. With permission of Oncotarget.

#### **1.4.5.1 Cancer du sein**

Dans le cancer du sein, de nombreux modèles de souris ont démontré que l'absence de CD73 est associée à une diminution de la croissance tumorale et des métastases (121,193-195). *In vitro*, l'inhibition de CD73 a clairement démontré une diminution de la prolifération de plusieurs lignées cellulaires de cancer du sein (196-200). Dans un même ordre d'idée, un traitement avec un anticorps monoclonal inhibant CD73 a également démontré une inhibition de la croissance et du développement des métastases chez la souris (193). Spécifiquement dans le cancer du sein triple négatif, ces résultats semblent être dépendant d'une diminution de l'infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> où CD73 corrèle avec un mauvais pronostic et une résistance à la chimiothérapie (201). CD73 a clairement été identifié comme étant une cible potentielle dans le cancer du sein triple négatif chez l'homme (121,202). Une analyse de masse spectrométrie sur 1919 protéines avec une analyse génique de xénogreffes ont corrélées CD73 comme une des protéines responsables du phénomène métastatique (203,204). CD73 joue également un rôle dans la promotion de l'angiogenèse tumorale (195,205). De manière intéressante, CD73 corrèle négativement avec l'expression du récepteur à l'oestrogène (206).

#### **1.4.5.2 Cancer de l'ovaire**

CD73 semble être surexprimé dans le cancer de l'ovaire sur différente fraction cellulaire présente dans le microenvironnement tumoral. En effet, CD73 exprimé au niveau du compartiment hématopoïétique ou non-hématopoïétique participe à l'augmentation de la prolifération tumorale (194). Alors que l'expression de CD73 directement sur les cellules cancéreuses inhibe les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et augmente la croissance tumorale via l'activation du récepteur à l'adénosine A2A (187). Un lien très clair a été émis qu'une surexpression de CD73 corrèle avec une diminution de l'infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> ainsi qu'une diminution de la cytotoxicité des cellules NK (207,208). Un autre groupe de recherche a démontré que les cellules cancéreuses productrices d'adénosine semblent attirer directement les cellules myéloïdes et forcent la différenciation vers un phénotype suppresseur démontrant ainsi un autre mécanisme d'immunosuppression potentielle de CD73 dans le cancer de l'ovaire (209).

Dans le cancer endométrial, les enzymes CD73 et CD39 sont fortement exprimées (210). Alors, qu'un autre groupe a démontré que la perte de CD73 est associée à une perte de l'intégrité

de l'épithéliale et ainsi favorise la progression tumorale endométriale. Ces résultats en cancer endométriale suggèrent un rôle potentiel de CD73 dans l'intégrité de l'épithélium, un mécanisme physiologique anti-tumorale important (211).

#### **1.4.5.3 Mélanome**

En ce qui concerne le mélanome, CD73 a été corrélé positivement avec le potentiel métastatique dans une étude incluant 7 lignées cellulaires (212). La particularité de la surexpression de CD73 dans le mélanome est que celle-ci semble être due à l'hypométhylation de son promoteur (213). Dans un modèle animal de mélanome (B16F10) chez la souris CD73 knock-out, une diminution de la croissance tumorale a été observée ainsi qu'une diminution du phénomène métastatique (214,215). Des résultats similaires ont été observés chez la souris A2A knock-out (216). D'un autre point de vue, l'ajout d'agonistes pour les récepteurs adénosinergiques ont renversé la décroissance de la néovascularisation et augmenter l'infiltration des macrophages de types immunosuppresseurs (217). L'ensemble de ces résultats démontrent l'importance d'une inhibition complète de l'axe adénosinergique.

L'inhibition de l'axe adénosinergique a également démontré une activité synergétique intéressante avec d'autres types d'immunothérapie tels les bloqueurs de points de contrôle anti-PD-1 et anti-CTLA-4, le transfert adoptif de lymphocytes T ainsi qu'un vaccin à base de GM-CSF (194,218-220). La plupart des études effectuées sur le mélanome démontrent une participation du récepteur à l'adénosine A2A, mais le récepteur A2B semble également impliqué dans la réponse anti-tumorale (221,222).

#### **1.4.5.4 Cancer de la Prostate**

Dans 2 modèles murins de cancer de la prostate (TRAMP-C1 et RM-1), CD73 a été associé à une augmentation de la croissance tumorale (223,224). De plus, il a été déterminé que l'expression de CD73 sur les cellules épithéliales et dans le tissu normal adjacent à la tumeur diminue l'infiltration des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et peut être défini comme un marqueur de mauvais pronostic indépendant (223). La surexpression de cette enzyme a également été identifiée comme un marqueur du processus métastatique du cancer de la prostate dans une cohorte de 116 patients (225). Finalement, le récepteur à l'adénosine qui semble prédominer dans ce type de cancer est le récepteur à l'adénosine A2B (226).

Dans le cancer de la vessie, le fait que CD73 a une expression plus élevée dans une lignée cellulaire de grade 3 (T24) comparativement à une lignée cellulaire de grade 1 (RT4) a été le premier indice de l'implication de cette enzyme dans ce cancer (227). Alors que la croissance tumorale de la lignée cellulaire du cancer de la vessie MB49 semble être dépendante du récepteur à l'adénosine A2B et non A2A (228).

#### **1.4.5.5 Cancer du Poumon**

Dans le cancer du poumon, CD73 a été démontré comme étant un facteur de mauvais pronostic indépendant contrairement au récepteur à l'adénosine A2A dans une cohorte de 642 patients (229). Cependant, une autre étude avait déjà identifié le récepteur A2A comme étant surexprimé au niveau des cellules tumorales d'adénocarcinome du poumon ainsi que sur les cellules fibroblastiques associées et avait identifié ce récepteur comme cible thérapeutique potentielle (230). Des conclusions similaires ont été tirées avec le modèle tumoral Lewis de cancer du poumon (231). Dans ce même modèle, le récepteur adénosine A2B a également démontré un pouvoir pro-tumorale grâce à l'utilisation de la souris A2B knock-out (232). Une autre étude semble observer une surexpression de CD73 spécifiquement sur les MDSC (172).

#### **1.4.5.6 Cancer du cerveau**

CD73 semble également jouer un rôle au niveau des cancers du cerveau. Premièrement, CD73 a été observé comme étant exprimé au niveau de 2 lignées cellulaires où l'ajout d'un inhibiteur chimique (APCP) inhibe la prolifération de 30 % alors que l'ajout d'adénosine augmente la prolifération de 36% (233). Sur des échantillons cliniques, une synergie du tandem enzymatique CD39 – CD73 a été observée quant à l'établissement d'une immunosuppression chez des patients atteints de gliome menant ainsi vers une diminution de l'infiltration des lymphocytes T (234). Une diminution de l'expression de CD73 a également été identifiée comme étant un facteur pronostique favorable à la survie des patients (234). Une observation similaire a été effectuée quant au glioblastome avec l'investigation de 165 spécimens cliniques (235). De plus, CD73 semble médié un effet sur la résistance aux médicaments dans le contexte du cancer du cerveau où une inhibition de CD73 sur des échantillons humains a permis d'observer l'augmentation de la sensibilité à la drogue anti-tumorale vincristine via la diminution de la protéine Mrp-1 (236). En ce qui concerne les récepteurs adénosinergiques, les

récepteurs A1 et A2B semblent prédominants dans les glioblastomes et la résistance à la chimiothérapie (237,238).

#### **1.4.5.7 Cancer hématologique**

En ce qui concerne les cancers hématologiques, CD73 joue un rôle évident dans la leucémie avec une induction de la résistance à l'apoptose (122). Le gène de CD73 a été un des gènes les plus dominants dans une étude qui a identifié 30 gènes étant 3 fois plus surexprimés dans la leucémie lymphoblastique aigüe comparativement à des échantillons de moelle osseuse non-leuémique (239). Alors que pour la leucémie lymphoblastique chronique, 97 patients sur 299 surexpriment CD73 sur les cellules tumorales du sang périphérique avec une activation constitutive du récepteur adénosinergique A2A (240). Outre CD73, CD39 a également été identifié comme un marqueur non-favorable pour un sous-type de lymphocytes B dans la leucémie lymphoblastique chronique (241).

#### **1.4.5.8 Études cliniques**

Une accumulation d'évidences que le système adénosinergique est impliqué dans la progression du cancer et l'échappement au système immunitaire a poussé le développement d'inhibiteurs de l'enzyme CD73. Plusieurs anticorps monoclonaux anti-CD73 ont déjà été développés pour des fins de recherche (242). Récemment, des méthodes de criblage à haut débit ont été établies spécifiquement pour CD73 (243,244). Finalement de petites molécules inhibitrices ont été identifiées (245-248) ainsi qu'un anticorps monoclonal thérapeutique développé par la compagnie MedImmune (249). Cet anticorps, MEDI9447, a fait ses preuves d'efficacité précliniques avec une efficacité en tant que monothérapie et en combinaison avec un anti-PD-1 par l'augmentation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, la diminution des MDSC ainsi qu'une diminution des Tregs dans le microenvironnement tumoral (250). MedImmune conduit présentement une étude clinique de phase I afin d'évaluer la sécurité, la tolérabilité, la pharmacocinétique, l'immunogénicité et l'activité anti-tumorale en tant que monothérapie et en combinaison avec MEDI4736, un anti-PD-L1, chez des sujets adultes avec des tumeurs solides avancées (NTC02503774). L'étude clinique est estimée se conclure en février 2021.



### 1.4.6 Rôle dans le système vasculaire

Outre son activité d'inhibiteur du système immunitaire, CD73 est impliqué dans l'extravasation des leucocytes lors du phénomène d'inflammation (251). La rapide diminution de cette enzyme à la surface des cellules endothéliales provoque un regroupement des intégrines CD11a et CD18 augmentant ainsi la liaison des lymphocytes à l'endothélium (124). L'augmentation de la concentration d'adénosine extracellulaire augmente la fonction de la barrière endothéliale par la phosphorylation des protéines VAP-1 dans les jonctions serrées (252). La vasodilatation de l'endothélium peut également être due à l'activation des récepteurs adénoenergiques qui va mener à l'hyperpolarisation des muscles lisses vasculaires (253).

CD73 semble clairement jouer un rôle dans la calcification artérielle et des jointures. Une étude et quelques cas ont identifié une mutation dans le gène CD73 résultant à l'absence d'activité enzymatique dans les fibroblastes des membres de la famille atteinte (182,254-256). Suite à ces observations, une étude chez la souris déficiente en CD73 a permis d'observer le même phénotype (185).

L'artériosclérose est aussi un phénomène pathophysiologique où CD73 semble être impliqué. L'implication de CD73 a été étudiée dans la souris Apolipoprotéine E (ApoE) knock-out où ce modèle forme des plaques artériosclérotiques causées par une augmentation du cholestérol sanguin et est caractérisé par une infiltration des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et des macrophages dans les lésions (257). Le croisement de la souris CD73 knock-out avec la souris ApoE knock-out a permis l'observation de l'augmentation des lésions d'environ 50 % via la désinhibition des macrophages et des lymphocytes T résidents (258). Un second modèle d'artériosclérose murin est la délétion de Cx40 où un des phénotypes observés chez ces souris a été la diminution de l'expression de CD73 sur les cellules de l'endothélium (259). L'ensemble de ces résultats indique que la perte de CD73 accélère significativement la progression de cette pathologie.

La thromborégulation est un autre phénomène vasculaire où CD73 est impliqué. L'étude de l'aggrégation plaquettaire chez la souris CD73 knock-out a démontré une réduction de temps de saignement de 35% ainsi qu'une diminution de 20% de l'occlusion carotidienne suite à l'exposition au chlorure de fer comparativement à la souris sauvage (260). L'utilisation

d'adénosine ainsi que d'AMP *in vitro* et *in vivo* a également démontré une diminution de l'adhésion des plaquettes sur le collagène via l'activation du récepteur à l'adénosine A2A (261,262). Le tout démontrant que l'adénosine générée par l'enzyme CD73 inhibe la fonction plaquettaire.

## 1.5 Récepteurs adénoenergiques

Finalement, le nucléoside adénosine est considéré comme produit final de l'hydrolyse de l'ATP par le tandem enzymatique CD39 – CD73 (figure 1.1). Elle peut être à son tour recyclé par une recapture de la cellule via des transporteurs spécifiques, puis rephosphoryler intracellulairement (263). La recapture cellulaire se fait par les transporteurs nucléosidiques ENT ou CNT qui sont présents de manière variable sur différents types cellulaires (264). Les transporteurs nucléotidiques peuvent également jouer le rôle de modulation de la concentration intracellulaire d'adénosine. L'adénosine peut également se faire dégrader en inosine par le complexe CD26 – ADA (265). Cependant, l'adénosine va majoritairement aller se lier aux récepteurs à l'adénosine pour transmettre un signal intracellulaire (266). La concentration d'adénosine est généralement constante, mais peut augmenter jusqu'à 100 fois dans un tissu hypoxique ou en réponse à l'inflammation (267).

Les récepteurs à l'adénosine sont une famille qui comprend 4 membres : A1, A2A, A2B et A3. Chacun de ces récepteurs sont couplés aux protéines G, A1/A3 pairés avec Gi et A2A/A2B pairés avec Gs et influencent les niveaux intracellulaires d'AMP cyclique (AMPc) (Figure 1.9) (266). Ces récepteurs, à l'exception de A2B, peuvent être activés par l'adénosine à des concentrations physiologiques entre 30 et 300 nm (268,269). Alors que A2B demande des concentrations plus élevées observées dans des conditions pathologiques tel le cancer (268). La stimulation des récepteurs A2A et A2B mène à une activation de PKA, puis à une phosphorylation de CREB par l'AMPc.

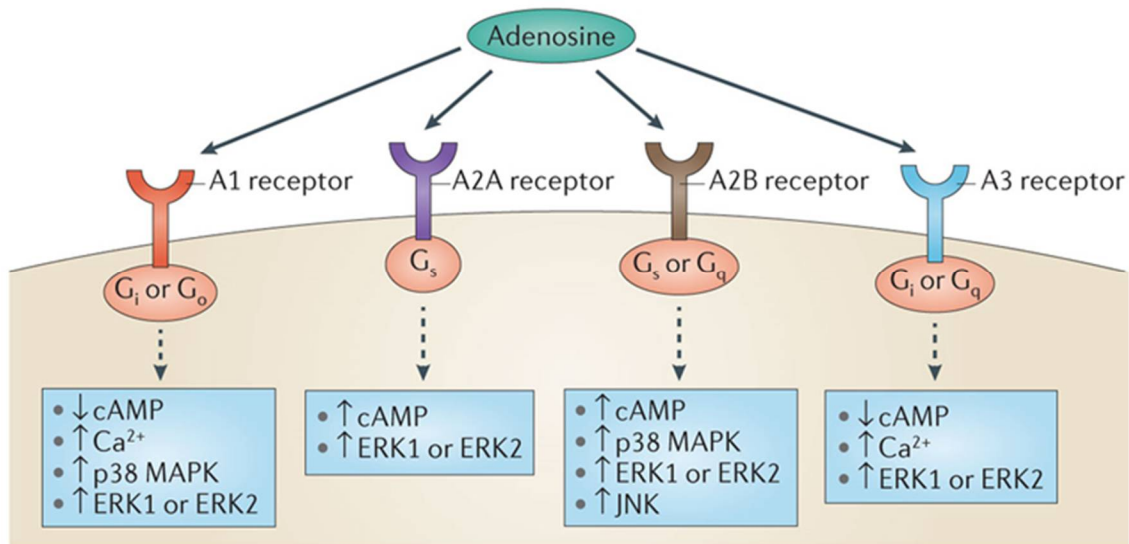


Figure 1.9 – Récepteurs à l'adénosine. © Antonioli et al. Nat Rev Cancer, 2013. With permission from Nature Publishing Group.

Les récepteurs adénosinergiques sont présents sur la majorité sinon toutes les cellules du système immunitaire inné et adaptatif où ils produisent un effet immunosuppresseur lorsqu'ils sont activés par l'adénosine (figure 1.10) (270).

Des 4 récepteurs à l'adénosine, le récepteur A2A est le récepteur prédominant sur les cellules du système immunitaire avec une expression sur les cellules lymphocytaires, macrophages, monocytes, granulocytes, dendritiques, NK et NKT (271). Sur ces cellules, ce récepteur a un rôle d'immunosuppression non-redondant (270,272). Le récepteur A2B est similaire au récepteur A2A à l'exception de son affinité plus faible pour l'adénosine. Similairement à CD73, les récepteurs A2A et A2B sont induits par l'hypoxie, mais également par le TNF $\alpha$ , l'INF $\gamma$  et l'adénosine extracellulaire (273-277). Il a également été démontré que l'expression du récepteur A2A est augmentée suite à une activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B et servirait comme mécanisme de régulation de la réponse inflammatoire (278).

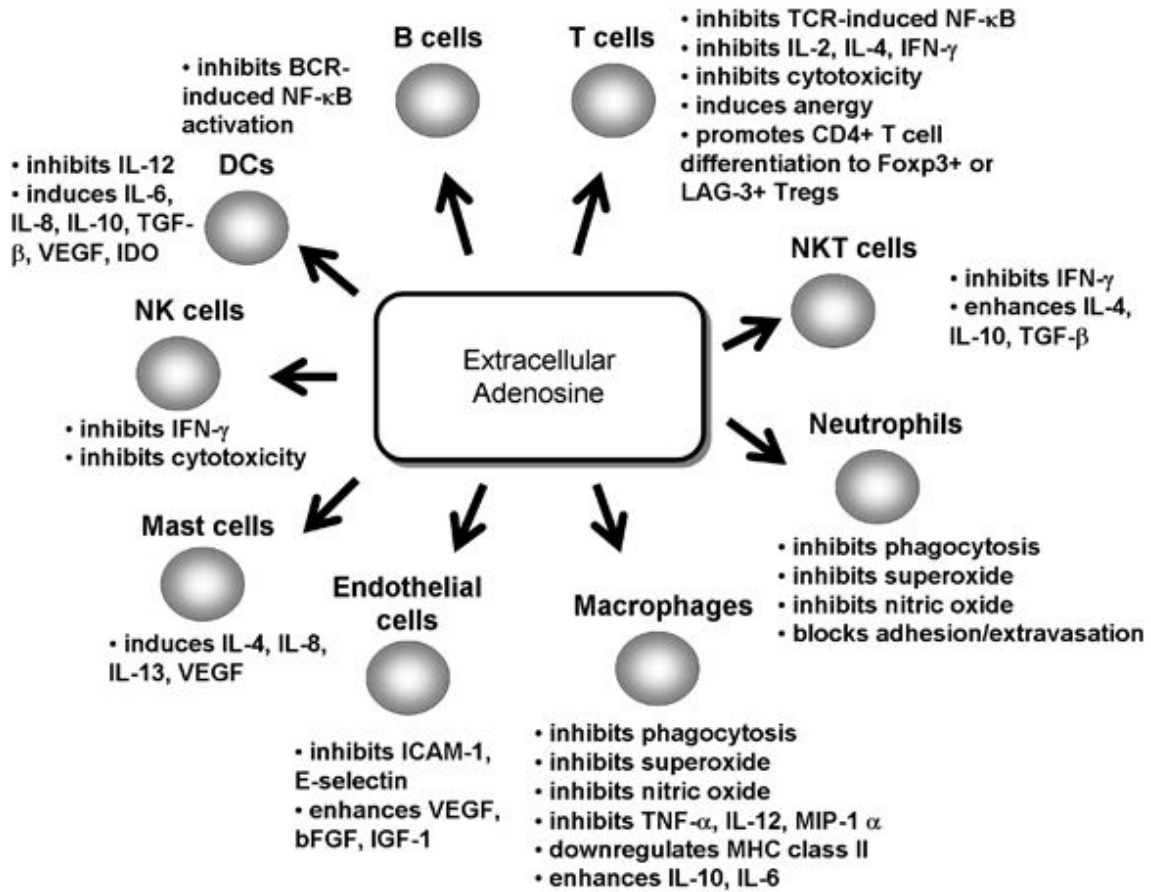


Figure 1.10 – Effet de l’adénosine sur les cellules du système immunitaire inné et adaptatif. © Stagg et Smith. Oncogene, 2010. With permission from Nature Publishing Group.

## 1.5.1 Adénosine dans le système immunitaire

### 1.5.1.1 Lymphocytes T

L’adénosine extracellulaire inhibe l’activation dépendant de NF-κB des lymphocytes T (279). Cette diminution de l’activation est dépendant de l’activation du récepteur A2A qui mène à une diminution des fonctions cytotoxiques, de production de cytokines et de la prolifération cellulaire (280,281).

À l’aide de la souris knock-out pour le gène A2A spécifiquement sur les lymphocytes T, une diminution de la survie et de la différenciation dans le microenvironnement tumoral a été

observée comparativement à la souche sauvage (282). Des résultats similaires ont été observés avec un agoniste spécifique (283). Alors que l'inverse, un blocage du récepteur A2A, a démontré une augmentation de la réponse lymphocytaire CD8<sup>+</sup> ainsi qu'une diminution des lymphocytes T régulateurs (284). L'adénosine a également un rôle dans l'inhibition de l'activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> en prévenant la phosphorylation rapide de ZAP-70, de la protéine kinase B (AKT) et de ERK1/2 (285). Une exposition prolongée à l'adénosine va jusqu'à promouvoir l'anergie de ces lymphocytes T tout en favorisant la génération de lymphocytes T régulateurs (286). L'engagement du récepteur A2B a également démontré les mêmes effets que le récepteur A2A sur l'augmentation de l'abondance des Tregs (287).

Contrairement aux lymphocytes T  $\alpha\beta$ , les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont davantage activés par un agoniste du récepteur A2A (288). Ces observations ont été confirmées dans un modèle d'EAU (289,290).

En ce qui concerne les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, l'activation du récepteur A2A inhibe le développement ainsi que la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-2, TNF- $\alpha$  et IFN- $\gamma$ ) par les lymphocytes T *helper* (291,292). Spécifiquement pour les lymphocytes T *helper* 17, l'adénosine générée via l'enzyme CD73 favorise un profil de cellules souches avec une augmentation de la production d'IL-17 (145). L'effet de l'adénosine sur ces cellules semble être médié par le récepteur A2B via la stimulation des cellules dendritiques (293-295).

L'activation du récepteur A2A a démontré pouvoir diriger les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers un phénotype Tregs (286). L'adénosine générée par ces cellules a le potentiel d'augmenter davantage le recrutement des Tregs tout en favorisant l'immuno-régulation suggérant ainsi un mécanisme de rétroaction positive s'établissant dans le microenvironnement immunosuppresseur (296).

### **1.5.1.2 Lymphocytes B**

Similaire aux lymphocytes T, l'activation du récepteur A2A inhibe l'activation des lymphocytes B dépendant de NF- $\kappa$ B (297). De plus, une étude a révélé une augmentation des gènes du système adénoinergique des lymphocytes B mémoires comparativement aux lymphocytes B naïf (298). Par ce fait, le système adénoinergique joue un rôle primordial dans la commutation isotypique essentiel pour la promotion de lymphocytes B mémoires (157).

### **1.5.1.3 Cellules dendritiques**

Il a été démontré que l'adénosine via le récepteur A2B diminue l'immunogénéité des cellules dendritiques impactant la régulation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (299-301). Spécifiquement sur ces cellules, l'activation du récepteur A2A va promouvoir une immunosuppression par l'inhibition de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-12 ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-10 (302,303).

Lors de la maturation de ces cellules, leur profil d'expression des récepteurs adenosinergiques change du récepteur A1 présent sur les DC plasmacytoïdes (PDC) avec un rôle de chimiotaxis vers une expression du récepteur A2A par les DC matures avec un rôle de downrégulation de la production de cytokines pro-inflammatoire (304).

### **1.5.1.4 Macrophages et neutrophiles**

L'adénosine diminue drastiquement la différenciation des monocytes en macrophages ainsi que leur capacité pour la phagocytose, alors que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques a démontré que cet effet est médié via les récepteurs A2 (305). Il a également été démontré que l'adénosine est une molécule importante dans l'activation alternative des macrophages via les récepteurs A2A et A2B (306).

Alors que pour les neutrophiles, l'activation des récepteurs A2 diminue la production de superoxydes ainsi que la dégranulation et l'adhésion cellulaire (307-309). De manière intéressante, l'activation du récepteur A1 sur ces mêmes cellules a démontré une augmentation de la chimiotaxie et l'activation du récepteur A3 une diminution de la dégranulation (307,308,310).

### **1.5.1.5 Cellules NK et NKT**

L'activation du récepteur A2A par l'adénosine a démontré une inhibition de la production d'IFN- $\gamma$  des cellules NK (311). Cependant, une étude ont a rapporté que l'activation du récepteur A3 augmente les fonctions de ces cellules (312).

La cascade signalétique suivant l'activation du récepteur A2A par un agoniste a été démontrée suffisante pour abolir l'activation des NKT et diminuer leur réponse anti-inflammatoire dans un modèle murin d'hépatite (313). En ce qui concerne les NKT invariants,

la signalisation via le récepteur A2A semble être requise pour permettre la sécrétion d'IL-4, d'IL-10 ainsi que du TGF- $\beta$  (314).

#### **1.5.1.6 MDSC**

Les MDSC (CD11b<sup>+</sup> GR1<sup>+</sup>) sont des cellules immunosuppressives où le système adénosinergique est fortement impliqué. En effet, dans un modèle de cancer de poumon de souris, le récepteur A2B est fortement exprimé sur les MDSC et corrèle avec une prolifération de la fraction granulocytaire ainsi qu'une croissance tumorale (232,315). Ces observations ont également été confirmées dans un modèle de mélanome (222).

### **1.5.2 Rôle dans l'auto-immunité**

Étant donné le rôle d'immunosuppression du système adénosinergique, les fonctions de l'adénosine sur les divers récepteurs adénosinergiques sont très étudiées dans les maladies auto-immunes (Tableau 1.3) (316).

AID type	Conclusion
Rheumatoid arthritis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Methotrexate unresponsiveness in RA is associated with low expression of CD39 on Treg cells</li> <li>- CD73-deficient mice are significantly more susceptible to collagen-induced arthritis, while this increased susceptibility of CD73-deficient mice to CIA is reversed by A2AR activation</li> <li>- Serum ADA activity of RA patients is higher compared to that of healthy controls</li> </ul>
System lupus erythematosus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CD39 and CD73 expression levels in Treg cells were decreased in active SLE patients as compared to healthy controls and inactive SLE patients</li> <li>- ADA2 activity and total ADA activity are significantly elevated in serum of SLE patients compared to healthy control</li> </ul>
Type I diabetes mellitus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Diminished A1R expression in pancreatic alpha-cells contributes to the pathology of type 1 diabetes</li> <li>- A3R activation markedly reduced Beta-TC6 cells proliferation, while this effect was partially blocked by the A3 antagonist</li> <li>- TLR9 deficiency promotes CD73 expression in T cells and reduces incidence of T1DM in nonobese diabetic mice</li> </ul>
Multiple sclerosis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CD73-deficient mice are more resistant to experiment autoimmune encephalomyelitis. A2AR antagonist protected WT mice from EAE induction through blockage of A2AR signaling</li> </ul>
Myasthenia gravis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Serum ADA activity of MG patients is significantly higher as compared to normal control</li> <li>- Activation of the A2AR attenuates experimental autoimmune myasthenia gravis severity</li> </ul>
Autoimmune hepatitis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In AIH, CD39-positive Tregs are decreased in number and fail to adequately hydrolyze proinflammatory nucleotides and do not efficiently suppress IL-17 production by effector T cells</li> <li>- The expressions of CD39 and A2AR were significantly diminished in Th17 cells from autoimmune liver disease patients</li> </ul>
Juvenile idiopathic arthritis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Correlation of low CD73 expression on synovial lymphocytes with reduced adenosine generation and higher disease severity in juvenile idiopathic arthritis</li> </ul>
Autoimmune uveitis	<ul style="list-style-type: none"> <li>- A3R agonist can ameliorate the pathological manifestations of the EAU</li> <li>- A2B agonist greatly enhanced the development of EAU</li> </ul>

Tableau 1.3 – Fonctions de l’adénosine dans diverses maladies auto-immunes. © Dong et al. Immunol Res, 2016.



### 1.5.3 Autres rôles physiologiques

Via la diminution de l'AMPc intracellulaire, A1 est un récepteur prédominant dans le système cardiovasculaire où celui-ci prévient l'ischémie dans un modèle de souris knockout (317). Les autres récepteurs adénosinergiques A1 (317-321), A2A (322) et A2B (323) ont également été investigués quant à leur rôle dans la cardioprotection.

Les récepteurs adénosinergiques ont également un rôle dans l'angiogenèse où le récepteur A1 favorise le relâchement de VEGF par les monocytes (324). L'adénosine générée par CD73 a également été démontrée comme jouant un rôle primordial dans l'angiogenèse via l'engagement des récepteurs A2A et A2B (195).

Étant donné le rôle clairement identifié de l'axe adénosinergique dans la down-régulation du système immunitaire, cette voie est également étudiée dans le rejet de greffe et la transplantation (325). Avec la souris CD73 knock-out et une inhibition pharmacologique, la pathologie de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) a été augmenté par l'expansion des lymphocytes T ainsi qu'une augmentation de la production d'IFN $\gamma$  et d'IL-6 (326-328). Plus spécifiquement, un groupe de recherche a étudié le rejet d'allogreffe de la trachée entre des souris sauvage et knock-out pour CD73 et ont déterminé que les récepteurs A2A est un modulateur négatif du recrutement des lymphocytes dans l'allogreffe (329). Suivant la même logique, l'adénosine générée par CD73 et agissant sur les récepteurs A2A joue également un rôle dans l'ischémie-reperfusion du rein ainsi que du foie (330,331). Un rôle similaire de protection pour la reperfusion des poumons a également été observé par plusieurs groupes de recherche (332-336).

Cependant, le domaine où l'étude des récepteurs adénosinergiques est le plus avancé est le récepteur A2A dans la maladie de Parkinson. Une première étude a été effectuée en 2000 où une altération du niveau d'expression du récepteur A2A a été observée chez des cerveaux de patients morts de la maladie de Parkinson (337). Ensuite, plusieurs études avec des modèles précliniques de Parkinson ont démontré l'efficacité d'antagonistes du récepteur A2A sur la restauration du système dopaminergique (337-340). L'accumulation de résultats a mené la compagnie pharmaceutique japonaise Kyowa Hakko Kirin à développer l'istradefylline le premier antagoniste sélectif du récepteur A2A (341). Finalement, un antagoniste (Preladenant)

a été déterminé sécuritaire dans une étude clinique de phase II (NCT00006337) (342). Cependant deux études cliniques de phases III (NCT01155479, NCT01155466) ont déterminé que cet antagoniste n'est pas plus efficace que le placebo, et ce, peu importe le stade de la pathologie (343,344).

#### 1.5.4 Rôle de A2A dans le cancer

Chacun des 4 récepteurs adénosinergiques a été étudié quant à leur implication directe dans divers types de cancers (révisé dans (270)). Cependant, plusieurs évidences démontrent que le récepteur A2A est celui avec le plus de potentiel thérapeutique.

Avec un rôle d'immunosuppression bien défini, l'inhibition du récepteur à l'adénosine A2A est étudiée comme une cible potentielle contre le cancer (3). La souris A2A knockout a permis d'établir plusieurs observations intéressantes. En effet, cette souris a une synergie avec un traitement de lymphocytes T avec un récepteur antigène chimérique (CAR) (345) et un vaccin GM-CSF (220). De plus, Beavis et al. ont démontré une diminution de l'effet métastatique via une augmentation de l'efficacité des cellules NK spécifiquement avec la souris A2A<sup>-/-</sup> (346). Il a également été démontré que l'expression de ce récepteur sur les cellules myéloïdes a effet d'immunosuppression direct sur les lymphocytes T ainsi que les cellules NK dans le microenvironnement tumoral (231). Spécifiquement, dans le cancer des voies aérodigestives supérieures le blocage de A2A augmente la réponse anti-tumorale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et diminue le nombre de lymphocytes T régulateurs (284). Finalement, divers modèles de souris ont démontré que le blocage de ce récepteur potentialise un traitement anti-PD-1 (218,347,348). Des résultats similaires ont été observés avec un traitement anti-CTLA-4 (219).

Le récepteur A2A a également été identifié comme pouvant être un facteur angiogénique par une augmentation de la prolifération, de la migration et de l'angiogénèse par la formation de tube *in vitro* (169). De plus, l'activation par un agoniste chimique (CGS21680) permet de stimuler la prolifération des MCF-7, une lignée de cancer du sein, *in vitro* (349).

Cette accumulation d'évidences démontre que l'inhibition du récepteur A2A tout comme une inhibition de CD73 a un potentiel de synergie avec les différentes approches immunomodulatrices présentement en recherche clinique (350,351).

## Chapitre 2 - Cancer de l'ovaire

Lors du diagnostic d'un cancer de l'ovaire, environ 75% des patientes ont déjà atteint un stade avancé (stade III ou IV) donnant une survie globale de seulement 20 à 30 % après 5 ans (352). Le traitement standard d'une personne atteinte d'un cancer de l'ovaire à ce stade avancé est une réduction de la tumeur primaire par chirurgie avec une chimiothérapie à base de platine (carboplatin ou cisplatine) et de taxanes (paclitaxel ou docitaxel) (353). Malgré ces traitements, environ 70 % des patientes qui atteignent une rémission vont éventuellement faire une rechute après 2 à 5 ans (354).

### 2.1 Pathophysiologie

Environ 90 % des cancers de l'ovaire sont d'origine épithéliale et peut être séparé en 6 sous-classes : séreux, endométrial, mucineux, à cellules claires, transitionnel et non-différencié. La forme la plus commune est le type séreux représentant environ 40 % des cas (355). La majorité de ces cas sont diagnostiqués au stade III et IV et sont catégorisé comme séreux de haut grade. Cette catégorie est la plus commune des cancers de l'ovaire, mais également la plus mortelle.

Environ 90 % des cas de cancer de l'ovaire séreux sont sporadique alors que 10 % est associé à une mutation dans les gènes BRCA1 et BRCA2 (356). Néanmoins la plupart des cas sporadiques vont exhiber une altération acquise de ces gènes démontrant ainsi leur rôle central dans la pathogenèse de ce type de cancer (357).

Le cancer de l'ovaire est caractérisé par une croissance rapide et une dissémination tumorale dans la cavité péritonéale menant à une accumulation d'ascites (358). Les métastases se disséminent aux sites proximaux de la tumeur primaire par une série complexe de phénomènes cellulaires qui inclut une augmentation de la prolifération cellulaire, une transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) menant à la migration cellulaire, puis une transition mésenchymateuse-épithéliale (MET) permettant la colonisation des organes (359). Le VEGF

semble être une molécule importante dans ce mécanisme de dissémination des cellules tumorales (Figure 2.1) (360).

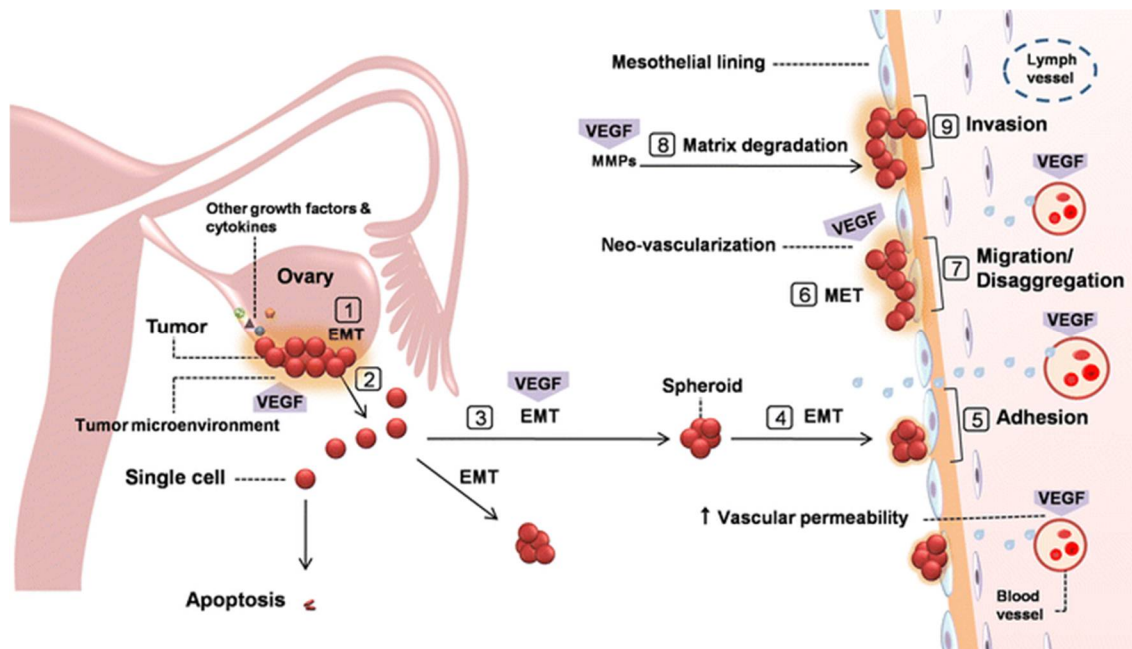


Figure 2.1 – Modèle proposé pour la dissémination intrapéritonéale du cancer de l’ovaire.  
© Masoumi et al. Cancer Metastasis Rev, 2012.

Le rôle pro-métastatique d’un stroma inflammatoire a déjà été décrit dans la littérature spécifiquement pour le cancer de l’ovaire (361). Cependant, un nombre significativement plus important de fibroblastes associés au cancer (CAF) a été associé aux cancers séreux de haut grade de l’ovaire en favorisant la croissance tumorale, l’adhésion et l’invasion des cellules tumorales (362). Cette augmentation du phénomène métastatique semble être causée par la voie de signalisation TGF- $\beta$ 1 (363).

### 2.1.1 Ascites

Étant donné la localisation physiologique du cancer de l’ovaire, les cellules tumorales se disséminent au niveau de la cavité péritonéale et s’implantent sur divers organes abdominaux

lors du phénomène métastatique. Cette dissémination est également accompagnée par la production d'ascites chez le tiers des patientes atteintes du cancer de l'ovaire et dans la majorité des cas lors d'une récurrence (364). La production accrue de fluide intra-abdominal est causée par la combinaison des fuites de la microvasculature tumorale, d'une sécrétion des cellules tumorales et d'une obstruction des vaisseaux lymphatiques tout en étant associé avec une infiltration de cellules stromales et immunitaires (365).

La progression d'ascites est associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à une détérioration de la qualité de vie par des douleurs abdominales et une diminution de l'efficacité des systèmes respiratoires, gastro-intestinale et urinaire (366). De plus, les ascites créent un microenvironnement propice aux cellules tumorales favorisant la croissance tumorale, la motilité et une inhibition de la chimiothérapie (367,368).

#### **2.1.1.1 Composantes solubles**

Les ascites contiennent un réservoir dynamique de cytokines, chimiokines et facteurs de croissance. Un profilage de 10 échantillons d'ascites provenant de cancers épithéliaux de l'ovaire a démontré une augmentation de plusieurs facteurs incluant angiogénine, angiopoietine, CXCL1, ICAM-1, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-10, leptin, CCL2, MIF, CXCL-7, OPG, CCL5, TIMP-2, uPAR (369).

Un autre facteur de croissance retrouvé en abondance dans les ascites est le VEGF où celui-ci corrèle avec un mauvais pronostic et une augmentation des métastases (370,371). Dans un même ordre d'idée, l'inhibition du VEGF dans des modèles de souris de cancer de l'ovaire prévient l'accumulation d'ascites et diminue la dissémination des métastases (372). Finalement, deux études de phase III ont déterminé que le bevacizumab, un anticorps monoclonal inhibiteur du VEGF, améliore significativement la survie sans progression (373,374).

#### **2.1.1.2 Composantes cellulaires**

Le terme "ascite maligne" est utilisé lorsque le fluide tumoral contient des cellules tumorales isolées ou sous forme de spéroïdes avec un taux élevé de lactate déshydrogénase indiquant une prolifération cellulaire rapide (375). En général, les cellules tumorales en

provenance d'ascites ont une expression élevée d'E-cadherin indicatif d'un type épithélial (376). De plus, ces cellules ont une prolifération plutôt lente avec une faible pénétrance aux drogues résultant en une résistance aux chimiothérapies (377).

Les ascites malignes sont composées d'une fraction cellulaire résidente et d'une fraction cellulaire non-résidente. Une centaine de sphéroïdes tumoraux peuvent s'agréger ensemble et flotter ou s'ancrer dans la cavité péritonéale puis développer leur propre système vasculaire (378). Les ascites sont également composées de CAF et peuvent inclure des cellules tumorales souches (CSC). Ces trois composantes cellulaires définissent la population de cellules résidentes (377). Aux cellules résidentes s'ajoute les cellules non-résidentes, qui sont recrutées à l'extérieur de la tumeur, telles les infiltrations de macrophages, MSCS et lymphocytes. En conclusion, les fractions résidente et non-résidente forment un microenvironnement tumoral unique.

## **2.2 Classification moléculaire**

Le profilage génique a permis d'identifier des sous-types moléculaires pertinents cliniquement dans le cancer du sein ainsi que dans le cancer du poumon (379,380). Récemment, un groupe de chercheurs australiens a mis au point une classification moléculaire en corrélation avec la survie globale spécifique pour le cancer de l'ovaire séreux (381). Leur cohorte de 285 patientes a permis d'effectuer une séparation optimale en 6 sous-groupes. L'histotype séreux de haut grade est principalement représenté dans les sous-groupes C1, C2, C4 et C5 (Tableau 2.1). Les sous-groupes C3 et C6 sont composés de tumeurs de faible grade caractérisés par une faible expression des marqueurs de prolifération KI67, TOP2A, CCNB1, CDC2 et KIF11. Le sous-groupe C3 a une surexpression de la voie MAPK, alors que le sous-groupe C6 est caractérisé par une surexpression des cibles du complexe transcriptionnel  $\beta$ -catenin/LEF/TEF.

Sous-types moléculaire	<b>C1 (Stromal)</b>	<b>C2 (Immunoactif)</b>	<b>C4 (Différencié)</b>	<b>C5 (Mésenchymateux)</b>
Caractéristiques	Surexpression des gènes du stroma Enrichissement de la voie de signalisation pour la production de la matrice extracellulaire Desmoplasie	Surexpression des gènes de l'immunité adaptative	Inverse du type C1	Surexpression des facteurs de transcription développementale Enrichissement de la voie de signalisation WNT/ $\beta$ – catenin et cadherin Surexpression des gènes de prolifération et de matrice extracellulaire
Signature immunitaire	Élevé (stromale)	Très élevé (tumorale et stromale)	Élevé (tumorale et stromale)	Faible
E-cadherin	Faible	Élevé	Élevé	Faible
Niveau CA125	Élevé	Élevé	Élevé	Faible

Tableau 2.1 – Caractéristiques des sous-types moléculaires agressifs du cancer de l’ovaire séreux de haut grade.

Le groupe C1 est défini par un stroma activé mesuré via l’intensité des gènes associé au stroma, et non la proportion cellules épithéliales / cellules stromales. Le groupe C2 est caractérisé par une importante infiltration immunitaire dans le microenvironnement tumoral. Le groupe C4 est défini par des cellules différenciées alors que le sous-groupe C5 se caractérise par les gènes exprimés lors du développement mésenchymateux et peut être défini comme “prolifératif”. Chacun de ces groupes affiche une survie différente où le groupe C1 est le plus agressif (Figure 2.2) (381).



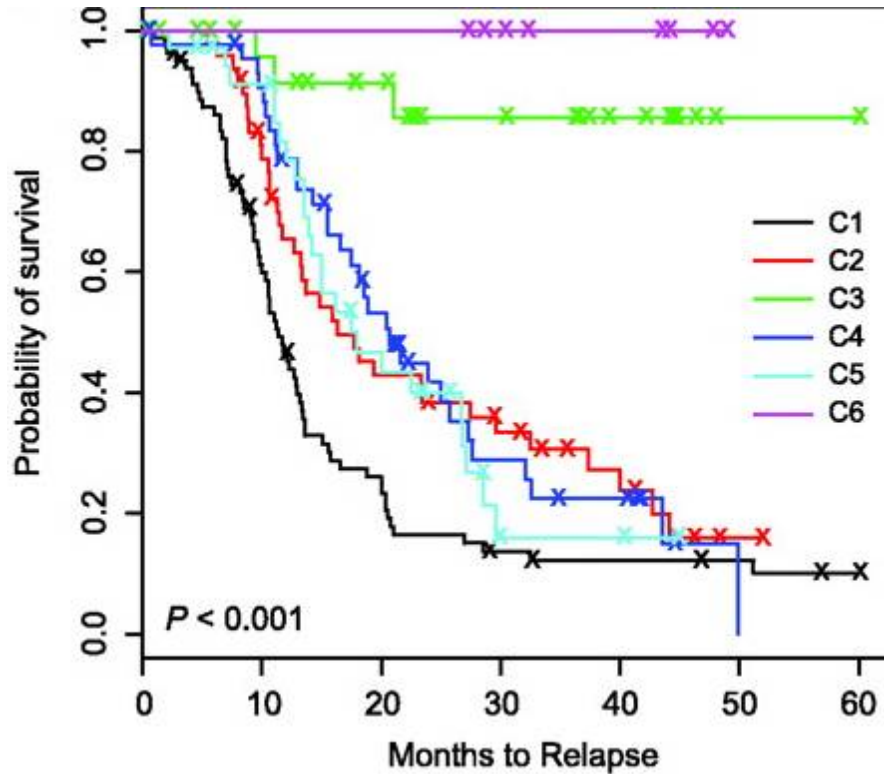


Figure 2.2 – Survie des sous-groupes moléculaire du cancer de l’ovaire. © Tothill et al. Clin Cancer Res, 2008. With permission from AACR.

Cette classification moléculaire a par la suite été confirmée dans une cohorte incluant 879 cas de cancer de l’ovaire séreux de haut grade (382). Cette classification moléculaire est maintenant appliquée au cancer du péritoine où le sous-type C1 est le plus fréquent (383).

## 2.3 Immunologie

Beaucoup d’études démontrent une corrélation entre le système immunitaire et les résultats cliniques des patientes atteints du cancer de l’ovaire séreux de haut grade (384,385). Plusieurs types cellulaires du système immunitaire participent positivement ou négativement à l’immunité anti-tumorale (Figure 2.3) (386).

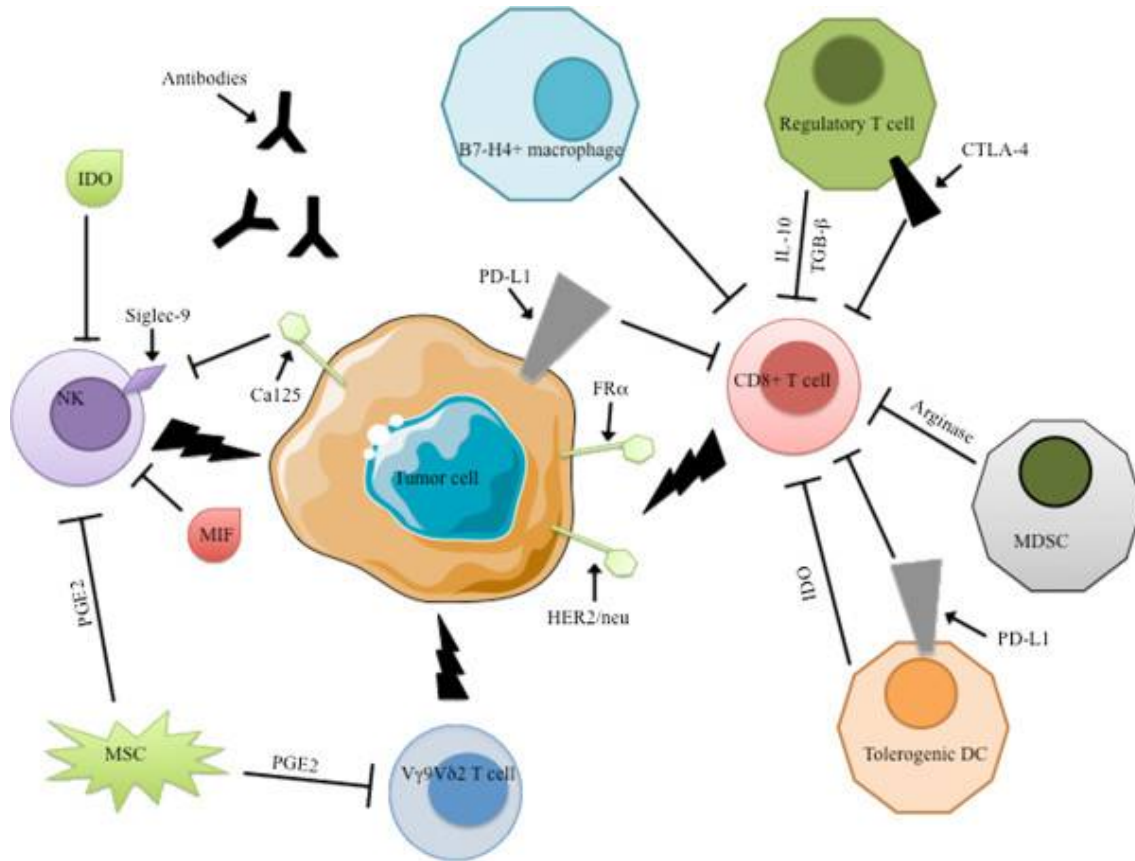


Figure 2.3 – Modèle d’immunité anti-tumorale dans le cancer de l’ovaire. © Lavoué et al. J Transl Med, 2013. With permission from BioMed Central Ltd.

### 2.3.1 Infiltration immunitaire tumorale

Dans le cancer de l’ovaire, environ une dizaine de groupes ont rapporté que les infiltrations immunitaires  $CD3^+$  et  $CD8^+$  sont fortement associées avec la survie globale (Figure 2.4) (387). Dans un même ordre d’idée, certains marqueurs de l’activité cytolytique tel  $IFN-\gamma$ , TIA-1 et le complexe majeur d’histocompatibilité (CMH) de classe I et II corrélaient également avec une meilleure survie (388,389). Cette infiltration est maintenant à l’étude en tant que biomarqueur pronostique et prédictif dans plusieurs types de cancer solide incluant le cancer de l’ovaire (390). Fait intéressant, le gène BRCA1 est souvent muté dans le cancer de l’ovaire sévère de haut grade et la perte de fonction de ce gène corréla avec une augmentation de l’infiltration tumorale  $CD8^+$  (391). L’ensemble de ces données suggère que le cancer de l’ovaire est un type tumoral propice aux traitements d’immunothérapies.

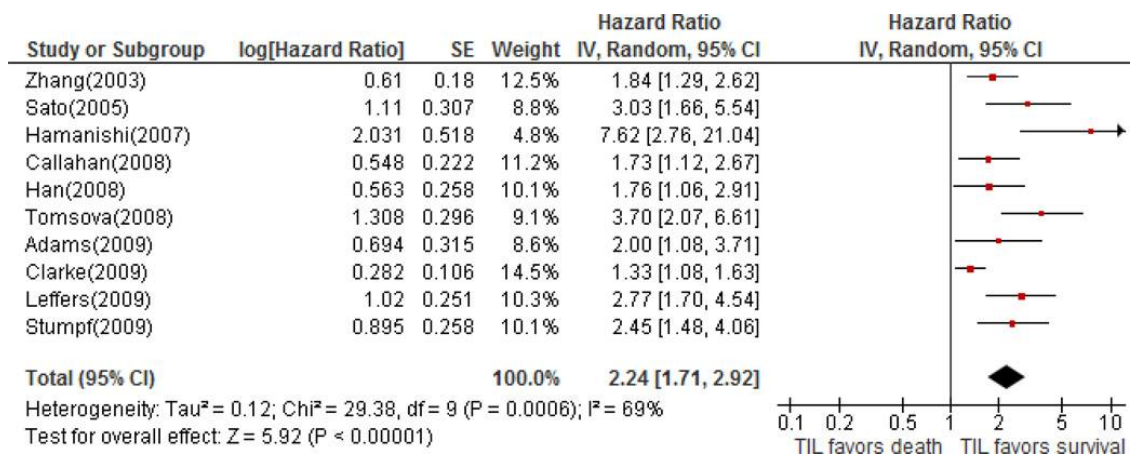


Figure 2.4 – Associations des infiltrations lymphocytaires T intra-tumoral avec la survie globale dans le cancer de l’ovaire. © Hwang et al. Gynecol Oncol, 2012. With permission from Elsevier.

Outre les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, d’autres types cellulaires du système immunitaire semblent jouer un rôle important dans la réponse anti-tumorale. Les lymphocytes T régulateurs ont été identifiés comme un marqueur de mauvais pronostic indépendant en surexprimant les marqueurs GITR, CTLA-4 et FoxP3 en plus de diminuer la synthèse *in vitro* d’IFN- $\gamma$  et d’IL-2 menant à une diminution de la cytotoxicité (392,393). Une étude a également rapporté une possible corrélation avec la présence des lymphocytes régulateurs dans le sang périphérique, mais avec des résultats non-concluants (394). Finalement, Sato et al. ont déterminé qu’un ratio élevé entre les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sur les lymphocytes T régulateurs était le paramètre clé corrélant avec le pronostic (395). Cependant, cette corrélation a été observée avec les infiltrations lymphocytaires intraépithéliales, mais non avec les infiltrations stromales démontrant ainsi l’importance de la localisation anatomique (395,396). L’ensemble des résultats de ces études démontre l’importance du concept de la localisation de l’infiltration immunitaire dans le cancer de l’ovaire.

En ce qui concerne les autres types cellulaires du système immunitaire, l’effet pronostic des infiltrations lymphocytaires CD8<sup>+</sup> a une synergie avec les lymphocytes B mémoires (CD20<sup>+</sup>) (397). La présence d’infiltration tumorale de cellules dendritiques a

également été associé à un pronostic favorable (398,399). D'un autre point de vue, l'infiltration de macrophages exprimant B7-H4 est associée à un mauvais pronostic (400,401).

### 2.3.2 Ascites

Il a été décrit précédemment que les ascites contiennent des taux élevés de cytokines/chimiokines. En outre, IL-10 a été associée à une diminution de la survie sans progression par l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T *helper*, de la maturation des cellules dendritiques et des molécules de costimulations des lymphocytes T (369,402). Suggérant ainsi un rôle dans l'échappement au système immunitaire. Consistant avec IL-10, les cellules tumorales dérivées des ascites ont également démontré une sécrétion du ligand Fas qui induit l'apoptose des cellules immunitaires exprimant le récepteur CD95 (403). Une accumulation des cytokines inflammatoires IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 et IL-10 a également été corrélée avec un mauvais pronostic et une mauvaise réponse thérapeutique (404).

D'un point de vue cellulaire, comme pour l'infiltration tumorale, un ratio lymphocytes T / Treg élevé dans les ascites corrèle avec une meilleure survie des patients (405). Cependant, la polyfonctionnalité de ces lymphocytes peut être perturbée au niveau des ascites (406). Les ascites contenant une forte concentration d'IL-17 produite par les lymphocytes Th17 ont également été corrélées avec une augmentation de la survie globale (407). Quant à eux, les cellules NK et les lymphocytes B semblent être associés à un mauvais pronostic, mais des analyses multivariées se sont révélées non-significatives (408). Les niveaux élevés d'IL-6 et d'IL-10 sont causés en partie par l'infiltration des macrophages de type M2 et corrélerent inversement avec la survie sans rechutes (409). Étrangement, l'angiogenèse au niveau des ascites semble être contrôlée par le ratio entre les pDC, qui sécrète du TNF- $\alpha$  et de l'IL-8 favorisant l'angiogenèse, et les mDC, qui répriment l'angiogenèse via la production d'IL-12 et sont généralement absents des ascites malignes (410).

### **2.3.3 Points de contrôle immunitaire**

De manière intéressante, l'expression PD-1 et PD-L1 corrèle avec une meilleure infiltration lymphocytaire cytolytique et régulateur ainsi qu'un pronostic favorable dans le cancer de l'ovaire (411,412). Ceci semble contradictoire étant donné que ces marqueurs sont des indicateurs de l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale. Cependant, dans le cas du cancer de l'ovaire cela peut indiquer une impasse immunologique qui peut être propice à des traitements d'immunothérapies.

## **2.4 Immunothérapies**

Durant les derniers 50 ans, les chimiothérapies à base de paclitaxel et de platine ont apporté que de faibles incréments aux réponses thérapeutiques. L'immunothérapie est une science émergente avec beaucoup de potentiels pour le cancer de l'ovaire par la promotion d'une immunité anti-tumorale durable. Plusieurs stratégies immunothérapeutiques sont maintenant à l'étude dans le cancer de l'ovaire tel les bloqueurs de points de contrôle, les vaccins ou le transfert adoptif de cellules T. Cependant, des résultats cliniques ont été observés chez seulement un faible pourcentage de patientes, mais produisent des données intéressantes et nécessaires pour la progression de la recherche.

### **2.4.1 Bloqueurs de points de contrôles**

Suite à l'activation des lymphocytes T, des mécanismes de régulation négatifs sont mis en place dans le microenvironnement tumoral. Deux de ces mécanismes sont la surexpression des récepteurs CTLA-4 et PD-1 (413). Une fois surexprimés, CTLA-4 va bloquer la liaison avec les molécules CD80/CD86 bloquant ainsi un signal de co-stimulation (414) et PD-1 va se lier aux récepteurs PD-L1/L2 pouvant être exprimé sur les cellules tumorales ce qui va promouvoir l'apoptose des lymphocytes T (415).

Durant les deux dernières années, plus d'une trentaine d'études cliniques évaluant ces bloqueurs de points de contrôles immunologiques en combinaison avec diverses chimiothérapies ou radiothérapies ont été initiées dans le cancer de l'ovaire (Tableau 2.2). Quelques études cliniques évaluent également des combinaisons possibles entre diverses stratégies d'immunothérapies (Tableau 2.3).

Agents thérapeutiques	Phase clinique	NCT ID	Agents thérapeutiques	Phase clinique	NCT ID
<b>Anti-CTLA-4</b>			<b>Anti-PD-L1</b>		
Ipilimumab	I-II	NCT01611558	Durvalumab	I	NCT03283943
Tremelimumab	I	NCT01975831	Atezolizumab	I - II	NCT02734004, NCT02484404, NCT02726997
<b>Anti-PD-1</b>				I	NCT02914470, NCT03101280, NCT03292172
Nivolumab	I	NCT03245892			
	I - II	NCT03100006			
Pembrolizumab	I – II	NCT03029598,	Avelumab	I – II	NCT03206047
		NCT02657889,		II	NCT03073525
		NCT03126812		III	NCT03038100, NCT02891824
	II	NCT03029403, NCT02901899, NCT02865811, NCT02834975, NCT02900560, NCT02674061, NCT02440425, NCT02520154, NCT02608684		I	NCT02943317
I – II				NCT02915523	
II				NCT03312114	
		III	NCT02718417, NCT02580058		

Tableau 2.2 – Études cliniques actives testant des bloqueurs de points de contrôles immunologique dans le cancer de l’ovaire.

Agents thérapeutiques	Phase clinique	NCT ID	Agents thérapeutiques	Phase clinique	NCT ID
<b>Combinaisons</b>			<b>Combinaisons</b>		
Ipilimumab + Nivolumab	II	NCT03342417, NCT02498600	Durvalumab + TPIV200	II	NCT02764333
Nivolumab + Bevacizumab	II	NCT02873962	Tr emelimumab + Durvalumab	I	NCT01975831, NCT03277482
Nivolumab + WT1 vaccine	I	NCT02737787		I – II	NCT03249142
Pembolizumab + Bevacizumab	II	NCT02853318		II	NCT03026062
Pembolizumab + Bevacizumab	I	NCT02606305	Atezolizumab + Bevacizumab	II	NCT02659384
Pembrolizumab + p53MVA	II	NCT03113487		II - III	NCT02839707
Durvalumab + VTX-2337	I – II	NCT02431559		III	NCT03353831

Tableau 2.3 – Études cliniques actives testant des combinaisons d’immunothérapies dans le cancer de l’ovaire.

#### **2.4.1.1 Anti-CTLA-4**

Avec un modèle murin de transplantation de cellules OV-HM, Yang YF et al. ont démontré pour la première fois une activité anti-tumorale possible d'un anticorps inhibiteur de CTLA-4 par une diminution de la progression tumorale ainsi qu'une augmentation de la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$  par les cellules de la rate (416). Une première étude chez 9 patientes atteintes de cancer de l'ovaire a déterminé une certaine efficacité dans la génération d'une nécrose tumorale avec une augmentation des infiltrations lymphocytaires et granulocytaires ainsi qu'une baisse des niveaux de CA-125 suite à l'injection d'un anticorps monoclonal bloquant CTLA-4 (417). Puis, une autre étude clinique a rapporté l'augmentation de l'immunité anti-tumorale lorsqu'un anti-CTLA-4 est administré après une vaccination de cellules tumorales autologues sécrétant le GM-CSF (GVAX) (418).

#### **2.4.1.2 Anti-PD-1**

PD-1 a été identifié comme étant exprimé au niveau du milieu tumoral dans le modèle de souris de cancer de l'ovaire ID8 (419). Suivant cette observation, plusieurs études *in vivo* utilisant le modèle de souris ID8 ont étudié plusieurs combinaisons possibles entre PD-1 et d'autres cibles d'immunothérapies. Premièrement, une synergie entre le cisplatine, un anticorps bloquant PD-1 et une activation de CD137 a démontré une survie des souris à long terme (420,421). Puis, une autre combinaison qui a démontré une immunité anti-tumorale est l'ajout d'un anticorps bloquant GITR et PD-1 (422). Finalement, un agoniste de OX40 a permis de réduire la mortalité des souris, lorsque combiné avec anti-PD-1 (423).

Une étude clinique de phase II en cancer de l'ovaire avec résistance aux platines et aux taxanes a démontré des résultats très encourageants avec le nivolumab, un anticorps anti-PD1 IgG4 monoclonal humanisé (424). Cette étude clinique a séparé leur cohorte de 20 patientes en deux groupes thérapeutiques soit 1 mg/kg ou 3 mg/kg de nivolumab toutes les 2 semaines jusqu'à la progression ou pour un total de 48 semaines. 4 patientes (2 dans chaque groupe) ont démontré une pathologie stable prolongée et 2 patientes (dans le groupe 3 mg/kg) ont expérimenté une réponse complète. Les réponses durables sont atypiques dans cette population déjà très fortement traitée et sont une cause d'enthousiasme pour la planification d'une étude clinique de phase III (425).

Pembrolizumab est un autre anticorps IgG4 monoclonal humanisé contre PD-1. Une étude clinique multicohorte de phase Ib (KEYNOTE-028, NCT02054806) incluant un groupe de 36 patientes atteintes de cancer de l’ovaire a investigué cet anticorps en monothérapie à une dose de 10 mg/kg toutes les 2 semaines. 1 réponse complète, 2 réponses partielles et 8 pathologies stables ont été enregistrées (425).

#### **2.4.1.3 Anti-PD-L1**

Utilisant des lignées cellulaires de cancer de l’ovaire murin surexprimant PD-L1, un groupe de recherche a déterminé son rôle essentiel dans la dissémination péritonéale via la diminution de l’activité cytolytique des lymphocytes (426). Sur des échantillons humains intégrés dans la paraffine, l’expression de PD-L1 au niveau des cellules tumorales a été déterminée comme étant un mauvais facteur pronostique tout en corrélant inversement avec l’infiltration intratumorale lymphocytaire CD8<sup>+</sup> (427). Finalement, une étude multicentrique de phase I étudiant avelumab, un anticorps anti-PD-L1 IgG1 monoclonal humanisé, chez des patients avec des cancers avancés a démontré une régression ou une stabilisation tumorale dans certains types de cancer, mais pas dans le cancer de l’ovaire (428).

#### **2.4.2 Vaccins**

Plusieurs antigènes tumoraux ont été identifiés avec les trois caractéristiques suivantes : une expression dans le cancer de l’ovaire comparativement aux tissus normaux, une immunogénéicité importante et un rôle pilote dans le phénotype malin (Tableau 2.4) (429). Permettant ainsi l’exploitation de la vaccination pour ce type de cancer en utilisant une stratégie de multi-antigènes avec un lysat de cellules tumorales permettant une réponse immunitaire diversifiée. Plusieurs stratégies de vaccination que se soit peptidique, virale ou à base de cellules dendritiques ont été essayé avec des résultats en général mitigés (429).



Antigènes	Expression IHC		Références
	Tumeur primaire	Tumeur récurrente	
NY-ESO-1	19 %	N/A	(430,431)
MAGE-A4	57 %	N/A	(431)
Mesothelin	82 % *		(432,433)
HER2	29 – 52 %		(434,435)
Folate receptor alpha	72 %	82 %	(436,437)
MUC-1	92 %	90 %	(438)
CA-125	88 % *		(439)
P53	45 – 50 %		(434,440)
	* type séreux de haut grade		

Tableau 2.4 – Antigènes associés aux tumeurs ovariennes.

Un des vaccins avec le plus de succès dans le cancer de l’ovaire est le vaccin FANG qui consiste en des cellules tumorales autologues génétiquement modifiées par un vecteur plasmidique encodant pour le GM-CSF permettant de recruter les cellules dendritiques et un shRNAi contre la convertase furine permettant d’inhiber TGF- $\beta$  (441). Ce vaccin a démontré des résultats cliniques préliminaires très encourageants. En effet, une étude clinique de phase II, incluant 42 patientes, a démontré une survie sans récurrence moyenne de 826 jours comparativement à 481 jours pour le groupe contrôle (442). Toutes les patientes traitées avec le vaccin ont développé une immunité détectée par ELISPOT. Une étude clinique de phase III est présentement en cours (NTC02346747).

### 2.4.3 Transfer de cellules T

Le transfert de lymphocytes T adoptif est une stratégie qui inclue l’administration passive de cellules dérivées des lymphocytes T infiltrant les tumeurs ou des lymphocytes T génétiquement modifiés pour exprimer un TCR spécifique ou chimérique (CAR). Cette stratégie d’immunologie anti-tumorale a déjà fait ses preuves dans divers cancers (443). En ce qui concerne le cancer de l’ovaire, une réinjection de cellules T génétiquement modifié n’a pas encore été testée. Alors que pour les cellules T CAR, une étude clinique de phase I n’a démontré aucun bénéfice clinique, mais une bonne tolérance avec une faible persistance des lymphocytes T après 1 mois de traitements a été noté (444). Deux études cliniques de phase I/II sont présentement en cours (NTC02159716 et NTC01583686).

## **Chapitre 3 – Cancer du sein**

Malgré le fait que le cancer du sein est le plus mortel des cancers chez la femme, la mortalité associée à cette pathologie est en diminution. Cela est en grande partie attribué aux outils diagnostiques permettant une détection plus rapide ainsi qu'à l'amélioration des options thérapeutiques (445,446).

### **3.1 Classification moléculaire**

Le cancer du sein est un groupe hétérogène de pathologies. En clinique, l'immunohistochimie d'une biopsie permet de déterminer l'expression des récepteurs hormonaux (récepteur à l'oestrogène, récepteur à la progestérone et récepteur ErbB2/HER2) ainsi que le marqueur de prolifération cellulaire Ki67. Puis, le profilage génomique peut déterminer 4 catégories principales pouvant être caractérisé selon leur profil moléculaire : luminal A, luminal B, triple négatif et HER2<sup>+</sup> (447). Le type luminal A est caractérisé par l'expression des récepteurs à l'oestrogène et progestérone avec une expression Ki67 faible, alors que le type luminal B varie du luminal A par une expression du ErbB2/HER2 ou un Ki67 élevé. Le sous-type triple négatif est caractérisé par une absence de tous les récepteurs hormonaux. Finalement, le sous-type HER2<sup>+</sup> consiste en une tumeur surexprimant le récepteur ErbB2/HER2 et, habituellement, une absence du récepteur à l'oestrogène et du récepteur à la progestérone (448). Chacun de ces sous-types a une progression biologique ainsi que des pronostiques et des approches thérapeutiques différentes (448).

### **3.2 Sous-type HER2<sup>+</sup>**

#### **3.2.1 Récepteur ErbB2/HER2**

Le récepteur ErbB2/HER2 est un récepteur de 185 kDa décrit pour une première fois chez l'homme dans les années 1980 (449). Celui-ci fait partie de la famille des ErbB/HER qui inclue 4 récepteurs tyrosine kinases (EGFR/ErbB1/HER1, ErbB2/Neu/HER2, ErbB3/HER3 et

ErbB4/HER4) avec une homologie partielle (450). En conditions physiologiques, ces récepteurs jouent un rôle crucial dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, la motilité ainsi que l'apoptose (451). La liaison avec leur ligand provoque l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation avec une préférence pour le ErbB2/HER2, alors que l'homodimérisation de ErbB2/HER2 n'a aucun ligand identifié (Figure 3.1) (452). La dimérisation avec le ErbB2/HER2 forme un récepteur dans une conformation fixe constitutivement active ce qui explique pourquoi une amplification génique mène à une suractivation des voies de signalisation intracellulaires et ultimement vers un oncogène (453). Cela a été démontré avec les cellules NIH/3T3 surexprimant ErbB2/HER2 par un facteur de 100 ce qui a mené vers une dimérisation ligand-indépendant spontanée et constitutive (454).

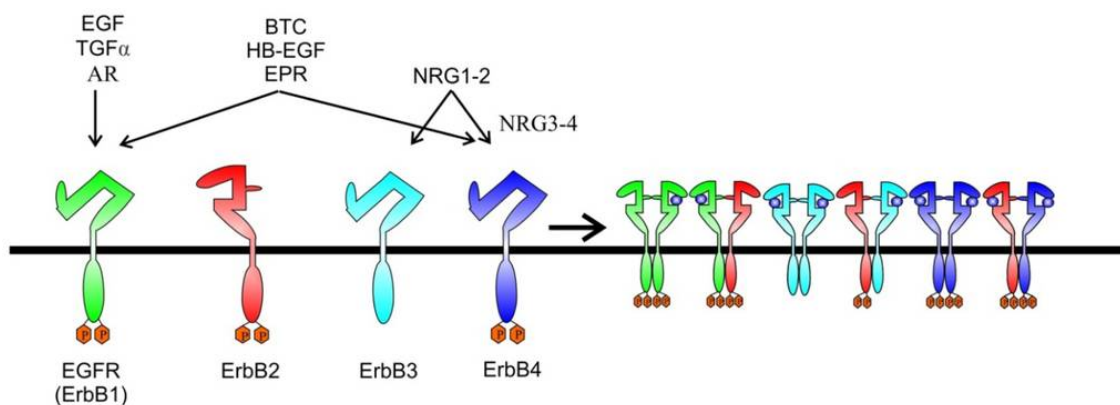


Figure 3.1 – Homo- et hétéro-dimérisation des récepteurs ErbB avec leurs ligands. Tous les membres de la famille des récepteurs ErbB partagent une homologie dans le domaine extracellulaire et le domaine kinase. Cependant, ErbB3 n'a pas d'activité tyrosine kinase. Aucun ligand pour ErbB2 n'a été identifié qui est le partenaire de dimérisation de préférence des autres récepteurs. EGFR (ErbB1), ErbB2, ErbB3 et ErbB4 ont différents ligands et différentes signalisations intracellulaires. © Hervent and Keulenaer. Int J Mol Sci, 2012.

Le récepteur ErbB2/HER2 joue un rôle important dans la coordination des récepteurs ErbB avec leur signalisation intracellulaire (455). Ce récepteur permet l'activation de deux voies majeures de signalisation intracellulaire : la voie RAS-MAPK et la voie PI3K-AKT (Figure 3.2) (450). Finalement, la voie JAK-STAT semble également être impliquée dans la signalisation intracellulaire de ErbB2/HER2 (452,456). Une étude a suggéré que les homodimères

ErbB2/HER2 active sélectivement la voie RAS-MAPK, alors que les hétérodimères activent les 2 autres voies de signalisation (457).

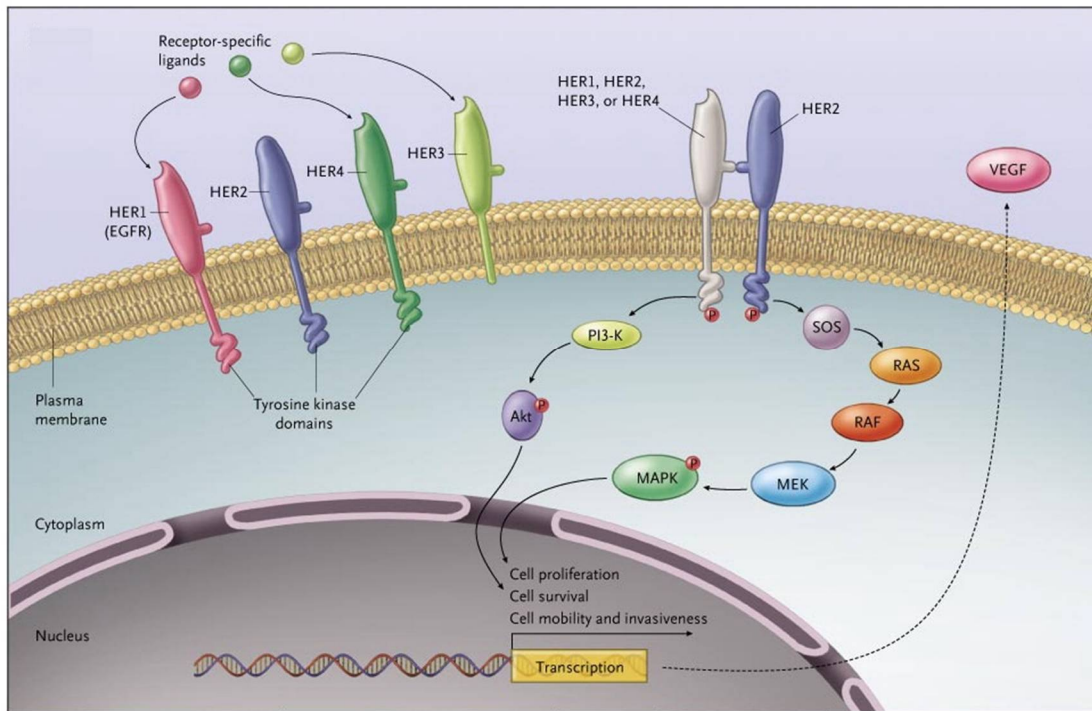


Figure 3.2 – Signalisation intracellulaire du récepteur ErbB2. © Clifford and Hudis, N Engl J Med, 2007. With permission from Massachusetts Medical Society.

Le récepteur EGFR est souvent muté dans plusieurs types de cancers incluant le cancer du sein (458). Cependant, c'est le récepteur ErbB2/HER2 qui prédomine la famille ErbB avec une amplification génique dans 30% des cancers du sein primaire par une augmentation de 2 à 20 fois du nombre de copies du gène (459). Chez l'homme, aucune mutation n'est nécessaire pour conférer un potentiel oncogénique où l'amplification génique est généralement de type sauvage (460). Outre le cancer du sein, ce récepteur peut également être surexprimé via une amplification génique ou une mutation dans le cancer de l'ovaire (461,462). Plusieurs cas ont également été rapportés dans d'autres types de cancers (463).

### 3.2.2 Traitements

Deux types d'inhibiteurs des récepteurs ErbB2/HER2 sont utilisés en clinique : les anticorps humanisés et les petites molécules inhibitrices des tyrosines kinases. Alors que les anticorps thérapeutiques sont de larges protéines (150 kDa) avec une injection intraveineuse, les petites molécules synthétisées chimiquement ont un poids de seulement 500 Da pouvant être administrées oralement (464). L'objectif final de ces thérapies étant d'inhiber la cascade de signalisation intracellulaire. Un résumé des mécanismes d'action des principaux agents thérapeutiques est présenté au tableau 3.1 (adapté de (460)).

	<b>Trastuzumab</b>	<b>Pertuzumab</b>	<b>Lapatinib</b>
<b>Effets sur l'expression de ErbB2/HER2</b>	Diminution de l'expression de HER2; blocage du clivage; suppression de la formation de p95HER2		Augmentation de l'expression total de HER2 à la surface cellulaire
<b>Effets sur la dimérisation</b>	Perturbation partielle de la dimérisation	Perturbation de la dimérisation avec les autres récepteur ErbB	
<b>Effets sur la signalisation intracellulaire</b>	Inhibition de la signalisation PI3K et MAPK	Inhibition de la signalisation PI3K et MAPK	Inhibition de la signalisation PI3K et MAPK
<b>Effets immunitaires</b>	Stimule l'ADCC	Stimule l'ADCC	
<b>Effets sur le cycle cellulaire</b>	Induction de p27 et p21; Inhibition de cdk2	Induction de p27 et p21; Inhibition de cdk2	Induction de p27; Inhibition de cdk2
<b>Effet sur l'apoptose</b>	Diminution de Bcl-2, survivin et Mcl-1	Induit l'apoptose (mécanismes inconnues)	Diminution de survivin et Mcl-1; Augmentation de BIM et Fox03a

Tableau 3.1 – Résumé des mécanismes d'action du trastuzumab, du pertuzumab et du lapatinib. © Nahta. ISRN Oncol, 2012.

#### 3.2.2.1 Trastuzumab

Le trastuzumab (Herceptin) est un anticorps monoclonal IgG1 humanisé inhibiteur du récepteur ErbB2/HER2 (465). En combinaison avec la chimiothérapie, ce traitement a

révolutionné les résultats cliniques des patientes avec une tumeur surexprimant fortement la protéine HER2. Deux études cliniques de phase II ont déterminé que le trastuzumab est sécuritaire et efficace (466,467). Finalement, une étude clinique de phase III incluant 469 patientes a démontré des résultats cliniques d'efficacité significatifs avec une augmentation du temps avant la progression de la maladie de 7,4 mois pour le groupe traité au trastuzumab comparativement à 4,6 mois pour le groupe contrôle sans trastuzumab (468). Ces résultats cliniques ont permis l'approbation de ce traitement par la *U.S Food and Drug Administration* (FDA) en 1998 contre le cancer du sein métastatique HER2<sup>+</sup> (460), et plus tard en 2006 comme adjuvant à la chimiothérapie (Figure 3.3). L'addition de cet anticorps aux anthracyclines a vu le nombre de rechutes du cancer du sein diminuer de 50 % et la mortalité de 33 % (469). Cependant, malgré des résultats cliniques incroyables, les réponses thérapeutiques sont habituellement de courtes durées suggérant le développement d'une résistance (460).

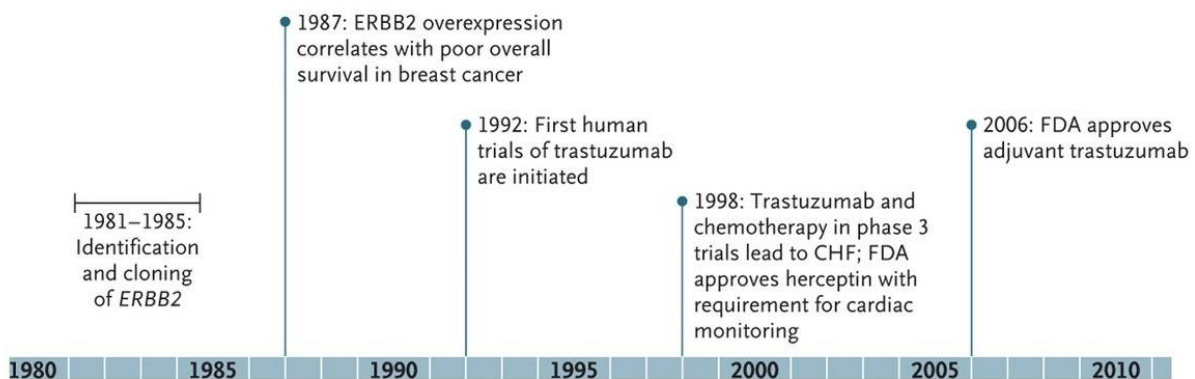


Figure 3.3 – Historique du trastuzumab. © Cote et al. N Engl J Med, 2012. With permission from Massachusetts Medical Society.

Cet anticorps se lie au domaine IV du récepteur HER2 et bloque l'homodimérisation inhibant ainsi sa signalisation intracellulaire (Figure 3.5) (452,457,470). Par la suite, plusieurs autres mécanismes d'actions complémentaires ont été découverts (Figure 3.4) (450). Cet anticorps a la propriété d'internaliser ErbB2 par sa liaison au domaine IV permettant sa dégradation (452). Il a également été démontré que cet anticorps peut bloquer l'hétérodimérisation d'une sous-unité HER2 avec la sous-unité HER3 (471). Un autre

mécanisme d'action du trastuzumab est l'inhibition du clivage du récepteur empêchant ainsi la formation de p95HER2, une forme du récepteur tronqué très active (472,473). Il y a aussi quelques évidences précliniques démontrant que le trastuzumab a des propriétés anti-angiogéniques par la normalisation et la régression de la vascularisation en diminuant la production de VEGF (474-476). Cependant, une étude clinique de phase III évaluant le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF-A, comme ajout au trastuzumab en première ligne de traitement n'a démontré aucune amélioration significative (477). De plus, le trastuzumab a la capacité d'induire la cytotoxicité cellulaire dépendant d'un anticorps (ADCC) (478). En effet, l'activation des cellules NK, monocytes et macrophages exprimant le récepteur Fc gamma (ex : CD16) reconnaissent le domaine Fc de l'anticorps lié aux cellules cancéreuses. Par la suite, ces cellules immunitaires relâchent des cytokines et des granules cytotoxiques provoquant ainsi l'apoptose et la lyse des cellules tumorales reconnue par le trastuzumab (479). Outre le système immunitaire inné, le système immunitaire adaptatif est également important dans la réponse thérapeutique du trastuzumab avec les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> clairement associés à une meilleure survie chez les patientes atteintes du cancer du sein HER2<sup>+</sup> (480).

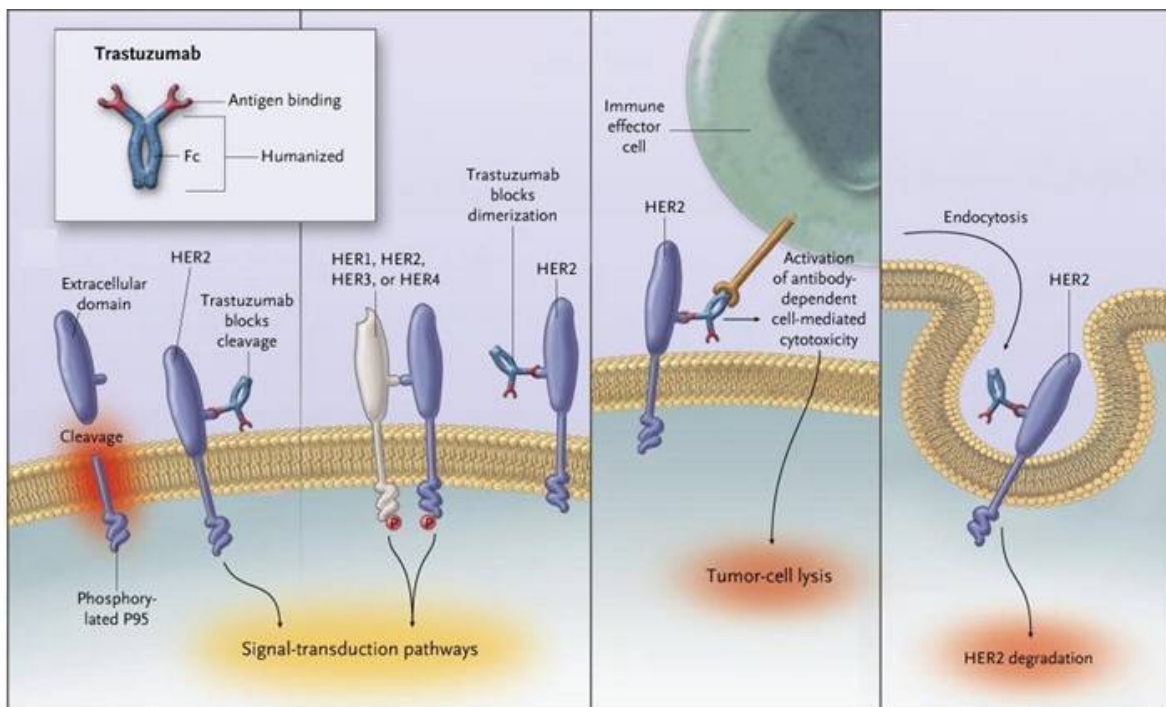


Figure 3.4 – Mécanismes d'action du trastuzumab. © Hudis. N Engl J Med, 2007. With permission from Massachusetts Medical Society.

Le trastuzumab est utilisé en clinique à une dose de départ de 8 mg/kg suivis de 2 mg/kg administré hebdomadairement ou 6 mg/kg à toutes les 3 semaines sur une durée de 1 an ou jusqu'à l'apparition de métastases (465). Cet anticorps a la propriété d'avoir une longue demi-vie dans le sérum de 18 à 27 jours avec une concentration sérique moyenne de 50 ng/ml (481,482). Une analyse rétrospective des sous-groupes des premières études cliniques utilisant le trastuzumab a démontré une plus grande activité lorsque les tumeurs ont une amplification génique de ErbB2 de plus de 2 mesurée par FISH (483). Similairement, toutes les patientes avec une réponse clinique dans l'étude clinique évaluant le trastuzumab en tant que monothérapie avaient une surexpression du récepteur ErbB2/HER2 de 3+ par immunohistochimie (IHC) (484).

### 3.2.2.2 Pertuzumab

Le pertuzumab est un anticorps monoclonal humanisé recombinant qui se lie au domaine 2 de dimérisation du ErbB2/HER2 qui est localisé sur le côté opposé au domaine 4 où se lie le trastuzumab (Figure 3.5) (452). Cette différente liaison avec le récepteur permet d'empêcher l'hétérodimérisation dépendant d'un ligand avec les autres sous-unités possibles des récepteurs ErbB (485). Cependant, le pertuzumab est incapable de prévenir la formation de la forme tronquée p95HER2 (473). Alors que le trastuzumab est actif préférentiellement contre les homodimères HER2, le pertuzumab permet d'être complémentaire en permettant un blocage plus efficace de la signalisation intracellulaire. Ce mécanisme d'action explique pourquoi le pertuzumab inhibe la croissance de tumeurs exprimant de faibles niveaux de ErbB2 où le trastuzumab n'a aucun effet (486). Finalement, une étude clinique de phase III a permis de démontrer une augmentation de la survie sans progression (PFS) de 6 mois avec une combinaison pertuzumab – trastuzumab comparativement au trastuzumab seul (487). Ce traitement est maintenant étudié pour être utilisé en première ligne contre le cancer du sein métastatique HER2<sup>+</sup> (NCT02642458).



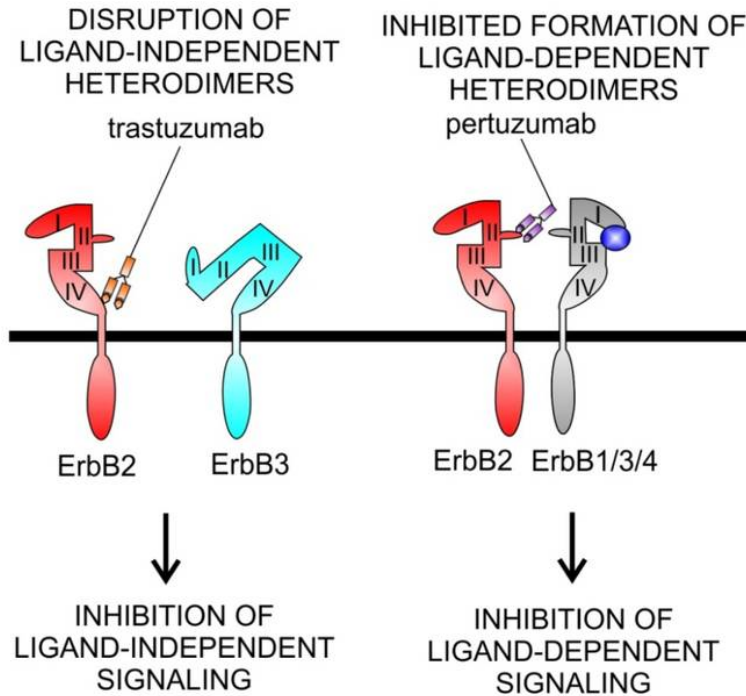


Figure 3.5 – Liaison du trastuzumab vs pertuzumab. © Hervent and Keulenaer. Int J Mol Sci, 2012.

### 3.2.2.3 Lapatinib

Le lapatinib est une petite molécule inhibitrice des récepteurs tyrosine kinases et est un analogue de l'ATP. Ce produit se lie de façon réversible à la partie intracellulaire du récepteur ErbB2/HER2 au site de liaison à l'ATP (452). Une étude clinique de phase III a démontré que les patientes atteignant une réponse complète avec la combinaison trastuzumab – lapatinib ont une meilleure survie globale que les patientes traitées seulement au trastuzumab d'où son utilisation en clinique comme ajout au trastuzumab (488). Contrairement au trastuzumab, le lapatinib inhibe la signalisation constitutive ainsi que la signalisation dépendant de ligands (489). Ce traitement permet également d'inhiber les cellules tumorales résistantes exprimant p95ErbB2. Finalement, le lapatinib est une option thérapeutique pour les métastases au cerveau étant donné sa capacité à traverser la barrière hématoencéphalique (490,491).

### 3.2.2.4 Trastuzumab emtansine

Le trastuzumab emtansine ou T-DM1 est un anticorps conjugué à une drogue (ADC) développé par Roche. Un lien covalent relie le trastuzumab au DM1 un agent cytotoxique. Une fois l'anticorps internalisé par les cellules tumorales via l'endocytose et traité, le DM1 se lie à la tubuline et inhibe la formation des microtubules menant à l'interruption de la mitose et éventuellement à l'apoptose (492). Le DM1 ainsi que ces métabolites doivent atteindre un certain seuil de concentrations intracellulaire avant de déclencher la mort cellulaire (493). Ainsi, les principaux mécanismes de résistance associés au T-DM1 empêchent l'accumulation intracellulaire de la drogue cytotoxique (Figure 3.6) (494).

Une étude clinique de phase III a démontré que ce traitement est significativement efficace en 2<sup>e</sup> ligne de traitement (495).

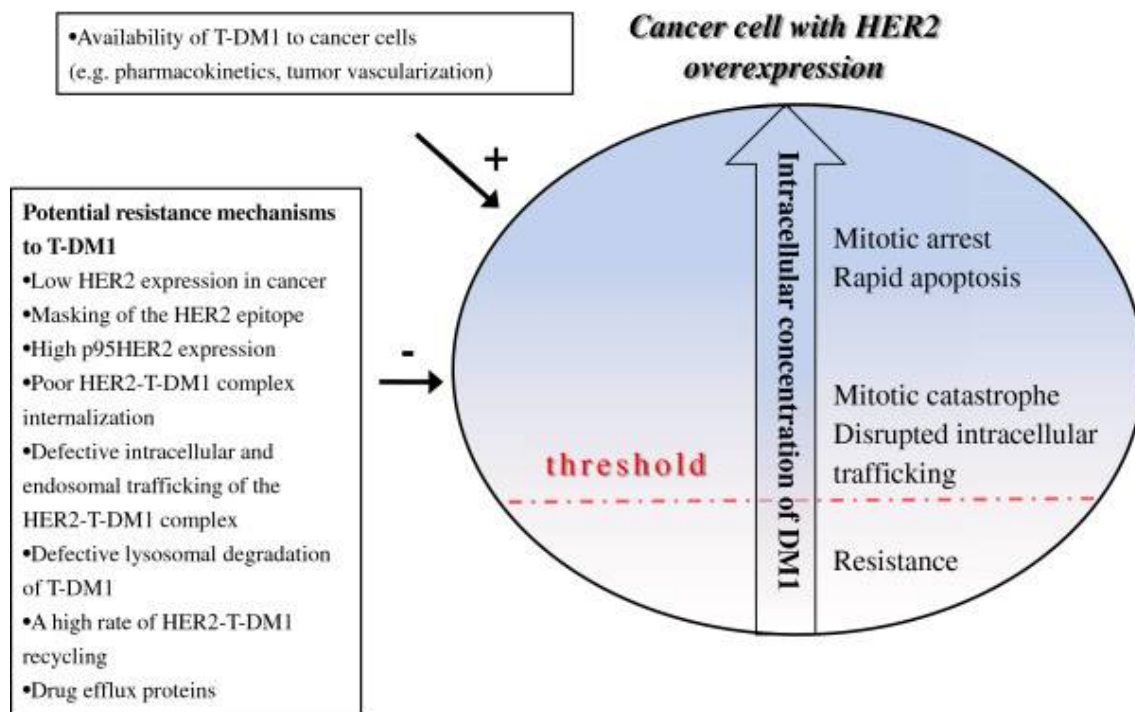


Figure 3.6 – Mécanismes de résistance du T-DM1. © Barok et al. Breast Cancer Res, 2014. With permission from BioMed Central Ltd.

D'autres ADC sont présentement en développement, tel le SYD985 développé par la compagnie Synthron. Cet ADC est la combinaison entre le trastuzumab et la duocarmycine. Malgré la pharmacocinétique similaire avec le T-DM1, le SYD985 a été démontré beaucoup plus efficace dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (PDX) avec une faible expression du récepteur ErbB2/HER2 (496,497). Finalement, une étude clinique de phase I est présentement en cours (NCT02277717).

### **3.2.3 Mécanismes de résistance au trastuzumab**

Malgré l'efficacité d'un traitement au trastuzumab, environ 15 % des patientes sous traitements vont subir une rechute résultant d'une résistance à cette thérapie (498). Cela malgré que les cellules tumorales continuent d'être dépendantes de la suractivation du récepteur HER2 (499).

#### **3.2.3.1 Mutation PI3K**

PI3K-mTOR est une voie de signalisation majeure dans l'activité du récepteur ErbB2/HER2 où le blocage de PI3K diminue la croissance tumorale de multiples modèles cellulaires de cancer du sein HER2<sup>+</sup> (500,501). L'activation constitutive de PI3K est causée par une hyperactivation due à des mutations (502) ou une perte de l'expression de PTEN (502,503). L'incapacité de maintenir une suppression de cette signalisation intracellulaire résulte en une résistance au trastuzumab (504). Récemment, une nouvelle technique de FISH (STAR-FISH) a permis d'observer qu'un traitement néoadjuvant à la chimiothérapie chez des patientes sélectionne des cellules avec une mutation PI3K et favorise la résistance au trastuzumab (505).

La protéine de signalisation intracellulaire PI3K est constituée de la sous-unité régulatrice p85 et de la sous-unité catalytique p110 (506). Plus spécifiquement, la sous-unité p110 a trois isoformes (alpha, bêta et delta) où la forme alpha a démontré être nécessaire pour la tumorigénèse Neu-dépendant chez la souris (506). Démontrant ainsi le potentiel thérapeutique de l'inhibition de cette isoforme.

### 3.2.3.2 HER2 tronqué

La forme tronquée du récepteur ErbB2 peut provenir d'un clivage par les métalloprotéases ou d'un site de début de translation alternatif (507,508). Il a déjà été discuté que le trastuzumab a la propriété de prévenir la forme du ErbB2 tronqué (p95HER2) (473). Cependant, si cette forme du récepteur est déjà présente au niveau de la tumeur, le trastuzumab ne peut pas inhiber l'activité kinase du récepteur tronqué étant donné l'absence de l'épitope visé par cet anticorps (509). L'inhibiteur de kinase lapatinib reste une option thérapeutique étant donné l'inhibition directe de la signalisation intracellulaire de HER2 (510). En effet, sur un total de 156 tumeurs étudiées, 68 d'entre-elles exprimaient le récepteur ErbB2 tronquée où un traitement lapatinib a efficacement inhibé la progression tumorale (511). Une seconde étude avec 93 cancers du sein métastatiques a obtenu des résultats similaires en plus de déterminer l'inefficacité du trastuzumab contre le récepteur tronqué (512).

Finalement, p110HER2 est une deuxième forme tronquée du récepteur ErbB2 (513). Une fraction significative de p110HER2 a été trouvée dans 18 sur 31 (58 %) échantillons de tumeurs de cancer du sein HER2<sup>+</sup> (514). De plus, un modèle *in vitro* a démontré une plus grande migration cellulaire et d'invasion ainsi qu'une augmentation de la croissance tumorale lors de xénogreffe comparativement à la forme p95HER2 (514).

### 3.2.3.3 Transition épithéliale-mésenchymateuse

La transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) est un processus où une cellule épithéliale perd sa polarité ainsi que son adhésion cellulaire tout en gagnant des propriétés migratoires et invasives. Ce phénomène biologique est considéré comme une étape importante dans l'induction du phénomène métastatique (515).

Dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup>, il a été déterminé qu'une résistance au trastuzumab corrèle avec le phénotype EMT tout en diminuant l'expression du récepteur ErbB2/HER2 *in vitro* (516). De plus, une surexpression ce récepteur dans les lignées cellulaires de cancer du sein MDA-MB-231 et MCF-7 a augmenté la production du TGF- $\beta$  résultant à l'activation des facteurs de transcription SNAIL, SLUG et ZEB-1 (517). De manière intéressante, une autre étude a rapporté la transformation des cellules HER2<sup>+</sup> vers un phénotype triple négatif lorsque celles-ci subissent un traitement au trastuzumab de manière continu (518). Ces cellules

transformées ont acquis une résistance aux traitements et une augmentation de leur potentiel métastatique (518).

#### **3.2.3.4 Échec de l'ADCC**

Une étude clinique pilote incluant 11 patientes, a démontré que la rémission corrèle avec l'infiltration immunitaire tumorale (519). Dans une seconde étude incluant 23 patientes, le traitement au trastuzumab a augmenté l'infiltration des lymphocytes ainsi que des cellules NK comparativement au groupe contrôle traité seulement avec la chimiothérapie (520). Finalement, une dernière étude a permis de démontrer l'ADCC chez 15 sur 18 patientes où l'unique patiente avec une réponse complète a présenté l'ADCC la plus intense (521).

Dans un même ordre d'idée, l'ajout d'un traitement à l'IL-2 a démontré une augmentation de l'efficacité de l'ADCC *in vitro* (522). Une conclusion similaire a été obtenue dans une étude clinique de phase I avec 10 patientes en plus de démontrer une tolérance acceptable à la combinaison trastuzumab – IL-2 (523). Cependant, une étude clinique de phase II n'a pas atteint l'efficacité recherchée avec l'absence d'une expansion des cellules NK (524). Une autre approche intéressante pour stimuler l'ADCC est la combinaison du trastuzumab avec un anticorps agoniste de CD137 (525). Finalement, il a été démontré que viser plusieurs épitopes du récepteur HER2 augmente l'ADCC *in vitro* et *in vivo* contre les cellules tumorales (526). Alors qu'un modèle préclinique a démontré que des animaux déficients en récepteur Fc sur les cellules effectrices ne répondent pas au trastuzumab (527). L'ensemble de ces travaux démontre l'importance de l'ADCC pour bâtir une réponse immunitaire anti-tumorale efficace en tant que mécanisme d'action primordiale du trastuzumab.

#### **3.2.4 Immunité anti-tumorale**

En générale, le cancer du sein HER2<sup>+</sup> n'est pas considéré comme un type de cancer immunogénique étant donné la rareté des régressions spontanées rapportée ainsi que l'absence d'une augmentation de l'incidence chez les patientes immunosupprimées (528). Une autre indication est le niveau relativement faible de mutation du cancer du sein comparativement aux

cancers du mélanome et du NSCLC qui répondent fortement aux bloqueurs de points de contrôle immunitaire (529).

Cependant, l'immunité humorale ainsi que l'immunité cellulaire spontanée contre le récepteur HER2 ont déjà été observées dans le contexte du cancer du sein. Il a été découvert que des patientes ont la capacité de développer des anticorps endogènes contre le récepteur ErbB2/HER2 (530,531). La participation des cellules NK dans l'ADCC a été corrélée avec la réponse au trastuzumab, mais seulement au début du traitement et perd leur significativité après 12 mois (532).

En ce qui concerne le système immunitaire cellulaire, l'expression de HER2 semble être inversement proportionnelle au CMH de classe I diminuant ainsi la présentation antigénique aux lymphocytes T (533-535). Ces lymphocytes T, spécifiquement les CD8<sup>+</sup>, ont démontré être essentiels dans la réponse thérapeutique à un anti-ErbB2 *in vivo* (536,537) et ont clairement été associés à une meilleure survie chez les patientes atteintes du cancer du sein HER2<sup>+</sup> (480). De plus, il a également été démontré qu'une amélioration de la survie lorsque les patientes sont traitées avec une combinaison trastuzumab – chimiothérapie est dépendante de l'établissement d'une immunité de l'hôte contre le récepteur ErbB2/HER2 (538). L'infiltration lymphocytaire CD8<sup>+</sup> a été identifiée comme un facteur pronostique positif et indépendant lors d'un traitement néoadjuvant au trastuzumab grâce à l'étude clinique NeoALTTO (539). L'étude FinHER a également permis de déterminer que le traitement au trastuzumab est plus efficace lorsqu'une quantité plus importante de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est présente dans le microenvironnement tumoral (540). De manière intéressante, l'étude BIG 02-98 a permis d'observer que l'infiltration lymphocytaire peut également être un facteur prédictif lorsque les patientes HER2<sup>+</sup> sont traitées avec l'anthracycline (541). Cela concorde avec le fait que la mort cellulaire induite par les anthracyclines est particulièrement immunogénique (542). L'ensemble de ces résultats d'études cliniques démontre que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sont un facteur pronostique de la réponse thérapeutique au trastuzumab.

Les lymphocytes T régulateurs sont aussi un indicateur pronostique de la réponse pathologique complète dans le cancer du sein (543,544). Cela peut sembler contre-intuitif étant donné le rôle immunosuppresseur de ces cellules, mais une explication simple est que l'infiltration FOXP3<sup>+</sup> est aussi significativement associée avec l'infiltration CD8<sup>+</sup>. Un meilleur

indicateur pronostique a été déterminé en prenant le ratio CD8<sup>+</sup> / Tregs ce qui a démontré une forte prédiction des réponses cliniques (545). Peu d'études ont été effectuées sur la valeur pronostique des autres sous-types cellulaires du système immunitaire dans le contexte du cancer du sein HER2<sup>+</sup>, mais la présence de cellules CD4<sup>+</sup> et de cellules CD20<sup>+</sup> ont également été associées à un bon facteur pronostique (546,547).

Une première étude clinique d'immunothérapie dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup> est présentement en cours (NCT02129556). Cette étude clinique de phase Ib/II va étudier l'effet synergétique entre le trastuzumab et un traitement anti-PD-1 chez les patientes qui ont progressé sur le trastuzumab. Cette étude clinique se base sur des observations précliniques qui ont préalablement déterminé la synergie entre ces deux traitements dans un modèle de souris (536).

# Chapitre 4 - Présentation du projet

## 4.1 Hypothèses de recherche

La suppression de l'immunité anti-tumorale par le microenvironnement tumoral est maintenant bien reconnue comme une caractéristique importante du cancer et une étape critique dans la progression tumorale ainsi que l'établissement des métastases (515,548). Plusieurs mécanismes d'immunosuppression sont mis en place par le microenvironnement tumoral diminuant ainsi l'efficacité anti-tumorale du système immunitaire (549). En mars 2011, le premier bloqueur de point de contrôle immunologique, un anti-CTLA-4 (ipilimumab), a été approuvé par la FDA pour le traitement du mélanome avancé suivi par l'approbation d'un anti-PD-1 (nivolumab) en 2014. Suite aux succès de ces anticorps inhibiteurs de points de contrôle immunologique, beaucoup d'efforts de recherche sont déployés pour augmenter l'efficacité anti-tumorale des lymphocytes T. Cependant, le système immunitaire comprend plein d'autres sous-types cellulaires participant également aux mécanismes de suppression de l'immunité anti-tumorale.

Étant donné le rôle pivot de CD73 dans l'immunosuppression par le système adénosinergique et que le cancer du sein HER2<sup>+</sup> ainsi que le cancer de l'ovaire séreux de haut grade sont deux pathologies susceptibles à l'immunothérapie, les hypothèses suivantes ont été émises :

1. Dans le cancer de l'ovaire séreux de haut grade, la présence de CD73 devrait diminuer les infiltrations lymphocytaires et augmenter la progression tumorale.
2. Dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup>, un traitement avec un anticorps monoclonal antagoniste de CD73 devrait potentialiser l'effet de l'inhibition de ErbB2.



## 4.2 Objectifs spécifiques

Dans le cancer de l'ovaire séreux de haut grade, évaluer :

- a) L'impact de l'expression de CD73 chez la survie des patientes
- b) Le rôle pronostique de CD73 en corrélation avec l'infiltration lymphocytaire CD8<sup>+</sup>
- c) Le rôle de CD73 exprimé sur cellules fibroblastiques sur la progression tumorale
- d) Le rôle de CD73 dans l'infiltration tumorale lymphocytaire spécifique aux cellules tumorales

Dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup>, évaluer :

- a) L'impact de l'expression de CD73 sur la résistance au trastuzumab
- b) Le potentiel thérapeutique de la combinaison anti-ErbB2 et anti-CD73
- c) L'influence des traitements sur l'infiltration immunitaire
- d) L'influence des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et des cellules NK dans la réponse thérapeutique
- e) L'importance de l'expression de CD73 sur les cellules tumorales et les cellules de l'hôte dans l'inhibition de la réponse thérapeutique anti-ErbB2

## 4.3 Présentations des articles

### 4.3.1 Premier article

Le premier article présenté dans cette thèse (chapitre 5) est paru dans le journal *Cancer Research* en 2015. En tant que premier auteur de cet article, j'ai participé à la conception et au design des expériences et j'ai participé au développement de la méthodologie. De toutes les figures de l'article, j'ai effectué l'acquisition des données, l'analyse et l'interprétation des résultats pour les figures 5.2, 5.3 et 5.5. Pour la figure 5.4, j'ai apporté mon aide lors de la culture cellulaire et joué un rôle d'assistant lors des expériences. De toutes les figures supplémentaires, j'ai généré les figures S5.2, S5.3, S5.4, S5.6A, S5.7 et S5.8.

La contribution des coauteurs a été comme suit :

- Kathleen Spring a généré l'intégralité des résultats de la figure 5.4.
- Sandra Pommey a aidé pour les expériences de la figure 5.4 et généré les figures S5.5 et S5.6B. Elle a également aidé à accumuler les résultats de la figure 5.2D.
- Guillaume Chouinard a été la personne responsable de la microscopie pour les analyses du TMA
- Joshy George, Gregory Chen, Deena Gendoo et Benjamin Haibe-Kains font partie de l'équipe qui ont été responsable des analyses géniques (Fig. 5.1)
- Cécile Le Page, Diane Provencher et Anne-Marie Mes Masson font partie de l'équipe qui ont récolté et préparé les biopsies nécessaires pour monter le TMA utilisé pour la figure 5.2 et 5.3.
- John Staag est l'investigateur principal qui a financé cette étude et qui a géré l'effort d'équipe à chaque étape.

### 4.3.2 Deuxième article

Le deuxième article présenté dans cette thèse (chapitre 6) est paru dans le journal Cancer Research en 2017. En tant que premier auteur de cet article, j'ai participé à la conception et au design des expériences et j'ai participé au développement de la méthodologie. De toutes les figures de l'article, j'ai effectué l'acquisition des données, l'analyse et l'interprétation des résultats pour les figures 6.4, 6.6 et 6.7. J'ai également participé aux résultats de la figure 6.5A. De toutes les figures supplémentaires, j'ai également généré les résultats des figures S6.4, S6.5 et S6.6.

La contribution des coauteurs a été comme suit :

- David Allard a généré les résultats de la figure 6.5A et 6.6C
- Deepak Mittal et Mark Smith font partie de l'équipe d'Australie qui a généré les résultats de la figure 6.5B et 6.5C
- Yacine Bareche, Laurence Buisseret, Vinu José, Sherene Loi, Heikki Joensuu, Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen et Christos Sotiriou et sont responsable de l'étude clinique FinHER et des analyses informatiques menant aux figures 6.1 à 6.3
- Sandra Pommey et Vincent Delisle ont été responsable de développer le modèle et généré une partie des résultats de la figure 6.7D à 6.7G.
- John Staag est l'investigateur principal qui a financé cette étude et qui a géré l'effort d'équipe à chaque étape

## **Chapitre 5 - CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer**

Martin Turcotte<sup>1,2,3</sup>, Kathleen Spring<sup>1,2</sup>, Sandra Pommey<sup>1,2</sup>, Guillaume Chouinard<sup>1,2</sup>, Isabelle Cousineau<sup>1,2</sup>, Joshy George<sup>4</sup>, Gregory M. Chen<sup>5,6</sup>, Deena M.A. Gendoo<sup>5,6</sup>, Benjamin Haibe-Kains<sup>5,6</sup>, Thomas Karn<sup>7</sup>, Kurosh Rahimi<sup>1,8,9</sup>, Cécile Le Page<sup>1,2</sup>, Diane Provencher<sup>1,2,9,10</sup>, Anne-Marie Mes-Masson<sup>1,2,9,10</sup>, John Stagg<sup>1,2,3</sup>.

1. Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Québec, Canada.
2. Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
3. Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Québec, Canada.
4. Computational Sciences and Statistical Analysis, Jackson Laboratory for Genomic Medicine.
5. Princess Margaret Cancer Centre, University Health Network, Toronto, Ontario, M5G 1L7, Canada
6. Department of Medical Biophysics, University of Toronto, Toronto, Ontario, M5G 1L7, Canada
7. Department of Obstetrics and Gynecology, University Hospital Frankfurt, Germany
8. Department of Medicine, Université de Montréal, Quebec, Canada
9. Department of Pathology, Centre hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)
10. Division of Gynecologic-Oncology, Department of Obstetrics and Gynecology,
11. Université de Montréal, Montreal, Canada.

Precis : This study highlights clinically relevant roles for a cell surface immunosuppressive enzyme as a prognostic marker and candidate therapeutic target in ovarian cancer.

Conflict of interest : J. Stagg reports receiving a commercial research grant from MedImmune LLC and Surface Oncology; has ownership interest in inventorship in Surface Oncology; and is a consultant/advisory board member for Surface Oncology. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

## 5.1 Abstract

The cell surface nucleotidase CD73 is an immunosuppressive enzyme involved in tumor progression and metastasis. While preclinical studies suggest that CD73 can be targeted for cancer treatment, the clinical impact of CD73 in ovarian cancer remains unclear. In this study, we investigated the prognostic value of CD73 in high-grade serous (HGS) ovarian cancer using gene and protein expression analyses. Our results demonstrate that high levels of CD73 are significantly associated with shorter disease-free survival and overall survival in HGS ovarian cancer patients. Furthermore, high levels of CD73 expression in ovarian tumor cells abolished the good prognosis associated with intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells. Notably, CD73 gene expression was highest in the C1/stromal molecular subtype of HGS ovarian cancer and positively correlated with an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) gene signature. Moreover, *in vitro* studies revealed that CD73 and extracellular adenosine enhance ovarian tumor cell growth as well as expression of anti-apoptotic BCL-2 family members. Finally, *in vivo* co-injection of ID8 mouse ovarian tumor cells with mouse embryonic fibroblasts showed that CD73 expression in fibroblasts promotes tumor immune escape and thereby tumor growth. In conclusion, our study highlights a role for CD73 as a prognostic marker of patient survival and also as a candidate therapeutic target in HGS ovarian cancers.

## 5.2 Introduction

High-grade serous (HGS) ovarian cancer is the most common and lethal histotype of epithelial ovarian cancers, with a 5-year survival rate of 30-40 % (1). Despite good initial responses to chemotherapy, the majority of patients with HGS ovarian cancer relapse and develop drug-resistant disease, emphasizing the need for new treatments.

Tumor-infiltrating intraepithelial lymphocytes (TILs), in particular CD8<sup>+</sup> T cells, correlate with improved clinical outcomes in epithelial ovarian cancers (2, 3). Interestingly, correlation between TILs and prognosis is particularly linked to the serous histotype of ovarian cancer (4). Within HGS ovarian cancer, studies from the Australian Ovarian Cancer Study

(AOCS) and The Cancer Genome Atlas (TCGA) have identified four molecular subtypes: the mesenchymal/stromal (C1) subtype, characterized by a reactive stroma and poor prognosis; the immunoreactive (C2) subtype, characterized by intraepithelial TILs and favorable prognosis; the differentiated (C4) subtype, characterized by a low stromal response; and the proliferative (C5) subtype, characterized by negligible TILs and poor prognosis.

Overcoming immunosuppressive mechanisms that restrict anti-tumor T cell function is a potential treatment strategy for ovarian cancer, as recently shown in clinical trials (5). Nevertheless, increasingly evident is the need to target multiple immunosuppressive mechanisms to overcome the high level of redundancy that exists in tumor immunity (6, 7). We and others have demonstrated that the CD73-adenosinergic pathway contributes to tumor immune escape in animal mouse models of cancer, including ovarian cancer (8-11). CD73 is a GPI-anchored nucleotidase that catabolizes the production of extracellular adenosine. Inspired by landmark studies from Sitkovsky and colleagues, we and others have underscored the therapeutic potential of blocking CD73 and adenosine receptors for cancer therapy (12-15). In the ID8 mouse model of ovarian cancer, B. Zhang and colleagues reported that CD73 gene silencing, or targeted blockade of CD73 with a monoclonal antibody (mAb) or a small molecule inhibitor, enhances anti-tumor T cell responses and improves animal survival (11). Others have shown that *in vitro* treatment of alloantigen-primed human T cells with an anti-CD73 mAb enhances T cell cytotoxicity against human ovarian cancer cells (16).

CD73 overexpression has been associated with worse clinical outcomes in different types of cancer (15, 17-19). In triple negative breast cancer, high levels of CD73 gene expression are associated with poor prognosis and resistance to immunogenic-cell death induced by anthracyclines (15). The clinical importance of CD73 in ovarian cancer remains, however, unclear. High levels of CD73 have been reported to be associated with better prognosis in ovarian cancer patients (20); however, this study aggregated various histotypes and relatively few cases of poor-outcome HGS were included. Since immunosurveillance of ovarian cancer is linked to the serous histotype, we hypothesized that the prognostic value of CD73 may be different in HGS ovarian cancer. We thus investigated the clinical importance of CD73 expression specifically in HGS ovarian cancer patients. We also considered the impact of CD73 expression in ovarian cancer cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs).

## 5.3 Materials and methods

### Gene expression analysis

The Australian Ovarian Cancer Study (AOCS; GSE9899) cohort (21) was stratified into two groups based on CD73 or CD39 gene expression level. Samples with expression level higher than a threshold (median + 0.5 \* median absolute deviation) were classified as “High” and samples lower than a threshold (median – 0.5 \* mad) were classified as “Low”. Statistical significance of the difference in survival was computed using Cox’s proportional hazard model and the log rank test p-value reported on Kaplan-Meier survival curves. The association between CD73 (NT5E) or PD-L1 (CD274) gene expression and the four molecular subtypes defined by gene expression profiling were assessed as previously described (21). The association between CD73 gene expression and EMT gene signature were assessed using the mean expression of the EMT genes: BMP1, CDH2, COL1A2, FN1, FOXC1, GNG11, ITGA5, ITGAV, MMP2, MMP3, MMP9, MSN, SNAI1, SNAI2, TCF4, TGFB1, TWIST1, VCAN, VIM, ZEB1, ZEB2, as previously described (22).

For the meta-analysis, gene expression and survival data from 13 independent ovarian cancer gene expression datasets were standardized as described in (23). We identified 1581 patients with high-grade, late-stage, serous ovarian carcinoma. The patient data were merged into a single pooled dataset using quantile normalization. Expression of CD73 in this pooled dataset was stratified into high, mid, and low tertiles. We performed a Cox proportional hazards model on the CD73 tertiles and performed statistical testing using the likelihood ratio test. Survival analysis was performed using R version 3.1.2. and package survcomp (24). To investigate the survival stratification of CD73 in combination with CD39, we grouped patients based on median-dichotomized expression values of CD73 and CD39. Patients with both genes expressed in the respective higher quantiles were assigned to the “CD39<sup>+</sup> / CD73<sup>+</sup>” group, and patients who did not highly express CD73 or CD39 were assigned to the “other” group.

### Patients and tissue microarray

For CD73 protein analysis, formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) oophorectomy tissue blocks were collected and banked following appropriate consent from patients undergoing

surgery within the Division of Gynecologic Oncology at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) from 1992 to 2012. A pathologist scored tumor grade and stage and a gynecologic oncologist scored tumor residual disease according to criteria from the International Federation of Gynecologists and Obstetricians (FIGO). Clinical data on progression-free interval were defined according to computed tomographic (CT) imaging, alone or combined with blood CA125 levels (25). Overall survival was defined as the time from diagnosis to death from ovarian cancer. Patients known to be still alive at time of analysis were censored at time of their last follow-up. Patient disease-free survival (DFS) was calculated from the time of surgery until the first progression. Eligibility criteria for inclusion in the study were as follows: no pre-operative chemotherapeutic treatment for ovarian cancer, high-grade tumors, serous histopathology subtype and completed informed consent. Patients who died from non-ovarian cancer related causes were censored at time of last follow-up. Ethics approval was obtained by the local institutional Ethics Board. Areas of tumor were selected based on review of a hematoxylin-eosin-stained slide. FFPE tumor blocks were then biopsied twice using a 0.6 mm diameter tissue arrayer (TMArrayer, Pathology Device Inc.) and resultant cores were arrayed into a grid in a recipient paraffin block. The tissue array was composed of 208 HGS ovarian cancer samples in duplicate. This tissue microarray was then sectioned, stained with hematoxylin-eosin and received another pathology review to confirm tumor content.

### **Protein expression analysis**

Sections of the tissue microarray were deparaffinized and rehydrated prior to immunostaining. CD73 expression and epithelial regions were revealed using a mouse anti-human CD73 primary antibody (1:500, Clone 1D7, Abcam), DAPI (50 ng/ml) staining and a mix of mouse anti-cytokeratin-7 (1:100, Clone Ab-2/OV-TL1 230, NeoMarkers) and mouse anti-cytokeratin-18 (1:100, Clone DC-10, Santa Cruz) primary antibodies. CD8<sup>+</sup> cells, nuclei and epithelial regions were revealed using a mouse anti-human CD8 primary antibody (1:40, Clone 4D11, Novus Biologicals), DAPI staining and a mix of mouse anti-cytokeratin-7 (1:100, Clone Ab-2, NeoMarkers) and mouse anti-cytokeratin-18 (1:100, Clone DC-10, Santa Cruz) primary antibodies. Cross-contamination between CD73 or CD8 and cytokeratin stainings was avoided by proceeding sequentially with a first primary-secondary labelling, and then blocking of any remaining mouse antigens with the Mouse On Mouse reagent (Vector, MKB-2213). The



slides where coverslip-mounted using ProlongGold (Life Technologies) and allowed to dry overnight at room temperature. Slides were imaged with a 20X/0.75NA objective using an Olympus VS110 Slide Scanner running FW-AS software. The scanner performs stitching of a collection of individual images to build super images (.vsi file format) of the whole slide. For immunohistochemistry, slides were treated with antigen retrieval solution (Dako 10X; #S2367), microwaved 11 min at 900W and 15 min 400W, cooled, and incubated in a Ventana Benchmark XT autostainer with primary anti-CD73 mAb (Abcam clone 1D7; 1/600) diluted in antibody dilution buffer (Ventana #ADB250) for 1 h at 37°C. UltraView Universal DAB detection kit (Ventana, #760-500) was used for detection and slides were imaged with a 20X/0.75NA objective using an Olympus VS110 Slide Scanner running FW-AS software.

### **Image Analysis**

Super images were imported into Visiomorph software (Visiopharm, Denmark) where individual cores are separated and automatically labeled with a patient identification number using the Array Imager module. Threshold values were calculated by separating the image histogram of intensities at the interface between the background and the features, providing epithelia and stroma segmentation. Threshold values were stored in binary images subsequently processed and converted to regions of interest thus allowing quantification of CD73 expression or the count of CD8<sup>+</sup> objects in the epithelial regions. All cores are batch-processed ensuring unbiased classification and measurement. CD73 mean expression intensity (MFI) was calculated as the integrated intensity of the CD73 channel divided by the number of pixels present in the epithelial or stromal compartment. For the stromal compartment, highest 20 % CD73 expression was used as an arbitrary cut-off. Epithelial CD8<sup>+</sup> cell density for each core was evaluated as the count of CD8<sup>+</sup> cells present in the epithelium over the corresponding epithelial area (number of CD8<sup>+</sup> cells /  $\mu\text{m}^2$  of epithelia). Correlation between duplicates was highly significant for both CD73 and CD8 expression (Pearson rho > 0.7; p < 0.001).

### **Animals and cell lines**

Ovarian cancer cell lines were obtained from the laboratory of Anne-Marie Mes-Masson and were cultured in OSE medium (Wisent, Canada) with the addition of 10 % bovine serum (FBS; Wisent, St. Bruno, Canada). SKOV3 cells were purchased from ATCC. Cell lines were

not authenticated. Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were harvested from wild type and CD73-deficient C57BL/6, immortalized using a lentiviral vector encoding a p53 gene-silencing element (GSE22) provided by Dr. Francis Rodier (Université de Montréal), and cultured in DMEM medium with 10 % FBS. Wild-type C57BL/6 mice were purchased from Charles River Laboratory (Montreal, Canada). CD73-deficient C57BL/6 mice were obtained from Dr. Linda F. Thompson (Oklahoma Medical Research Foundation) and were bred and housed at CHUM. The mouse ovarian cancer cell line ID8 was cultured in complete DMEM medium with 10% FBS and gene-modified to express ovalbumin (OVA) using a retroviral vector, with an internal ribosome entry site and the Green Fluorescent Protein (GFP). CD73 gene-silencing of SKOV3 cells was performed using lentiviral vectors expressing a short-hairpin (sh)RNA-encoding plasmid targeting human CD73 (TRCN0000048755, Thermo Fisher Scientific, USA) or GFP as control (target sequence: 5'GCAAGCTGACCCTGAAGTTCAT3') followed by one week of selection in 1 µg/mL puromycin. Stable silencing of CD73 was assessed by flow cytometry.

### **Cell proliferation assay**

For 3D assays, spheroids were formed using a modified protocol of the hanging drop method (26). Briefly, SKOV3 cells were trypsinized, counted and 4,000 cells cultured in inverted drops (30 µl) for 5 days in OSE medium (Wisent, St. Bruno, Canada) with 10 % FBS. Spheroids (5 per group, in triplicates) were harvested, pooled and trypsinized for 15 min at 37°C. After inactivation of trypsin with complete medium, cells were centrifuged and subjected to Cell Titer 96 Aqueous Cell Proliferation Assay (Promega, Woods Hollow, USA) following manufacture's protocol. For 2D assays, cells were plated at 2,000 cells per well (in quadruplicates) in complete media and subjected to Cell Titer 96 Aqueous Cell Proliferation Assay after 3 days. For CD73 re-expression, lentiviral vectors encoding human CD73 cDNA were used.

For co-culture experiments, ID8 cells were stained with CFSE dye (Life Technologies), mixed at a ratio of 1:1: with wild type or CD73-deficient MEF (total  $10^5$  cells), and incubated for 48 h. Co-cultures were then exposed 1h to BrdU (Sigma) and analyzed by flow cytometry with an anti-BrdU antibody (Invitrogen). Samples were analyzed on LSRII Fortessa based on

CFSE to discriminate ID8 cells and BrdU to assess the percentage of cells in proliferation. Data were analyzed with FlowJo software.

### **Flow cytometry analysis of CD73 and CD39 expression**

Cells were incubated with PE-conjugated mouse anti-human CD73 mAb (BD Biosciences, 550257), PE-conjugated anti-human CD39 (BD Biosciences, 555464) or PE-conjugated IgG1k isotype control (BD Biosciences, 555749). Samples were analyzed on a Fortessa flow cytometer (BD) and data analyzed with FlowJo software.

### **CD73 activity**

Malachite green phosphate detection kit (R&D systems #DY996) was used to measure CD73 enzymatic activity. Cells were plated in complete media in a flat-bottom 96-well plate ( $10^4$  cells per well) 20 h before the assay and washed twice with phosphate-free buffer (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 125 mM NaCl, 1 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES pH 7.2). AMP (40 μM in phosphate-free buffer; Sigma) was then added and cells were incubated for 90 min at 37°C. Where indicated, the CD73 inhibitor APCP (50 μM; Sigma) was added. Inorganic phosphate levels were measured following the manufacturer's instructions.

### **Animal studies**

For *in vivo* studies,  $5 \times 10^6$  ID8 cells and  $5 \times 10^6$  MEF were re-suspended in 200 μl of PBS and co-injected intraperitoneally into WT C57BL/6 mice or Rag2<sup>-/-</sup> γc<sup>-/-</sup> mice. MEF were re-injected bi-weekly for 8 weeks. Weights of mice were measured 3 times per week. In one of two experiments, mice were euthanized at day 60 for peritoneum nodules count. For survival studies, mice were excluded when weight gain exceeded 40% of initial weight. For tumor-infiltrating lymphocyte analysis, mice were injected subcutaneously with a mix of  $5 \times 10^6$  ID8-OVA cells and  $5 \times 10^6$  MEF in 400 μl of an equal volume of PBS and cold Matrigel (BD Biosciences). After 24 days, tumors were collected and exposed to a solution of collagenase type IV (Sigma) and DNase type I (Sigma). Single cell suspensions were then analyzed with a panel of antibodies consisting of anti-CD8α (BD Biosciences), anti-TCRβ (Abcam) and H-2Kb-SIINFEKL tetramer (from the CHUM). Vitality dye 7-AAD (BD Biosciences) was added 20

min prior to analysis. Samples were analyzed on LSRII Fortessa and data were analyzed with FlowJo software.

## **Quantitative PCR**

RNA were extracted from cell pellets using RNeasy Mini Kit (Qiagen) following manufacturer's instructions and quantified on a Nanodrop spectrometer (Thermo Scientific). 1µg of RNA were reverse transcribed with qScript cDNA Supermix (Quanta Biosciences). Real-time PCR were performed using Taqman Master Mix and Gene Expression Assays primers and probes (human BCL2: Hs00608023\_m1, BCLXL: Hs00236329\_m1, MCL1: Hs01050896\_m1, CD73: Hs00159686\_m1, 18S: Hs03003631\_g1 ADORA1: Hs00379752\_m1, ADORA2A: Hs00169123\_m1, ADORA2B: Hs00386497\_m1, ADORA3: Hs00252933\_m1, and GAPDH: Hs02758991\_g1) (Applied Biosystems) on the StepOnePlus instrument and analysed with StepOne software V.2.3 (Applied Biosystems). Every reaction was performed in triplicates and the relative expression of each gene was normalised to 18S or GAPDH and relative to the shGFP control of the cell line.

## **5.4 Results**

### **CD73 gene expression is associated with poor prognosis and a C1/reactive stromal gene signature**

Tumor CD73 gene expression levels were correlated with disease-free survival in HGS ovarian cancer patients from the Australian Ovarian Cancer Study (21). As shown in Fig. 5.1A, patients with high levels of CD73 had a significantly worse prognosis than patients with low levels of CD73 ( $P = 0.00055$ ). CD73 gene expression also positively correlated with CD39 gene expression (suppl. Fig. S5.1A), an ectonucleotidase that hydrolyzes extracellular ATP to AMP. Consistent with this, high levels of CD39 gene expression showed a trend towards association with poor prognosis (Fig. 5.1B;  $P = 0.0507$ ). In a meta-analysis of 13 independent datasets representing 1581 patients with late-stage HGS ovarian cancer (suppl. Fig. S5.1B), high levels of CD73 significantly associated with worse overall survival (Fig. 5.1C;  $P = 0.008$ ). Patients with both CD73 and CD39 genes expressed in the respective higher quantiles also had a worse

prognosis (suppl. Fig. S5.1C). We next assessed whether CD73 gene expression was associated with a specific molecular subtype of HGS ovarian cancer, as defined by Tothill et al. (21). As shown in Fig. 5.1D, CD73 levels were highest in the C1 molecular subtype, characterized by a reactive stromal gene signature (21). In comparison, PD-L1 expression was highest in the C2 molecular subtype, characterized by an immune gene signature (Fig. 5.1D). CD73 gene expression also strongly correlated with an EMT gene signature (Fig. 5.1E) and was independent of copy-number variations (suppl. Fig S5.1).

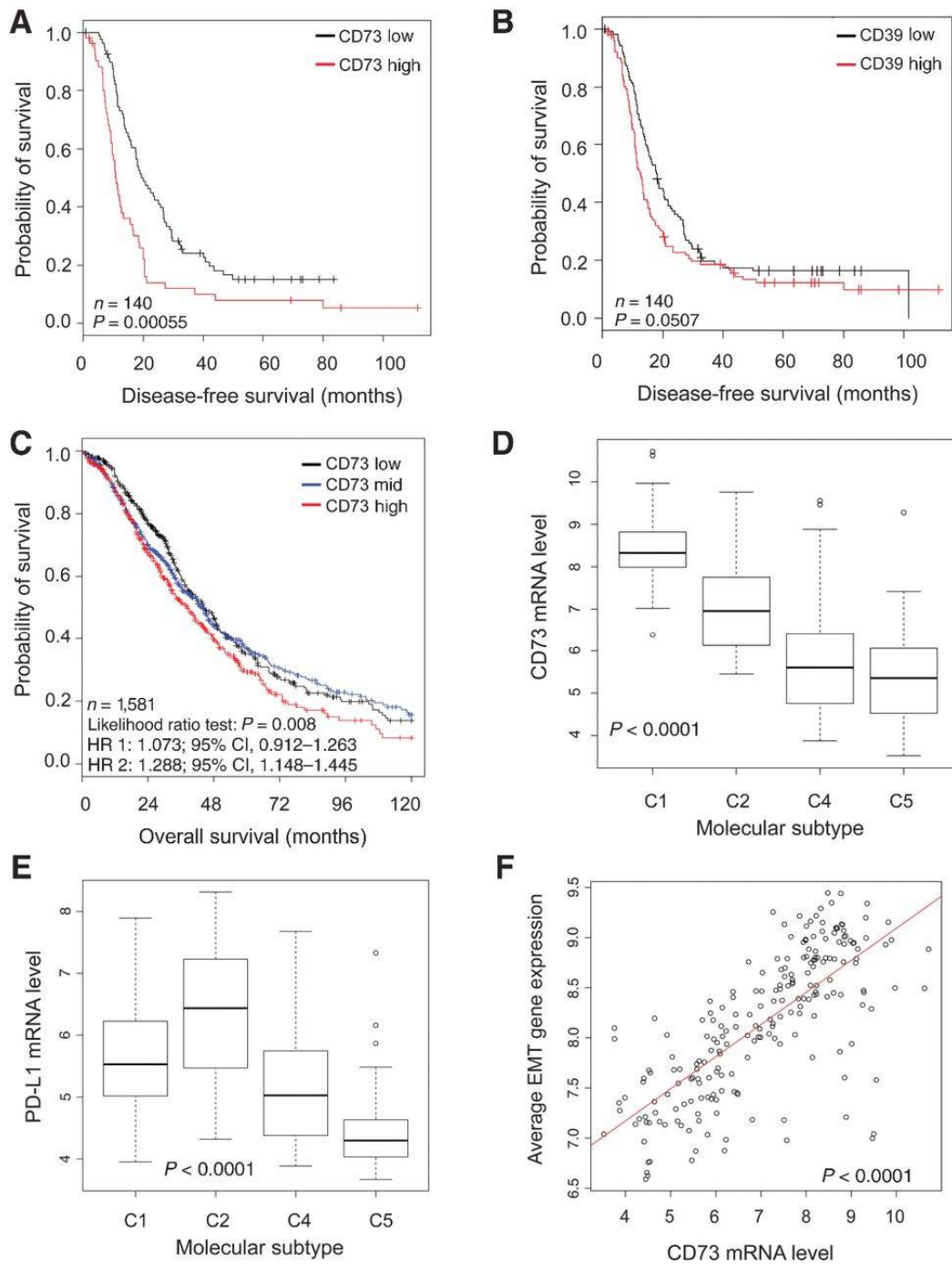


Figure 5.1 – CD73 gene expression is associated with poor prognosis in HGS ovarian cancer. (A) We assessed the prognostic value of CD73 (NT5E) expression in the AOCS dataset. Significance of differences in survival between patient groups was estimated by log-rank test. (B) Prognostic value of CD39 (ENTPD1) expression in the AOCS dataset. (C) Prognostic value of CD73 in a meta-analysis of 13 independent datasets composed of 1581 HGS ovarian cancer cases. Expression of CD73 was stratified into high, mid, and low tertiles. Cox proportional hazards model on the CD73 tertiles and likelihood ratio test were performed (HR1 is mid vs. low; HR2 is high vs. low). (D) Association between CD73 gene expression and HGS molecular

subtypes ( $P < 0.0001$  by Kruskal-Wallis test). (E) Association between PD-L1 (CD274) gene expression and HGS molecular subtypes ( $P < 0.0001$  by Kruskal-Wallis test). (F) Correlation between CD73 gene expression and EMT gene signature (Pearson coefficient = 0.73;  $P < 0.0001$ ). The line of best fit is shown in red.

### **CD73 expression in ovarian tumors is associated with poor prognosis**

To validate our gene expression analysis, we next assessed the prognostic value of CD73 protein expression in an independent cohort (Table 5.1). A total of 208 HGS cases were analyzed by quantitative immunofluorescence (IF) on tissue-microarray (TMA). To specifically assess the impact of CD73 expression on ovarian tumor cells, we performed co-IF of CD73 and epithelial cytokeratins (CK)-7/18 (suppl. Fig. S5.2A) and determined the intensity of CD73 expression per epithelial surface unit (Fig. 5.2A). Standard immunohistochemistry was also performed on selected cases for validation (suppl. Fig. S5.2B-C). As shown in Fig. 5.2B-C, high levels of CD73 in tumor cells (above median) were associated with a significant shorter disease-free survival (mean  $\pm$  SD:  $31.7 \pm 4.7$  vs  $47.1 \pm 5.5$  months;  $P = 0.004$  by log rank) and decreased overall survival ( $62.7 \pm 6.1$  vs  $78.6 \pm 6.4$  months;  $P = 0.048$  by log rank). CD73 expression in tumor cells was also associated with worse disease-free survival in multivariate Cox regression analysis (Table 5.2). Consistent with our IF analysis, CD73 was expressed on a majority of cell lines derived from serous human ovarian tumors (Fig. 5.2D and suppl. Fig. S5.3).

	<b>Median (range) or <i>n</i> (%)</b>
Age, y	61 (34–89)
FIGO stage	
I	13 (6)
II	23 (11)
III	147 (71)
IV	25 (12)
Grade	
2	29 (14)
3	179 (86)
Histological type	
Serous carcinoma	208 (100)
Debulking	
Optimal	96 (46)
Non-optimal	91 (44)
Unknown	21 (10)
Chemotherapy	
Platinum-based	191 (92)
Taxane alone	2 (1)
Unknown	15 (7)
Follow-up time (months)	36 (1–156)
Disease progression time (months)	14 (0–76)

Table 5.1 – Clinicopathological characteristics of the TMA sample set (n=208).



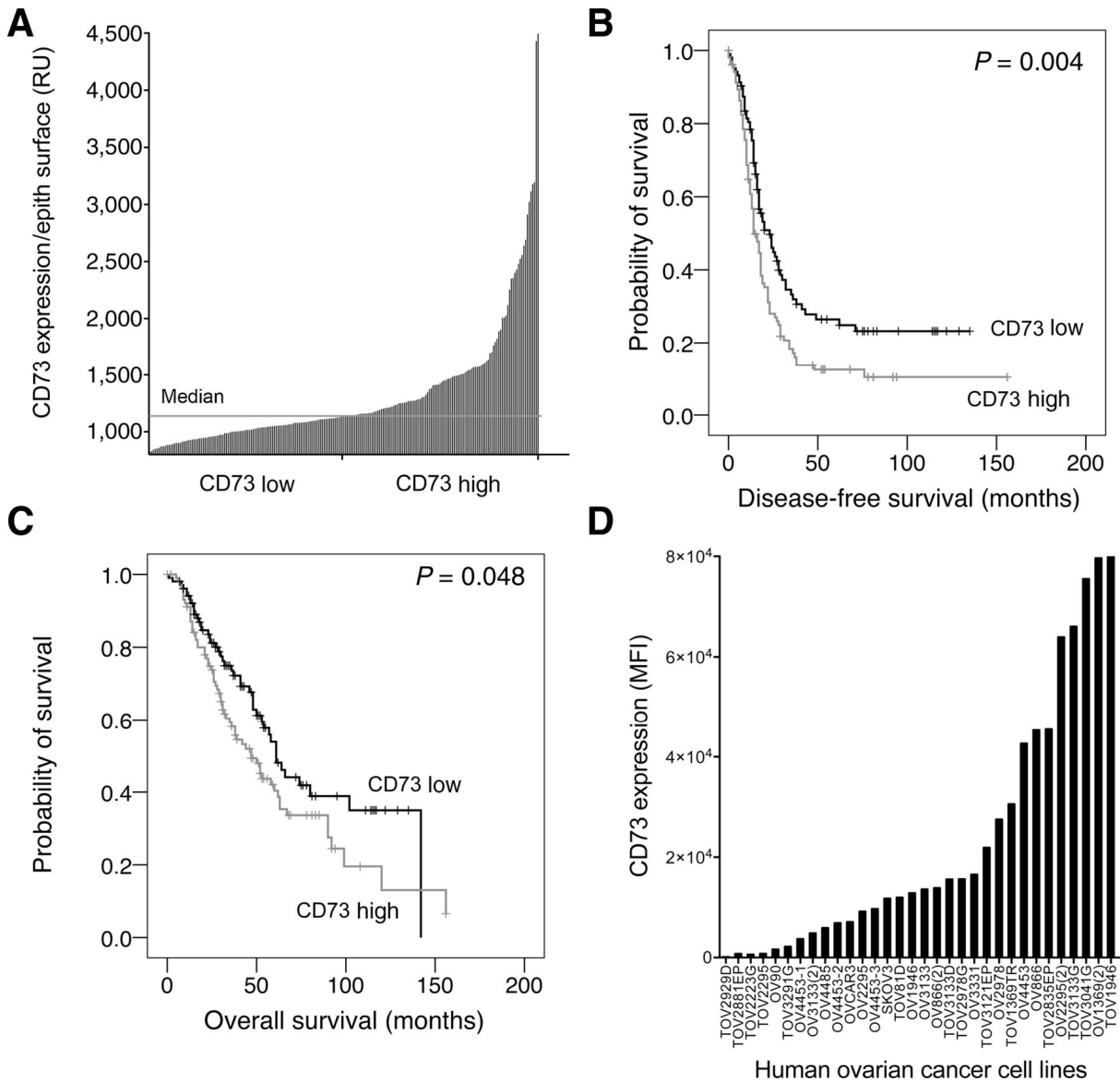


Figure 5.2 – CD73 protein expression in ovarian tumor cells is associated with poor prognosis. (A) CD73 protein expression in cytokeratin 7/18<sup>+</sup> tumor cells was quantified by immunofluorescence in 208 cases of HGS ovarian cancer on TMA. Expression per epithelial surface unit was calculated as the integrated intensity of CD73 in the cytokeratin compartment divided by the number of pixels present in the cytokeratin compartment (bars, individual cases). B and C, association of CD73 expression in tumor cells with disease-free survival (B) and overall survival (C). Significance of differences in survival was estimated by log-rank test. D, flow cytometry analysis of CD73 expression on 32 human serous ovarian cancer cell lines.

	Univariate		Multivariate	
	HR (95% CI)	<i>P</i>	HR (95% CI)	<i>P</i>
CD73	1.581 (1.152–2.171)	0.005	1.479 (1.052–2.078)	0.024
Age	1.005 (0.993–1.018)	0.393	1.010 (0.994–1,027)	0.216
FIGO stage	2.070 (1.602–2.674)	0	1.796 (1.330–2.425)	0
Residual disease	2.658 (1.886–3.746)	0	1.861 (1.276–2.715)	0.001

Table 5.2 – Disease-free survival Cox regression analysis.

### **CD73 expression in tumor cells hinders the prognostic impact of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> cells**

The presence of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells has been associated with improved survival in HGS ovarian cancer (3). We hypothesized that high levels of CD73 might hinder the prognostic value of intratumoral CD8<sup>+</sup> T cells (27). Using the same TMA as described above, we analyzed tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> cell density (suppl. Fig. S5.2D) and evaluated its prognostic value, alone and in combination with CD73 expression. As shown in Fig. 5.3A-B, patients with a high density of intratumoral CD8<sup>+</sup> cells (i.e. above median) showed a trend towards longer disease-free survival ( $47.8 \pm 6.1$  vs  $32.8 \pm 4.3$  months) and a significant increased in overall survival ( $83.6 \pm 6.7$  vs  $56.3 \pm 5.0$  months). In support of our hypothesis, co-analysis of CD73 expression in tumor cells and CD8<sup>+</sup> cell density significantly improved the prognostic value of either biomarker (Fig. 5.3C-D); patients with high CD73 expression in tumor cells and low CD8<sup>+</sup> cell density had the shortest disease-free survival ( $20.0 \pm 3.0$  months) and overall survival ( $45.5 \pm 5.8$  months), while patients with low CD73 expression in tumor cells and high CD8<sup>+</sup> cell density had the longest disease-free survival ( $60.7 \pm 9.6$  months) and overall survival ( $94.8 \pm 10$  months).

We next evaluated whether the prognostic value of CD73 was different in tumors infiltrated with CD8<sup>+</sup> cells compared to tumors with low CD8<sup>+</sup> cell density. We hypothesized that CD73 expression, due to its immunosuppressive effects, would be most prognostic in tumors with high CD8<sup>+</sup> cell density. The prognostic value of CD73 expression was indeed superior in tumors with high CD8<sup>+</sup> cell density compared to tumors with low CD8<sup>+</sup> cell density

(log rank  $P = 0.008$  and  $0.07$ , respectively; Fig. 5.3C-D and suppl. Fig. S5.4A-B). Conversely, the association between intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells and good prognosis was restricted to tumors with low levels of CD73 expression (log rank  $P = 0.025$  and  $0.199$ , respectively; Fig. 5.3C-D and suppl. Fig. S5.4C-D). Our data thus strongly suggests that CD73 expression in HGS ovarian tumors contributes to suppress the function of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells.

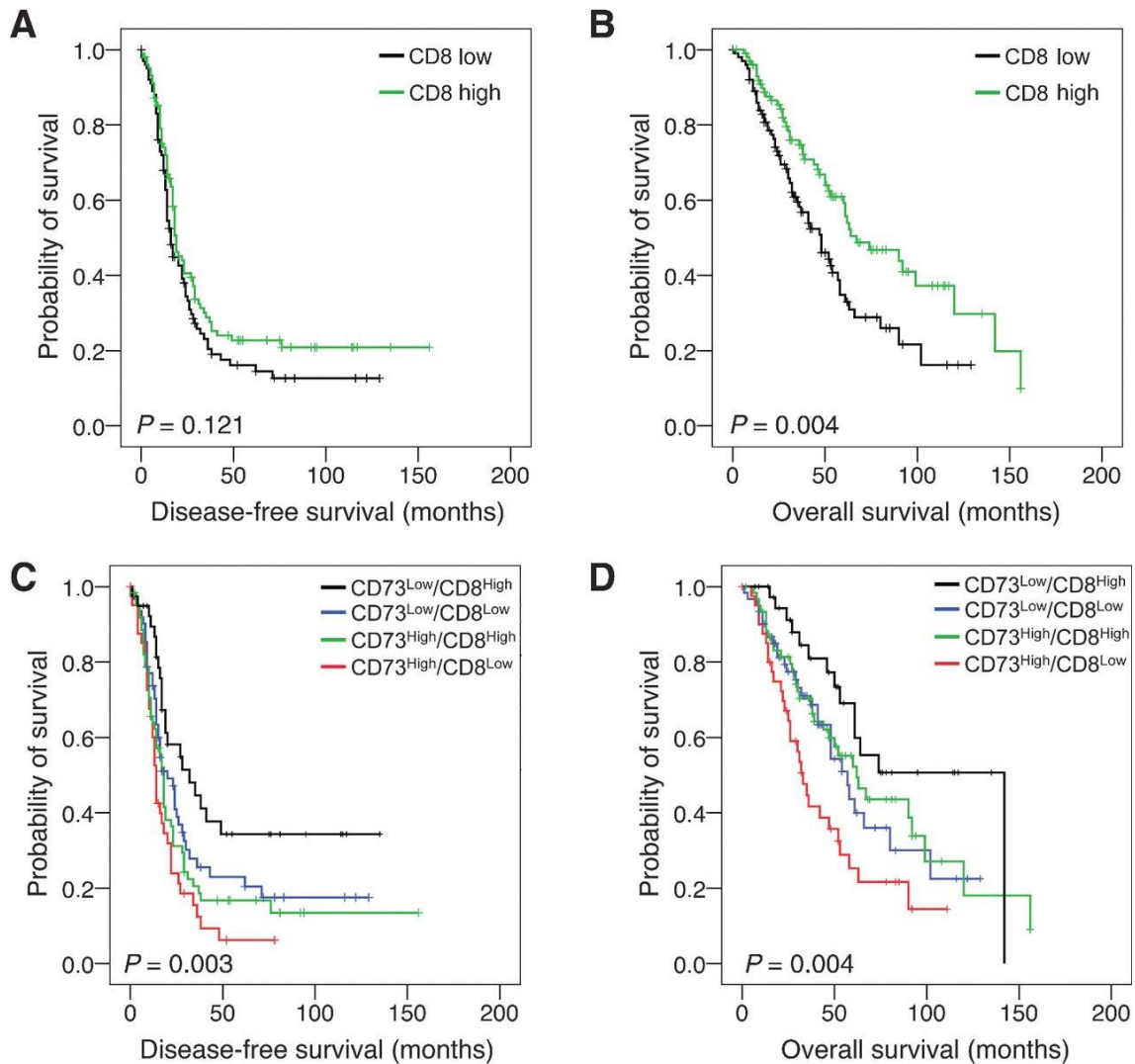


Figure 5.3 – CD73 expression in ovarian tumor cells enhances the prognostic value of intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells. (A-B) Intraepithelial CD8<sup>+</sup> cell density was measured in the HGS tissue microarray and its prognostic impact assessed. (C) Association of CD73 expression in tumor cells and intraepithelial CD8<sup>+</sup> cell density with disease-free survival and (D) overall survival. Significance of differences in survival between patients groups was estimated by log-rank test. Medians were used as cut-offs.

### **CD73 promotes ovarian tumor cell growth**

Because ovarian tumor cells can express high levels of CD73 (Fig. 5.4A), we next investigated the impact of CD73 expression on tumor cell growth using shRNA gene silencing (Fig. 5.4B). As shown in Fig. 5.4C, CD73 gene silencing (Fig. 5.4B) significantly suppressed the proliferation of SKOV3 cells. Similar results were obtained with OV4485 cells (suppl. Fig. S5.5A). Consistent with these results, CD73 rescued expression (suppl. Fig. S5.5B) in SKOV3 cells, or treatment with exogenous CADO, a stable adenosine analogue, significantly enhanced tumor cell proliferation (Fig. 5.4D-E). While CD73 gene silencing had minimal impact on cyclin D1 gene expression (Fig. 5.4F), it significantly down regulated anti-apoptotic BCL-2 and BCL-XL expression and slightly albeit not-significantly down regulated MCL-1 expression (Fig. 5.4G-I). Consistent with these results, exogenous CADO enhanced BCL2, BCLXL and MCL-1 gene expression (Fig. 5.4J). Taken together, our data demonstrated that CD73 expression and extracellular adenosine promote ovarian tumor cell growth. Further studies are required to decipher the role of CD39 and adenosine receptors, which can be expressed on ovarian tumor cells (suppl. Fig. S5.6).

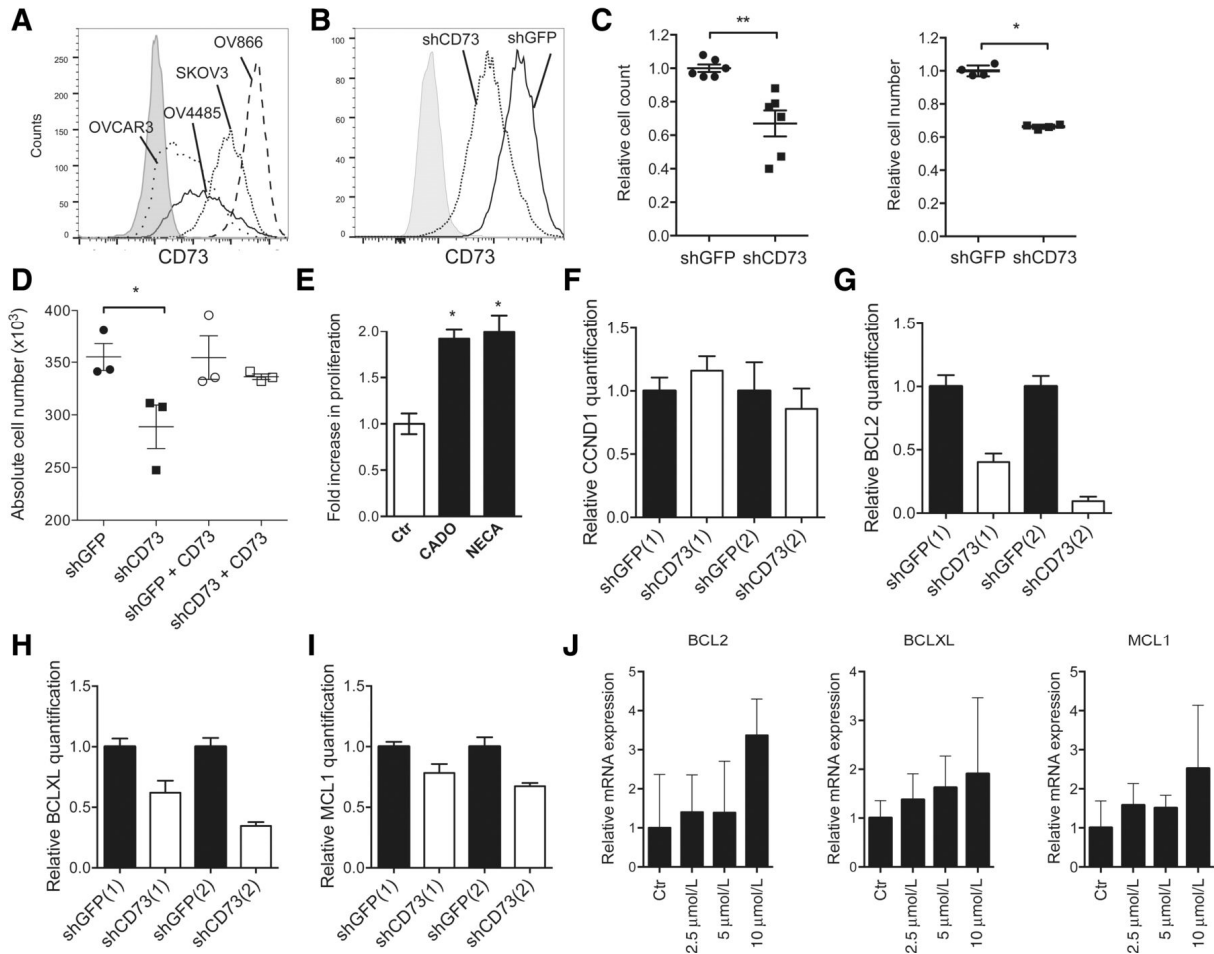


Figure 5.4 – CD73 promotes ovarian tumor cell proliferation. (A) CD73 expression levels on human ovarian cancer cell lines were measured by flow cytometry. (B) CD73 gene-silencing in SKOV3 cells was performed using a short-hairpin (sh)RNA-encoding plasmid targeting CD73 (or GFP as control). (C) SKOV3-shCD73 and SKOV3-shGFP cells were maintained in 3D cultures (left panel) or standard 2D cultures (right panel) and proliferation measured after 5 days or 3 days, respectively (3D data represent a pool of 2 independent experiments; 2D data represent individual replicates of one representative experiment; \*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$  by Mann-Whitney; means  $\pm$  standard errors are shown). (D) CD73 re-expression in SKOV3-shCD73 restored cell proliferation in 5 days assays (\*:  $p < 0.05$ ; means  $\pm$  standard errors are shown). (E) Treatment of SKOV3 cells with CADO (20  $\mu\text{M}$ ) or NECA (100  $\mu\text{M}$ ) increased cell proliferation in 3 days assays (\*:  $p < 0.05$ ; means  $\pm$  standard errors are shown). (F-I) Real-time PCR was performed on SKOV3-shCD73 and SKOV3-shGFP cells or (J) SKOV3 cells treated with CADO for 3 days. Expression of each gene is normalised to 18S and relative mean expression to SKOV3-shGFP cells or control is shown (error bars represent 95 % CI).

### **CD73-expressing cancer associated fibroblasts (CAFs) promote tumor growth in mice**

Our IF analysis revealed that CD73 could be expressed on tumor cells (Fig. 5.2A) and CAFs (suppl. Fig. S5.7A). When we evaluated the prognostic impact of CD73 expression on CAFs, we observed that high levels were associated with worse prognosis (Fig. 5.5A; mean  $\pm$  SD:  $37.85 \pm 6.6$  vs  $28.71 \pm 6.6$  months;  $P = 0.05$  by log rank). To test whether CD73 expression on CAFs was involved in suppressing anti-tumor immunity, we utilized the ID8 mouse model of ovarian cancer, which expresses CD73 at low levels and produces low levels of adenosine *in vitro* (suppl. Fig. S5.7B), and primary mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from wild type and CD73-deficient mice as a model of CAFs. Flow cytometry confirmed CD73 expression on wild type fibroblasts (suppl. Fig. S5.7C). While CD73 expression on MEF had no effect on ID8 cell proliferation *in vitro* (suppl. Fig. S5.7D), CD73 expression on MEF significantly enhanced ID8 tumorigenesis in immunocompetent mice (Fig. 5.5B-C; suppl. Fig. S5.7E). As shown in Fig. 5.5D, this pro-tumorigenic effect of CD73-expressing MEF was lost in immunodeficient Rag2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> mice, suggesting an immune-dependent mechanism.

### **CD73 expression by CAFs promotes tumor immune escape in mice**

To validate that CD73 expression on MEF promoted ID8 tumor immune escape, we generated ovalbumin-expressing ID8 cells to monitor ovalbumin-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses (suppl. Fig. S5.8), and co-injected ID8-OVA tumor cells with wild type or CD73-deficient MEF. As shown in Fig. 5.5E, CD73-expressing MEF significantly inhibited tumor-specific CD8<sup>+</sup> T cells responses against ID8-OVA tumors. Our data thus demonstrated that CD73 expression by MEF significantly suppressed CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunosurveillance of ID8 ovarian cancer in mice, thereby promoting tumor growth.

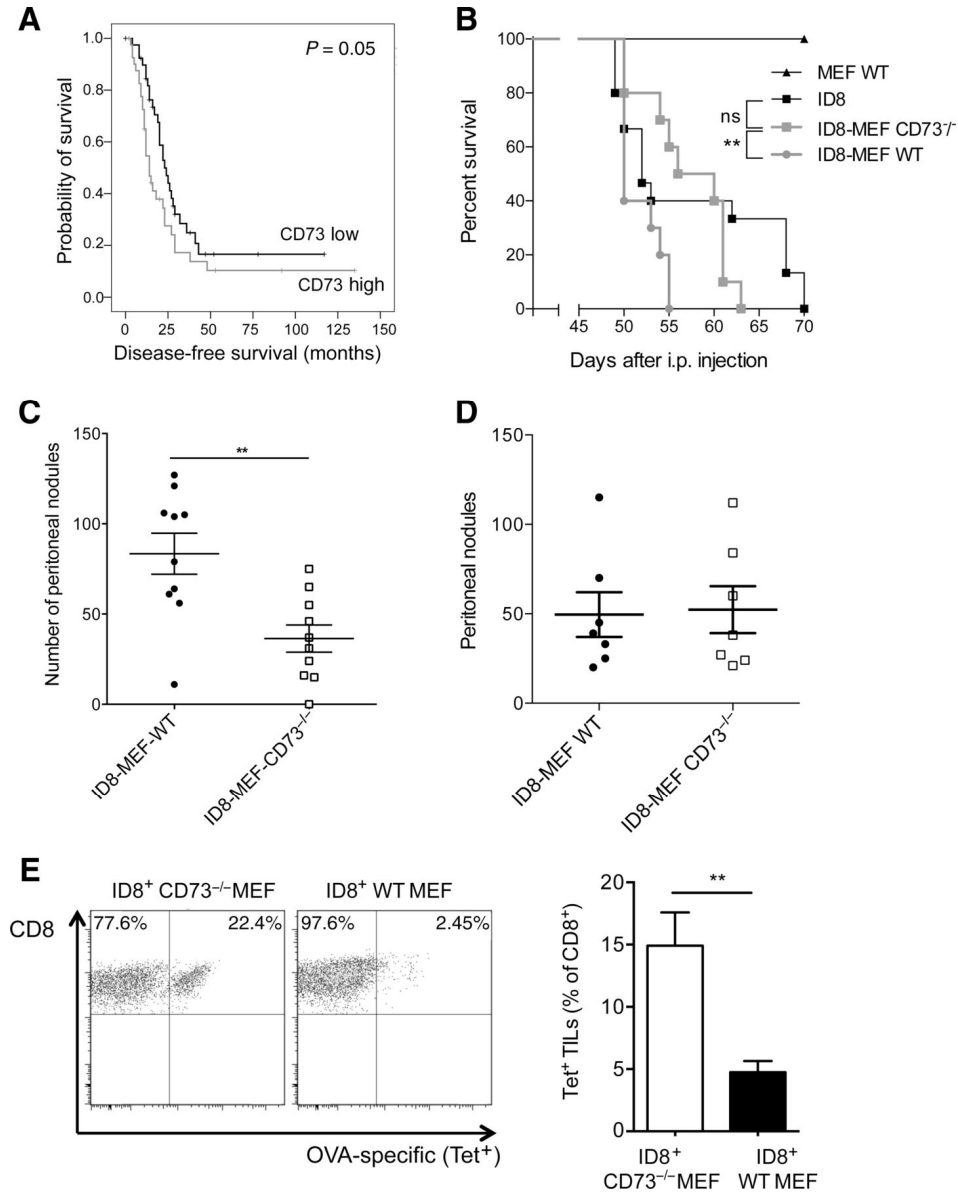


Figure 5.5 – CD73-expressing cancer-associated fibroblasts (CAFs) promote ovarian cancer. (A) CD73 protein expression in CAFs (cytokeratin-7/18 neg) was quantified by immunofluorescence and its prognostic value evaluated. Significance of differences in survival between patients groups was estimated by log-rank test (High: top 20 %). (B) ID8 cells ( $5 \times 10^6$ ) with or without MEF ( $5 \times 10^6$ ) were re-suspended in 200  $\mu$ l of PBS, co-injected intraperitoneally into wild type C57Bl/6 mice ( $n=10$  per group) and overall survival estimated by log-rank test (\*\*:  $p < 0.01$ ). (C) Same as (B), except that mice were euthanized at day 60 for peritoneum nodules count (means  $\pm$  standard errors are shown; \*:  $p < 0.05$  by Mann-Whitney). (D) Same as (C), except that immunodeficient Rag2<sup>-/-</sup>  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> mice were injected. (E) Wild type C57Bl/6 mice were injected subcutaneously with a mix of  $5 \times 10^6$  ID8-OVA cells and  $5 \times 10^6$  MEF, tumors were collected after 24 days and single cell suspensions analyzed by flow cytometry. Percentages of OVA-specific tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> specific are shown (means  $\pm$  standard errors are shown; \*\*:  $p < 0.01$  by Mann-Whitney).

## 5.5 Discussion

HGS ovarian cancer is the most common and lethal histotype of all ovarian cancer with a 5-years survival rate of only 30 % (28). There has been little improvement in overall survival for several decades, emphasizing the need for new treatments (29).

Several studies have shown that TILs, in particular CD8<sup>+</sup> T cells, are associated with improved clinical outcomes in HGS (2, 3, 30). This suggests that HGS ovarian cancer may be amendable to immune-based therapy. Nevertheless, the microenvironment of ovarian tumors is highly immunosuppressive. Accordingly, T regulatory cells (Treg), B7-H4 expressing macrophages and PD-L1 expression on tumor cells have all been associated with poor survival in ovarian cancer patients (31-33). Another immunosuppressive pathway potentially involved in ovarian cancer is the production of extracellular adenosine by the ecto-nucleotidase CD73 (34).

CD73 is a GPI-anchored enzyme that generates extracellular adenosine, a potent immunosuppressive metabolite in the tumor microenvironment [reviewed in (35)]. CD73 has been shown to suppress anti-tumor T cells in the ovarian cancer setting (27, 36). Monoclonal antibody treatment targeting CD73 has been shown to delay ovarian tumor growth in mice and to rescue human T cell functions when co-cultured with CD73-expressing human ovarian cancer cells (11, 16).

Our current study revealed that CD73 is significantly associated with a poor prognosis in HGS ovarian cancer. Both gene expression and protein expression analyses confirmed the prognostic importance of CD73 in HGS ovarian cancer. Interestingly, we observed that CD73 gene expression, in contrast to PD-L1, was highest in the C1 molecular subtype, characterized by an activated stroma and poor outcome. The C1 subtype contains markers of activated myofibroblasts, vascular endothelial cells, pericytes, and enrichment of pathways defining extracellular matrix production and angiogenesis (21). A important feature of the C1 subtype is that despite its poor prognosis, it displays a prominent immune gene expression signature (21), suggesting the presence of immunosuppressive mechanisms keeping anti-tumor immunity at check. The fact that C1 tumors express high levels of CD73 may explain why C1 tumors have poor prognosis despite having TILs. In support of an immunosuppressive role for CD73 in HGS



ovarian tumors, we found that the prognostic value of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> cells was restricted to tumors with low levels of CD73. While we recognize that core samples used in TMAs may not account for tumor heterogeneity, our data suggest that when CD73 is expressed at high levels in tumors, tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> cells fail to control tumor progression. This is further supported by the fact that CD73 expression by tumor cells (11) and associated fibroblasts (Fig. 5.6) inhibit CD8<sup>+</sup> T cell-mediated immunosurveillance in pre-clinical models of ovarian cancer.

Stromal expression of CD73 has been previously described in the mammary gland (37), but its effect on tumorigenesis was never investigated. Using the ID8 mouse model of ovarian cancer and primary MEF derived from wild type or CD73-deficient mice as a model of CAFs, we demonstrated that CD73 expression in MEF significantly enhanced ID8 tumorigenesis *in vivo* and promoted immune escape from CD8<sup>+</sup> T cells. Our study is thus consistent with recent reports that in the tumor microenvironment, CAFs are important regulators of tumor immunity (38).

Another finding of our study is the observation that CD73 gene expression is strongly correlated with an EMT gene signature, consistent with a recent study in gallbladder cancer cells (18). CD73 has been shown to be upregulated on human mammary epithelial cells stably expressing the EMT-inducers Twist, Snail or TGF- $\beta$ 1 (39). As EMT is increasingly being recognized as an important process in ovarian cancer, especially in promoting the invasion of ovarian tumor cells into the mesothelial cell lining of the peritoneal cavity (40), further work should be required to decipher the role of CD73 in EMT. Interestingly, tumors that express a mesothelial clearance-EMT gene signature generally fall into the C1 molecular subtype of ovarian cancer (40). This is consistent with our observation that CD73 expression is associated with both C1 and EMT gene signatures. Inhibiting EMT is a potentially promising therapeutic approach, as it may maintain tumor cells in a lower-grade state, thereby increasing efficacy of standard treatments. However, the development of EMT inhibitors remains a challenge, as current targets consist of transcription factors.

In conclusion, our study validates CD73 as a potential target in HGS ovarian cancer. We found that when CD73 is expressed at high levels in HGS ovarian tumors, patients' survival is decreased and, importantly, the presence of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> cells no longer correlates

with better prognosis. Taken together with previous studies (11), our study suggests that CD73 blockade might be a relevant strategy to enhance the anti-tumor function of CD8<sup>+</sup> T cells in HGS ovarian cancer. Our study thus sheds new light on the pro-tumorigenic effects of CD73 in ovarian cancer.

## **5.6 Grant support**

Tumor banking was supported by the Banque de tissus et données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fond de recherche du Québec–Santé (FRQS), associated with the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). J. Stagg, A.-M. Mes-Masson, and D. Provencher are researchers of the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal, which receives support from the FRQS. J. Stagg is supported by Operating Grants from the Cancer Research Society and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). J. Stagg is supported by the Chaire de Recherche Famille Jean-Guy Sabourin en Santé des Femmes. D.M.A. Gendoo is supported by a CIBC-Brain Canada Brain Cancer Research Training Award. G.M. Chen is supported by a Computational Biology Undergraduate Summer Student Health Research Award. B. Haibe-Kains was supported by the Gattuso Slight Personalized Cancer Medicine Fund at Princess Margaret Cancer Centre.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

## **5.7 Acknowledgments**

We recognize the generosity of patients that participated in the study. We are grateful to the Gynecology-Oncology and Pathology services of the CHUM-Hôpital Notre-Dame for tumor procurement. Tumor banking was supported by the Banque de tissus et données of the Réseau de recherche sur le cancer of the Fond de recherche du Québec – Santé (FRQS), associated with the Canadian Tumor Repository Network (CTRNet). J.S., A-M.M-M. and D.M.P. are

researchers of the Centre de recherche du Centre hospitalier de l'Université de Montréal which receive support from the FRQS. J.S. is supported by Operating Grants from the Cancer Research Society and the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). J.S. is supported by the Chaire de Recherche Famille Jean-Guy Sabourin en Santé des Femmes. D.M.A.G. is supported by a CIBC-Brain Canada Brain Cancer Research Training Award. G.M.C. is supported by a Computational Biology Undergraduate Summer Student Health Research Award. B.H.K was supported by the Gattuso Slight Personalized Cancer Medicine Fund at Princess Margaret Cancer Centre. We thank Dr. David D.L. Bowtell (Peter MacCallum Cancer Centre) for his suggestions.

## 5.8 References

1. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin.* 2009;59:225-49.
2. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003;348:203-13.
3. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol.* 2012;124:192-8.
4. Clarke B, Tinker AV, Lee CH, Subramanian S, van de Rijn M, Turbin D, et al. Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol.* 2009;22:393-402.
5. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Matsumura N, et al. Efficacy and safety of anti-PD-1 antibody (Nivolumab: BMS-936558, ONO-4538) in patients with platinum-resistant ovarian cancer. 2014 ASCO Annual Meeting; 2014; Chicago, Illinois, USA: *J Clin Oncol*; 2014.
6. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res.* 2013;73:3591-603.

7. Holmgaard RB, Zamarin D, Munn DH, Wolchok JD, Allison JP. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J Exp Med.* 2013;210:1389-402.
8. Stagg J, Beavis PA, Divisekera U, Liu MC, Moller A, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res.* 2012;72:2190-6.
9. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, et al. CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res.* 2011;71:2892-900.
10. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, et al. Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107:1547-52.
11. Wang L, Fan J, Thompson LF, Zhang Y, Shin T, Curiel TJ, et al. CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest.* 2011;121:2371-82.
12. Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I, Stagg J. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2014;134:1466-73.
13. Allard B, Turcotte M, Stagg J. Targeting CD73 and downstream adenosine receptor signaling in triple-negative breast cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2014;18:863-81.
14. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, et al. Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73<sup>+</sup> tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:14711-6.
15. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:11091-6.
16. Hausler SF, Del Barrio IM, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Honig A, et al. Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am J Transl Res.* 2014;6:129-39.

17. Lu XX, Chen YT, Feng B, Mao XB, Yu B, Chu XY. Expression and clinical significance of CD73 and hypoxia-inducible factor-1alpha in gastric carcinoma. *World Gastroenterol.* 2013;19:1912-8.
18. Xiong L, Wen Y, Miao X, Yang Z. NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell Tissue Res.* 2014;355:365-74.
19. Wu XR, He XS, Chen YF, Yuan RX, Zeng Y, Lian L, et al. High expression of CD73 as a poor prognostic biomarker in human colorectal cancer. *J Surg Oncol.* 2012;106:130-7.
20. Oh HK, Sin JI, Choi J, Park SH, Lee TS, Choi YS. Overexpression of CD73 in epithelial ovarian carcinoma is associated with better prognosis, lower stage, better differentiation and lower regulatory T cell infiltration. *J Gynecol Oncol.* 2012;23:274-81.
21. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, et al. Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res.* 2008;14:5198-208.
22. Hatami R, Sieuwerts AM, Izadmehr S, Yao Z, Qiao RF, Papa L, et al. KLF6-SV1 drives breast cancer metastasis and is associated with poor survival. *Sci Transl Med.* 2013;5:169ra12.
23. Ganzfried BF, Riester M, Haibe-Kains B, Risch T, Tyekucheva S, Jazic I, et al., curatedOvarianData: clinically annotated data for the ovarian cancer transcriptome. *Database* 2013;2013:bat013.24.
24. Schröder MS, Culhane AC, Quackenbush J, Haibe-Kains B. "survcomp: an R/Bioconductor package for performance assessment and comparison of survival models." *Bioinformatics* 2011;27:3206–8
25. Rustin GJ, Vergote I, Eisenhauer E, Pujade-Lauraine E, Quinn M, Thigpen T, et al. Definitions for response and progression in ovarian cancer clinical trials incorporating RECIST 1.1 and CA 125 agreed by the Gynecological Cancer Intergroup (GCIg). *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21:419-23.

26. Kelm JM, Timmins NE, Brown CJ, Fussenegger M, Nielsen LK. Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types. *Biotechnol Bioeng.* 2003;83:173-80.
27. SF, Montalban del Barrio I, Strohschein J, Anoop Chandran P, Engel JB, Honig A, et al. Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother.* 2011;60:1405-18.
28. Kobel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Santos JL, Swenerton KD, Seidman JD, et al. Differences in tumor type in low-stage versus high-stage ovarian carcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2010;29:203-11.
29. Vaughan S, Coward JI, Bast RC, Jr., Berchuck A, Berek JS, Brenton JD, et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:719-25.
30. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, et al. Intraepithelial CD8<sup>+</sup> tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8<sup>+</sup>/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:18538-43.
31. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, et al. The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:8326-31.
32. Kryczek I, Wei S, Zhu G, Myers L, Mottram P, Cheng P, et al. Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 2007;67:8900-5.
33. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Yoshioka Y, Matsumura N, Baba T, et al. PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction. *Clin Cancer Res.* 2013;19:1363-74.
34. Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res.* 2013;19:5626-35.
35. Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene.* 2010;29:5346-58.

36. Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, et al. CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res.* 2010;70:2245-55.
37. Kruger KH, Thompson LF, Kaufmann M, Moller P. Expression of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in normal mammary gland and in breast carcinoma. *Br J Cancer.* 1991;63:114-8.
38. Fearon DT. The carcinoma-associated fibroblast expressing fibroblast activation protein and escape from immune surveillance. *Cancer Immunol Res.* 2014; 2(3):187-93.
39. Battula VL, Evans KW, Hollier BG, Shi Y, Marini FC, Ayyanan A, et al. Epithelial-mesenchymal transition-derived cells exhibit multilineage differentiation potential similar to mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2010;28:1435-45.
40. Davidowitz RA, Selfors LM, Iwanicki MP, Elias KM, Karst A, Piao H, et al. Mesenchymal gene program-expressing ovarian cancer spheroids exhibit enhanced mesothelial clearance. *J Clin Invest.* 2014;124:2611-25.
41. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun.* 2013;4:2126.

## 5.9 Supplementary figures

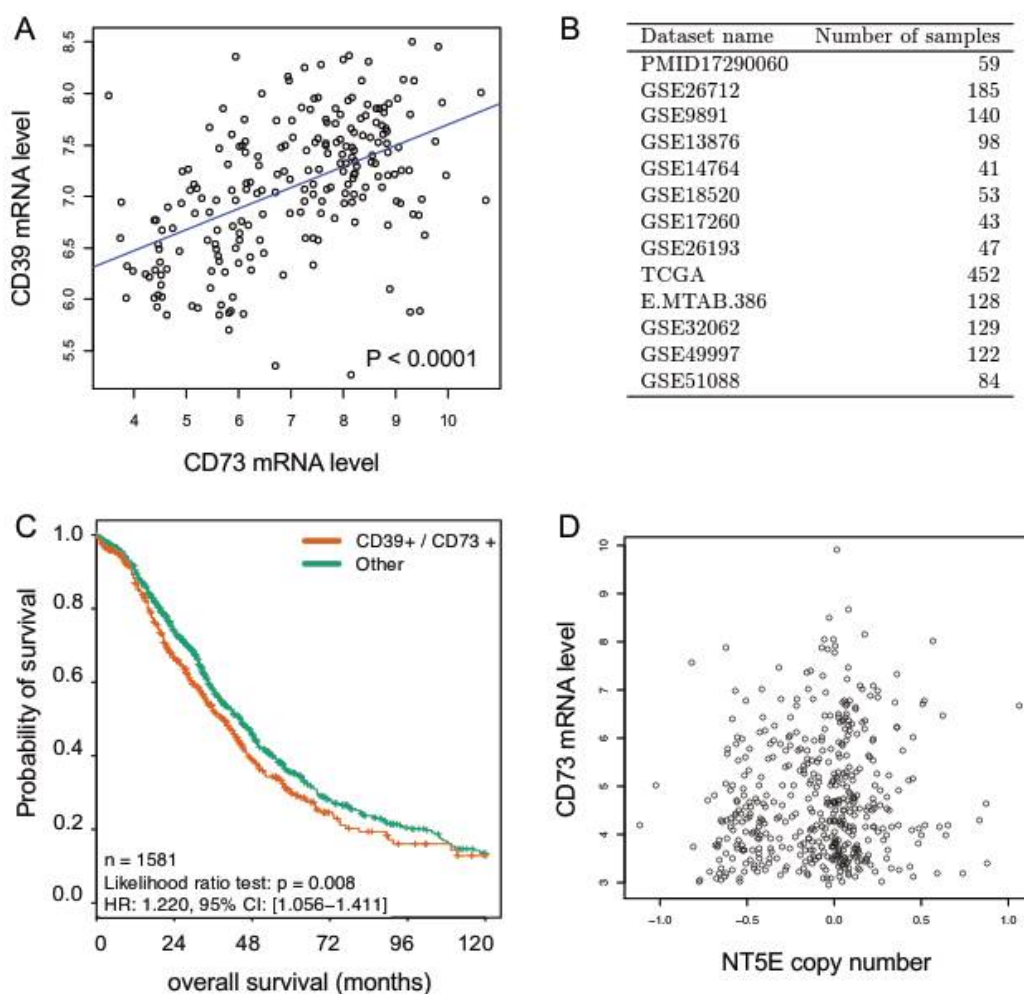


Figure S5.1 – CD73 and CD39 gene expression analysis in HGS ovarian cancer. (A) Correlation analysis between CD73 gene expression and CD39 gene expression in the AOCS dataset. (B) Gene expression and survival data from 13 independent ovarian cancer gene expression datasets were standardized as described in Ganzfried, B.F. et al. (22). (C) The prognostic value of CD73 in combination with CD39 was assessed using median-dichotomized expression values of CD73 and CD39. Patients with both genes expressed in the respective higher quantiles were assigned to the “CD39<sup>+</sup> / CD73<sup>+</sup>” group. Cox proportional hazards model on the CD73 tertiles and likelihood ratio test were performed. (D) Correlation analysis between CD73 gene expression and copy number variations in the AOCS dataset ( $P > 0.1$ ).



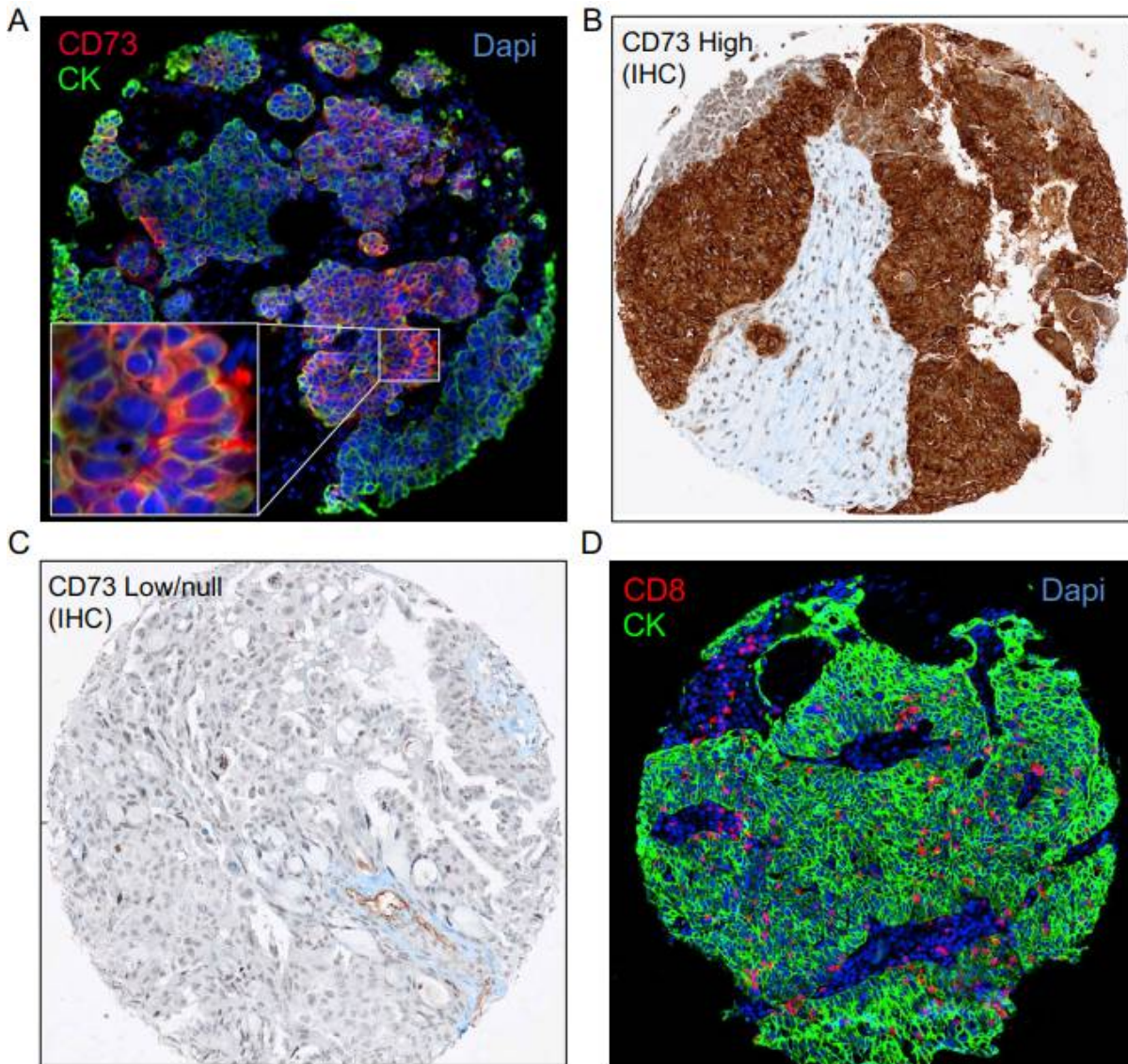


Figure S5.2 – Analysis of CD73 and CD8 protein expression on tissue microarray. (A) CD73 expression (red) and epithelial cytokeratin-7/18 expression (green) were co-analyzed by immunofluorescence (IF). (B-C) Immunohistochemistry of CD73 expression in two HGS tumors on TMA corresponding to a CD73-High tumor and a CD73-Low/null tumor by IF, respectively. (D) CD8 expression (red) and epithelial cytokeratin-7/18 expression (green) were co-analyzed and epithelial CD8<sup>+</sup> cell density for each core was evaluated as the count of CD8<sup>+</sup> object in the epithelial area.

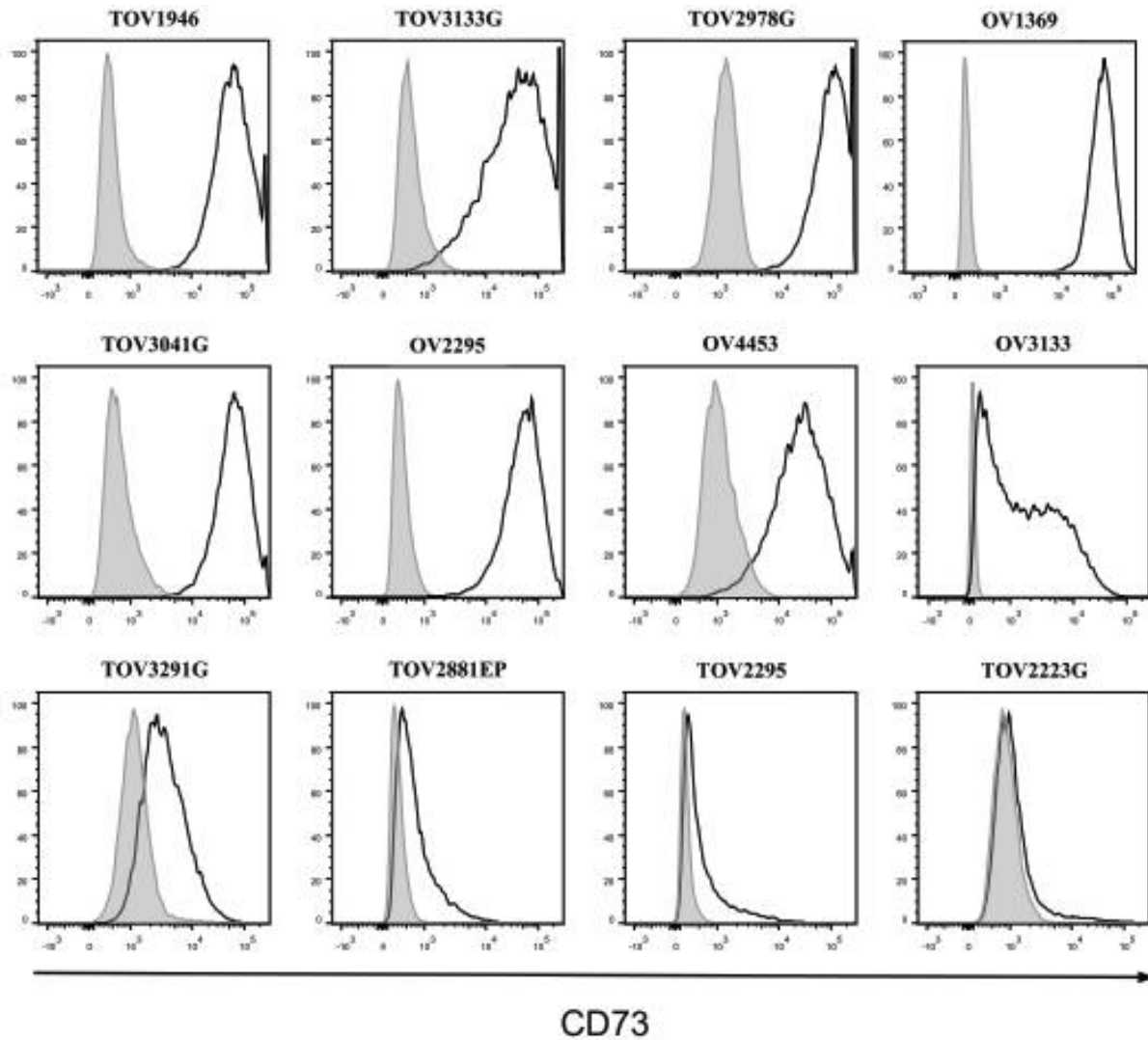


Figure S5.3 – Flow cytometry analysis of CD73 expression on 12 human ovarian cancer cell lines. Unstained cells shown in gray.

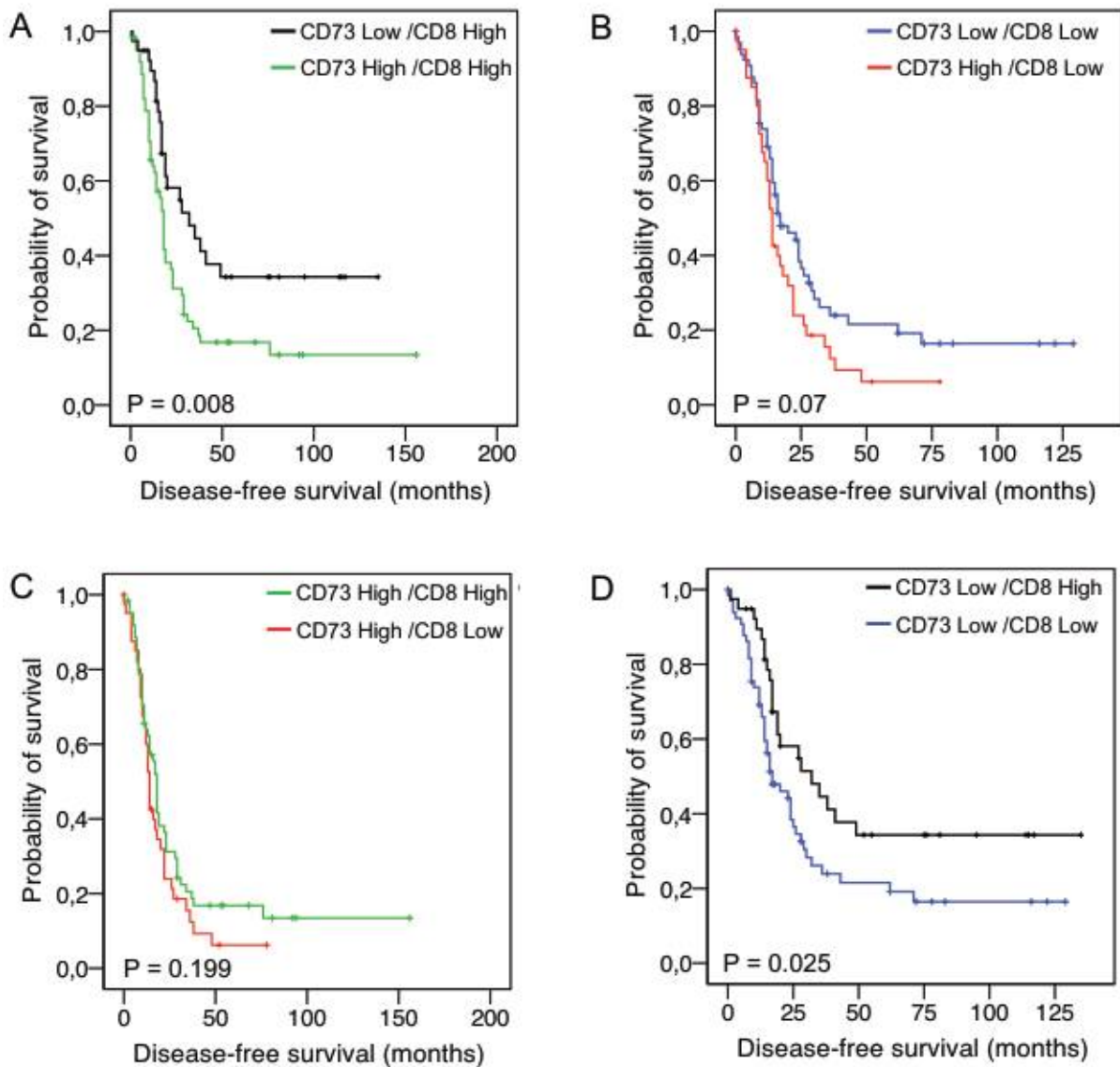


Figure S5.4 – CD73 expression hinders the prognostic impact of intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells. (A) Prognostic value of tumor CD73 expression in ovarian tumors with high levels of intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells. (B) Prognostic value of tumor CD73 expression in ovarian tumors with low levels of intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells. (C) Prognostic value of intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells in tumors with high levels of CD73. (D) Prognostic value of intraepithelial CD8<sup>+</sup> cells in tumors with low levels of CD73. Significance of differences in survival between patients groups was estimated by log-rank test. Medians were used as cut-offs.

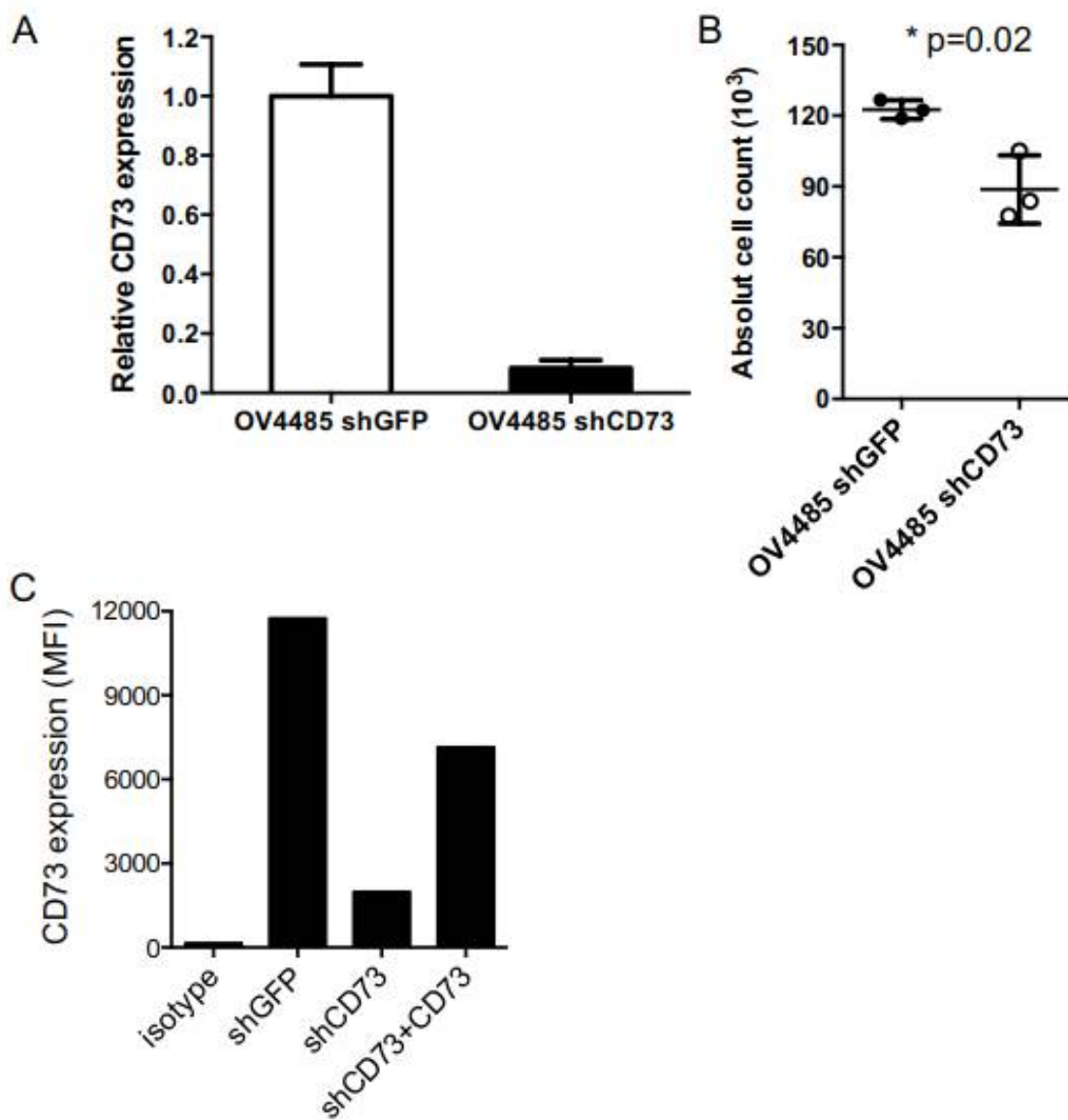


Figure S5.5 – OV4485 cell line analysis. (A) CD73 gene silencing in OV4485 human ovarian cancer cell line was measured by quantitative PCR (relative mean expression to shGFP cells is shown; error bars represent 95 % CI). (B) OV4485-shCD73 and OV4485-shGFP cells were plated in standard culture conditions and proliferation measured after 5 days (P = 0.02 by Mann-Whitney; means  $\pm$  standard errors are shown). (C) CD73 re-expression in SKOV3-shCD73 cells was measured by flow cytometry.

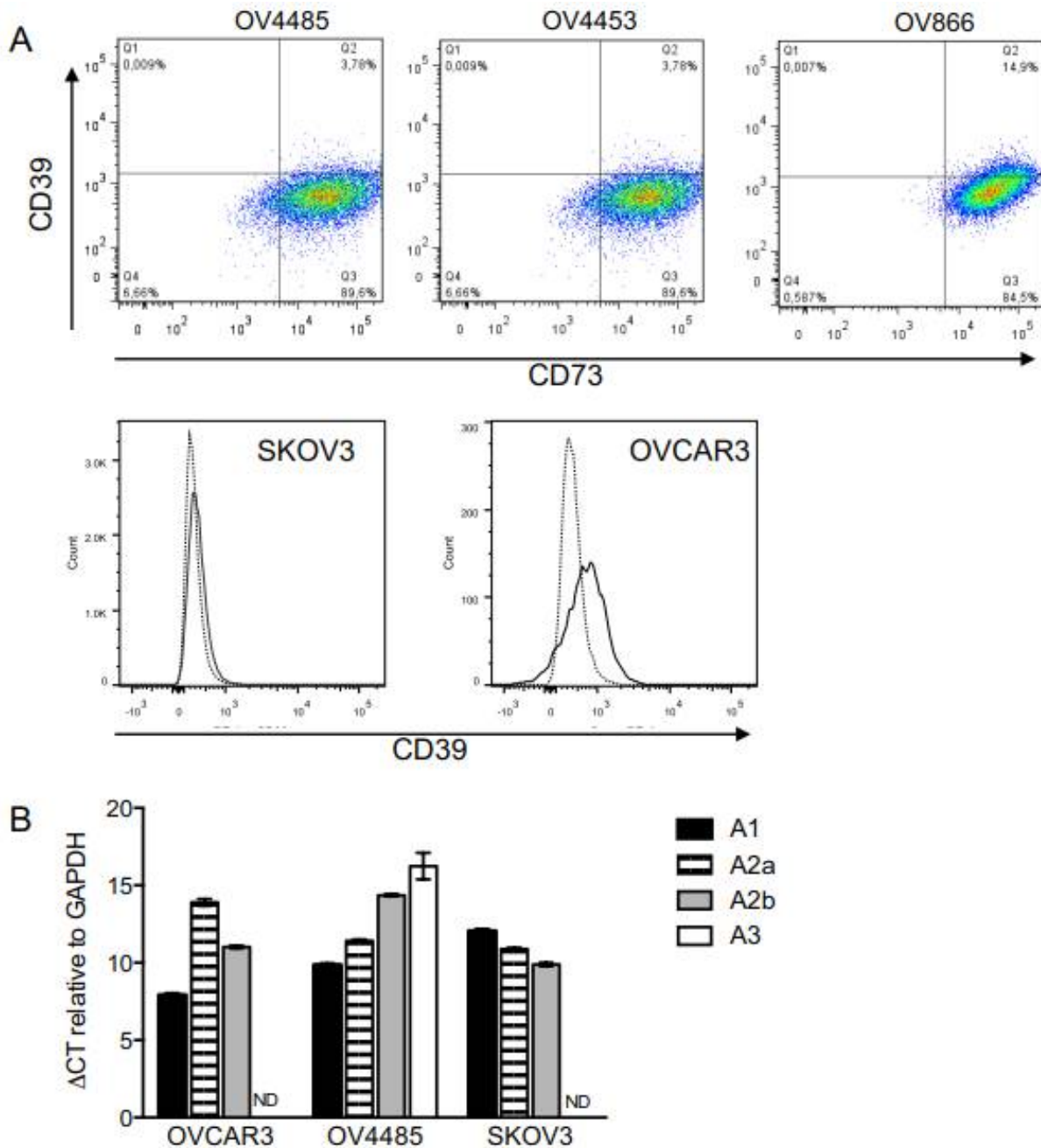


Figure S5.6 – Adenosine receptors on ovarian cancer cell lines. (A) Flow cytometry analysis of CD39 expression in 5 human ovarian cancer cell lines (unstained cells shown in dotted lines). (B) Expression of adenosine receptors in ovarian cancer cells was measured by quantitative PCR (relative to GAPDH expression; error bars represents 95 % CI; ND: not detected).

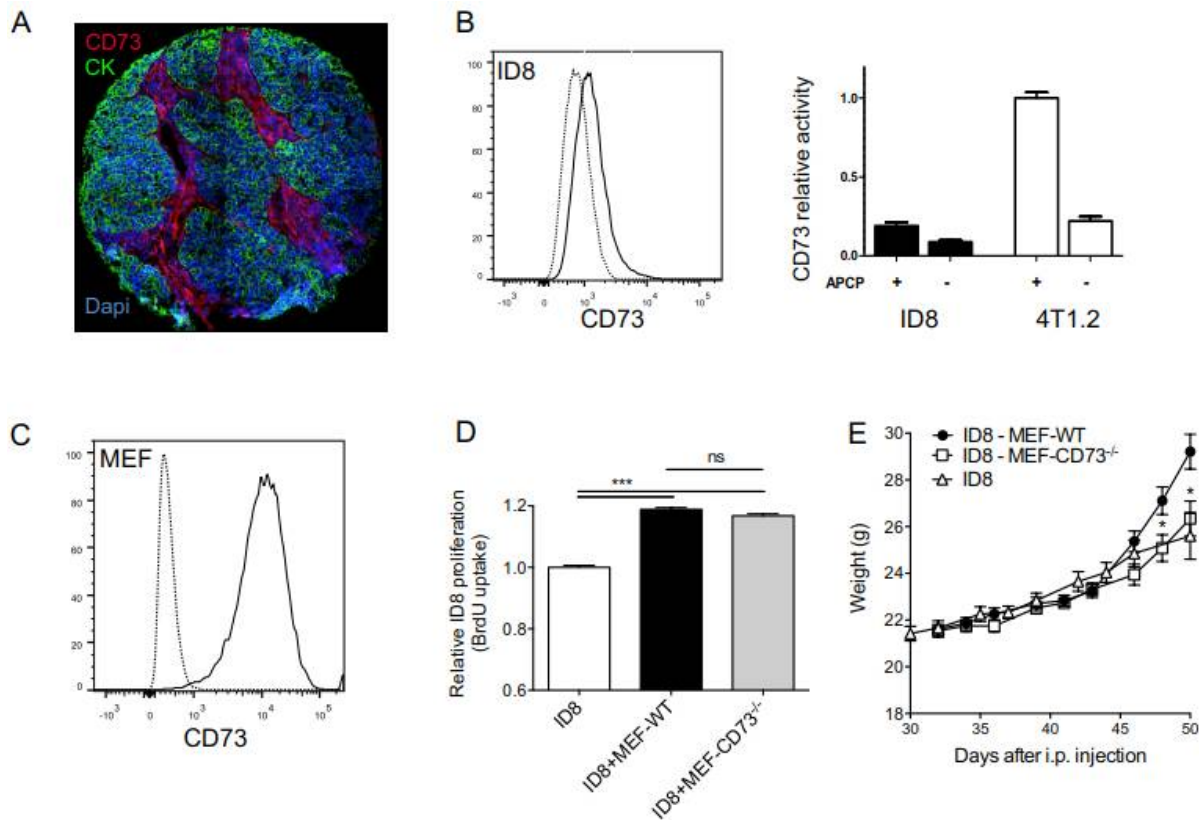


Figure S5.7 – CD73 expression analysis in the *in vitro* and tumor proliferation. (A) CD73 expression (red) and epithelial cytokeratin-7/18 expression (green) in HGS ovarian tumors were co-analyzed by immunofluorescence. Representative staining of CD73 expression in the stroma is shown. (B) Flow cytometry analysis of CD73 expression (dotted line shows unstained cells) and CD73 activity (relative to 4T1.2 mouse breast cancer cells with or without 100  $\mu$ M APCP) in ID8 ovarian tumor cells. (C) Flow cytometry analysis of CD73 expression on primary wild type mouse embryonic fibroblasts (dotted line shows unstained cells). (D) ID8 mouse ovarian cancer cells were mixed at a ratio of 1:1: with wild type or CD73-deficient mouse embryonic fibroblasts (MEF) and incubated for 48 h. Co-cultures were then exposed 1h to BrdU and analyzed for BrdU incorporation by flow cytometry. Relative ID8 proliferation is shown (means  $\pm$  standard errors are shown; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). (E) ID8 cells ( $5 \times 10^6$ ) with or without MEF ( $5 \times 10^6$ ) were re-suspended in 200  $\mu$ l of PBS and co-injected intraperitoneally into C57Bl/6 mice ( $n=10$  per group). Weights of mice were measured 3 times per week (means  $\pm$  standard errors are shown; \*:  $p < 0.05$  by Mann-Whitney).

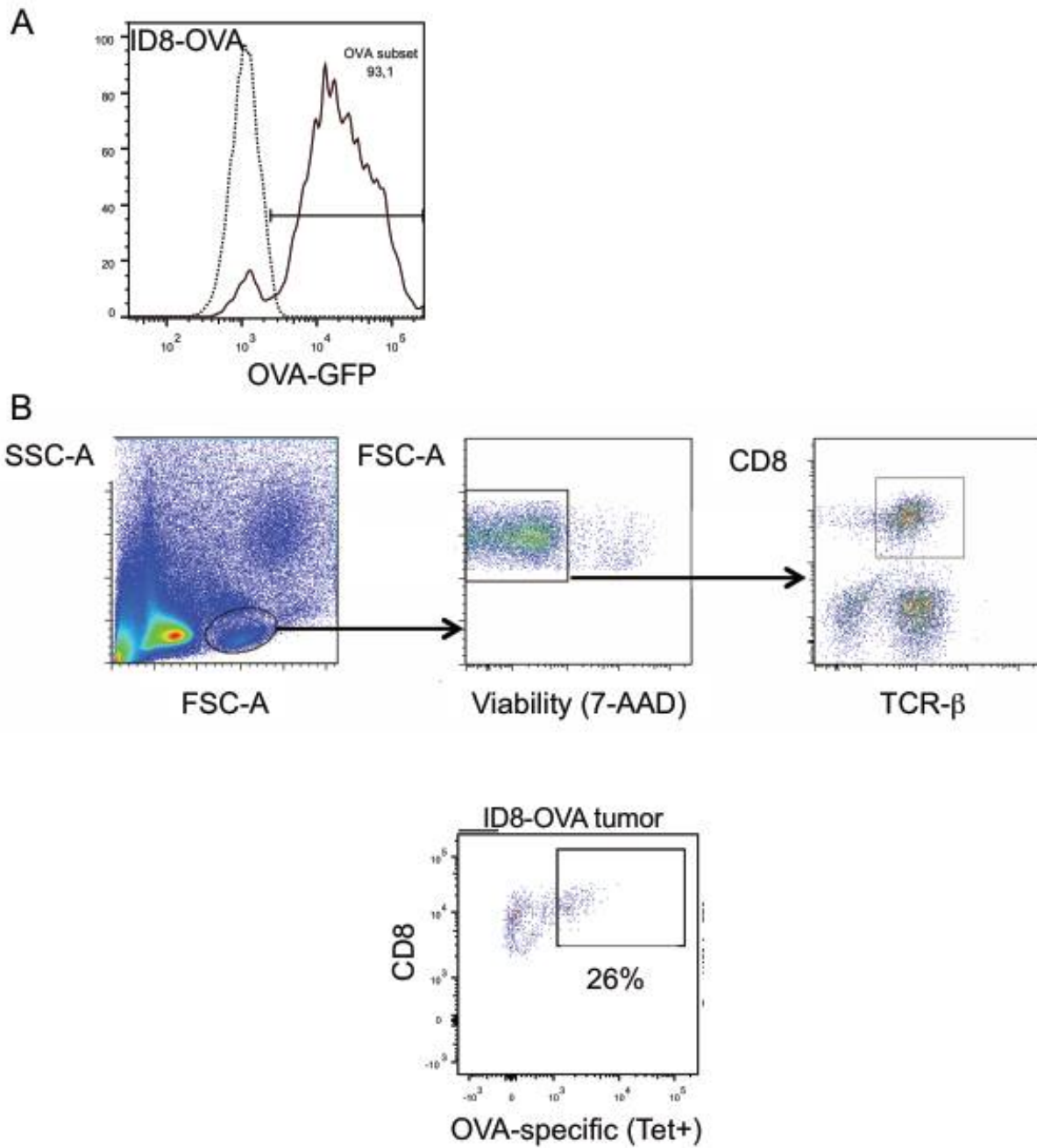


Figure S5.8 – Flow cytometry analysis of ID8-OVA. (A) ID8 cells were retrovirally gene-modified to express OVA-GFP and analyzed for GFP expression by flow cytometry (dotted line shows parental cells). (B) Gating strategy and representative CD8 $\alpha$ , TCR- $\beta$  and H-2Kb-SIINFEKL tetramer staining in ID8-OVA tumors without MEF.

## **Chapitre 6 – CD73 promotes resistance to HER2/ErbB2 antibody therapy**

Martin Turcotte<sup>1,2,3</sup>, David Allard<sup>1,2,3</sup>, Deepak Mittal<sup>4,5</sup>, Yacine Bareche<sup>6,7</sup>, Laurence Buisseret<sup>6,7</sup>, Vinu José<sup>6,7</sup>, Sandra Pommey<sup>1,2,3</sup>, Vincent Delisle<sup>1,2,3</sup>, Sherene Loi<sup>8,9</sup>, Heikki Joensuu<sup>10</sup>, Pirkko-Liisa Kellokumpu-Lehtinen<sup>11</sup>, Christos Sotiriou<sup>6,7</sup>, Mark J. Smyth<sup>4,5</sup> and John Stagg<sup>1,2,3</sup>.

1. Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Québec, Canada.
2. Institut du Cancer de Montréal, Montréal, Québec, Canada.
3. Faculté de Pharmacie, Université de Montréal, Québec, Canada.
4. Immunology in Cancer and Infection Laboratory, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Herston, 4006 Queensland, Australia.
5. School of Medicine, University of Queensland, Herston, 4006 Queensland, Australia.
6. Molecular Immunology Unit, Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium
7. Breast Cancer Translational Research Laboratory J.-C. Heuson, Institut Jules Bordet, Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.
8. Cancer Immunology Program, Peter MacCallum Cancer Centre, East Melbourne, Victoria, Australia.
9. Sir Peter MacCallum Department of Oncology, University of Melbourne, Parkville, Victoria, Australia.
10. Helsinki University Hospital and University of Helsinki, Helsinki, Finland.
11. Faculty of Medicine and Life Sciences, University of Tampere, Tampere, Finland.

Funding support: JS received a Project Grant from the Canadian Institutes for Health Research (CIHR). JS received a salary award from the CIHR and support from the Jean-Guy Sabourin Research Chair in Pharmacology. MT received a doctoral scholarship from the Fonds de Recherche du Québec – Santé (FRQS). MJS was supported by a National Health and Medical Research Council of Australia (NH&MRC) Senior Principal Research Fellowship (1078671) and Project Grant (1120887). JS and MJS were supported by the Susan G. Komen foundation



(IIR12221504). CS received a research grant from the Breast Cancer Research Foundation (BCRF) and from the Fonds de la Recherche Scientifique (FNRS). LB is fellow of the FNRS.

Conflict of interest: J. Stagg is a consultant and member of the Scientific Advisory Board for Surface Oncology Inc. M. J. Smyth has scientific research agreements with Bristol Myers Squibb, Corvus Pharmaceuticals and Aduro Biotech; and is a scientific advisory board member for F-star, Kymab, and Arcus Biosciences.

## 6.1 Abstract

Expression of the ectonucleotidase CD73 by tumor cells, stromal cells, and immune cells is associated in cancer with immune suppression. In this study, we investigated the role of CD73 on the activity of the anti-HER2/ErbB2 monoclonal antibody (mAb) trastuzumab. In a prospective randomized phase III clinical trial evaluating the activity of trastuzumab, high levels of CD73 gene expression associated significantly with poor clinical outcome. In contrast, high levels of PD-1 and PD-L1 associated with improved clinical outcome. In immunocompetent mouse models of HER2/ErbB2-driven breast cancer, CD73 expression by tumors cells and host cells significantly suppressed immune-mediated responses mediated by anti-ErbB2 mAb. Further, anti-CD73 mAb therapy enhanced the activity of anti-ErbB2 mAb to treat engrafted or spontaneous tumors as well as lung metastases. Gene ontology enrichment analysis from gene expression data revealed a positive association of CD73 expression with extracellular matrix organization, TGF- $\beta$  genes, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) transcription factors and hypoxia-inducible-factor (HIF)-1 gene signature. Human mammary cells treated with TGF- $\beta$  or undergoing EMT upregulated CD73 cell-surface expression, confirming roles for these pathways. In conclusion, our findings establish CD73 in mediating resistance to trastuzumab and provide new insights into how CD73 is regulated in breast cancer.

## 6.2 Introduction

The ecto-5'-nucleotidase CD73 causes accumulation of extracellular adenosine in the tumor microenvironment (TME), thereby promoting tumor immune escape, metastasis and resistance to immune checkpoint inhibitors (1). Extracellular adenosine mediates its immunosuppressive activity essentially by activating the high affinity A2A and low affinity A2B receptors. Several studies have demonstrated that targeting CD73 or A2A receptor promote anti-tumor immunity, have non-redundant therapeutic effects and synergize with T cell checkpoint inhibitors, chemotherapy or adoptive cell therapy (2,3). Phase I clinical trials are currently underway evaluating anti-CD73 mAbs or A2A antagonists in cancer patients, including in combination with PD-1/PD-L1 inhibitors (NCT02655822, NCT02403193, NCT02503774). We and others demonstrated that high levels of CD73 in the TME are generally associated with worse prognosis (4-8). In some cases, CD73 expression abrogates the good prognosis associated with tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> lymphocytes (TIL), consistent with its immunosuppressive function (9). In human breast cancer, we recently showed that CD73 expression negatively correlates with estrogen receptor (ER) signaling and is associated with poor prognosis and chemoresistance in the triple negative subtype (6).

In the current study, we investigated the prognostic impact of CD73 in HER2<sup>+</sup> breast cancer in the context of trastuzumab therapy. While anti-ErbB2 mAbs, such as trastuzumab, significantly increase survival of patients with HER2<sup>+</sup> breast cancer (10,11) acquired and *de novo* resistance remain important challenges (12). In addition to targeting HER2 signaling, trastuzumab stimulates anti-tumor immunity (13-15). In support of a critical role for anti-tumor immunity in clinical responses to trastuzumab, high levels of TIL at diagnosis are associated with improved clinical outcomes, and patients with weak tumor immune gene signatures are less likely to benefit from trastuzumab treatment (16,17). Yet, the value of TIL in predicting trastuzumab responses remains controversial (18).

Several immune effector pathways participate in trastuzumab activity, including NK cell-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and adaptive CD8<sup>+</sup> T cell responses (13). Given the importance of immune cells for trastuzumab activity, immunotherapy could synergize with anti-ErbB2 mAbs. In support of this, we previously showed that anti-

ErbB2 mAb synergizes with PD-1 blockade in mice (13). However, clinical data suggest that the PD-1/PD-L1 pathway is infrequently engaged in human breast cancer (19). Alternative approaches are thus likely required to induce clinically relevant anti-tumor responses.

We hypothesized that CD73 expression may constitute an important immune-regulatory pathway involved in trastuzumab resistance. We here provide evidence that CD73 expression by breast cancer cells and host cells indeed promote resistance to trastuzumab-like therapy in immunocompetent mouse models of breast cancer. We further demonstrate that targeting CD73 significantly enhances anti-ErbB2 mAb therapy, and that high levels of CD73 in human HER2<sup>+</sup> breast cancer is associated with poor clinical benefit from trastuzumab. Our study thus supports the concept that targeting the CD73-adenosine pathway may enhance the immune-mediated activity of anti-ErbB2 mAb therapy.

## **6.3 Materials & Methods**

### **Mice and cell lines**

H2N100 and TUBO cells originate from BALB/c MMTV-NeuT transgenic mice (14,20). TUBO cells were obtained in 2014 from Dr. Jason Steel (University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio) and used within less than 10 freeze-thaw cycles. H2N100 cells were derived in the laboratory of Dr Mark J. Smyth (QIMR Berghofer Medical Research, Australia) and used within less than 10 freeze-thaw cycles. TUBO were cultured in complete DMEM 10% serum and H2N100 were cultured in RPMI 10% serum with non-essential amino acid, HEPES, glutamax and sodium pyruvate. Human breast cancer cell lines SKBR3 and HCC1954 were purchased from ATCC in 2015 by the laboratory of Dr John Stagg (University of Montreal, Canada), cultured in DMEM 10% serum and used within less than 10 freeze-thaw cycles. HMLE-TWISTER cells (21) were obtained in 2015 from Dr. Robert Weinberg (Whitehead Institute for Biomedical Research), cultured in MEGM medium (Lonza) and used within less than 10 freeze-thaw cycles. No cell lines were authenticated. All cell lines were cultured at 37 °C under humidified conditions and 5% CO<sub>2</sub> and routinely tested for mycoplasma (MycoAlert detection kit from Lonza; cells were tested within one week prior to experimental use). Wild-type BALB/c

mice were purchased from Charles Rivers (Montreal, Canada). CD73-deficient BALB/c mice were obtained from Dr. Linda F. Thompson (Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City) and maintained at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM; Canada). CD73-deficient BALB/c MMTV-NeuT mice were maintained at QIMR Berghofer Medical Research Institute (Australia). Animal studies have been conducted in accordance with an Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

### **CD73 expression**

Mouse CD73 cDNA was transduced into tumor cells using a retroviral vector co-expressing GFP. Cells were sorted 5 days later by flow cytometry based on GFP expression. CD73 protein expression on transduced tumor cells was stable after *in vivo* injection (i.e. < 10% variation). CD73 expression on mouse cells was assessed with eFluor 450-conjugated rat anti-mouse CD73 mAb (eBioscience, 48-0731-82) or eFluor 450-conjugated IgG1k isotype control (eBioscience, 48-4301-82). CD73 expression on human cells was assessed with PE-conjugated mouse anti-human CD73 mAb (BD Biosciences, 550257) or PE-conjugated IgG1k isotype control (BD Biosciences, 555749). Samples were analyzed on LSRII Fortessa flow cytometer (BD) and data analyzed with FlowJo software.

### **CD73 activity**

H2N100-CD73 and TUBO-CD73 cells were plated in complete media in a flat-bottom 96-well plate ( $10^4$  cells per well) 24 h before the assay and washed twice with phosphate-free buffer (2 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaCl, 1 mM KCl, 10 mM glucose, 10 mM HEPES pH 7.2). AMP (40  $\mu$ M in phosphate-free buffer; Sigma) was then added and cells were incubated for 60 min at 37°C. Where indicated, the CD73 inhibitor APCP (50  $\mu$ M; Sigma) was added. CD73 activity was quantified by measuring inorganic phosphate levels with the Malachite green phosphate detection kit (R&D systems #DY996) following the manufacturer's instructions.

### **Mouse studies**

Wild-type (WT) or CD73-deficient (CD73<sup>-/-</sup>) mice were injected subcutaneously (s.c.) with H2N cells ( $5 \times 10^5$ ) and treated with 25  $\mu$ g of anti-ErbB2 mAb (clone 7.16.4) on day 12,

16 and 20, and/or 200 µg of anti-CD73 (clone TY/23) on day 3, 8, 12, 16 and 20 injected intraperitoneally (i.p.). TUBO cells were injected s.c. at  $10^5$  cells and treated with 100 µg of anti-ErbB2 and 200 µg of anti-CD73 following the same schedule. Where indicated, Nod-*rag1*-*gamma c* (NRG) mice were used. Where indicated, mice were depleted of NK cells by injecting anti-asialo GM1 antibody (Wako) or 50 µg anti-CD8b (clone 53-5.8; BioXcell) on day -1, 0, 7 and 14 post tumor cell injection following the manufacturer's instructions. BALB/c-MMTV-NeuT transgenic mice were treated at day 70 with 100 µg of anti-CD73 and/or anti-ErbB2 twice weekly for 6 weeks. Tumor multiplicity was assessed two times a week. For lung metastases studies, H2N cells ( $2 \times 10^5$  cells) were injected intravenously (i.v.) to WT mice and treated on day 8 with 250 µg of anti-CD73 and/or 10 µg of anti-ErbB2 mAbs i.p. Lungs were harvested on day 20, washed in PBS and fixed in Bouin's solution for 24 h before counting tumor nodules using a dissection microscope. Anti-ErbB2 mAb, anti-CD73 mAb and control Ig (clone 2A3) were purchased from BioXcell (West Lebanon, NH).

### **Flow cytometry analysis of tumor infiltrating lymphocytes**

Tumors were harvested from a TUBO subcutaneous experiment at the indicated time and exposed to a solution of collagenase type IV and DNase type I (Sigma). Lymphocytes were then purified using a Percoll solution of 40 % – 80 %. Single cell suspensions were then stained with a panel of fluorochrome-conjugated antibodies consisting of CD4-APC (BD, 553051), CD8 $\alpha$ -APC-H7 (BD, 560182), TCR $\beta$ -PE (BD, 553172), CD49b-BV421 (BD, 563063), CD45.2-Alexa700 (eBioscience, 56-0454-82) and viability dye eF506 (eBioscience, 65-0866-14). Where indicated, cells were stained for CD11b (BD, 561689), Gr1 (BD, 553124) and CD73 (eBioscience, 48-0731-82). Where indicated, cell suspensions were fixed with a Foxp3 Staining Buffer Set (eBioscience, 00-5523-00) to be then stained for Foxp3-Alexa488 (eBioscience, 53-5773-82). Samples were analyzed on LSRII Fortessa and data were analyzed with FlowJo software.

### **FinHER**

FinHER is a phase III adjuvant clinical trial that enrolled 1010 early-stage BC patients, 232 of whom were HER2/neu amplified and were randomly assigned to receive or not, nine

weekly trastuzumab infusions in addition to chemotherapy (17). Hormone receptor status was assessed locally by immunohistochemistry (IHC) and samples were considered positive if  $\geq 10\%$  cancer cells expressed receptors. HER2/neu expression was evaluated locally by IHC and confirmed centrally by in-situ hybridization (CISH). Intra-tumoral and stromal TIL scores assessed on full-face haematoxylin and eosin (H&E)-stained sections were obtained for 193 HER2-positive patients from the analysis published by Loi et al. (16).

### **Kmplot**

Kmplot is a web-based gene expression database including more than 5000 breast cancers associated with clinical and survival data. This database includes 1015 untreated breast cancer patients. From those patients, 1010 had available survival data for relapse-free survival (RFS), 543 for distant-metastasis free survival (DMFS), 382 for overall survival (OS) and 137 for post progression survival (PPS).

### **METABRIC**

The breast cancer dataset disclosed by the METABRIC study is hosted by the European Bioinformatics Institute (EBI) and deposited in the European Genome-Phenome Archive (EGA) at <http://www.ebi.ac.uk/ega/>, under accession number EGAS00000000083. It contains normalized RNA microarray profiling of about 2000 fresh-frozen breast cancer samples performed on the Illumina HT-12 v3. Hormone receptor status for the ER, HER2 and PR were inferred based on the bimodality of their mRNA expression level using the R package *genefu* (version 2.6.0) (22). Patients were treated either with chemotherapy, hormone-therapy and/or radiotherapy.

### **Gene expression of FinHER samples**

RNA was extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) primary breast tumor tissue. All samples were re-evaluated to ensure that tumor was present in the specimen. Of the 232 FinHER HER2-positive cases, 202 (87 %) samples had sufficient good quality RNA for gene expression analysis. Gene expression was measured using Affymetrix U219 GeneChips™ as per Affymetrix protocols on 96 well plates at AROS Applied Biotechnology A/S, Denmark. Affymetrix expression data were normalised using the RMA approach followed

by a batch effect correction (affy (v.3.1.2) and SVA (v.3.10.0) packages of the R (v.3.1.2) / Bioconductor (v.2.6) suite). When multiple probe sets mapped to the same official gene symbol, we computed the average value of their intensity.

### **Correlation analysis**

Gene ontology (GO) enrichment was performed using bc-GenExMiner v4.0, a publically available statistical mining tool of published annotated genomic data (23). Using bc-GenExMiner v4.0, a Robust Molecular Subtype Predictors Classification (RMSPC) was used to identify 124 patients classified in the HER2 molecular subtype with six molecular subtype predictors. GO enrichment identified over-represented terms present in the list of genes most positively correlated with CD73 (NT5E). For each term of each of the GO trees (biological process), comparison is done between the number of occurrences of this term in the "target list", i.e. the number of times this term is directly linked to a gene, and the number of occurrences of this term in the "gene universe" (all of the genes that are expressed in the database) by means of Fisher's exact test. Terms with associated p-values less than 0.01 are kept. For targeted correlation analyses, we used the breast cancer dataset disclosed by the METABRIC study. A list of top CD73-positively correlated genes was computed using cBioportal.org on 224 cases of the METABRIC study classified as HER2-enriched by PAM50. For HIF-1 signature, a signature score was calculated as a mean of the normalized expressions of its genes (i.e. P4HA1, P4HA2, PLOD1, PLOD2, LOX, LOXL2, ANGPTL4, VEGF, SLC2A1) (24). The degree of association between CD73 expression and the expression of target genes (or signature) was performed using Pearson correlation.

### ***In vitro* studies**

TUBO cells were treated with 10 ng/mL mouse recombinant TGF- $\beta$  (R&D System, 7666-MB-005) and SKBR-3 cells were treated with recombinant 10 ng/mL human recombinant TGF- $\beta$  (R&D System, 240-B-002). Cell media was changed every 2 days with fresh TGF- $\beta$ . CD73 expression on TUBO and SKBR-3 cells was measured by flow cytometry. SKBR-3 cells were treated *in vitro* with 10  $\mu$ g/mL of trastuzumab (obtained from CRCHUM pharmacy) and CD73 expression measured by flow cytometry. HMLE-TWIST-ER cells were induced with 20 nM of 4-hydroxytamoxifen (OHT) for 12 days. CD24 (BD, 555427) and CD44 (BD, 559942)

expression were measured by flow cytometry at different time points. For CD73 gene-editing, HMLE-TWIST-ER cells were transfected with a CRISPR/Cas9 vector (px330, Addgene) expressing the 20mer target sequences GACGCCGGCGACCAGTACCA (exon1) and GCAGCACGTTGGGTTCGGCG (exon1), provided by Michael Hoelzel (University of Bonn, Germany). CD73 negative cells (approximately 10 % of total transfected cells) were sorted by flow cytometry for further studies.

### **Statistical analysis**

The prognostic value of gene expression levels from selected genes and their possible interaction with trastuzumab treatment were assessed using Cox proportional hazard models. Medians values of gene expression were used to divide High and Low expression groups of patients. Distant relapse-free survival was compared using Kaplan-Meier analysis and statistical significance was examined using the log-rank test. Multivariate logistic regression models (genefu R package) were also performed in order to assess the robustness of our result when accounting for covariates, including age (as continuous), tumor size (as continuous), nodal status (positive vs. negative) and ER status (positive vs. negative). Possible interactions with trastuzumab treatment were tested using a Wald test after adding a trastuzumab main effect and a product interaction term in the Cox model. Interaction effects were displayed using forest plots. Associations between two parameters were evaluated by a Pearson correlation. All P-values were two-sided and a P-value of less than 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses of clinical data were performed using R v.3.2.5. (“R: The R Project for Statistical Computing” 2016, <https://www.r-project.org>).

## **6.4 Results**

### **CD73 is associated with trastuzumab resistance**

We firstly assessed the prognostic value of CD73 in untreated breast cancer patients. CD73 expression was found to be significantly associated to worse disease-free survival in all untreated breast cancer, as well as in untreated HER2<sup>+</sup> breast cancer (Suppl. Fig. S6.1). Higher CD73 expression was also associated to a worse disease-specific survival in the METABRIC



cohort, but this association was not significant in the HER2<sup>+</sup> subtype (Suppl. Fig. S6.2). We then assessed whether CD73 gene expression in HER2<sup>+</sup> subtype was specifically associated with therapeutic benefit from trastuzumab. Using gene expression profiles of 202 cases of the FinHER clinical trial confirmed to have HER2 gene amplification and randomly assigned to receive or not short-course adjuvant trastuzumab (17), we compared distant relapse-free survival according to CD73 expression levels. As shown in Fig. 6.1A-B, patients with low levels of CD73 (below median) significantly benefited from trastuzumab (panel A; P = 0.048 by Log rank), whereas patients with high levels of CD73 (above median) showed no significant benefit (panel B; P = 0.72 by Log rank). For comparison, we also assessed the prognostic value of PD-L1 and PD-1 gene expression. In contrast to CD73, high levels of PD-L1 (Fig. 6.1C and 6.1D) or PD-1 (Fig. 6.1E and 6.1F) were associated with improved clinical benefit from trastuzumab (P = 0.09 and P = 0.003 by Log rank, respectively). Multivariate analysis supported these results (Suppl. Fig. S6.3). To confirm that CD73 was associated with trastuzumab responses, we performed interaction tests for distant relapse free survival. As shown in Fig. 6.2A, there was a significant interaction between CD73 expression and trastuzumab in hormonal receptor (HR) negative patients (P = 0.0303), but not in HR positive patients (P = 0.4949). This interaction was still significant when adjusted for age, nodal status and grade (P = 0.0242; Fig. 6.2B). We next evaluated whether CD73 expression correlated with tumor-infiltrating lymphocytes (TIL), as previously quantified on H&E-stained sections (16). We observed a weak negative correlation between CD73 and stromal TIL (Fig. 6.3A) and no correlation between CD73 and intratumoral TIL (Fig. 6.3B). In contrast, both PD-L1 and PD-1 gene expression positively correlated with intratumoral TIL (Fig. 6.3C-F).

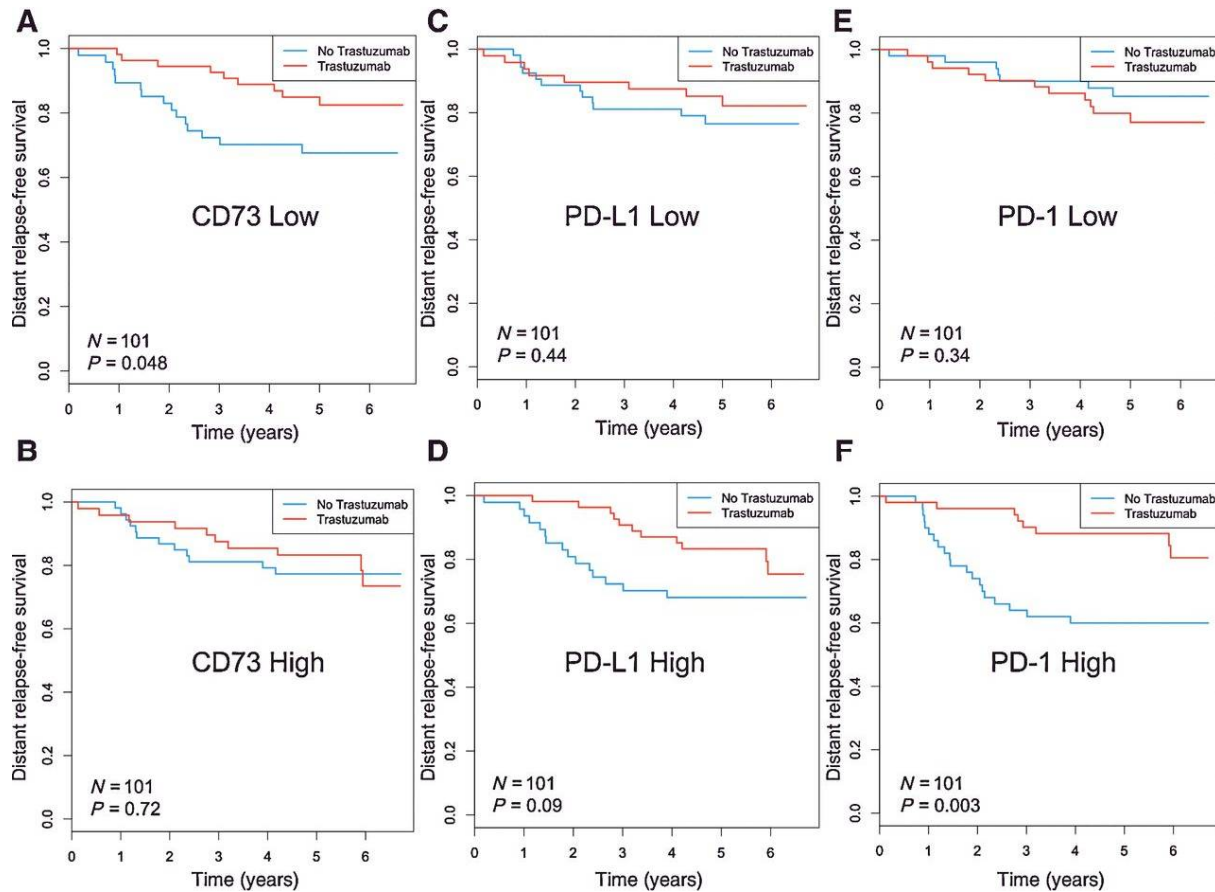


Figure 6.1 – High CD73 gene expression is associated with poor clinical benefit from trastuzumab in HER2<sup>+</sup> breast cancer. Relapse-free survival data of 202 cases of HER2 gene-amplified breast cancer patients randomized to receive or not trastuzumab (FinHER clinical trial) were analyzed according to: (A-B) CD73 gene expression, (C-D) PD-L1 gene expression, (E-F) PD-1 gene expression. Significance (P values) of differences in survival between groups of patients defined by median gene expression was estimated by log-rank test.

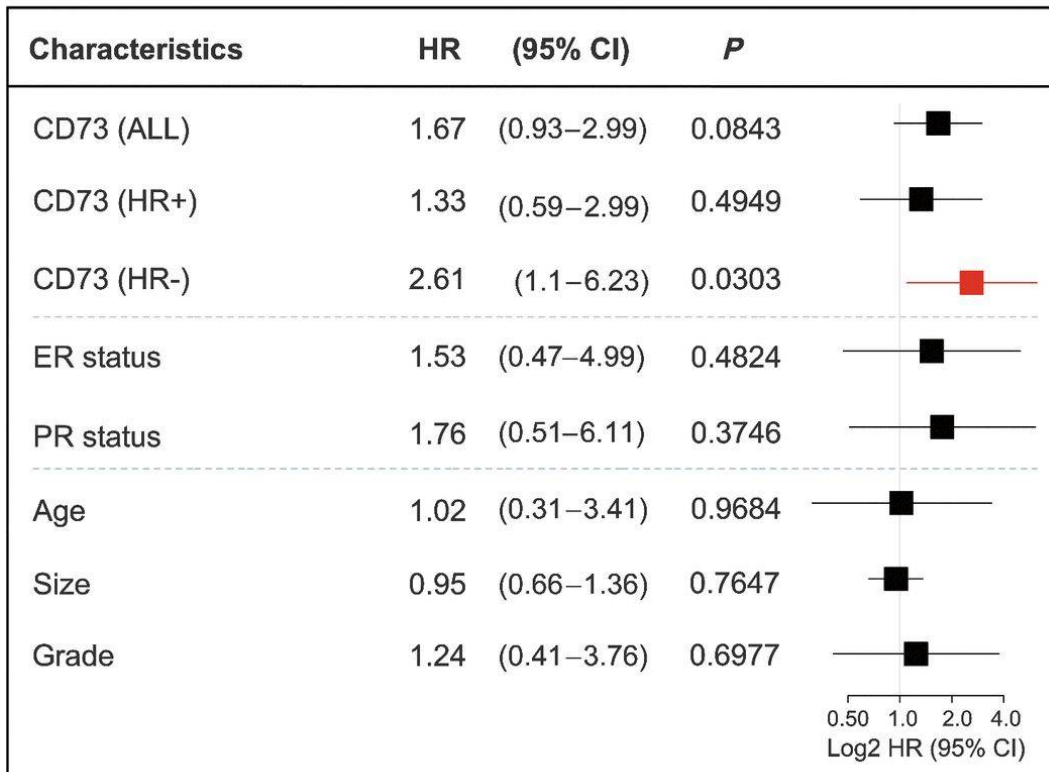
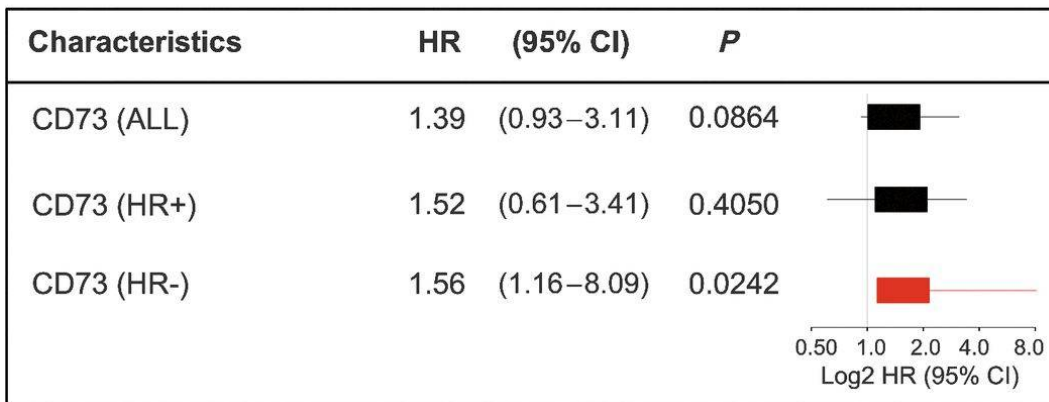
**A****B**

Figure 6.2 – CD73 interaction with trastuzumab in FinHER clinical trial. (A) Interaction test with trastuzumab for Distant Relapse Free Survival (DRFS). Significant associations ( $p < 0.05$ ) are shown in red. Horizontal bars represent the 95 % confidence intervals of Hazard ratios (HRs). (B) Interaction test for CD73, according to hormonal status (HR), with Trastuzumab for Distant Relapse Free Survival (DRFS), adjusted for age, nodal status and grade. Significant associations ( $p < 0.05$ ) after correction for multiple testing are shown in red. Horizontal bars represent the 95 % confidence intervals of Hazard ratios (HRs).

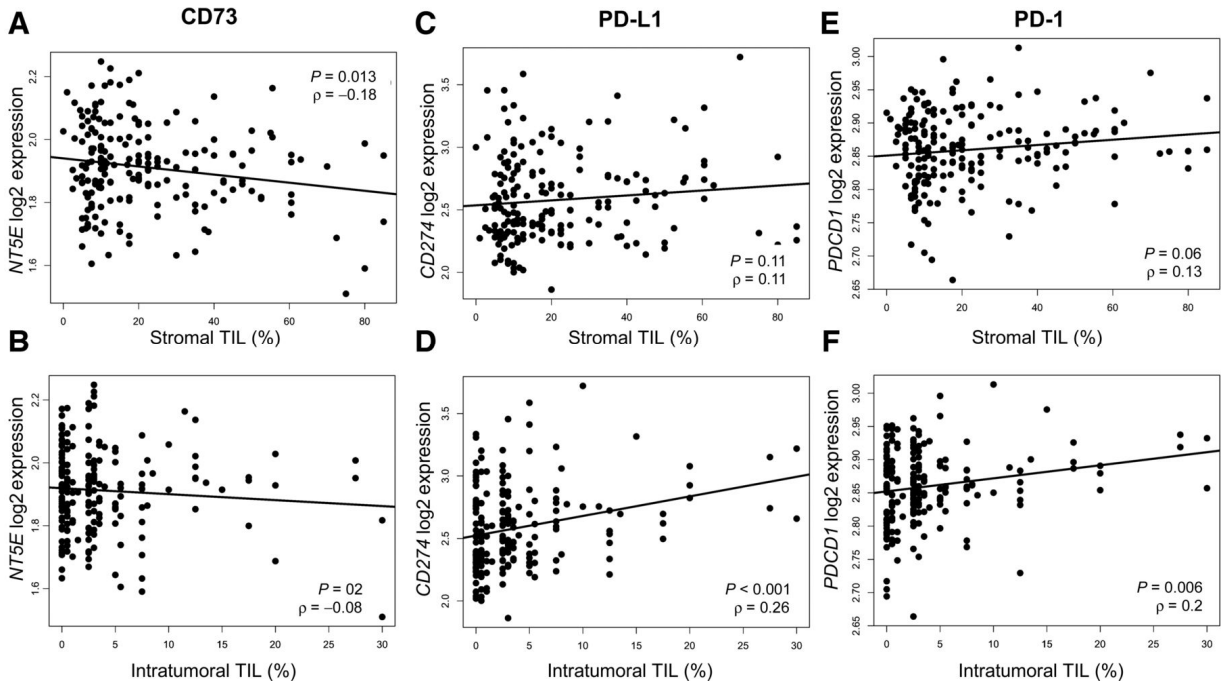


Figure 6.3 – PD-1 and PD-L1, but not CD73, correlate with tumor-immune infiltrates in HER2<sup>+</sup> breast cancer. Stromal and intratumoral TIL assessed on full-face haematoxylin and eosin (H&E) sections of HER2 gene-amplified breast tumors from FinHER were correlated to: (A-B) CD73 gene expression, (C-D) PD-L1 gene expression, (E-F) PD-1 gene expression. Correlation coefficients (Spearman rho) with P values are shown.

### CD73 on tumor cells confers resistance to anti-ErbB2 mAb

Using immunocompetent mouse models of HER2<sup>+</sup> breast cancer, we further investigated the impact of CD73 expression on anti-ErbB2 mAb therapy. H2N100 and TUBO breast tumor cells, derived from neuT-transgenic mice and endogenously negative for CD73, were gene-modified to overexpress CD73 or control vector (Suppl. Fig. S6.4), injected subcutaneously to syngeneic mice and treated with anti-ErbB2 mAb (clone 7.16.4). As shown in Fig. 6.4A-B (and Suppl. Fig. S6.5), CD73 overexpression on H2N100 tumors significantly suppressed the activity of anti-ErbB2 mAb. Accordingly, while anti-ErbB2 mAb induced complete responses (CR) in 100 % (20/20) of mice with CD73-negative H2N100 tumors, only 25 % (5/20) of mice bearing CD73-positive tumors achieved CR (Suppl. Fig. S6.5;  $P < 0.0001$  by Log-rank). CD73 overexpression on TUBO cells was also associated with reduced anti-ErbB2 mAb activity (Fig.

6.4C-D and Suppl. Fig. S6.5;  $P < 0.0001$  by Log-rank), although no CR response was achieved in this model.

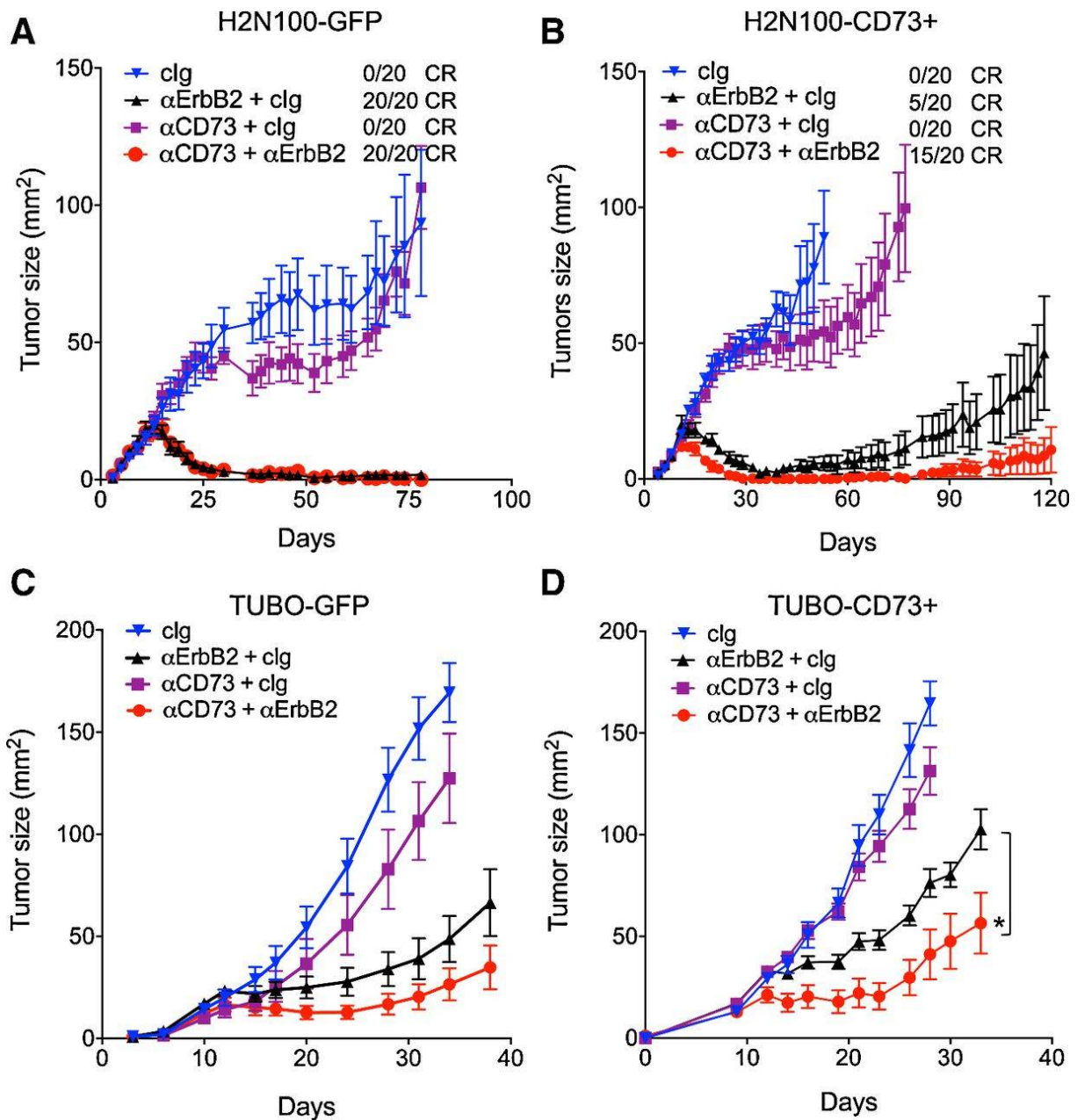


Figure 6.4 – CD73 expression by breast tumor cells inhibits anti-ErbB2 mAb activity. (A-B) BALB/c mice were injected s.c. with H2N100-GFP or H2N100-CD73<sup>+</sup> breast tumor cells and treated with anti-ErbB2 mAb (25  $\mu$ g i.p. of clone 7.16.4) on day 12, 16 and 20, and/or anti-CD73 mAb (200  $\mu$ g i.p. of clone TY/23) on day 3, 8, 12, 16 and 20. Means  $\pm$  standard errors (n = 10 / group) of one representative experiment are shown. Number of

mice achieving complete response (CR) from 2 independent experiments is shown. (C-D) BALB/c mice were injected s.c. with TUBO-GFP or TUBO-CD73<sup>+</sup> breast tumor cells and treated with anti-ErbB2 mAb (100 µg i.p. of clone 7.16.4) on day 12, 16 and 20, and/or anti-CD73 mAb (200 µg i.p. of clone TY/23) on day 3, 8, 12, 16 and 20. Means ± standard errors (n = 10 / group) of one representative experiment are shown (\*: p < 0.05 by Mann-Whitney test).

### **Targeting CD73 enhances the activity of anti-ErbB2 mAb**

We next assessed whether targeting CD73 could enhance trastuzumab-like therapy. As shown in Fig. 6.4 (and Suppl. Fig. S6.5), combining anti-CD73 mAb with anti-ErbB2 mAb was significantly more effective than either single agent. In H2N100-CD73<sup>+</sup> tumors, the combined therapy induced CR in 75 % of mice (15/20), compared to 25 % CR (5/20) for anti-ErbB2 mAb and 0 % CR while (0/20) for anti-CD73 mAb. Anti-CD73 mAb also significantly enhanced the activity of anti-ErbB2 mAb against TUBO-CD73<sup>+</sup> tumors, although no CR was achieved. In support of an immune-dependent mechanism, the benefit of combining anti-ErbB2 mAb with anti-CD73 mAb was lost in immunodeficient NOD-Rag1- $\gamma$ c mice (Suppl. Fig. S6.6). Also consistent with increased anti-tumor immunity, combined treatment significantly enhanced tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T cells (Fig. 6.5A). Interestingly, combining anti-ErbB2 with anti-CD73 mAb also significantly reduced tumor-infiltrating CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> myeloid cells, while no significant effect was observed on CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs (Fig. 6.5A).

We next evaluated the therapeutic activity of the combination on autochthonous ErbB2-driven tumors spontaneously arising in BALB/c-NeuT transgenic mice. Cohorts of transgenic female mice were treated from day 70 twice a week with intraperitoneal injections of anti-CD73 mAb, anti-ErbB2 mAb or anti-CD73 + anti-ErbB2 mAbs and tumor multiplicity (i.e. tumor occurrence in the 10 mammary glands) monitored over time. As shown in Fig. 6.5B, the combination therapy was significantly more effective than either monotherapy. We also evaluated the anti-metastatic activity of the combination therapy and observed that anti-CD73 mAb significantly enhanced the activity of anti-ErbB2 mAb against experimental lung metastases (Fig. 6.5C). Taken together, our data demonstrated that CD73 promotes resistance to anti-ErbB2 mAb and that targeting CD73 can overcome this resistance.

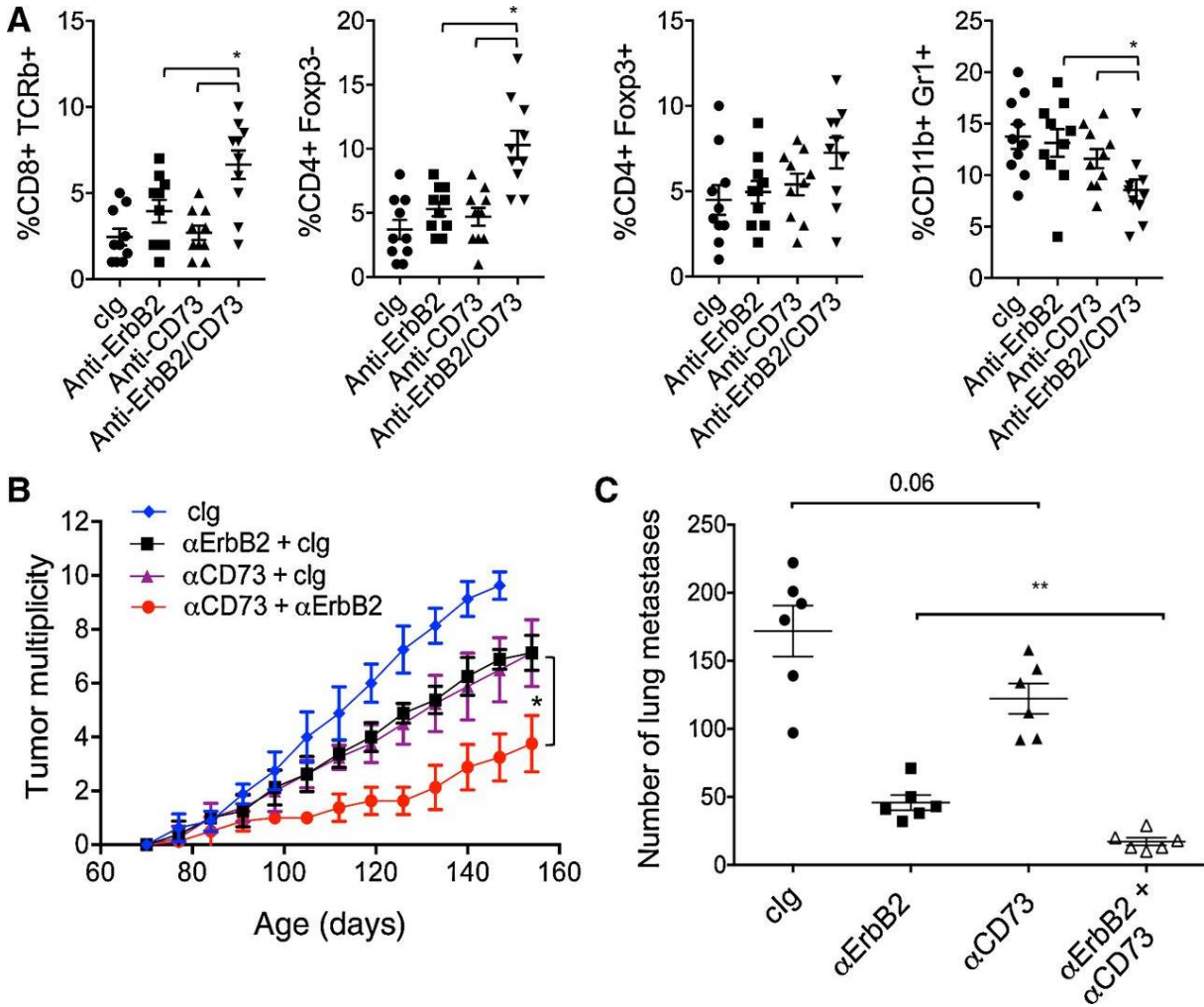


Figure 6.5 – Anti-CD73 mAb enhances anti-ErbB2 mAb therapy. (A) BALB/c mice were injected s.c. with TUBO-CD73<sup>+</sup> cells and treated with anti-ErbB2 mAb (100 μg i.p. of clone 7.16.4) on day 12 and 16 and/or anti-CD73 mAb (200 μg i.p. of clone TY/23) on day 3, 8, 12, and 16. Tumors were harvested at day 20 for flow cytometry analysis. Frequencies of tumor-infiltrating CD8<sup>+</sup> T cell, CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>-</sup> T cells, CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells and CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> cells in CD45.2<sup>+</sup> cells are shown. Means ± standard errors are shown (\* : p < 0.05 by Mann-Whitney test). (B) BALB/c-MMTV-NeuT transgenic mice were treated from day 70 with anti-CD73 mAb (TY/23) and/or anti-ErbB2 mAb (7.16.4) for 6 weeks (100 μg each i.p.). Mean tumor multiplicity ± standard errors are shown (n = 10 / group; \* : p < 0.05 by Mann-Whitney test at end-point). (C) H2N100 tumor cells (2 x 10<sup>5</sup> cells) were injected i.v. to wild type BALB/c mice and treated on day 8 with 250 μg of anti-CD73 mAb and/or 10 μg of anti-ErbB2 (i.p.). Lungs were harvested on day 20, fixed and lung tumor nodules counted using a dissection microscope. Individual nodule counts with means ± standard errors are shown (\*\* : p < 0.01 by Mann-Whitney test).

## Host CD73 confers resistance to anti-ErbB2 mAb

Since CD73 is found expressed on both tumor cells and non-transformed cells, we investigated the role of host-derived CD73 using CD73-deficient mice. As shown in Fig. 6.6A, anti-ErbB2 mAb therapy was significantly more effective in CD73-deficient mice, inducing CR in 100 % of mice (10/10) compared to 0 % in WT mice (0/10). Notably, this enhanced activity in CD73-deficient mice was lost upon NK cell depletion (Fig. 6.6A). Long-term control in CD73-deficient mice was also lost upon CD8<sup>+</sup> T cell depletion (Fig. 6.6B). Flow cytometry analyses revealed a significantly increased in NK cells, CD4<sup>+</sup> Tconv cells and CD8<sup>+</sup> T cells in response to anti-ErbB2 mAb in CD73-deficient mice compared to WT (Fig. 6.6C). When tumor-infiltrating host cells expressing CD73 were analyzed, we found that the vast majority were CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs, followed by CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> myeloid cells (Fig. 6.6D).

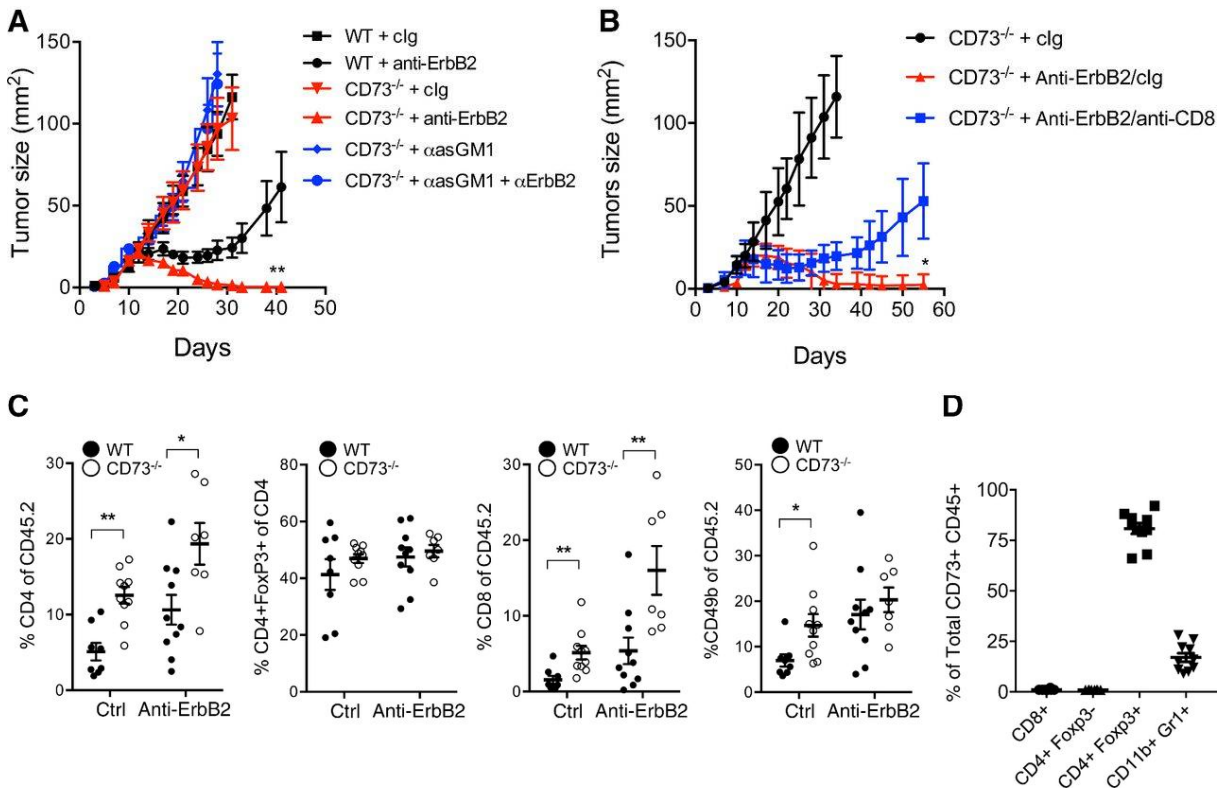


Figure 6.6 – Host CD73 inhibits anti-ErbB2 mAb activity. (A) Wild type (WT) and CD73-deficient (CD73<sup>-/-</sup>) BALB/c mice were injected s.c. with TUBO cells and treated with anti-ErbB2 mAb (100  $\mu$ g i.p. of clone 7.16.4) on day 12, 16 and 20. Some mice were further depleted of NK cells (anti-asialo GM1 antibody), or (B) depleted of CD8<sup>+</sup> T cells, on day



-1, 0, 7 and 14. Means  $\pm$  standard errors (n = 10 / group) are shown (\*\* : p < 0.01 by Mann-Whitney test). (C) Same as (A), except that TUBO tumors were harvested at day 19 for flow cytometry analysis. Frequencies of CD4<sup>+</sup> T cells, Foxp3<sup>+</sup> Tregs, CD8<sup>+</sup> T cells and CD49b<sup>+</sup> NK cells are shown. Means  $\pm$  standard errors are shown (\* : p < 0.05, \*\* : p < 0.01 by Mann-Whitney test). (D) WT BALB/c mice were injected with TUBO cells and treated as in (A), and frequencies of indicated cells within CD73<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> tumor-infiltrating cells are shown. Means  $\pm$  standard errors are shown.

### **CD73 expression is associated with HIF-1, TGF- $\beta$ and EMT**

We next investigated underlying pathways associated with CD73 expression in HER2<sup>+</sup> breast cancer. Since CD73 is a transcriptional target of HIF-1 $\alpha$  (25), we first assessed the correlation between CD73 and a HIF-1 gene signature derived in human breast cancer (24). We observed a significant, albeit weak, positive correlation between CD73 expression and HIF-1 responses (Fig. 6.7A). We next performed gene ontology enrichment analysis and found a significant association between CD73 and extracellular matrix organization (Table 6.1). Correlative analyses further revealed that 8 of the 10 most positively correlated genes in HER2-enriched breast cancer were linked to TGF- $\beta$  (Table 6.1). We thus investigated whether TGF- $\beta$  regulated CD73 expression in HER2<sup>+</sup> breast tumor cells. As shown in figure 6.7B-C, treatment with recombinant TGF- $\beta$  significantly induced CD73 expression on both mouse and human HER2<sup>+</sup> breast tumor cells. Interestingly, CD73 upregulation in SKBR3 in response to TGF- $\beta$  was maximal approximately 20 days after treatment initiation (Fig. 6.7B), suggesting that cellular reprogramming, in contrast to direct signaling, might be involved. CD73 upregulation in mouse TUBO cells reached a maximum after 48 hours (Fig. 6.7B). TGF- $\beta$  is a potent inducer of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (26). We hypothesized that EMT regulated CD73 expression in mammary cells. Consistent with this, CD73 was significantly and positively correlated with several EMT transcription factors in HER2<sup>+</sup> breast tumors, with a notable exception for SNAI1 (Suppl. Fig. S6.7). To assess whether EMT promoted CD73 expression, we used human mammary epithelial cells (HMLE) expressing an inducible TWIST1 (i.e. HMLE-TWIST-ER cells). As shown in Fig. 6.7D, activation of EMT indeed significantly upregulated CD73 cell-surface expression on HMLE cells. To determine if CD73 was required for EMT, we performed CRISPR-mediated editing of CD73 in HMLE cells (Fig. 6.7E). As

shown in Fig. 6.7F-G, lack of CD73 had no impact on the expression of EMT surrogate markers (CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>). Overall, our study highlights the importance of CD73 in trastuzumab resistance and suggests that targeting the CD73-adenosine pathway, or upstream regulators such as TGF- $\beta$  or EMT, may enhance immune-mediated responses induced by anti-ErbB2 mAb therapy.

GO term and associated genes		p-value	% target list	% universe
extracellular matrix organization: <i>COL27A1, CTSK, LOX, DCN, ITGA11, TIMP2, MFAP2, ECM2, MMP13, THBS1, PLOD2, POSTN</i>		7.37e-09	17.65	1.97
Gene	Spearman rho	KEGG pathway		Other pathway
CLIC4	0.67	Adherens junction / Fc-gamma / Cell cycle / Tight junction		TGF- $\beta$
CTHRC1	0.66	n/a		TGF- $\beta$ , EMT
GAS1	0.64	Hedgehog / NOD-like / Apoptosis / Ubiquitin		WNT
DSE	0.64	n/a		(TGF- $\beta$ )
THBS1	0.64	ECM / Adhesion / Actin / TGF / Cytokine		TGF- $\beta$
ACSL4	0.63	PPAR / Adipocytokine		Ferroptosis
FNDC1	0.63	n/a		TGF- $\beta$
COL10A1	0.63	n/a		TGF- $\beta$
CD55	0.63	T cell / NK cell / Adherens junction		TGF- $\beta$
LUM	0.63	ECM / GnRH / Spliceosome		TGF- $\beta$

Table 6.1 – CD73 Gene Ontology enrichment and Top genes correlated to CD73.

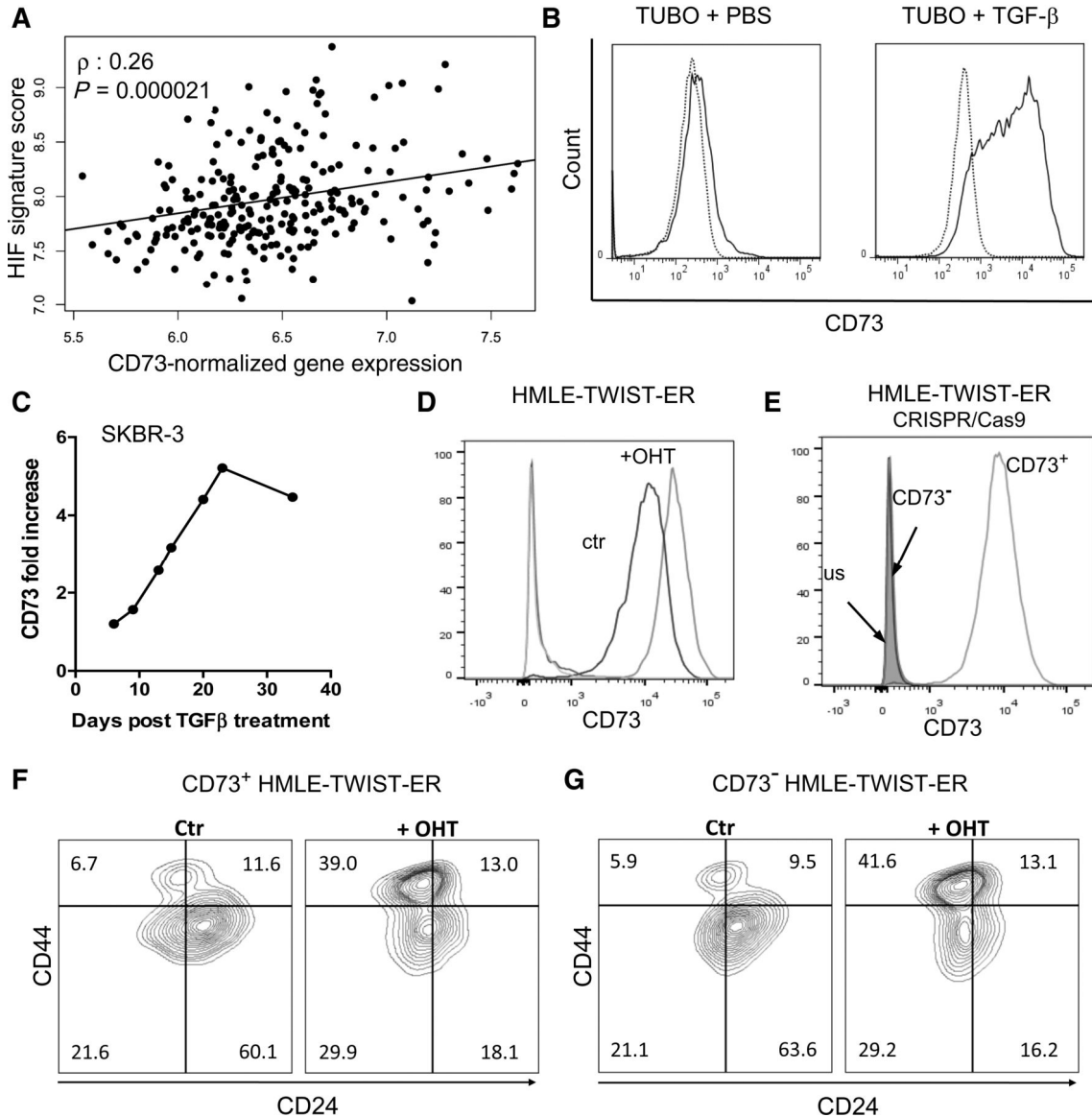


Figure 6.7 – Association between CD73 and HIF-1, TGF- $\beta$  and epithelial-to-mesenchymal transition. (A) The degree of association between CD73 gene expression and the expression of a HIF-1 gene signature was performed in HER2<sup>+</sup> cases in METABRIC. Pearson coefficient and P value are shown. (B) Mouse TUBO and (C) human SKBR-3 breast tumor cells were treated with recombinant TGF- $\beta$  (10 ng/mL) and CD73 expression measured by flow cytometry after 48 h (B) or at indicated time-points (C). Fold-increase of mean fluorescence intensity over PBS-treated cells is shown. (D) HMLE-TWIST-ER cells were treated with 20 nM 4-hydroxytamoxifen (OHT) for 12 days and CD73 expression measured by flow cytometry. (E) HMLE-TWIST-ER were transfected with two CRISPR-Cas9 vectors containing sgRNA against CD73 and sorted into CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>-</sup> cells. (F-G) CD73<sup>+</sup> and CD73<sup>-</sup> HMLE cells were treated with 20 nM 4-hydroxytamoxifen (OHT) for 12 days and CD24/CD44 expression was measured by flow cytometry.

## 6.5 Discussion

Immune infiltrates in HER2/ErbB2<sup>+</sup> breast tumors are associated with improved survival and contribute to the therapeutic activity of trastuzumab (16). With the general objective to identify novel actionable immunosuppressive pathways, we here report the role of CD73 on the activity of anti-ErbB2 antibody therapy. Our study demonstrated that: i) high levels CD73, but not PD-1 or PD-L1, are associated with increased resistance to trastuzumab; ii) CD73 expression by breast tumor cells and host cells suppress immune-mediated anti-tumor responses induced by anti-ErbB2 mAb therapy in mice; iii) targeted blockade of CD73 enhances anti-ErbB2 mAb therapy in mice; and iv) CD73 expression in human mammary cells is induced by TGF- $\beta$  and EMT.

Several environmental factors have been shown to promote activation of adenosine signaling in the tumor microenvironment, including tissue hypoxia, HIF-1 $\alpha$  and inflammatory cytokines (27). CD73 promoter methylation and ER signaling have also been shown to regulate CD73 expression in melanoma and breast cancer (28-30). Consistent with a role for tissue hypoxia in regulating extracellular adenosine levels, we observed a positive correlation between CD73 expression and HIF-1 responses in HER2<sup>+</sup> breast tumors. We further demonstrated that TGF- $\beta$  and EMT are important inducers of CD73 expression in human mammary cells. Interestingly, EMT has been shown to be associated with trastuzumab resistance (31,32) and TGF- $\beta$  was recently identified as a major pathway disabling anti-tumor immunity in human breast cancer (33). We propose that CD73 and adenosine signaling may contribute to EMT-mediated trastuzumab resistance and TGF- $\beta$ -mediated tumor immune escape.

Using GO enrichment analysis, we found an association between CD73 expression and extracellular matrix organization. In particular, CD73 positively correlated with several genes involved in collagen remodelling and previously associated with increased tumor cell metastasis, including lysyl oxidase (LOX), lysyl hydroxylase (PLOD2), cathepsin K (CTSK), collagen-binding integrin (ITGA11), matrix metalloproteinase-13 (MMP13), thrombospondin-1 (THBS1) and periostin (POSTN) (34-39). Since CD73 has been shown to promote fibrosis (40), it would be of interest to evaluate whether adenosine signaling regulates any of these genes.

Our current study provides an important proof-of-concept that targeting CD73 significantly enhances the therapeutic activity of anti-ErbB2 mAb in immunocompetent hosts. We clearly demonstrated that tumor-derived CD73, as well as host-derived CD73, suppressed anti-tumor immune responses generated by anti-ErbB2 mAb. Notably, host CD73 was found to significantly suppress NK cell-mediated as well as CD8<sup>+</sup> T cell-mediated anti-tumor responses. NK cells have been shown to be critical for trastuzumab activity (41) and our previous work demonstrated that interferon responses and CD8<sup>+</sup> T cells activation generate adaptive anti-tumor immunity following anti-ErbB2 mAb therapy (13). We now provide evidence that host CD73 contributes to suppress both innate and adaptive anti-tumor immunity stimulated by anti-ErbB2 mAb treatment. Interestingly, we observed that targeting CD73 significantly reduced the level of tumor-infiltrating CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> myeloid cells when combined with anti-ErbB2 mAb. Since CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs can promote immunosuppressive CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> cells in response to ErbB2-driven breast cancer (41), and considering that CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs are a major source of host CD73, Tregs may favor the recruitment of CD11b<sup>+</sup> Gr1<sup>+</sup> myeloid cells in the tumor microenvironment.

While our study suggests that targeting the CD73-adenosine pathway can potentiate the anti-tumor activity of trastuzumab, further studies investigating the impact of targeting A2A adenosine receptor would be valuable. We argue that CD73- and/or A2A-targeting therapy would be most beneficial against HER2<sup>+</sup> breast tumors that express high levels of CD73, such as mesenchymal tumors. Nevertheless, caution should be employed in restricting adenosine-targeting therapies to CD73-expressing tumors. Indeed, CD73 expression by tumor cells is not always a prerequisite to activity, as can be observed in the CT26 colon adenocarcinoma model (42).

Several anti-CD73 mAbs and antagonists to A2A adenosine receptor are now entering clinical trials. A recent study suggested that dual targeting of CD73 and A2A receptor could generate synergistic therapeutic responses (43). Notably, it was observed that tumor CD73 expression was significantly upregulated when transplanted to A2A-deficient hosts. While anti-CD73 mAbs can decrease adenosine levels and block its suppressive effects on immune effectors, Fc receptor engagement may also play a role in therapeutic activity. In support of this, it was shown in human mixed leukocyte reactions that Fc receptor binding significantly

increased production of pro-inflammatory cytokines upon anti-CD73 mAb (43). Consideration of the Fc domain and its interaction with immune cells may thus be important in the development of optimal anti-CD73 mAbs.

In conclusion, our current study provided clinical and experimental evidence that CD73 expression is associated with resistance to trastuzumab therapy. Given the importance of anti-tumor immune responses in HER2<sup>+</sup> breast cancer and the paucity of clinical responses to PD-1/PD-L1 inhibitors in this subtype, our study provides a rationale to further investigate the impact of combining adenosine-targeting agents with anti-ErbB2 mAbs for patients refractory to standard-of-care treatments.

## 6.6 Acknowledgments

We thank Dominique Gauchat of the CRCHUM Cytometry core facility for performing cell sorting.

## 6.7 References

1. Allard D, Turcotte M, Stagg J. Targeting A2 adenosine receptors in cancer. *Immunol cell Biol* 2017
2. Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res* 2013;19:5626-35
3. Beavis PA, Henderson MA, Giuffrida L, Mills JK, Sek K, Cross RS, et al. Targeting the adenosine 2A receptor enhances chimeric antigen receptor T cell efficacy. *J Clin Invest* 2017;127:929-41
4. Gaudreau PO, Allard B, Turcotte M, Stagg J. CD73-adenosine reduces immune responses and survival in ovarian cancer patients. *Oncoimmunology* 2016;5:e1127496
5. Leclerc BG, Charlebois R, Chouinard G, Allard B, Pommey S, Saad F, et al. CD73 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* 2016;22:158-66

6. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, et al. CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:11091-6
7. Inoue Y, Yoshimura K, Kurabe N, Kahyo T, Kawase A, Tanahashi M, et al. Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* 2017;8:8738-51
8. Limagne E, Euvrard R, Thibaudin M, Rebe C, Derangere V, Chevriaux A, et al. Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen. *Cancer Res* 2016;76:5241-52
9. Turcotte M, Spring K, Pommey S, Chouinard G, Cousineau I, George J, et al. CD73 is associated with poor prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Res* 2015
10. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-48
11. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353(16):1659-72.
12. Rexer BN, Arteaga CL. Intrinsic and acquired resistance to HER2-targeted therapies in HER2 gene-amplified breast cancer: mechanisms and clinical implications. *Crit Rev Oncog* 2012;17:1-16
13. Stagg J, Loi S, Divisekera U, Ngiow SF, Duret H, Yagita H, et al. Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:7142-7
14. Charlebois R, Allard B, Allard D, Buisseret L, Turcotte M, Pommey S, et al. PolyI:C and CpG Synergize with Anti-ErbB2 mAb for Treatment of Breast Tumors Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Res* 2017;77:312-9

15. Pusztai L, Karn T, Safonov A, Abu-Khalaf MM, Bianchini G. New Strategies in Breast Cancer: Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2016;22:2105-10
16. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, et al. Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol* 2014;25:1544-50
17. Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, Alanko T, Kataja V, Asola R, et al. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006; 354(8):809-20.
18. Perez EA, Ballman KV, Tenner KS2, Thompson EA, Badve SS, Bailey H, Baehner FL. Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. *JAMA Oncol* 2016; 2(1):56-64.
19. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, et al. Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* 2016;13:228-41
20. Rovero S, Amici A, Di Carlo E, Bei R, Nanni P, Quaglino E, et al. DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J Immunol* 2000;165:5133-42
21. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* 2011;71:245-54
22. Gendoo DM, Ratanasirigulchai N, Schroder MS, Pare L, Parker JS, Prat A, et al. Genefu: an R/Bioconductor package for computation of gene expression-based signatures in breast cancer. *Bioinformatics* 2016;32:1097-9
23. Jezequel P, Frenel JS, Champion L, Guerin-Charbonnel C, Gouraud W, Ricolleau G, et al. bc-GenExMiner 3.0: new mining module computes breast cancer gene expression correlation analyses. *Database (Oxford)* 2013;2013:bas060

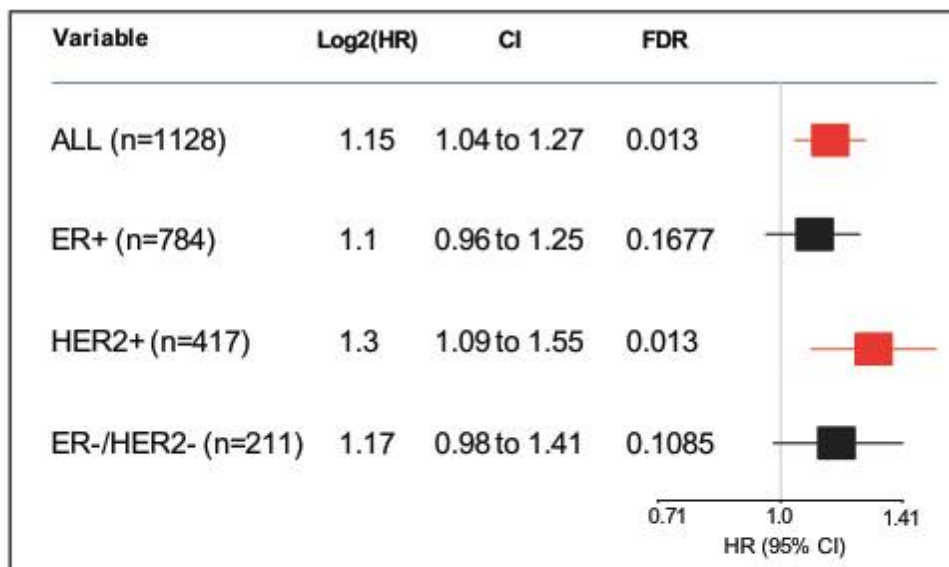


24. Samanta D, Gilkes DM, Chaturvedi P, Xiang L, Semenza GL. Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E5429-38
25. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, et al. Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* 2002;110:993-1002
26. Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* 2014;31:56-66
27. Hatfield SM, Sitkovsky M. A2A adenosine receptor antagonists to weaken the hypoxia-HIF-1alpha driven immunosuppression and improve immunotherapies of cancer. *Curr Opin Pharmacol* 2016;29:90-6
28. Wang H, Lee S, Nigro CL, Lattanzio L, Merlano M, Monteverde M, et al. NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *Br J Cancer* 2012;106:1446-52
29. Lo Nigro C, Monteverde M, Lee S, Lattanzio L, Vivenza D, Comino A, et al. NT5E CpG island methylation is a favourable breast cancer biomarker. *Br J Cancer* 2012;107:75-83
30. Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, Mitchell BS. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:708-17
31. Wu Y, Ginther C, Kim J, Mosher N, Chung S, Slamon D, et al. Expression of Wnt3 activates Wnt/beta-catenin pathway and promotes EMT-like phenotype in trastuzumab-resistant HER2-overexpressing breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 2012;10:1597-606
32. Oliveras-Ferraros C, Corominas-Faja B, Cufi S, Vazquez-Martin A, Martin-Castillo B, Iglesias JM, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) confers primary resistance to trastuzumab (Herceptin). *Cell Cycle* 2012;11:4020-32
33. Miller LD, Chou JA, Black MA, Print C, Chifman J, Alistar A, et al. Immunogenic Subtypes of Breast Cancer Delineated by Gene Classifiers of Immune Responsiveness. *Cancer Immunol Res* 2016;4:600-10

34. Cox TR, Rumney RM, Schoof EM, Perryman L, Hoye AM, Agrawal A, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* 2015;522:106-10
35. Pankova D, Chen Y, Terajima M, Schliekelman MJ, Baird BN, Fahrenholtz M, et al. Cancer-Associated Fibroblasts Induce a Collagen Cross-link Switch in Tumor Stroma. *Mol Cancer Res* 2016;14:287-95
36. Ju JA, Godet I, Ye IC, Byun J, Jayatilaka H, Lee SJ, et al. Hypoxia Selectively Enhances Integrin Receptor Expression to Promote Metastasis. *Mol Cancer Res* 2017
37. Nannuru KC, Futakuchi M, Varney ML, Vincent TM, Marcusson EG, Singh RK. Matrix metalloproteinase (MMP)-13 regulates mammary tumor-induced osteolysis by activating MMP9 and transforming growth factor-beta signaling at the tumor-bone interface. *Cancer Res* 2010;70:3494-504
38. Schultz-Cherry S, Lawler J, Murphy-Ullrich JE. The type 1 repeats of thrombospondin 1 activate latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1994;269:26783-8
39. Wang Z, Xiong S, Mao Y, Chen M, Ma X, Zhou X, et al. Periostin promotes immunosuppressive premetastatic niche formation to facilitate breast tumour metastasis. *J Pathol* 2016;239:484-95
40. Wirsdorfer F, de Leve S, Cappuccini F, Eldh T, Meyer AV, Gau E, et al. Extracellular Adenosine Production by ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Enhances Radiation-Induced Lung Fibrosis. *Cancer Res* 2016;76:3045-56
41. Ambrosino E1, Spadaro M, Iezzi M, Curcio C, Forni G, Musiani P, Wei WZ, Cavallo F. Immunosurveillance of Erbb2 carcinogenesis in transgenic mice is concealed by a dominant regulatory T-cell self-tolerance. *Cancer Res* 2006;66:7734-40.
42. Hay CM, Sult E, Huang Q, Mulgrew K, Fuhrmann SR, McGlinchey KA, et al. Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447. *Oncoimmunology* 2016;5:e1208875
43. Young A, Ngiow SF, Barkauskas DS, Sult E, Hay C, Blake SJ, et al. Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses. *Cancer Cell* 2016;30:391-403

## 6.8 Supplementary figures

A



B

Dataset	Microarray technology	Survival data	Treatment	No. of patients (untreated)	Source	Reference
CAL	Affymetrix HGU	RFS/DMFS	Untreated, Chemo, hormonal	14	GEO: GSE7390	1
DFHCC	Affymetrix HGU	DMFS	Heterogeneous	7	GEO: GSE19615	2
EMC2	Affymetrix HGU	DMFS	Untreated, chemo	48	GEO: GSE12276	3
MAINZ	Affymetrix HGU	DMFS	Untreated	200	GEO: GSE11121	4
NKI	Agilent	RFS/DMFS	Untreated, chemo	188	Rosetta Inpharmatics	5,6
TRANSBIG	Affymetrix HGU	RFS/DMFS	Untreated	198	GEO: GSE7390	7
UCSF	In-house cDNA	RFS/DMFS	Untreated, chemo, hormonal	4	Authors' Web site	8,9
UNT	Affymetrix HGU	RFS/DMFS	Untreated	125	GEO: GSE2990	10,11
VDX	Affymetrix HGU	RFS/DMFS	Untreated	344	GEO: GSE2034/GSE5327	12,13

C

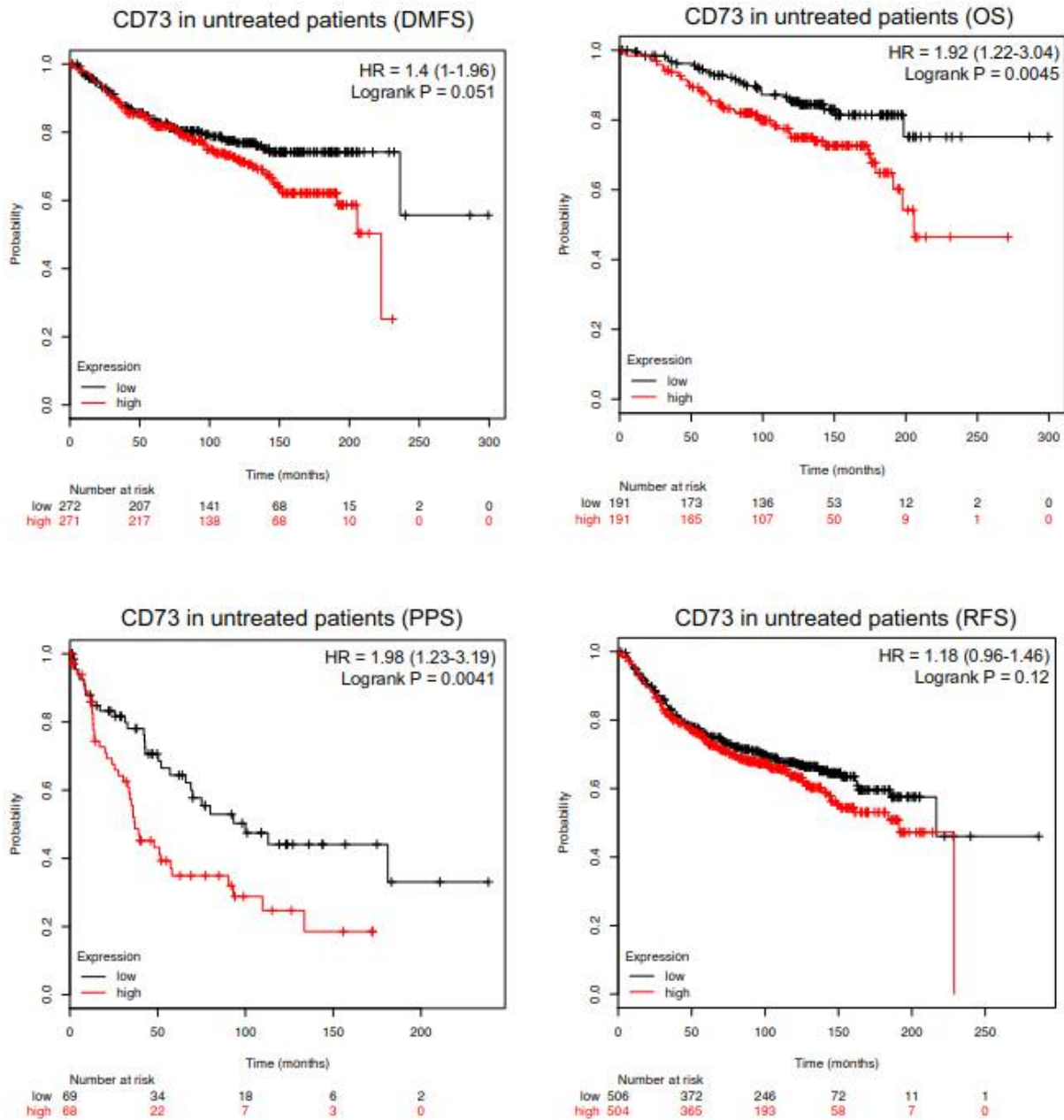


Figure S6.1 – CD73 gene expression and survival in untreated breast cancer. (A) Meta-analysis of the prognosis of CD73 in untreated patients (distant-metastatic free survival). Horizontal bars represent the 95 % confidence intervals of HRs. Characteristics with significant effect ( $p < 0.05$ ) after correction for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure are shown in red. (B) Meta-analysis in (A) consisted of 9 datasets encompassing for 1128 untreated breast cancer patients were used for a meta-analysis of the effect of CD73 on distant-metastatic free survival (DMFS). Hormone receptor status for the ER, HER2 and PR were inferred based on the bimodality of their mRNA

expression level using the R package *genefu* (version 2.6.0). (C) *KmPlot* meta-analysis of the prognosis of CD73 mRNA expression on untreated patients using different end-points: Distant-Metastasis Free survival (DMFS), Overall survival (OS), Post-Progression survival (PPS) and Relapse-Free survival (RFS).

Reference for Figure S6.1 :

1. Chin K, et al. (2006) Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiologies. *Cancer Cell* 10(6):529–541.
2. Li Q, et al. (2010) Minimising immunohistochemical false negative ER classification using a complementary 23 gene expression signature of ER status. *PLoS ONE* 5(12):e15031.
3. Bos PD, et al. (2009) Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature* 459(7249):1005–1009.
4. Schmidt M, et al. (2008) The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. *Cancer Res* 68(13):5405–5413.
5. van de Vijver MJ, et al. (2002) A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347(25):1999–2009.
6. Van 't Veer LJ, et al. (2002) Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415(6871):530–536.
7. Desmedt C, et al. (2007) Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG multicenter independent validation series. *Clin Cancer Res* 13(11):3207–3214.
8. Korkola JE, et al. (2007) Identification of a robust gene signature that predicts breast cancer outcome in independent data sets. *BMC Cancer* 7:61
9. Korkola JE, et al. (2003) Differentiation of lobular versus ductal breast carcinomas by expression microarray analysis. *Cancer Res* 63(21):7167–7175.
10. Loi SM, et al. (2007) Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol* 25(10):1239–1246; and erratum (2007) 25(24):3790.

11. Sotiriou C, et al. (2006) Gene expression profiling in breast cancer: Understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98(4):262–272.
12. Minn AJ, et al. (2007) Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(16):6740–6745.
13. Wang Y, et al. (2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365(9460):671–679.

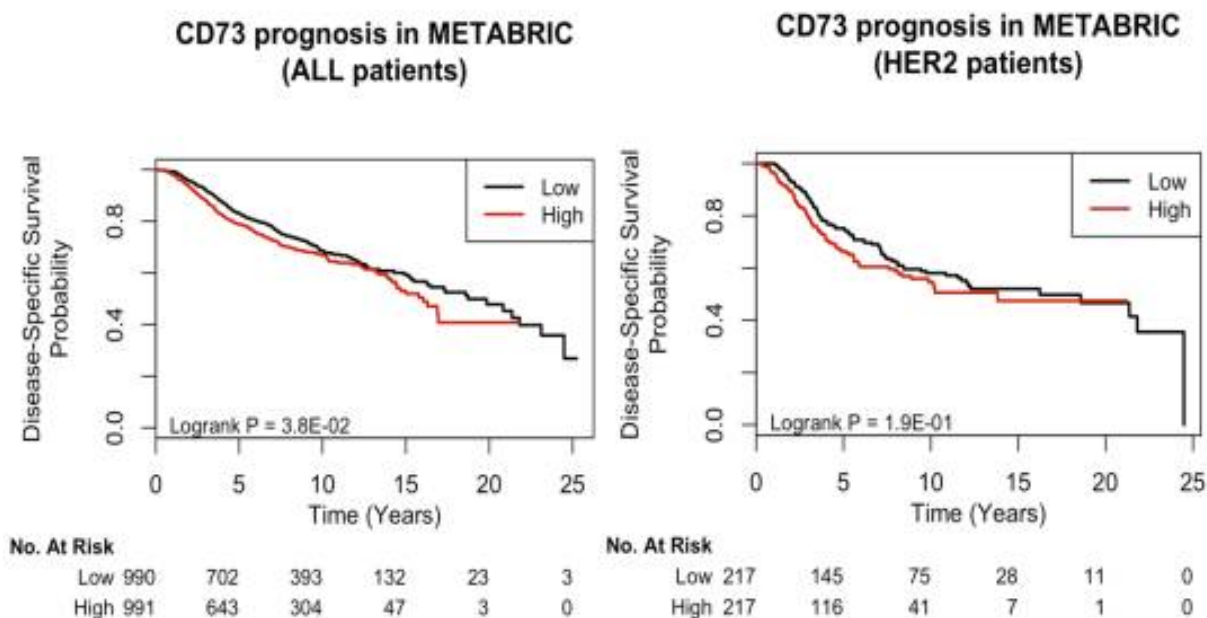


Figure S6.2 – Prognosis of CD73 gene expression in METABRIC. The median of CD73 mRNA expression was used to characterize the High (red) and Low (black) expression groups according to Disease-Specific survival (DSS).

### Multivariate analysis

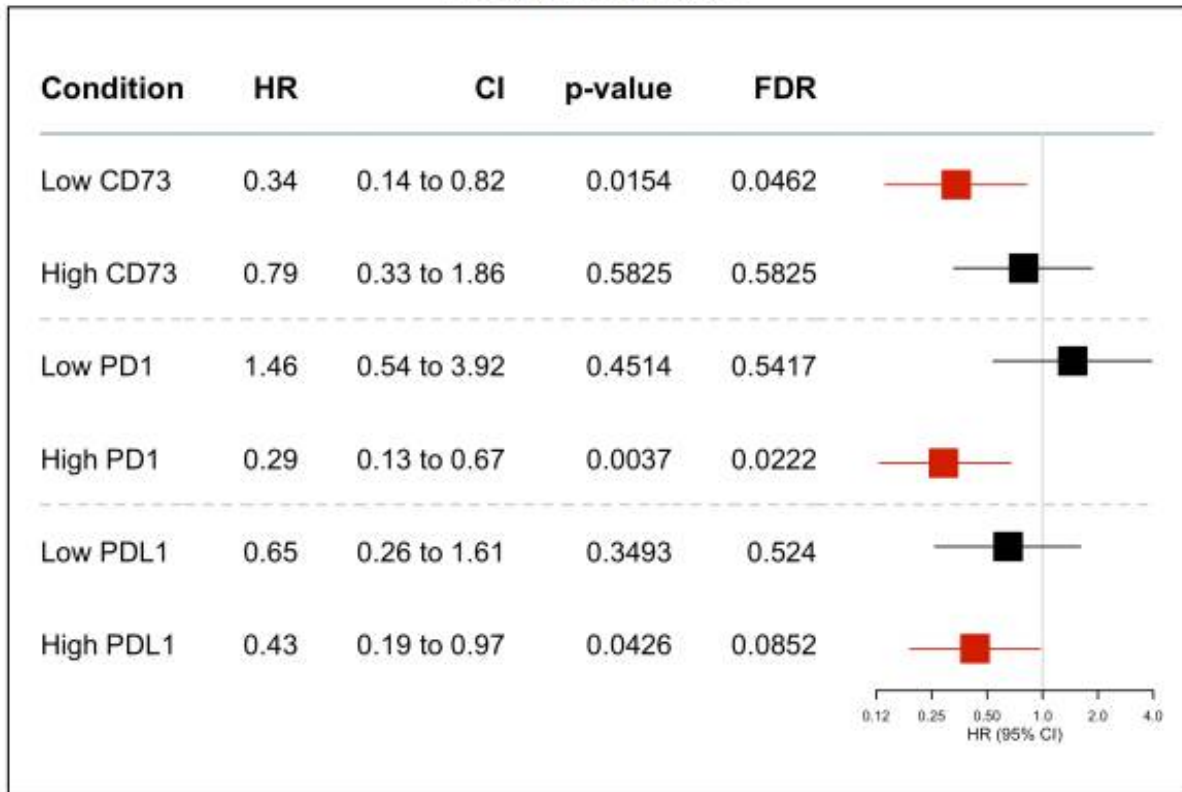


Figure S6.3 – Multivariate analysis. Clinical benefit from trastuzumab depending on the level of CD73 (NT5E), PD-1 (PDCD1) or PD-L1 (CD274) mRNA expression using logistic regression (adjustment for clinic-pathological characteristics including age, tumor size, nodal status and ER status). Horizontal bars represent the 95 % confidence intervals of Hazard Ratios (HR). Characteristics with significant effect after correction for multiple testing using the Benjamini-Hochberg procedure are shown in red ( $p < 0.05$  and  $FDR < 0.10$ ).

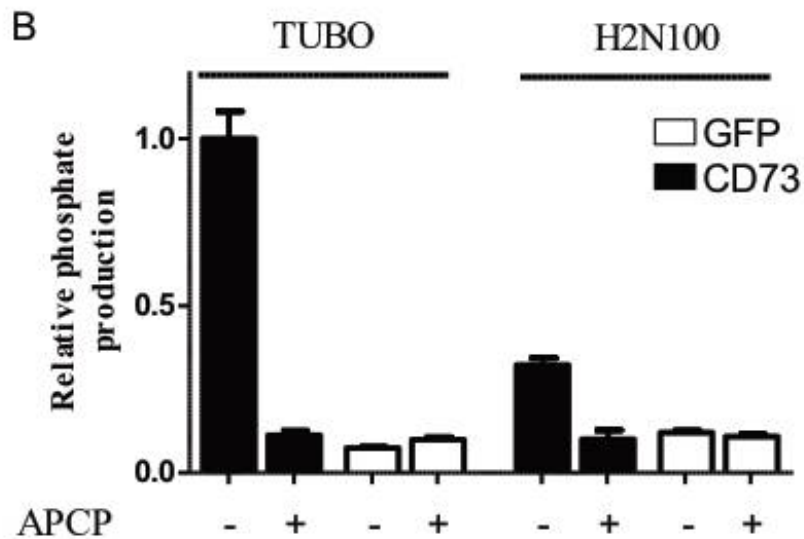
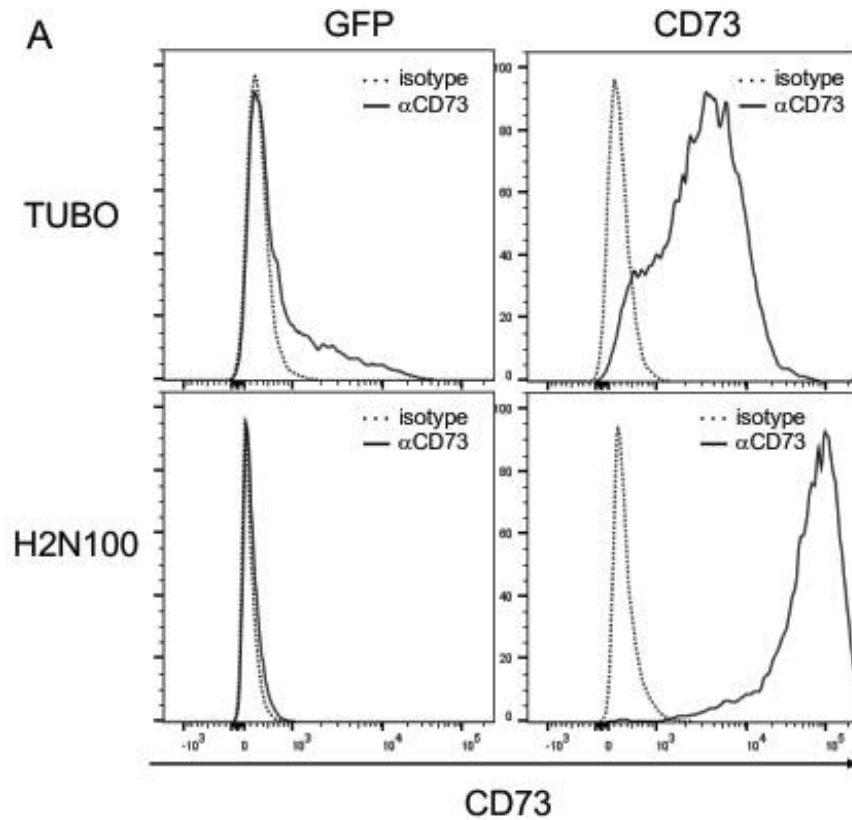


Figure S6.4 – CD73 expression and activity. (A) Flow cytometry analysis of CD73 expression in H2N100 cells and TUBO cells expressing a control GFP or CD73-GFP vector. (B) CD73 enzymatic activity of H2N100 and TUBO cells measured using a malachite green assay. AMP (40  $\mu$ M) was added and cells were incubated for 1 h with or without APCP (50  $\mu$ M).



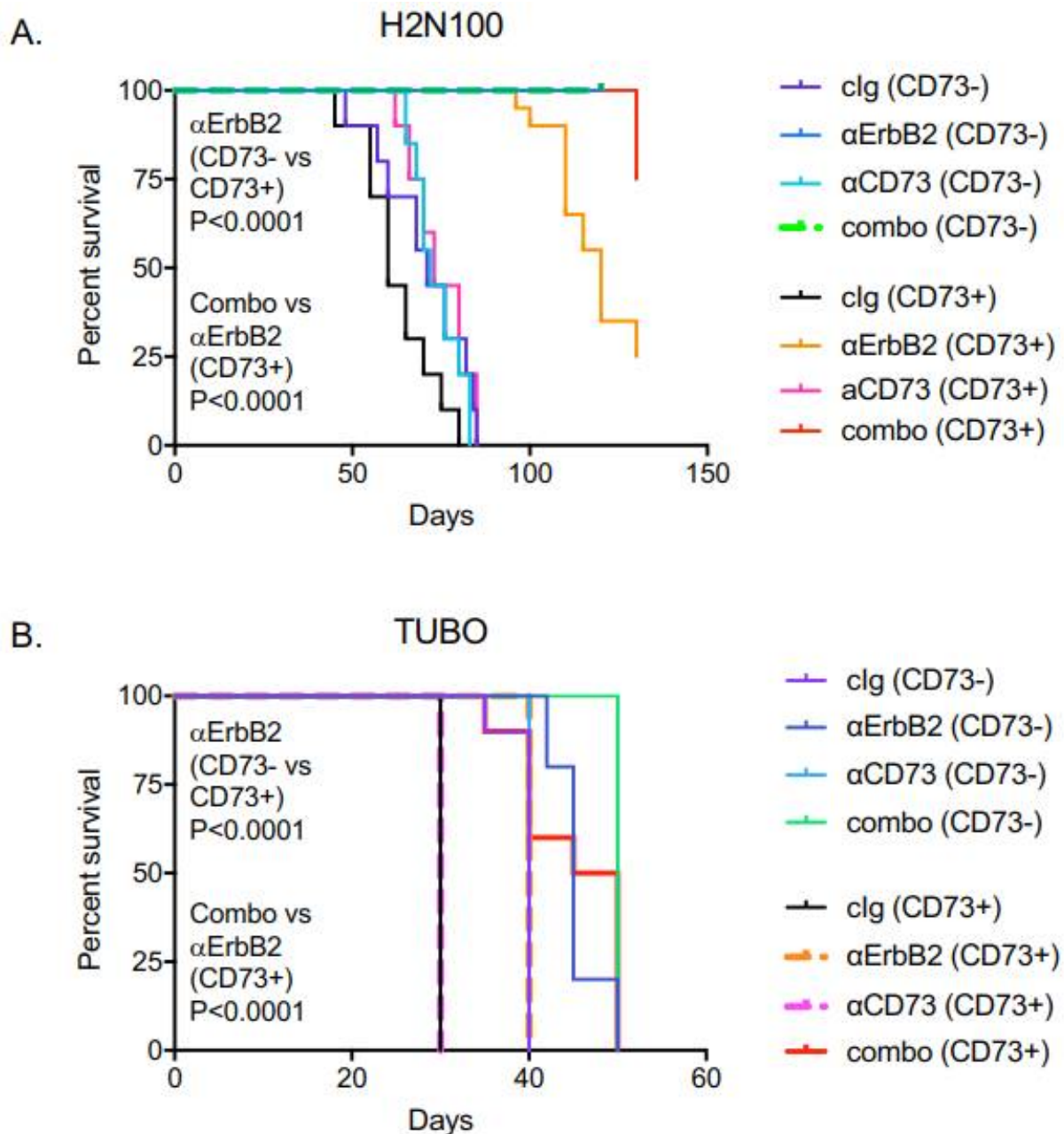


Figure S6.5 – Survival of mice bearing H2N100 or TUBO tumors. Data from Fig. 6.3 is plotted as Kaplan-Meier survival curves. (A) BALB/c mice were injected s.c. with H2N100-GFP (CD73<sup>-</sup>) or H2N100-CD73<sup>+</sup> breast tumor cells and treated with anti-ErbB2 mAb (25  $\mu$ g i.p. of clone 7.16.4) on day 12, 16 and 20, and/or anti-CD73 mAb (200  $\mu$ g i.p. of clone TY/23) on day 3, 8, 12, 16 and 20. (B) BALB/c mice were injected s.c. with TUBO-GFP (CD73<sup>-</sup>) or TUBO-CD73<sup>+</sup> breast tumor cells and treated with anti-ErbB2 mAb (100  $\mu$ g i.p. of clone 7.16.4) on day 12, 16 and 20, and/or anti-CD73 mAb (200  $\mu$ g i.p. of clone TY/23) on day 3, 8, 12, 16 and 20. Log-rank P values are shown.

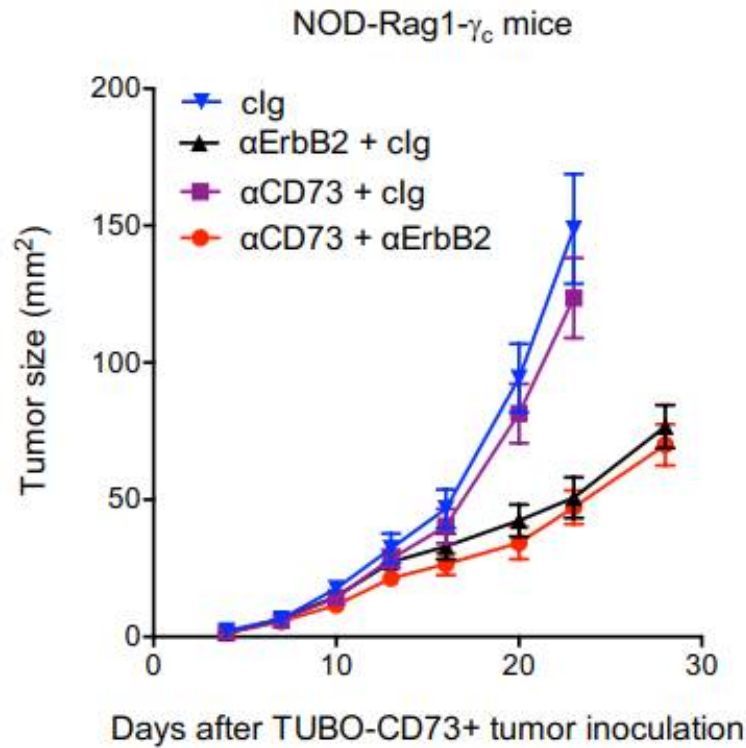


Figure S6.6 – Synergy between anti-CD73 and anti-ErbB2 mAb therapy is dependant on the immune system. Immunodeficient Nod-Rag1- $\gamma_c$  mice were injected s.c. with TUBO-CD73<sup>+</sup> tumor cells and treated with anti-ErbB2 mAb (100  $\mu$ g i.p. of clone 7.16.4) on day 12, 16 and 20, and/or anti-CD73 mAb (200  $\mu$ g i.p. of clone TY/23) on day 3, 8, 12, 16 and 20. Means  $\pm$  standard errors (n = 10 / group) are shown.

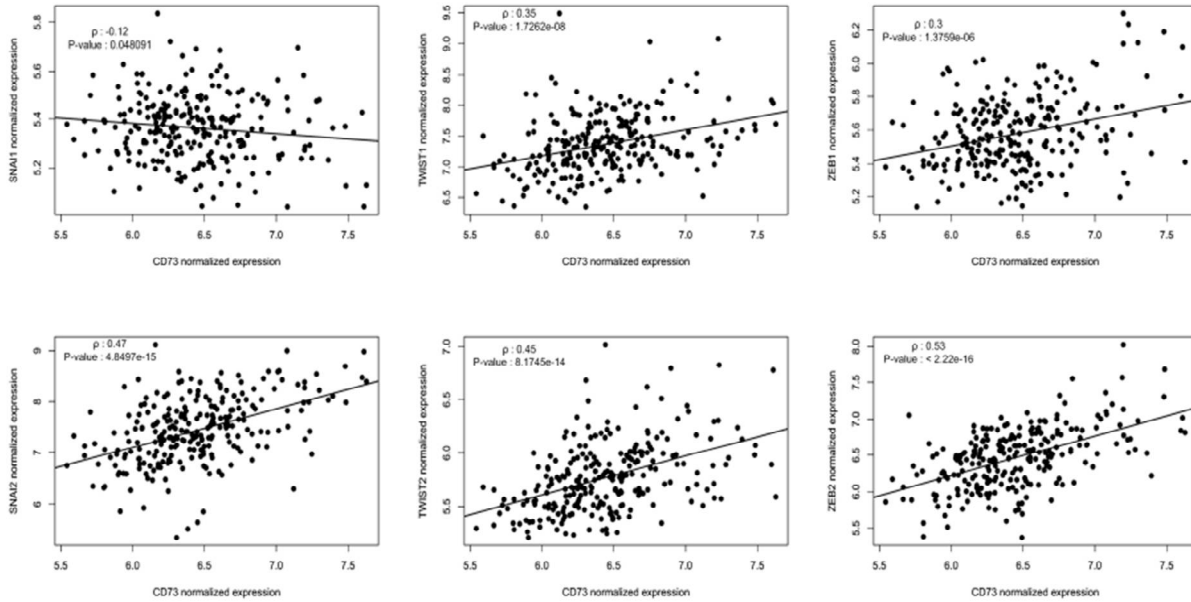


Figure S6.7 – CD73 is associated with EMT marker. The degree of association between CD73 mRNA expression and the EMT transcription factors SNAI1, SNAI2, TWIST1, TWIST2, ZEB1 and ZEB2 was performed in HER2<sup>+</sup> cases in METABRIC. Pearson coefficient ( $r$ ) and P values are shown.

# Chapitre 7 – Discussion, Perspectives & Conclusion

## 7.1 Réflexion sur la thérapie du cancer

Selon Statistique Canada, le cancer est la première cause de mortalité avec environ 30 % du total chez la population canadienne. Une grande partie de nos ressources sont dérivé vers le traitement et la recherche du cancer. Historiquement, beaucoup d'investissements de provenance gouvernementale ou philanthropique ont été injectés dans la recherche pour vaincre le cancer.

De manière générale, les plans thérapeutiques pour combattre un cancer sont constitués d'une thérapie visant l'élimination des cellules à prolifération rapide (c.-à-d. chimiothérapies, radiothérapies). Historiquement, ces thérapies ont effectué leurs preuves thérapeutiques, mais dans la majorité une sélection clonale s'effectue. C'est-à-dire qu'il y a une élimination d'une portion des cellules tumorales en créant un effet de sélection naturelle ce qui permet l'émergence de clone cellulaire plus agressif et résistant au traitement de première ligne. Un second problème est la difficulté de viser les cellules métastatiques qui ont souvent un profil différent des cellules tumorales primaires. Finalement, les thérapies à base de chimiothérapies sont très toxiques et entraînent des effets secondaires graves qui, dans certains cas, limite l'effet thérapeutique.

L'ajout de l'immunothérapie aux thérapies actuelles du cancer est une solution possible à ces problèmes. Les synergies observées avec la radiothérapie et l'immunothérapie permettent un meilleur contrôle tumoral systémique via le système immunitaire (550). En ce qui concerne la combinaison chimiothérapie – immunothérapie, le concept de mort cellulaire immunologique (ICD) par certaines chimiothérapies a permis d'expliquer les meilleurs résultats cliniques observés comparativement aux patients avec seulement de la chimiothérapie (551).

L'objectif principal de l'immunothérapie est de supporter le système immunitaire de l'hôte à effectuer une réponse anti-tumorale plus efficace dans le but de faire pencher la balance vers une immunosurveillance capable d'éliminer les cellules tumorales (Figure 7.1) (552).

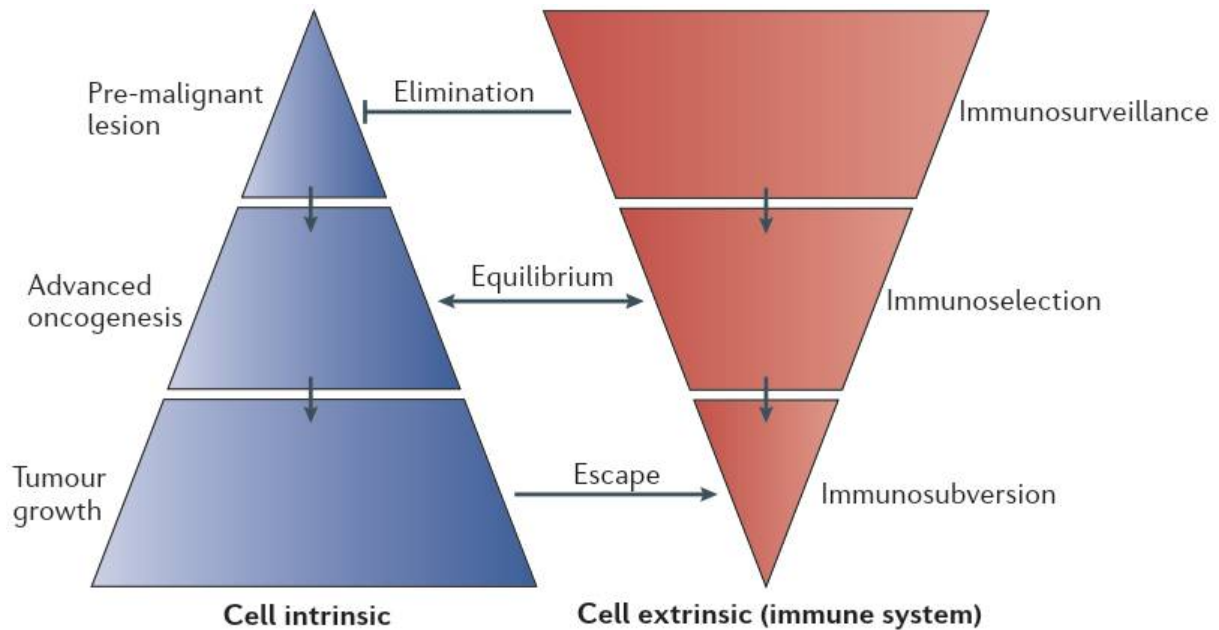


Figure 7.1 – Équilibre immunologique de la tumeur. © Zitvogel et al. Nat Rev Immunol, 2006. With permission from Springer Nature.

## 7.2 Modèles *in vivo*

### 7.2.1 Cancer de l’ovaire

Le modèle *in vivo* de cancer de l’ovaire épithélial utilisé au chapitre 5 est le modèle ID8. Brièvement, ce modèle a été généré dans les années 2000 par l’isolement de cellules murines de l’épithélium de la surface de l’ovaire. Puis, une transformation phénotypique via une vingtaine de passages *in vitro* a été effectuée menant à une perte de la morphologie épithéliale des cellules (Figure 7.2) (553).

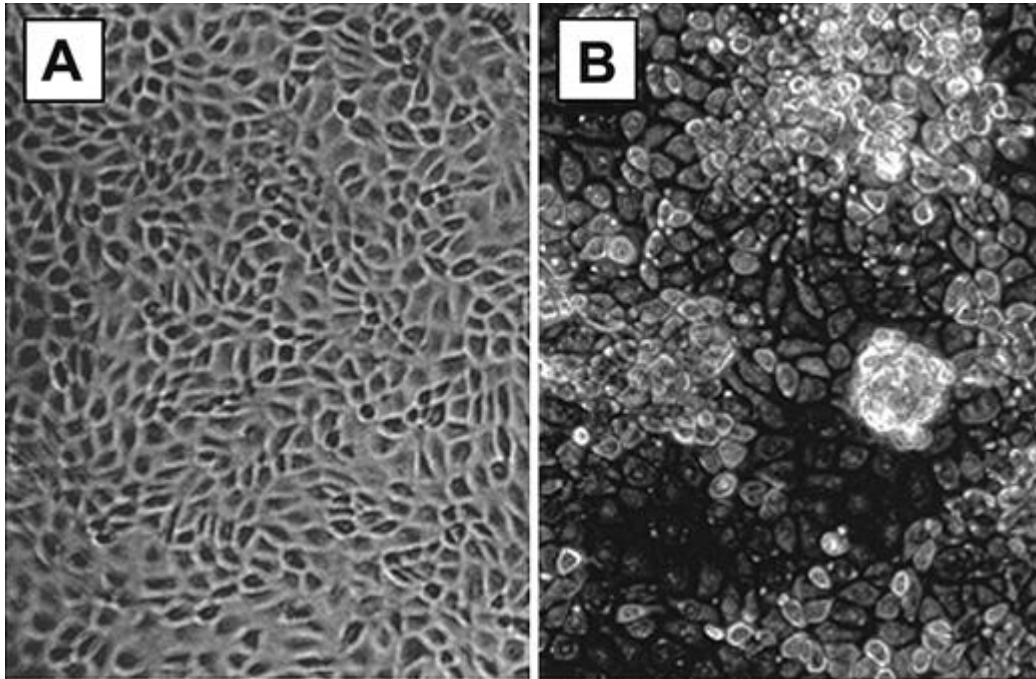


Figure 7.2 – Morphologie des MOSEC *in vitro*. (A) Cellules de bas passage exhibant une morphologie typique épithéliale par une couche unicellulaire en forme de pavé avec une inhibition de croissance. (B) Cellules de passage tardif avec une perte de la morphologie en pavé et perte de l’inhibition de contact. © Roby and Taylor. Carcinogenesis, 2000. With permission from Oxford University Press.

Ces cellules ont la propriété de former des tumeurs dans la cavité péritonéale des souris avec une production d’ascite similaire à ce qui est observé cliniquement chez les femmes atteintes de cancer de l’ovaire (554,555). Étant donné que ces cellules forment des tumeurs dans la souris immunocompétente, ce modèle est idéal pour étudier les interactions immunitaires dans le développement du cancer de l’ovaire. En effet, ce modèle préclinique est le modèle le plus utilisé lors de l’étude des combinaisons entre différentes immunothérapies avec PD-1 (419-423).

Cependant, une des principales critiques de ce modèle est son origine. En effet, les cellules ID8 sont dérivées de l’épithélium de surface de l’ovaire d’une souris, alors que l’origine des cancers séreux de haut grade est beaucoup plus complexe. Cette pathologie est très hétérogène et peut se développer à partir de multiples tissus hors ovaire incluant les tissus Müllérien des trompes de Fallope (556,557). De plus, il est important de noter que lors de

l'injection intrapéritonéale de ce modèle préclinique de cancer de l'ovaire, les cellules tumorales vont coloniser toute la cavité péritonéale et non seulement les ovaires (Figure 7.3) (558).

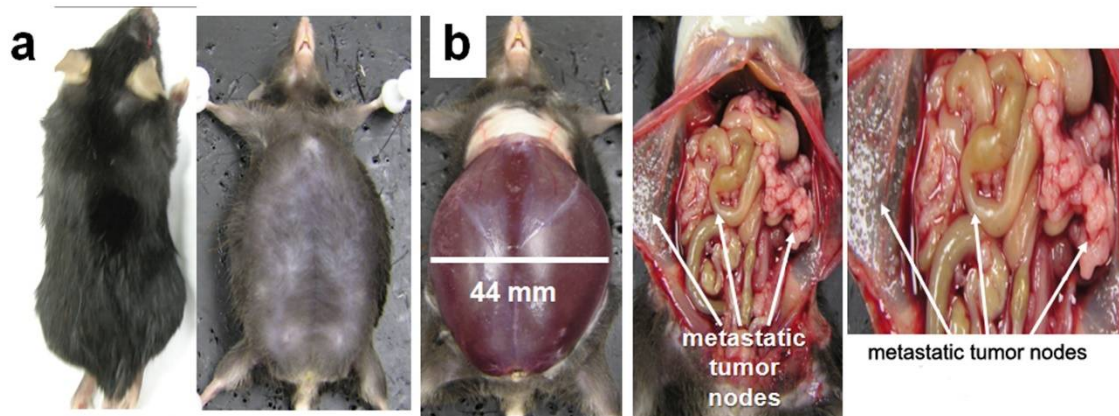


Figure 7.3 – Analyse *in vivo* des ID8. (A) Souris contrôle sans injection de cellules ID8 (gauche) et souris injectée avec  $2 \times 10^6$  cellules ID8 après 40 jours (droite). (B) Souris injectée avec  $2 \times 10^6$  cellules ID8 après 40 jours (gauche) et après avoir aspiré les 22 mL d'ascites de la cavité péritonéale (droite). © Chiriva-Internati et al. PLoS One, 2010.

Pour davantage simuler l'observation que CD73 est présent sur la fraction mésenchymateuse (Fig S5.7A) le modèle *in vivo* a été adapté par la co-injection de fibroblastiques mésenchymateux embryonnaires (MEF) et de cellules ID8 de manière intrapéritonéale (Fig 5.5 et S5.7). L'objectif de ce modèle de souris a été de reproduire le plus fidèlement possible l'observation de la figure 5.5A démontrant que l'expression de CD73 sur les fibroblastes associés aux tumeurs corrèle avec un mauvais pronostic. Un modèle similaire a déjà été utilisé où les fibroblastes agissaient en tant que vecteur de production d'une cytokine (559). Les expériences *in vivo* avec le modèle ID8-MEF sont d'environ 60 jours où les souris sont réinjectées avec une dose de  $5 \times 10^6$  de fibroblastes tous les 15 jours. Ce protocole a été mis sur pied dans le but de garder une expression constante de CD73 dans la région péritonéale de la souris étant donné une prolifération *in vitro* beaucoup plus rapide des cellules ID8 comparativement aux MEF. Finalement, les cellules fibroblastiques ont été modifiées à très bas passage par un vecteur GSEp53 permettant leur immortalisation avant leur passage vers la sénescence.

La seule différence entre les deux groupes à l'étude est l'expression de CD73 au niveau des cellules fibroblastiques. L'hypothèse initiale étant que la très faible expression et activité enzymatique de CD73 au niveau des cellules ID8 observées *in vitro* (Fig. S5.7B) influence de manière négligeable l'activité anti-tumorale *in vivo*. Cependant, il a déjà été décrit que les cellules ID8 injectées *in vivo* augmentent leur niveau d'expression de CD73 au niveau des ascites (Figure 7.4) (187). *In vitro*, une co-culture de cellules ID8 et MEF augmentent le niveau de prolifération des cellules ID8 de manière CD73-indépendante (Fig. S5.7D), mais aucune variation de l'expression de CD73 n'a été observée (données non montrées).

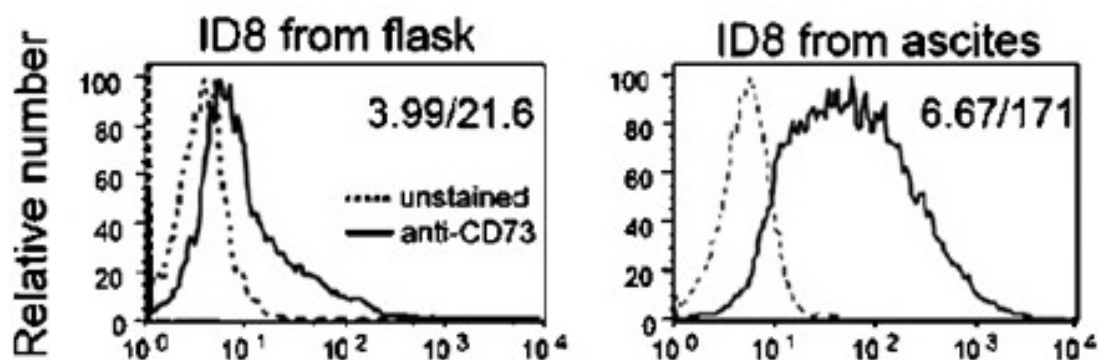


Figure 7.4 – Expression de CD73 des cellules ID8 *in vitro* vs ascites. © Jin et al. Cancer Res, 2010. With permission from AACR.

L'objectif de la figure 5.5 était de déterminer l'effet de l'expression de CD73 fibroblastique sur la promotion de la prolifération tumorale. Pour ce faire, plusieurs expériences indépendantes ont été effectuées pour suivre différents paramètres; augmentation du poids (Fig. S5.7E), nombres de nodules tumoraux (Fig. 5.5C) et survie des souris (Fig. 5.5B). La prise de poids de la souris est un paramètre très variable selon la croissance normale de la souris, la production d'ascite et la perte de poids par la condition générale de la souris lorsque celle-ci est atteinte d'un cancer avancé. Une mesure quantitative du poids de ces souris lors de leur stade final est très difficile étant donné la présence de variations au niveau de la production d'ascites qui corréleront faiblement avec la prise de poids ainsi que la charge tumorale. Les deux autres paramètres, nombre de nodules tumoraux et survie, sont des paramètres qui ont un statut



terminal ne pouvant pas mesurer la progression tumorale. Une solution permettant d'améliorer l'efficacité de ces expériences aurait été d'employer l'imagerie. En effet, l'imagerie diagnostique permet de mesurer la masse tumorale de manière quantitative sans sacrifier les souris permettant ainsi de suivre la progression (560). Il a également été démontré que l'infection des cellules ID8 par un vecteur codant la luciférase en combinaison avec l'imagerie permet d'améliorer la visualisation des résultats tout en étant faiblement immunogénique (561,562).

Pour analyser l'infiltration immunitaire spécifique aux cellules tumorales, une modification du modèle *in vivo* a été nécessaire. En effet, les cellules ID8 ont été modifiées pour exprimer l'ovalbumine et co-injecté de manière sous-cutanée avec les différents MEF permettant ainsi d'obtenir assez de matériel tumoral pour effectuer des expériences de cytométrie en flux. Au moment de l'injection des souris, les cellules ID8-OVA exprimait cette protéine à 93 % (Fig. S5.8A). Représentant ainsi la présence hétérogène des antigènes tumoraux au sein d'une tumeur. Les résultats de cette expérience démontrent clairement que la présence de CD73 au niveau des cellules stromales diminue significativement la réponse anti-tumorale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> spécifiques aux cellules tumorales.

Un modèle de souris génétiquement modifié spécifiquement au niveau de l'épithélium de l'ovaire pour les gènes p53, RB et BRCA1/2 a été déterminé comme très proche de la pathophysiologie du cancer de l'ovaire séreux humain (563). Il serait très intéressant de croiser cette souris avec la souris CD73<sup>-/-</sup> pour observer l'effet de cette enzyme sur le développement de tumeurs spontanées.

## 7.2.2 Cancer du sein

Le modèle murin utilisé au chapitre 6 est la souris MMTV-NeuT. Cette souris transgénique a été créée par l'insertion d'un transgène contenant le gène NeuT sous le promoteur MMTV. Après environ 60 jours, la souris va développer des tumeurs spontanées spécifiquement au niveau de ces glandes mammaires (564). Ce modèle *in vivo*, avec ces variances, est utilisé dans plusieurs applications cliniques pour l'étude du cancer du sein HER2<sup>+</sup> (565).

Les lignées cellulaires utilisées pour les expériences *in vivo* injectées de manière sous-cutanée sont les H2N100 et les TUBO. Celles-ci ont été dérivées d'un carcinome lobulaire spontané d'une souris MMTV-NeuT par deux laboratoires indépendants; les H2N100 par le laboratoire de Mark Smith en Australie (566) et les TUBO par le laboratoire de Guido Forni en Italie (567). Étrangement, ces deux lignées cellulaires, qui ont été dérivées selon le même protocole, démontrent des caractéristiques très différentes. En ce qui concerne les expérimentations *in vivo*, on peut clairement observer que la lignée TUBO a une croissance tumorale plus rapide et est plus résistante au traitement anti-ErbB2 (Fig. 6.4A vs Fig. 6.4C). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette différence : une croissance cellulaire plus rapide *in vitro* (données non montrées), une activité enzymatique plus élevée de CD73 (Fig. S6.4B) ainsi qu'une expression plus élevée du CMH de classe I dans la lignée cellulaire TUBO (Figure 7.5). Néanmoins, obtenir des résultats similaires avec 2 modèles se comportant différemment renforce la conclusion de ces expériences démontrant une synergie entre un traitement anti-CD73 et un traitement anti-ErbB2.

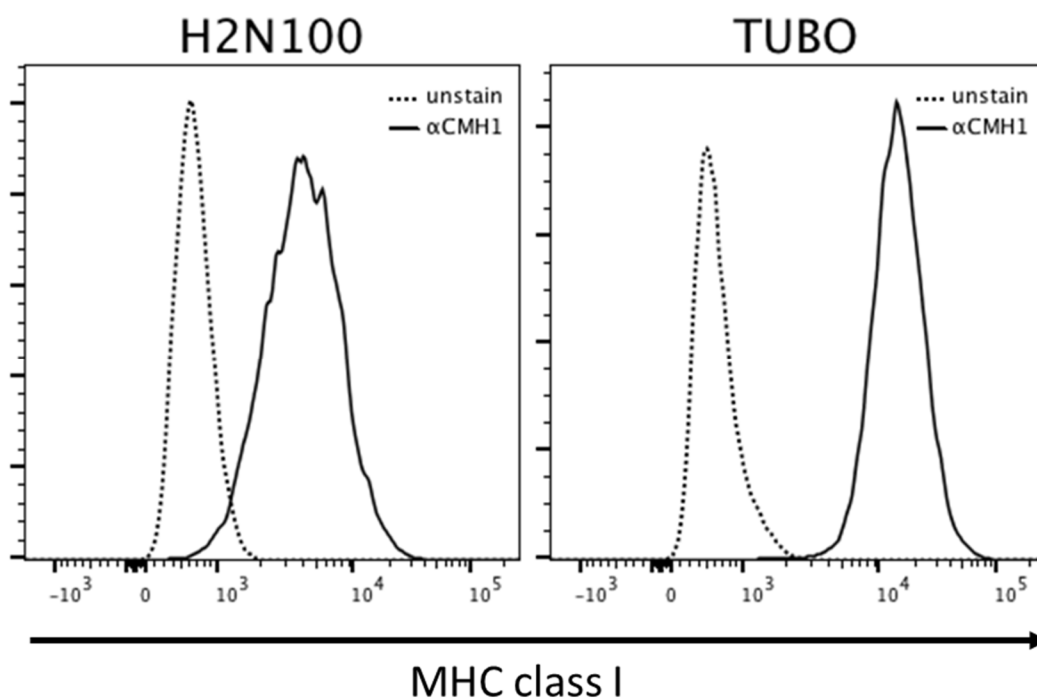


Figure 7.5 – Expression du CMH classe I des lignées cellulaires H2N100 et TUBO.

Le premier modèle *in vivo* utilisé (fig. 6.4) est l'injection, chez la souris sauvage, de cellules tumorales syngéniques dérivées à partir d'une souris MMTV-NeuT (c.-à-d. H2N100 et TUBO). L'objectif principal étant d'étudier la synergie thérapeutique entre les traitements trastuzumab et anti-CD73 d'un point de vue immunologique, il était obligatoire d'expérimenter avec un modèle syngénique pourvue d'un système immunitaire complet. L'utilisation d'un modèle de xénogreffe dans une souris immunodéficiente, par exemple l'injection de cellules SKBR3 dans une souris NSG, aurait certes été intéressante à utiliser pour déterminer d'autres mécanismes de synergie possible entre les traitements étant donné les rôles non immunitaires de CD73.

Dans ce modèle syngénique, il est impossible d'utiliser le trastuzumab étant donné que c'est un anticorps humanisé. Donc, un anticorps monoclonal (clone 7.16.4) reconnaissant le récepteur ErbB2 de rat du modèle MMTV-NeuT a été utilisé. Cet anticorps se lie sur le même épitope que le trastuzumab et partage beaucoup de similarités structurelles (568).

Récemment, un modèle transgénique surexprimant le récepteur ErbB2 humain (MMTV.f.HuHER2) a été caractérisé et plusieurs lignées cellulaires ont été dérivées (569). Ce nouveau modèle *in vivo* est une amélioration des modèles utilisés au chapitre 6. Chacune de ces lignées cellulaires expriment peu le récepteur à l'oestrogène ainsi que le récepteur à la progestérone et provient de plusieurs origines (tumeurs primaires, métastases pulmonaires, métastases du cerveau). Ces lignées cellulaires et ce modèle transgénique permettraient de se rapprocher davantage du phénomène biologique humain.

Des expériences de déplétions spécifiques a permis de démontrer que l'inhibition thérapeutique de ErbB2 chez la souris CD73<sup>-/-</sup> est en partie dépendante des cellules NK (Fig. 6.6A) et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Fig. 6.6B). Suite à ces observations et considérant l'importance de l'ADCC dans l'efficacité thérapeutique du trastuzumab, il serait intéressant et pertinent de démontrer le rôle précis de CD73 dans l'ADCC avec un système *in vitro* humain.

Il est également démontré que la combinaison entre l'inhibition de CD73 et de ErbB2/HER2 diminue significativement les métastases pulmonaires comparativement à un traitement anti-ErbB2 seul (Fig 6.5C). Cette expérience emploie un modèle simpliste de métastases qui consiste à l'injection de cellules tumorales (dans ce cas les H2N100) dans la

veine caudale des souris. En suivant le système vasculaire, le poumon est l'organe de prédilection pour la colonisation des cellules tumorales. Ce type d'expérience permet davantage de mesurer l'effet des thérapies sur l'ensemencement de l'organe qui est seulement une étape du processus métastatique. L'utilisation des cellules TUBO-P2J permettrait d'obtenir des observations sur l'ensemble du phénomène métastatique. Ces cellules, dérivées des TUBO, sont résistantes à une thérapie anti-ErbB2 et produisent des métastases pulmonaires spontanément après 14 jours lorsqu'elles sont injectées de manière sous-cutanée (570). Fait intéressant, la lignée cellulaire TUBO-P2J semble avoir effectué une EMT par une diminution de l'expression de E-cadherin et une augmentation de l'expression de vimentin, SNAIL et TWIST comparativement aux cellules TUBO parentales (570). De plus, ces cellules expriment fortement CD73 (Figure 7.6). Une expérience avec ces cellules injectées de manière sous-cutanée à un groupe de souris sauvage traité avec un anticorps monoclonal inhibant CD73 permettrait d'observer le rôle de CD73 sur un phénomène métastatique plus complet.

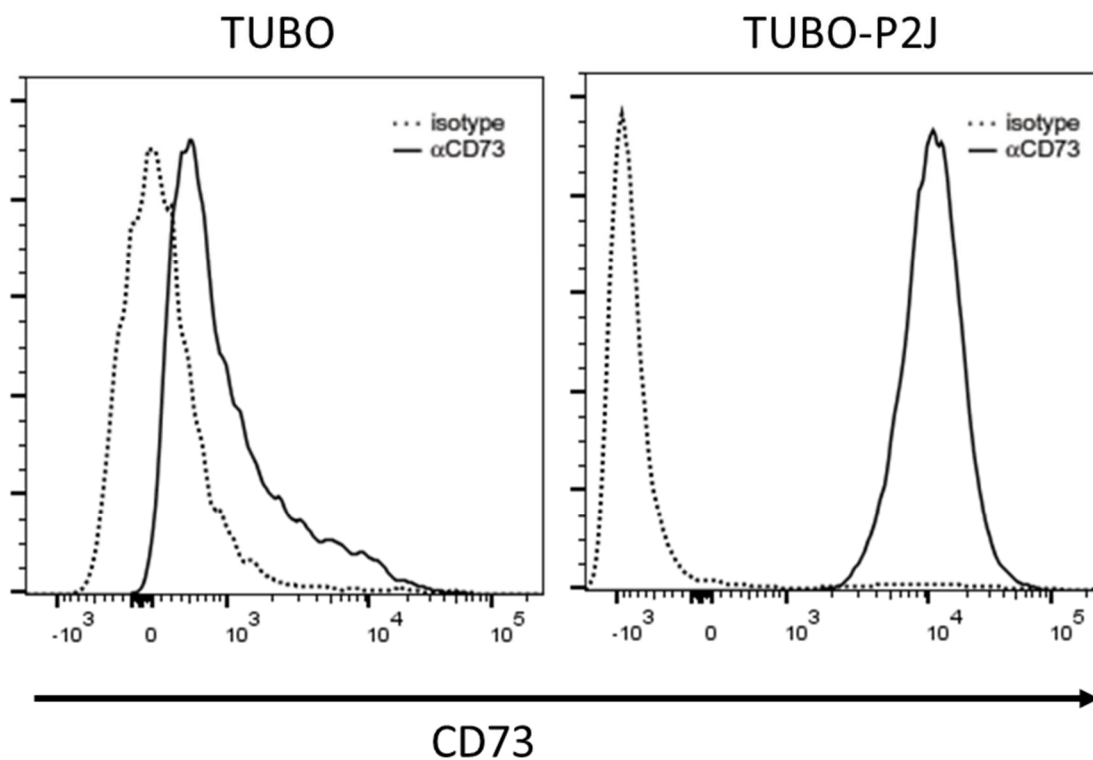


Figure 7.6 – Niveau d'expression de CD73 des lignées cellulaires TUBO et TUBO-P2J.

## 7.3 Modèles *in vitro*

### 7.3.1 Cancer de l'ovaire

L'intégralité de la figure 5.4 consiste en des expériences *in vitro* avec la lignée cellulaire SKOV3. Une étude a déjà rapporté que cette lignée cellulaire est peu représentative du cancer de l'ovaire séreux de haut grade (571). Les cellules SKOV3 ont peu d'altérations génomiques caractérisé par aucune mutation dans le gène TP53 et le gène BRCA1/2, tous des caractéristiques essentielles au cancer de l'ovaire séreux de haut grade. Cependant, cette lignée cellulaire est la plus populaire avec une utilisation dans plus de 2000 publications scientifiques. Ceci découlerait d'une mauvaise communication du laboratoire d'origine des SKOV3 qui n'on pas assigné de sous-type histologique à cette lignée cellulaire, alors qu'aujourd'hui elle est largement acceptée comme un modèle de cancer séreux de haut grade.

Malgré les analyses de cette publication, cela ne diminue pas la qualité des résultats obtenus avec la lignée cellulaire SKOV3 qui démontrent une promotion de la prolifération cellulaire dépendante de CD73. En effet, les résultats obtenus avec ces cellules ont été répétés avec la lignée cellulaire de cancer de l'ovaire OV4485 qui a été caractérisée moléculairement comme étant du sous-type séreux de haut grade (572).

### 7.3.2 Cancer du sein

La partie *in vitro* du chapitre 6 emploie les HMLE une lignée cellulaire dérivée par le laboratoire du Dr Robert Weinberg dans les années 2000 (573). Brièvement, cette lignée cellulaire est une transformation de cellules épithéliales primaires mammaires humaines par l'introduction des gènes SV40 large-T antigen, telomerase catalytic subunit et de l'oncoprotéine H-RAS. Ensuite, les HMLE ont été infectés avec un vecteur codant pour une protéine de fusion TWIST1-ER qui peut être spécifiquement activé par la liaison du 4-hydroxytamoxifen (4-OHT). Ce système a déjà prouvé sa pertinence pour l'étude des phénomènes entourant l'EMT (574). En effet, l'induction de l'EMT dans ce modèle cellulaire augmente les marqueurs

mésenchymateux fibronectin, vimentine et N-cadherin avec une diminution de l'expression de E-cadherin (Figure 7.7B). Le suivi de l'expression de E-cadherin a permis de mesurer une baisse significative de l'expression de cette molécule après 12 jours d'induction (Figure 7.7C-D).

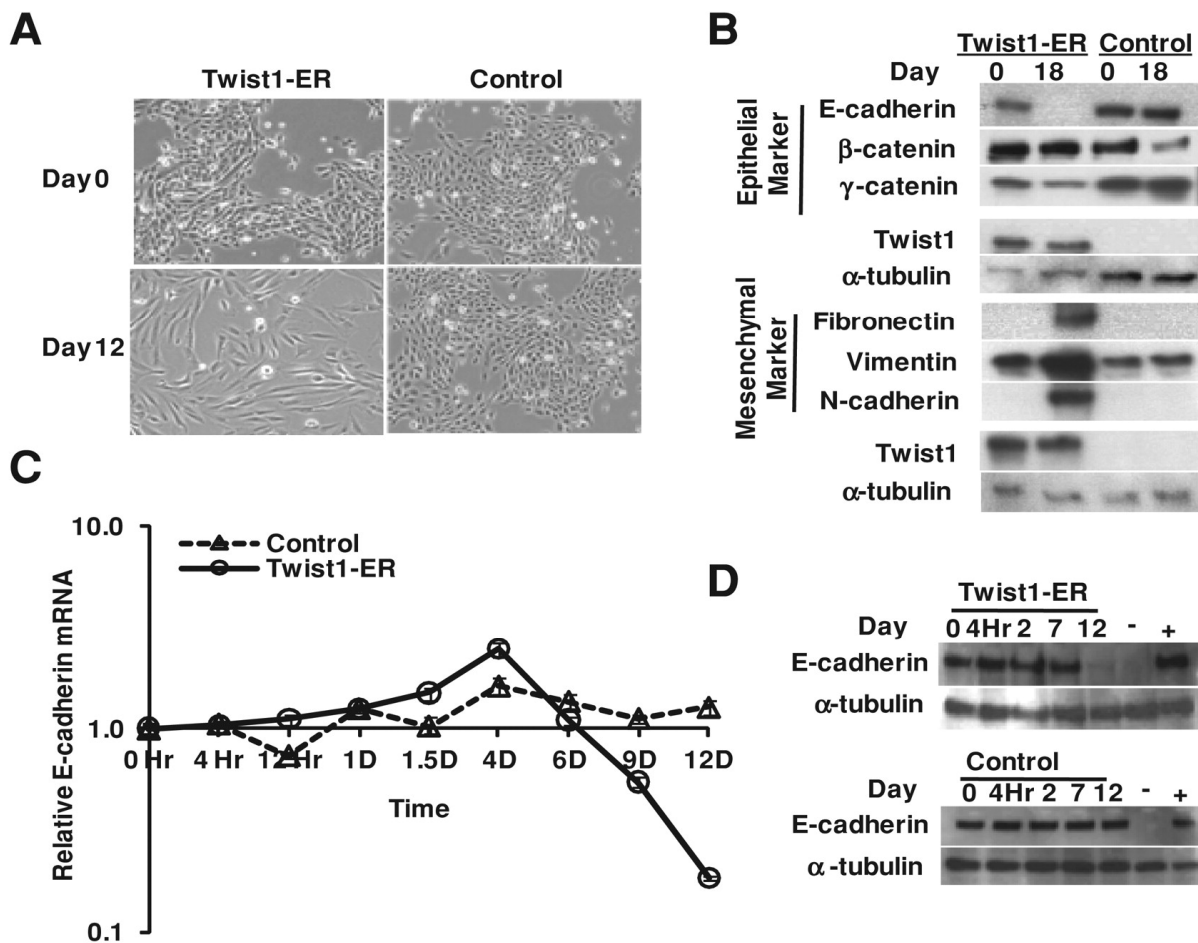


Figure 7.7 – Twist1 supprime indirectement la transcription d'E-cadherin pour promouvoir l'EMT. (A) Images des cellules HMLE exprimant Twist-ER ou un vecteur contrôle avant et après 12 jours avec un traitement au 4-OHT (20 nmol/L). (B) Lysat de cellules HMLE exprimant Twist1-ER ou un vecteur contrôle collecté avant et après 18 jours avec un traitement au 4-OHT, analysé par SDS-PAGE pour les protéines Twist1-ER, E-cadherin,  $\beta$ -catenin,  $\gamma$ -catenin, fibronectin, vimentin, N-cadherin et  $\alpha$ -tubulin. (C) Analyse PCR de l'expression du mRNA de E-cadherin des cellules HMLE exprimant Twist-ER ou un vecteur contrôle traité avec 4-OHT. (D) Lysat de cellules HMLE exprimant Twist1-ER ou un vecteur contrôle collecté pendant le traitement de 12 jours au 4-OHT, analysé par SDS-PAGE pour les protéines E-cadherin et  $\alpha$ -tubulin. Les cellules HMLE exprimant Twist1 ou un vecteur contrôle sont utilisées comme contrôle négatif ou positif. © Cases E et al. Cancer Res, 2011. With permission from AACR.

En suivant ces résultats, l'emploi de ce modèle cellulaire après un traitement au 4-OHT pendant 12 jours a permis de générer des résultats intéressants (Fig. 6.7D-G). Les HMLE expriment fortement CD73 et encore davantage lorsqu'elles sont exposées au 4-OHT (Fig. 6.7D). Le suivi de ces cellules vers un état mésenchymateux a été effectué en cytométrie en flux avec les marqueurs CD24 et CD44. Ces marqueurs sont deux molécules d'adhésion cellulaire où CD24 est plus largement exprimé au niveau des cellules épithéliales alors que CD44 est associé à un phénotype mésenchymateux (575). L'utilisation de ces marqueurs par cytométrie en flux a permis d'augmenter l'efficacité des expériences en améliorant la rapidité et la quantification des résultats comparativement à d'autres méthodes. Différents marqueurs associés à l'EMT (c-à-d. TWIST, SNAIL, E-cadherin, Vimentin, ZEB1 et ZEB2) ont quand même été vérifiés par PCR (données non-montrées).

## 7.4 Infiltration lymphocytaire

Une partie importante du chapitre 5 est l'étude de l'infiltration des lymphocytes T dans le compartiment épithélial par la quantification du marqueur CD8 (Fig. 5.3). Cependant, ce marqueur ne fournit aucune indication quant à leur état fonctionnel par la production de cytokines, la capacité cytolytique ou le statut de prolifération. Toutes ces caractéristiques, si absentes, peuvent diminuer la pertinence de cette infiltration. Une autre possibilité est le ratio entre les lymphocytes T  $\alpha/\beta$  et les lymphocytes  $\gamma/\delta$  qui est également inconnu. De manière intéressante, une étude a démontré une proportion de plus de 30 % des lymphocytes T  $\gamma$  dans le cancer de l'ovaire séreux (576). Ces lymphocytes peuvent avoir des effets anti-tumoraux comme les lymphocytes T  $\alpha/\beta$ , mais peuvent également avoir des effets pro-tumoraux par la promotion d'une inflammation non-cytotoxique (577). Néanmoins, l'infiltration intra-tumorale lymphocytaire dans le cancer de l'ovaire est bien décrite dans la littérature en corrélant positivement avec la survie des patientes (Fig. 2.4).

Finalement, un anticorps anti-CD8 peut également marquer d'autres sous-types cellulaires tels certaines cellules NK, cellules NKT et lymphocytes T régulateurs CD8<sup>+</sup>. Cependant, la densité de l'infiltration des lymphocytes T corrèle positivement avec l'expression du CMH de classe I ainsi que HLA-DR indiquant une présentation antigénique (578,579).

Les conclusions démontrant qu'une faible expression de CD73 potentialise l'effet pronostique des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Fig. 5.3) peuvent être extrapolés vers les modèles *in vivo* du projet sur le cancer du sein HER2<sup>+</sup>. En effet, il y a une augmentation significative de l'infiltration des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le modèle TUBO lors d'une déficience de CD73 chez l'hôte (souris CD73<sup>-/-</sup>) (Fig. 6.6C). De manière intéressante, ces infiltrations semblent être potentialisées par un traitement anti-ErbB2 (Fig. 6.5A et 6.6C).

## 7.5 CD73 : Biomarqueur en cancer de l'ovaire

Tel que mentionné au chapitre 2, le taux élevé de mortalité dans le cancer de l'ovaire est principalement causé par un diagnostic tardif. Donc, une détection plus tôt de la tumeur pourrait théoriquement améliorer les résultats cliniques. Cependant, ceci reste un défi important étant donné le manque de biomarqueurs sensibles et spécifiques avec une pathophysiologie évoluant rapidement laissant une fenêtre thérapeutique très mince.

Spécifiquement pour le cancer de l'ovaire, CD73 pourrait agir en tant que biomarqueur pronostique. Tel que démontré à la figure 5.2B et C où une expression élevée de CD73 au niveau tumoral corrèle avec un mauvais pronostic. De plus, le cancer de l'ovaire séreux a la caractéristique unique de produire des ascites dans un compartiment facilement accessible. L'expression de CD73 au niveau des exosomes ainsi que la forme soluble de CD73 sont deux alternatives qui devraient d'être investiguées en tant que biomarqueur.

### 7.5.1 Exosomes

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires qui ont un rôle de communication intercellulaire. Dans un contexte oncogénique, les exosomes dérivées des tumeurs sont caractérisés par un phénotype pro-EMT incluant TGF- $\beta$ , caveolin-1, HIF1 $\alpha$  et  $\beta$ -catenin (580). Par l'expression de CD39 et CD73, ces exosomes ont également la caractéristique de moduler le microenvironnement tumoral immunologique (580). En effet, CD73 sur ces exosomes a déjà



été décrit comme pouvant contribuer aux mécanismes d'immunosuppression des lymphocytes T régulateurs (581,582) via l'activation du récepteur A2A sur les lymphocytes T (188).

Au niveau du cancer de l'ovaire, les exosomes ont été identifiés dans les ascites malignes et joue un rôle important dans la dissémination péritonéale (583). Cependant, aucun lien direct n'a été effectué avec le rôle de CD73 au niveau des exosomes précisément dans le cancer de l'ovaire.

D'un point de vue du cancer du sein, les exosomes dérivées des tumeurs ont également la propriété de lier et séquestrer les anticorps, diminuant ainsi l'ADCC dépendant des cellules NK (584). Aucun lien entre cette propriété et l'activité de CD73 n'a été établi. Étant donné l'importance de l'ADCC dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup>, ce phénomène biologique devrait être investigué.

### **7.5.2 CD73 soluble**

Tel que décrit au chapitre 1, CD73 est une enzyme ancrée à la membrane par un GPI qui peut être clivé et relâcher une forme soluble dans le microenvironnement tumorale et dans le système circulatoire. Très récemment, une association significative a été observée entre l'activité de cette enzyme sous sa forme soluble dans le sérum de patients atteint de mélanomes de stade IV et leur réponse clinique au nivolumab (585). Suggérant ainsi un rôle potentiel de biomarqueur sanguin pronostique. Cette idée devrait être étudiée dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup> ainsi que dans le cancer de l'ovaire séreux de haut grade étant donnée l'identification de cette enzyme en tant que facteur pronostique au niveau tumoral aux chapitres 5 et 6.

La poursuite de cette idée est particulièrement pertinente pour le cancer de l'ovaire au niveau des ascites qui est un compartiment très accessible et plus proche physiologiquement de la tumeur que le système sanguin. De plus, des données préliminaires démontrent une corrélation inverse entre la survie des patientes et les niveaux de CD73 soluble dans les ascites dans une cohorte d'environ une centaine de patientes (données non montrées). La méthode de détection du CD73 soluble devrait être validée et ces résultats préliminaires devront être confirmés sur une plus grande cohorte.

## 7.6 CD73 : Cible thérapeutique

Tel que discuté aux chapitres 2 et 3, plusieurs études cliniques investiguant diverses immunothérapies en cancer de l’ovaire et cancer du sein HER2<sup>+</sup> ont démontré des résultats cliniques encourageants chez certaines patientes. Ces résultats posent la fondation nécessaire pour l’exploration de nouvelles immunothérapies et de nouvelles combinaisons d’immunothérapies. Particulièrement en cancer de l’ovaire où une multitude d’études cliniques en immunothérapie ont été entreprises (tableaux 2.2 et 2.3). Les deux articles de recherche présentés aux chapitres 5 et 6 démontrent CD73 comme une cible thérapeutique potentielle.

### 7.6.1 Cancer de l’ovaire

L’article présenté au chapitre 5 en combinaison avec deux autres articles (187,194) démontre le rôle pro-tumorale de CD73 dans plusieurs compartiments physiologiques. La prochaine étape serait d’étudier CD73 en tant que cible thérapeutique. Il serait particulièrement pertinent d’étudier cette cible en combinaison avec un blocage de PD-1.

Dans le modèle ID8, une diminution de la mortalité a déjà été démontré via l’inhibition de CD73 par un siRNA dans les cellules tumorales (Figure 7.8A), par l’inhibiteur chimique APCP (Figure 7.8.B) et par un anticorps monoclonal (clone TY/23) (Figure 7.8C) (187,194).

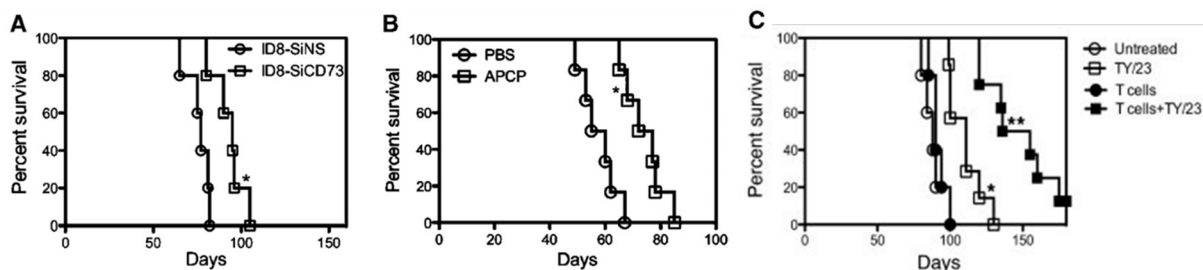


Figure 7.8 – Knockdown de l’expression de CD73 augmente la survie globale des souris portant des tumeurs ID8. (A) Femelles C57BL/6 sauvages ont été inoculées i.p. avec  $5 \times 10^6$  cellules ID8-SiNS ou ID8-SiCD73. (B) Femelles C57BL/6 ont été traitées avec l’APCP 1 semaine après l’inoculation ID8. Groupe de 5-8 souris; \*,  $P < 0,05$ ; représentatif de 3 expériences indépendantes. © 2010, American Association for Cancer Research

Beaucoup d'études précliniques ont déterminé quelles combinaisons étaient efficaces dans le modèle de cancer de l'ovaire ID8. De manière intéressante, toutes les études à l'exception du laboratoire de Georges Coukos n'ont rapporté aucun effet de l'inhibition de PD-1 en monothérapie (Tableau 7.1).

Nombre de ID8 injectées	Souris par groupe	Clone anti-PD-1	Traitments (doses)	Traitements (dates)	Réponse anti-tumorale	Réf.
3x10 <sup>6</sup>	5	RMP1-14	500 µg	D10, D14	Non	(420)
5x10 <sup>6</sup>	12	29F.1A12	200 µg	D30, D32, D34, D36, D38	Oui	(421)
5x10 <sup>6</sup>	10	RMP1-14	250 µg	D8, D11, D15	Non	(422)
1x10 <sup>6</sup>	10	RMP1-14	200 µg	D10, D14, D18	Non	(423)
1x10 <sup>6</sup>	6	RMP1-14	200 µg	D13, D17, D20, D24	Non	(586)
5x10 <sup>6</sup>	6	29F.1A12	200 µg	D10, D13, D16	Oui	(587)

Tableau 7.1 – Traitement monothérapie anti-PD-1 dans le modèle ID8.

En observant les succès des combinaisons entre les anti-PD-1 et les différentes immunothérapies, l'hypothèse a été émise d'une synergie possible entre l'anticorps monoclonal anti-PD-1 (clone RMP1-14) et l'anticorps monoclonal anti-CD73 (clone TY/23). Similairement aux publications avec le clone RMP1-14, aucun effet anti-tumoral avec l'anticorps anti-PD-1 n'a été observé dans le modèle ID8 (Figure 7.9). Cependant, un effet anti-tumorale significatif a été observé avec l'anti-CD73 en monothérapie, répétant ainsi les résultats observés antérieurement par un autre laboratoire (194).

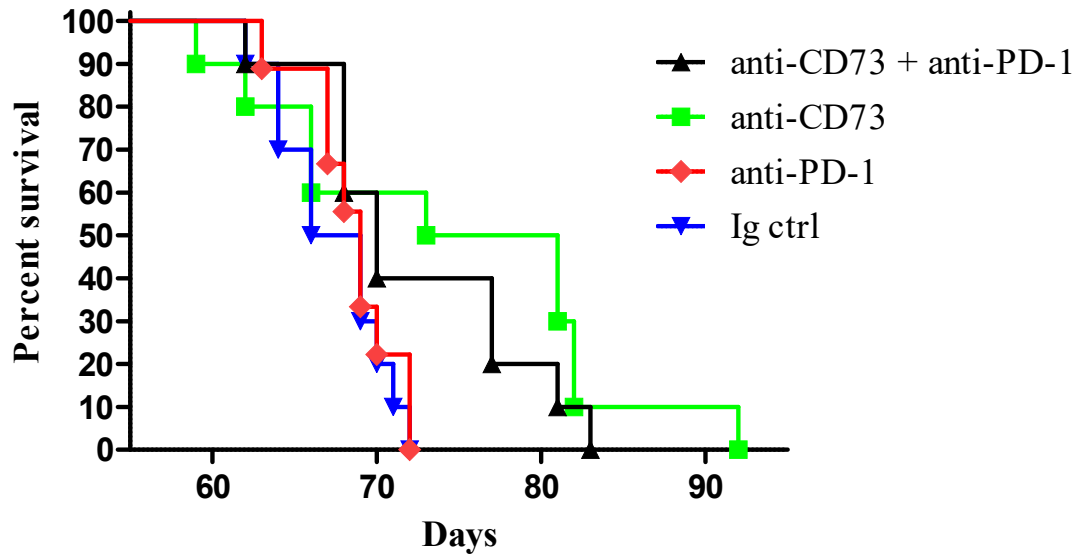


Figure 7.9 – Survie globale des souris avec une combinaison anti-PD-1 et anti-CD73. 10 femelles C57BL/6 ont été injectées avec  $5 \times 10^6$  cellules ID8 i.p. et traitées avec  $100 \mu\text{g}$  d’anti-PD1 (clone RMP1-14) et  $100 \mu\text{g}$  d’anti-CD73 (clone TY/23) à partir du jour 10; 2 fois par semaine.

Étant donné l’efficacité d’un anticorps anti-CD73 en monothérapie dans le modèle ID8, il serait recommandé d’étudier l’effet d’un anticorps monoclonal inhibant cette cible dans le cancer de l’ovaire séreux de haut grade. De plus, il a été démontré que CD73 joue un rôle sur les cellules tumorales, sur les cellules mésenchymateuses, dans les ascites et sur les exosomes dans le but de diminuer l’activité anti-tumorale du système immunitaire. Cette présence sur une multitude de compartiments cellulaires établit l’inhibition de cette cible comme particulièrement pertinente.

Une distribution particulière a été observée concernant les niveaux d’expression de CD73 sur les 208 échantillons du TMA du cancer de l’ovaire séreux de haut grade (Fig. 5.2A). De manière intéressante, cette distribution est similaire à la distribution des niveaux d’expression de CD73 *in vitro* de 32 lignées cellulaires de cancer de l’ovaire séreux obtenu du laboratoire du Dr Anne-Marie Mes Masson (Fig. 5.2D). Permettant d’émettre l’hypothèse que l’expression de CD73 est conservée lorsqu’un échantillon de tumeur est dérivé en lignée cellulaire.

## 7.6.2 Cancer du sein HER2<sup>+</sup>

Récemment, une étude clinique de phase II étudiant la combinaison entre le lapatinib – trastuzumab avec hormonothérapie (sans chimiothérapies) a démontré un échantillon non-négligeable de patientes avec une réponse pathologique complète aussi élevée qu'un contrôle historique avec chimiothérapies (588). Démontrant ainsi pour la première fois la possibilité d'un plan thérapeutique sans chimiothérapie pour les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2<sup>+</sup>. Une inhibition efficace de la voie de signalisation du récepteur ErbB2/HER2 semble être la clé pour atteindre cet objectif (589). Tel que démontré au chapitre 6, la réponse complète observée par le trastuzumab est dépendante des cellules NK et des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> (Fig. 6.6A-B). De plus, la synergie entre un traitement anti-CD73 et anti-ErbB2 (Fig. 6.4) est également dépendante d'un système immunitaire compétent (Fig. S6.6). La présence de CD73 sur les cellules cancéreuses a démontré pouvant diminuer l'effet thérapeutique d'une inhibition anti-ErbB2 (Fig. 6.4) tout comme lorsque CD73 est exprimé par les cellules de l'hôte (Fig. 6.6A). L'ensemble de ces résultats démontre que l'inhibition de CD73 est une stratégie thérapeutique potentielle dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup>.

L'étude FinHER démontre qu'une expression génique élevée de CD73 corrèle avec la perte d'efficacité du trastuzumab sur la survie des patientes (Fig. 6.1A-B). Si une inhibition de cette enzyme sur les cellules tumorales est recherchée, il serait pertinent de mesurer l'expression de CD73 en tant que biomarqueur prédictif de ça réponse. Cependant, la figure 6.6A avec le modèle murin TUBO démontre que l'absence de CD73 sur les cellules hôtes permet d'obtenir une efficacité plus grande d'un anticorps inhibiteur du récepteur ErbB2/HER2 (clone 7.16.4) comparativement à une souris sauvage (Fig. 6.4C-D). Démontrant ainsi un potentiel bénéfique d'un traitement anti-CD73 malgré l'absence de CD73 au niveau des cellules tumorales.

Beaucoup de littérature existe sur les points de contrôle immunologiques PD-1 et PD-L1 grâce aux succès de l'inhibition de ces récepteurs en mélanome. Cependant, tel que présenté à la figure 6.1C-D pour PD-L1 et à la figure 6.1E-F pour PD-1, un niveau d'expression élevé de ces récepteurs corrèle avec une bonne réponse au trastuzumab. Il a déjà été rapporté qu'un niveau d'expression élevé de ces récepteurs peut corrélérer positivement avec l'infiltration tumorale des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et a été associé à de meilleurs résultats cliniques de manière

consistante (590). Donc, l'inhibition de PD-1 et PD-L1 n'est probablement pas une stratégie optimale pour augmenter l'efficacité thérapeutique du trastuzumab.

## 7.7 Rôle de CD73 dans l'EMT

Le passage d'une cellule tumorale vers un stade mésenchymateux (EMT) est considéré comme la première étape vers le phénomène métastatique et est associé à une résistance aux thérapies (591). Un des objectifs identifiés dans cette thèse (chapitre 4) est de déterminer le rôle de CD73 dans l'EMT. Une première indication d'un rôle possible de cette enzyme a été l'identification d'une corrélation entre CD73 et une signature génique EMT dans une cohorte de cancer de l'ovaire séreux de haut grade (Fig. 5.1F). Cette association est très intéressante étant donné la corrélation entre CD73 et le sous-type C1 correspondant à une signature stromale (Fig. 5.1D). L'implication de CD73 dans l'EMT a été également répertorié dans le dataset METABRIC incluant plus de 2000 spécimens de cancer du sein sur 6 gènes associés au phénomène de l'EMT (Fig. S6.7).

Suite à ces observations, une série d'expériences a permis de déterminer si cette enzyme est une cause ou une conséquence de l'EMT. Utilisant un modèle cellulaire avec un gène TWIST inducible discuté à la section " 7.3 modèles *in vitro* ", il a été démontré que le passage vers un état mésenchymateux induit l'expression de CD73 (Fig. 6.7D). De plus, le traitement *in vitro* continu des cellules TUBO et SKBR3 avec le TGF- $\beta$ , un fort inducteur de l'EMT, augmente significativement l'expression de CD73 (Fig. 6.7B-C). Cependant, l'excision du gène de CD73 par la méthode CRISPR-CAS9 n'influence pas la capacité de ces cellules à effectuer un EMT (Fig. 6.7F-G). L'ensemble de ces résultats démontre que l'augmentation de l'expression de CD73 est une conséquence de l'EMT, mais n'est pas nécessaire pour effectuer cette transition.

Très peu de littérature existe sur le rôle de CD73 dans la transition épithéliale-mésenchymateuse. De manière intéressante, une étude sur la lignée cellulaire de cancer de la vésicule biliaire GBC-SD a observé un changement dans 225 gènes lors de l'EMT où le gène de CD73 a été le plus augmenté (175). Finalement, CD73 a également été corrélé avec les

marqueurs mésenchymateux dans diverses lignées de cancer du sein démontrant un rôle potentiel dans les cellules souches de cancer du sein (176).

La prochaine étape serait de déterminer si l'augmentation de l'expression de CD73 dans un contexte d'EMT observé au chapitre 6 se traduit *in vivo*. Il serait intéressant d'étudier l'implication direct de CD73 causé par l'EMT sur différent aspect tels la prolifération *in vivo*, le phénomène métastatique ou la diminution de la réponse anti-tumorale.

## 7.8 CD73 mécanisme de résistance au trastuzumab

Une observation a clairement démontré que lorsque CD73 est fortement exprimé, les patientes atteintes de cancer du sein HER2<sup>+</sup> ne bénéficie pas du traitement trastuzumab (Fig. 6.1B). Cette observation démontre que CD73 pourrait être associé à un possible mécanisme de résistance. Étant donné le rôle immunosuppressif de l'adénosine générée par cette enzyme, une hypothèse expliquant cette résistance pourrait être une inhibition du système immunitaire dans le microenvironnement tumoral. Cependant, le niveau d'expression de CD73 corrèle faiblement avec l'infiltration lymphocytaire stromale (Fig. 6.3A), et aucune corrélation n'a été observé avec l'infiltration intra-tumorale (Fig. 6.3B). Démontrant ainsi qu'il y a probablement un autre mécanisme d'action que l'influence de l'adénosine sur l'infiltration immunitaire pour expliquer la résistance au trastuzumab lorsque CD73 est fortement exprimé.

Tel que discuté au chapitre 3, le récepteur ErbB2/HER2 active plusieurs voies de signalisation intracellulaire. L'étude de ces voies de signalisation a permis de démontrer que ce récepteur augmente l'expression génique dépendante de NF- $\kappa$ B (592). Plus précisément, ErbB2/HER2 active sélectivement la voie de signalisation canonique IKK- $\alpha$  en aval de PI3K-AKT menant directement à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B (593). Finalement, le trastuzumab a démontré également ses propriétés de diminution de l'expression de NF- $\kappa$ B (594).

Une observation *in vitro* intéressante a été effectuée lorsque les cellules tumorales humaines SKBR3 sont exposées au trastuzumab. En effet, suite à des traitements avec cet anticorps, ces cellules augmentent, de manière dose-dépendante, leur niveau d'expression de

CD73 (Figure 7.10A). En se basant sur les observations que le trastuzumab diminue NF- $\kappa$ B, l'ajout du ML-120B un inhibiteur chimique de NF- $\kappa$ B au traitement trastuzumab a permis d'observer un effet additif dans l'augmentation de l'expression de CD73 (Figure 7.10B) ainsi qu'au niveau de l'ARN messenger (Figure 7.10C). L'ensemble de ces résultats démontre un lien entre l'inhibition de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et l'augmentation de l'expression de CD73. Avec ces résultats intéressants, il reste à élucider le lien entre l'inhibition de NF- $\kappa$ B et l'augmentation de l'expression de CD73.

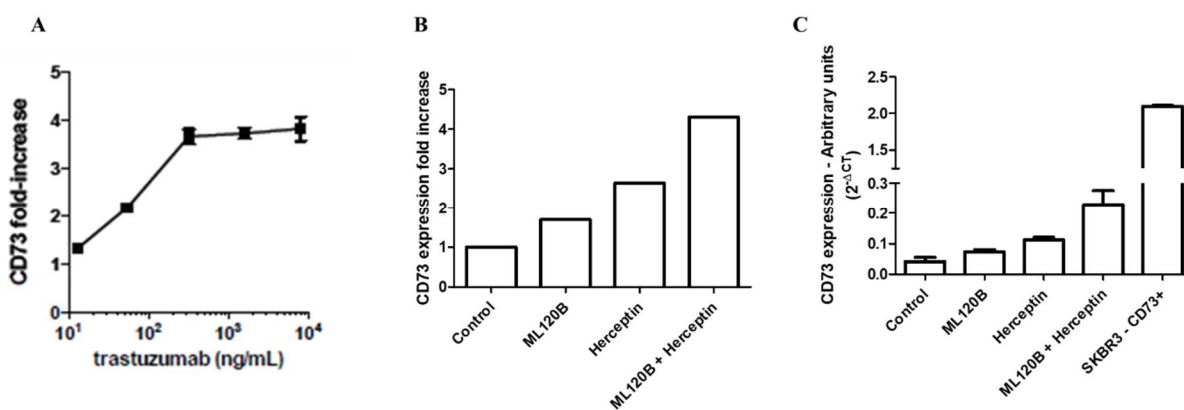


Figure 7.10 – Augmentation de l'expression de CD73 NF- $\kappa$ B dépendant suite au trastuzumab. (A) Cellules SKBR3 exposées à des doses croissantes de trastuzumab pendant 3 jours. Monitoring de l'expression de CD73 par cytométrie en flux (N=3). (B) Similaire à (A) avec une dose fixe de trastuzumab (10  $\mu$ g/mL) et de ML120B (50  $\mu$ g/mL). (C) Similaire à (B) avec une observation par PCR. SKBR3-CD73<sup>+</sup> comme lignée contrôle positive (N=2).

D'un autre point de vue, ces observations ont été effectuées avec seulement la lignée cellulaire SKBR3. Pour confirmer l'hypothèse que CD73 agit comme mécanisme de résistance dans le cancer du sein HER2<sup>+</sup>, plusieurs autres lignées cellulaires similaires aux SKBR3 devront être employées tels les lignées MDA-MB-453 et SUM-225. Ces deux lignées cellulaires ont un statut amplifié pour ErbB2 et sont négatives pour le récepteur à l'oestrogène. En effet, il est important que ces lignées soient négatives pour le récepteur à l'oestrogène étant donné sa capacité d'inhiber l'expression de CD73 (595). Pour renforcer l'hypothèse initial basé sur ces observations *in vitro*, une expérience *in vivo* est nécessaire. Cette expérience pourrait être



l'injection de cellules SKBR3 chez une souris immunodéficiente suivi de traitements au trastuzumab et d'une observation de l'expression de CD73 sur les cellules tumorales.

Bref, plusieurs autres évidences devront être accumulées avant de déterminer le rôle potentiel de CD73 en tant que mécanismes de résistances possibles ainsi que le lien entre l'inhibition de NF- $\kappa$ B et l'augmentation de l'expression de CD73.

## 7.9 Conclusion

Après les succès des anticorps monoclonaux inhibant les points de contrôle immunologique CTLA-4 et PD-1, il y a maintenant une multiplication des essais cliniques en immunothérapie du cancer. Suite à ces premières preuves de concept, l'objectif est maintenant de découvrir quelles sont les meilleures synergies entre les différents agents thérapeutiques ainsi que de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques.

Cette thèse a décrit l'implication de l'ecto-enzyme CD73 comme une cible potentielle en immunothérapie du cancer. Il est démontré que cette enzyme est surexprimée au niveau du cancer de l'ovaire séreux de haut grade et du cancer du sein HER2<sup>+</sup>. Par des modèles *in vivo* pertinents, cette thèse démontre que l'inhibition de cette enzyme diminue de la pression immunosuppressive sur l'ensemble du microenvironnement tumoral. De plus, cette thèse présente CD73 avec des rôles pro-tumoraux telles l'augmentation de la prolifération cellulaire et la transition épithéliale-mésenchymateuse.

À l'aide de modèles précliniques, de modèles cellulaires et de banques de données cliniques, cette thèse met les fondations nécessaires pour justifier le développement d'un agent thérapeutique inhibant l'enzyme CD73. Ces observations en combinaison avec les résultats qui seront obtenus lors de la première étude clinique étudiant l'inhibition de CD73 par un anticorps monoclonal (NTC02503774) permettront d'aider le développement d'études cliniques de phase II et III dans des cancers spécifiques. L'objectif ultime étant le développement d'un nouvel agent en immunothérapie du cancer permettant d'augmenter l'efficacité anti-tumorale du système immunitaire menant vers l'amélioration des réponses cliniques.

## Bibliographie

1. Fountain SJ, Parkinson K, Young MT, Cao L, Thompson CR, North RA. An intracellular P2X receptor required for osmoregulation in *Dictyostelium discoideum*. *Nature* **2007**;448:200-3
2. Kim SY, Sivaguru M, Stacey G. Extracellular ATP in plants. Visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol* **2006**;142:984-92
3. Allard B, Beavis PA, Darcy PK, Stagg J. Immunosuppressive activities of adenosine in cancer. *Curr Opin Pharmacol* **2016**;29:7-16
4. Park J, Gupta RS. Adenosine kinase and ribokinase--the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci* **2008**;65:2875-96
5. Horenstein AL, Chillemi A, Zaccarello G, Bruzzone S, Quarona V, Zito A, *et al.* A CD38/CD203a/CD73 ectoenzymatic pathway independent of CD39 drives a novel adenosinergic loop in human T lymphocytes. *Oncoimmunology* **2013**;2:e26246
6. Gupta PK, Godec J, Wolski D, Adland E, Yates K, Pauken KE, *et al.* CD39 Expression Identifies Terminally Exhausted CD8+ T Cells. *PLoS Pathog* **2015**;11:e1005177
7. Sitkovsky MV, Lukashev D, Apasov S, Kojima H, Koshiba M, Caldwell C, *et al.* Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol* **2004**;22:657-82
8. Herrera AS, Del CAEM, Md Ashraf G, Zamyatnin AA, Aliev G. Beyond mitochondria, what would be the energy source of the cell? *Cent Nerv Syst Agents Med Chem* **2015**;15:32-41
9. Burnstock G. Historical review: ATP as a neurotransmitter. *Trends Pharmacol Sci* **2006**;27:166-76
10. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* **1970**;40:668-88
11. Su C, Bevan JA, Burnstock G. [<sup>3</sup>H]adenosine triphosphate: release during stimulation of enteric nerves. *Science* **1971**;173:336-8

12. Burnstock G, Dumsday B, Smythe A. Atropine resistant excitation of the urinary bladder: the possibility of transmission via nerves releasing a purine nucleotide. *Br J Pharmacol* **1972**;44:451-61
13. Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* **2007**;87:659-797
14. Pellegatti P, Raffaghello L, Bianchi G, Piccardi F, Pistoia V, Di Virgilio F. Increased level of extracellular ATP at tumor sites: in vivo imaging with plasma membrane luciferase. *PLoS One* **2008**;3:e2599
15. Lazarowski ER, Boucher RC, Harden TK. Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules. *Mol Pharmacol* **2003**;64:785-95
16. Abbracchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, *et al.* International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev* **2006**;58:281-341
17. Elliott MR, Chekeni FB, Tramont PC, Lazarowski ER, Kadl A, Walk SF, *et al.* Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* **2009**;461:282-6
18. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, *et al.* ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* **2006**;314:1792-5
19. Schenk U, Westendorf AM, Radaelli E, Casati A, Ferro M, Fumagalli M, *et al.* Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Sci Signal* **2008**;1:ra6
20. North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* **2002**;82:1013-67
21. Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* **1985**;16:433-40
22. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* **1994**;64:445-75
23. Burnstock G. Introduction: P2 receptors. *Curr Top Med Chem* **2004**;4:793-803
24. Brake AJ, Wagenbach MJ, Julius D. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature* **1994**;371:519-23

25. North RA. Families of ion channels with two hydrophobic segments. *Curr Opin Cell Biol* **1996**;8:474-83
26. Nicke A, Baumert HG, Rettinger J, Eichele A, Lambrecht G, Mutschler E, *et al.* P2X1 and P2X3 receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J* **1998**;17:3016-28
27. Torres GE, Egan TM, Voigt MM. N-Linked glycosylation is essential for the functional expression of the recombinant P2X2 receptor. *Biochemistry* **1998**;37:14845-51
28. Torres GE, Egan TM, Voigt MM. Topological analysis of the ATP-gated ionotropic [correction of ionotropic] P2X2 receptor subunit. *FEBS Lett* **1998**;425:19-23
29. Torres GE, Egan TM, Voigt MM. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. Specificities exist with regard to possible partners. *J Biol Chem* **1999**;274:6653-9
30. Gunosewoyo H, Coster MJ, Kassiou M. Molecular probes for P2X7 receptor studies. *Curr Med Chem* **2007**;14:1505-23
31. Choi CH, Spooner R, DeGuzman J, Koutouzis T, Ojcius DM, Yilmaz O. *Porphyromonas gingivalis*-nucleoside-diphosphate-kinase inhibits ATP-induced reactive-oxygen-species via P2X7 receptor/NADPH-oxidase signalling and contributes to persistence. *Cell Microbiol* **2013**;15:961-76
32. Sluyter R, Barden JA, Wiley JS. Detection of P2X purinergic receptors on human B lymphocytes. *Cell Tissue Res* **2001**;304:231-6
33. Chvatchko Y, Valera S, Aubry JP, Renno T, Buell G, Bonnefoy JY. The involvement of an ATP-gated ion channel, P(2X1), in thymocyte apoptosis. *Immunity* **1996**;5:275-83
34. Chused TM, Apasov S, Sitkovsky M. Murine T lymphocytes modulate activity of an ATP-activated P2Z-type purinoceptor during differentiation. *J Immunol* **1996**;157:1371-80
35. Burnstock G. P2X ion channel receptors and inflammation. *Purinergic Signal* **2016**;12:59-67
36. Monif M, Reid CA, Powell KL, Smart ML, Williams DA. The P2X7 receptor drives microglial activation and proliferation: a trophic role for P2X7R pore. *J Neurosci* **2009**;29:3781-91

37. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* **2002**;10:417-26
38. Grahames CB, Michel AD, Chessell IP, Humphrey PP. Pharmacological characterization of ATP- and LPS-induced IL-1beta release in human monocytes. *Br J Pharmacol* **1999**;127:1915-21
39. Ferrari D, Chiozzi P, Falzoni S, Dal Susino M, Melchiorri L, Baricordi OR, *et al.* Extracellular ATP triggers IL-1 beta release by activating the purinergic P2Z receptor of human macrophages. *J Immunol* **1997**;159:1451-8
40. Baricordi OR, Ferrari D, Melchiorri L, Chiozzi P, Hanau S, Chiari E, *et al.* An ATP-activated channel is involved in mitogenic stimulation of human T lymphocytes. *Blood* **1996**;87:682-90
41. Baricordi OR, Melchiorri L, Adinolfi E, Falzoni S, Chiozzi P, Buell G, *et al.* Increased proliferation rate of lymphoid cells transfected with the P2X(7) ATP receptor. *J Biol Chem* **1999**;274:33206-8
42. Csoka B, Nemeth ZH, Toro G, Idzko M, Zech A, Koscsó B, *et al.* Extracellular ATP protects against sepsis through macrophage P2X7 purinergic receptors by enhancing intracellular bacterial killing. *FASEB J* **2015**;29:3626-37
43. Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, *et al.* Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett* **1993**;324:219-25
44. Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D. Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1993**;90:5113-7
45. Communi D, Gonzalez NS, Detheux M, Brezillon S, Lannoy V, Parmentier M, *et al.* Identification of a novel human ADP receptor coupled to G(i). *J Biol Chem* **2001**;276:41479-85
46. Abbracchio MP, Boeynaems JM, Barnard EA, Boyer JL, Kennedy C, Miras-Portugal MT, *et al.* Characterization of the UDP-glucose receptor (re-named here the P2Y14 receptor) adds diversity to the P2Y receptor family. *Trends Pharmacol Sci* **2003**;24:52-5

47. Burnstock G, Knight GE. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *Int Rev Cytol* **2004**;240:31-304
48. Luttkhuizen DT, Harmsen MC, de Leij LF, van Luyn MJ. Expression of P2 receptors at sites of chronic inflammation. *Cell Tissue Res* **2004**;317:289-98
49. Barrett MO, Sesma JI, Ball CB, Jayasekara PS, Jacobson KA, Lazarowski ER, *et al.* A selective high-affinity antagonist of the P2Y<sub>14</sub> receptor inhibits UDP-glucose-stimulated chemotaxis of human neutrophils. *Mol Pharmacol* **2013**;84:41-9
50. Idzko M, Dichmann S, Ferrari D, Di Virgilio F, la Sala A, Girolomoni G, *et al.* Nucleotides induce chemotaxis and actin polymerization in immature but not mature human dendritic cells via activation of pertussis toxin-sensitive P2y receptors. *Blood* **2002**;100:925-32
51. Warny M, Aboudola S, Robson SC, Sevigny J, Communi D, Soltoff SP, *et al.* P2Y<sub>6</sub> nucleotide receptor mediates monocyte interleukin-8 production in response to UDP or lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **2001**;276:26051-6
52. Wilkin F, Duhant X, Bruyns C, Suarez-Huerta N, Boeynaems JM, Robaye B. The P2Y<sub>11</sub> receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* **2001**;166:7172-7
53. la Sala A, Sebastiani S, Ferrari D, Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, *et al.* Dendritic cells exposed to extracellular adenosine triphosphate acquire the migratory properties of mature cells and show a reduced capacity to attract type 1 T lymphocytes. *Blood* **2002**;99:1715-22
54. Gabel CA. P2 purinergic receptor modulation of cytokine production. *Purinergic Signal* **2007**;3:27-38
55. Hechler B, Cattaneo M, Gachet C. The P2 receptors in platelet function. *Semin Thromb Hemost* **2005**;31:150-61
56. Gachet C, Hechler B. The platelet P2 receptors in thrombosis. *Semin Thromb Hemost* **2005**;31:162-7
57. Rapaport E. Treatment of human tumor cells with ADP or ATP yields arrest of growth in the S phase of the cell cycle. *J Cell Physiol* **1983**;114:279-83

58. Kitagawa T, Amano F, Akamatsu Y. External ATP-induced passive permeability change and cell lysis of cultured transformed cells: action in serum-containing growth media. *Biochim Biophys Acta* **1988**;941:257-63
59. Fang WG, Pirnia F, Bang YJ, Myers CE, Trepel JB. P2-purinergetic receptor agonists inhibit the growth of androgen-independent prostate carcinoma cells. *J Clin Invest* **1992**;89:191-6
60. Spungin B, Friedberg I. Growth inhibition of breast cancer cells induced by exogenous ATP. *J Cell Physiol* **1993**;157:502-8
61. Spranzi E, Djeu JY, Hoffman SL, Epling-Burnette PK, Blanchard DK. Lysis of human monocytic leukemia cells by extracellular adenosine triphosphate: mechanism and characterization of the adenosine triphosphate receptor. *Blood* **1993**;82:1578-85
62. Correale P, Tagliaferri P, Guarrasi R, Caraglia M, Giuliano M, Marinetti MR, *et al.* Extracellular adenosine 5' triphosphate involvement in the death of LAK-engaged human tumor cells via P2X-receptor activation. *Immunol Lett* **1997**;55:69-78
63. Lasso de la Vega MC, Terradez P, Obrador E, Navarro J, Pellicer JA, Estrela JM. Inhibition of cancer growth and selective glutathione depletion in Ehrlich tumour cells in vivo by extracellular ATP. *Biochem J* **1994**;298 ( Pt 1):99-105
64. Nayak KK, Maity P, Bhattacharyya R, Chatterjee M. Antitumour activities of copper-ATP complex on transplantable murine lymphoma. *Pharmacology* **1990**;41:350-6
65. Froio J, Abraham EH, Soni R, Epstein A, Okunieff P. Effect of intraperitoneal ATP on tumor growth and bone marrow radiation tolerance. *Acta Oncol* **1995**;34:419-22
66. Obrador E, Navarro J, Mompo J, Asensi M, Pellicer JA, Estrela JM. Glutathione and the rate of cellular proliferation determine tumour cell sensitivity to tumour necrosis factor in vivo. *Biochem J* **1997**;325 ( Pt 1):183-9
67. Estrela JM, Obrador E, Navarro J, Lasso De la Vega MC, Pellicer JA. Elimination of Ehrlich tumours by ATP-induced growth inhibition, glutathione depletion and X-rays. *Nat Med* **1995**;1:84-8
68. Haskell CM, Mendoza E, Pisters KM, Fossella FV, Figlin RA. Phase II study of intravenous adenosine 5'-triphosphate in patients with previously untreated stage IIIB and stage IV non-small cell lung cancer. *Invest New Drugs* **1998**;16:81-5

69. Agteresch HJ, Dagnelie PC, van der Gaast A, Stijnen T, Wilson JH. Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **2000**;92:321-8
70. Agteresch HJ, Burgers SA, van der Gaast A, Wilson JH, Dagnelie PC. Randomized clinical trial of adenosine 5'-triphosphate on tumor growth and survival in advanced lung cancer patients. *Anticancer Drugs* **2003**;14:639-44
71. Salvestrini V, Orecchioni S, Talarico G, Reggiani F, Mazzetti C, Bertolini F, *et al.* Extracellular ATP induces apoptosis through P2X7R activation in acute myeloid leukemia cells but not in normal hematopoietic stem cells. *Oncotarget* **2017**;8:5895-908
72. Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* **1996**;272:735-8
73. Zheng LM, Zychlinsky A, Liu CC, Ojcius DM, Young JD. Extracellular ATP as a trigger for apoptosis or programmed cell death. *J Cell Biol* **1991**;112:279-88
74. Katzur AC, Koshimizu T, Tomic M, Schultze-Mosgau A, Ortmann O, Stojilkovic SS. Expression and responsiveness of P2Y2 receptors in human endometrial cancer cell lines. *J Clin Endocrinol Metab* **1999**;84:4085-91
75. Nylund G, Nordgren S, Delbro DS. Expression of P2Y2 purinoceptors in MCG 101 murine sarcoma cells, and HT-29 human colon carcinoma cells. *Auton Neurosci* **2004**;112:69-79
76. Li HJ, Wang LY, Qu HN, Yu LH, Burnstock G, Ni X, *et al.* P2Y2 receptor-mediated modulation of estrogen-induced proliferation of breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* **2011**;338:28-37
77. Limami Y, Pinon A, Leger DY, Pinault E, Delage C, Beneytout JL, *et al.* The P2Y2/Src/p38/COX-2 pathway is involved in the resistance to ursolic acid-induced apoptosis in colorectal and prostate cancer cells. *Biochimie* **2012**;94:1754-63
78. Elsing C, Georgiev T, Hubner CA, Boger R, Stremmel W, Schlenker T. Extracellular ATP induces cytoplasmic and nuclear Ca<sup>2+</sup> transients via P2Y2 receptor in human biliary epithelial cancer cells (Mz-Cha-1). *Anticancer Res* **2012**;32:3759-67



79. Choi JH, Ji YG, Lee DH. Uridine triphosphate increases proliferation of human cancerous pancreatic duct epithelial cells by activating P2Y2 receptor. *Pancreas* **2013**;42:680-6
80. Schumacher D, Strilic B, Sivaraj KK, Wettschureck N, Offermanns S. Platelet-derived nucleotides promote tumor-cell transendothelial migration and metastasis via P2Y2 receptor. *Cancer Cell* **2013**;24:130-7
81. Li WH, Qiu Y, Zhang HQ, Liu Y, You JF, Tian XX, *et al.* P2Y2 receptor promotes cell invasion and metastasis in prostate cancer cells. *Br J Cancer* **2013**;109:1666-75
82. Xie R, Xu J, Wen G, Jin H, Liu X, Yang Y, *et al.* The P2Y2 nucleotide receptor mediates the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells induced by ATP. *J Biol Chem* **2014**;289:19137-49
83. Jin H, Eun SY, Lee JS, Park SW, Lee JH, Chang KC, *et al.* P2Y2 receptor activation by nucleotides released from highly metastatic breast cancer cells increases tumor growth and invasion via crosstalk with endothelial cells. *Breast Cancer Res* **2014**;16:R77
84. Joo YN, Jin H, Eun SY, Park SW, Chang KC, Kim HJ. P2Y2R activation by nucleotides released from the highly metastatic breast cancer cell MDA-MB-231 contributes to pre-metastatic niche formation by mediating lysyl oxidase secretion, collagen crosslinking, and monocyte recruitment. *Oncotarget* **2014**;5:9322-34
85. Eun SY, Ko YS, Park SW, Chang KC, Kim HJ. P2Y2 nucleotide receptor-mediated extracellular signal-regulated kinases and protein kinase C activation induces the invasion of highly metastatic breast cancer cells. *Oncol Rep* **2015**;34:195-202
86. Li WH, Qiu Y, Zhang HQ, Tian XX, Fang WG. P2Y2 Receptor and EGFR Cooperate to Promote Prostate Cancer Cell Invasion via ERK1/2 Pathway. *PLoS One* **2015**;10:e0133165
87. Tak E, Jun DY, Kim SH, Park GC, Lee J, Hwang S, *et al.* Upregulation of P2Y2 nucleotide receptor in human hepatocellular carcinoma cells. *J Int Med Res* **2016**;44:1234-47
88. Zhang JL, Liu Y, Yang H, Zhang HQ, Tian XX, Fang WG. ATP-P2Y2-beta-catenin axis promotes cell invasion in breast cancer cells. *Cancer Sci* **2017**;108:1318-27
89. Deterding R, Retsch-Bogart G, Milgram L, Gibson R, Daines C, Zeitlin PL, *et al.* Safety and tolerability of denufosol tetrasodium inhalation solution, a novel P2Y2 receptor

- agonist: results of a phase 1/phase 2 multicenter study in mild to moderate cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **2005**;39:339-48
90. Accurso FJ, Moss RB, Wilmott RW, Anbar RD, Schaberg AE, Durham TA, *et al.* Denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis and normal to mildly impaired lung function. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**;183:627-34
  91. Ratjen F, Durham T, Navratil T, Schaberg A, Accurso FJ, Wainwright C, *et al.* Long term effects of denufosal tetrasodium in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **2012**;11:539-49
  92. Grinthal A, Guidotti G. CD39, NTPDase 1, is attached to the plasma membrane by two transmembrane domains. Why? *Purinergic Signal* **2006**;2:391-8
  93. Chadwick BP, Frischauf AM. The CD39-like gene family: identification of three new human members (CD39L2, CD39L3, and CD39L4), their murine homologues, and a member of the gene family from *Drosophila melanogaster*. *Genomics* **1998**;50:357-67
  94. Kukulski F, Levesque SA, Lavoie EG, Lecka J, Bigonnesse F, Knowles AF, *et al.* Comparative hydrolysis of P2 receptor agonists by NTPDases 1, 2, 3 and 8. *Purinergic Signal* **2005**;1:193-204
  95. Handa M, Guidotti G. Purification and cloning of a soluble ATP-diphosphohydrolase (apyrase) from potato tubers (*Solanum tuberosum*). *Biochem Biophys Res Commun* **1996**;218:916-23
  96. Vasconcelos EG, Ferreira ST, Carvalho TM, Souza W, Kettlun AM, Mancilla M, *et al.* Partial purification and immunohistochemical localization of ATP diphosphohydrolase from *Schistosoma mansoni*. Immunological cross-reactivities with potato apyrase and *Toxoplasma gondii* nucleoside triphosphate hydrolase. *J Biol Chem* **1996**;271:22139-45
  97. Wu Y, Sun X, Kaczmarek E, Dwyer KM, Bianchi E, Usheva A, *et al.* RanBPM associates with CD39 and modulates ecto-nucleotidase activity. *Biochem J* **2006**;396:23-30
  98. Avis JM, Clarke PR. Ran, a GTPase involved in nuclear processes: its regulators and effectors. *J Cell Sci* **1996**;109 ( Pt 10):2423-7
  99. Eltzhig HK, Kohler D, Eckle T, Kong T, Robson SC, Colgan SP. Central role of Sp1-regulated CD39 in hypoxia/ischemia protection. *Blood* **2009**;113:224-32

100. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, Hichami A, *et al.* Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **2012**;36:362-73
101. Zebisch M, Krauss M, Schafer P, Lauble P, Strater N. Crystallographic snapshots along the reaction pathway of nucleoside triphosphate diphosphohydrolases. *Structure* **2013**;21:1460-75
102. Maliszewski CR, Delespesse GJ, Schoenborn MA, Armitage RJ, Fanslow WC, Nakajima T, *et al.* The CD39 lymphoid cell activation antigen. Molecular cloning and structural characterization. *J Immunol* **1994**;153:3574-83
103. Zebisch M, Strater N. Characterization of Rat NTPDase1, -2, and -3 ectodomains refolded from bacterial inclusion bodies. *Biochemistry* **2007**;46:11945-56
104. Robson SC, Sevigny J, Zimmermann H. The E-NTPDase family of ectonucleotidases: Structure function relationships and pathophysiological significance. *Purinergic Signal* **2006**;2:409-30
105. Schulze Zur Wiesch J, Thomssen A, Hartjen P, Toth I, Lehmann C, Meyer-Olson D, *et al.* Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease. *J Virol* **2011**;85:1287-97
106. Moncrieffe H, Nistala K, Kamhieh Y, Evans J, Eddaoudi A, Eaton S, *et al.* High expression of the ectonucleotidase CD39 on T cells from the inflamed site identifies two distinct populations, one regulatory and one memory T cell population. *J Immunol* **2010**;185:134-43
107. Zhou Q, Yan J, Putheti P, Wu Y, Sun X, Toxavidis V, *et al.* Isolated CD39 expression on CD4+ T cells denotes both regulatory and memory populations. *Am J Transplant* **2009**;9:2303-11
108. Friedman DJ, Kunzli BM, Yi AR, Sevigny J, Berberat PO, Enjyoji K, *et al.* From the Cover: CD39 deletion exacerbates experimental murine colitis and human polymorphisms increase susceptibility to inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**;106:16788-93
109. Bai A, Moss A, Kokkotou E, Usheva A, Sun X, Cheifetz A, *et al.* CD39 and CD161 modulate Th17 responses in Crohn's disease. *J Immunol* **2014**;193:3366-77

110. Csoka B, Nemeth ZH, Toro G, Koscsó B, Kokai E, Robson SC, *et al.* CD39 improves survival in microbial sepsis by attenuating systemic inflammation. *FASEB J* **2015**;29:25-36
111. Zimmermann H, Zebisch M, Strater N. Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases. *Purinergic Signal* **2012**;8:437-502
112. Resta R, Yamashita Y, Thompson LF. Ecto-enzyme and signaling functions of lymphocyte CD73. *Immunol Rev* **1998**;161:95-109
113. Misumi Y, Ogata S, Hirose S, Ikehara Y. Primary structure of rat liver 5'-nucleotidase deduced from the cDNA. Presence of the COOH-terminal hydrophobic domain for possible post-translational modification by glycosphospholipid. *J Biol Chem* **1990**;265:2178-83
114. Resta R, Hooker SW, Hansen KR, Laurent AB, Park JL, Blackburn MR, *et al.* Murine ecto-5'-nucleotidase (CD73): cDNA cloning and tissue distribution. *Gene* **1993**;133:171-7
115. Misumi Y, Ogata S, Ohkubo K, Hirose S, Ikehara Y. Primary structure of human placental 5'-nucleotidase and identification of the glycolipid anchor in the mature form. *Eur J Biochem* **1990**;191:563-9
116. Evans WH. A biochemical dissection of the functional polarity of the plasma membrane of the hepatocyte. *Biochim Biophys Acta* **1980**;604:27-64
117. Semenza G. Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. *Annu Rev Cell Biol* **1986**;2:255-313
118. Knapp K, Zebisch M, Pippel J, El-Tayeb A, Müller CE, Strater N. Crystal structure of the human ecto-5'-nucleotidase (CD73): insights into the regulation of purinergic signaling. *Structure* **2012**;20:2161-73
119. Knapp KM, Zebisch M, Strater N. Crystallization and preliminary X-ray analysis of the open form of human ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **2012**;68:1545-9
120. Knöfel T, Strater N. Mechanism of hydrolysis of phosphate esters by the dimetal center of 5'-nucleotidase based on crystal structures. *J Mol Biol* **2001**;309:239-54

121. Terp MG, Olesen KA, Arnspang EC, Lund RR, Lagerholm BC, Ditzel HJ, *et al.* Anti-human CD73 monoclonal antibody inhibits metastasis formation in human breast cancer by inducing clustering and internalization of CD73 expressed on the surface of cancer cells. *J Immunol* **2013**;191:4165-73
122. Mikhailov A, Sokolovskaya A, Yegutkin GG, Amdahl H, West A, Yagita H, *et al.* CD73 participates in cellular multiresistance program and protects against TRAIL-induced apoptosis. *J Immunol* **2008**;181:464-75
123. Airas L, Hellman J, Salmi M, Bono P, Puurunen T, Smith DJ, *et al.* CD73 is involved in lymphocyte binding to the endothelium: characterization of lymphocyte-vascular adhesion protein 2 identifies it as CD73. *J Exp Med* **1995**;182:1603-8
124. Airas L, Niemela J, Jalkanen S. CD73 engagement promotes lymphocyte binding to endothelial cells via a lymphocyte function-associated antigen-1-dependent mechanism. *J Immunol* **2000**;165:5411-7
125. Airas L, Jalkanen S. CD73 mediates adhesion of B cells to follicular dendritic cells. *Blood* **1996**;88:1755-64
126. Massaia M, Perrin L, Bianchi A, Ruedi J, Attisano C, Altieri D, *et al.* Human T cell activation. Synergy between CD73 (ecto-5'-nucleotidase) and signals delivered through CD3 and CD2 molecules. *J Immunol* **1990**;145:1664-74
127. Thompson LF, Ruedi JM, Glass A, Low MG, Lucas AH. Antibodies to 5'-nucleotidase (CD73), a glycosyl-phosphatidylinositol-anchored protein, cause human peripheral blood T cells to proliferate. *J Immunol* **1989**;143:1815-21
128. Loertscher R, Lavery P. The role of glycosyl phosphatidyl inositol (GPI)-anchored cell surface proteins in T-cell activation. *Transpl Immunol* **2002**;9:93-6
129. Dianzani U, Redoglia V, Bragardo M, Attisano C, Bianchi A, Di Franco D, *et al.* Co-stimulatory signal delivered by CD73 molecule to human CD45RAhiCD45ROlo (naive) CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* **1993**;151:3961-70
130. Thompson LF, Eltzschig HK, Ibla JC, Van De Wiele CJ, Resta R, Morote-Garcia JC, *et al.* Crucial role for ecto-5'-nucleotidase (CD73) in vascular leakage during hypoxia. *J Exp Med* **2004**;200:1395-405
131. Blackburn MR, Gao X, Airhart MJ, Skalko RG, Thompson LF, Knudsen TB. Adenosine levels in the postimplantation mouse uterus: quantitation by HPLC-fluorometric

- detection and spatiotemporal regulation by 5'-nucleotidase and adenosine deaminase. *Dev Dyn* **1992**;194:155-68
132. Colgan SP, Eltzschig HK, Eckle T, Thompson LF. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Purinergic Signal* **2006**;2:351-60
133. Toczek M, Kutryb-Zajac B, Kapczynska M, Lipinski M, Slominska EM, Smolenski RT. Extracellular adenine nucleotide catabolism in heart valves. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **2014**;33:329-32
134. Thompson LF, Ruedi JM, Low MG. Purification of 5'-nucleotidase from human placenta after release from plasma membranes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *Biochem Biophys Res Commun* **1987**;145:118-25
135. Klemens MR, Sherman WR, Holmberg NJ, Ruedi JM, Low MG, Thompson LF. Characterization of soluble vs membrane-bound human placental 5'-nucleotidase. *Biochem Biophys Res Commun* **1990**;172:1371-7
136. Johnson SM, Patel S, Bruckner FE, Collins DA. 5'-Nucleotidase as a marker of both general and local inflammation in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* **1999**;38:391-6
137. Niemela J, Ifergan I, Yegutkin GG, Jalkanen S, Prat A, Airas L. IFN-beta regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier. *Eur J Immunol* **2008**;38:2718-26
138. Maksimow M, Kyhala L, Nieminen A, Kylanpaa L, Aalto K, Elima K, *et al.* Early prediction of persistent organ failure by soluble CD73 in patients with acute pancreatitis\*. *Crit Care Med* **2014**;42:2556-64
139. Chuang NN, Newby AC, Luzio JP. Characterization of different molecular forms of 5'-nucleotidase in normal serum and in serum from cholestatic patients and bile-duct-ligated rats. *Biochem J* **1984**;224:689-95
140. Martin-Satue M, Lavoie EG, Fausther M, Lecka J, Aliagas E, Kukulski F, *et al.* High expression and activity of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in the male murine reproductive tract. *Histochem Cell Biol* **2010**;133:659-68
141. Heuts DP, Weissenborn MJ, Olkhov RV, Shaw AM, Gummadova J, Levy C, *et al.* Crystal structure of a soluble form of human CD73 with ecto-5'-nucleotidase activity. *Chembiochem* **2012**;13:2384-91

142. Thompson LF, Ruedi JM, Low MG, Clement LT. Distribution of ecto-5'-nucleotidase on subsets of human T and B lymphocytes as detected by indirect immunofluorescence using goat antibodies. *J Immunol* **1987**;139:4042-8
143. Thompson LF, Saxon A, O'Connor RD, Fox RI. Ecto-5'-nucleotidase activity in human T cell subsets. Decreased numbers of ecto-5'-nucleotidase positive cells from both OKT4<sup>+</sup> and OKT8<sup>+</sup> cells in patients with hypogammaglobulinemia. *J Clin Invest* **1983**;71:892-9
144. Thompson LF, Ruedi JM, O'Connor RD, Bastian JF. Ecto-5'-nucleotidase expression during human B cell development. An explanation for the heterogeneity in B lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity in patients with hypogammaglobulinemia. *J Immunol* **1986**;137:2496-500
145. Flores-Santibanez F, Fernandez D, Meza D, Tejon G, Vargas L, Varela-Nallar L, *et al.* CD73-mediated adenosine production promotes stem cell-like properties in mouse Tc17 cells. *Immunology* **2015**;146:582-94
146. Regateiro FS, Cobbold SP, Waldmann H. CD73 and adenosine generation in the creation of regulatory microenvironments. *Clin Exp Immunol* **2013**;171:1-7
147. Bono MR, Fernandez D, Flores-Santibanez F, Roseblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. *FEBS Lett* **2015**;589:3454-60
148. Coffey F, Lee SY, Buus TB, Lauritsen JP, Wong GW, Joachims ML, *et al.* The TCR ligand-inducible expression of CD73 marks gammadelta lineage commitment and a metastable intermediate in effector specification. *J Exp Med* **2014**;211:329-43
149. Yang L, Kobie JJ, Mosmann TR. CD73 and Ly-6A/E distinguish in vivo primed but uncommitted mouse CD4 T cells from type 1 or type 2 effector cells. *J Immunol* **2005**;175:6458-64
150. Doherty GA, Bai A, Hanidziar D, Longhi MS, Lawlor GO, Putheti P, *et al.* CD73 is a phenotypic marker of effector memory Th17 cells in inflammatory bowel disease. *Eur J Immunol* **2012**;42:3062-72
151. Hernandez-Mir G, McGeachy MJ. CD73 is expressed by inflammatory Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis but does not limit differentiation or pathogenesis. *PLoS One* **2017**;12:e0173655

152. Goodman WA, Cooper KD, McCormick TS. Regulation generation: the suppressive functions of human regulatory T cells. *Crit Rev Immunol* **2012**;32:65-79
153. Kobie JJ, Shah PR, Yang L, Rebhahn JA, Fowell DJ, Mosmann TR. T regulatory and primed uncommitted CD4 T cells express CD73, which suppresses effector CD4 T cells by converting 5'-adenosine monophosphate to adenosine. *J Immunol* **2006**;177:6780-6
154. Borsellino G, Kleinewietfeld M, Di Mitri D, Sternjak A, Diamantini A, Giometto R, *et al.* Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3<sup>+</sup> Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* **2007**;110:1225-32
155. Han L, Sugiyama H, Zhang Q, Yan K, Fang X, McCormick TS, *et al.* Phenotypical analysis of ectoenzymes CD39/CD73 and adenosine receptor 2A in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cells in psoriasis. *Australas J Dermatol* **2017**
156. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, *et al.* Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. *J Exp Med* **2007**;204:1257-65
157. Schena F, Volpi S, Faliti CE, Penco F, Santi S, Proietti M, *et al.* Dependence of immunoglobulin class switch recombination in B cells on vesicular release of ATP and CD73 ectonucleotidase activity. *Cell Rep* **2013**;3:1824-31
158. Zanin RF, Braganhol E, Bergamin LS, Campesato LF, Filho AZ, Moreira JC, *et al.* Differential macrophage activation alters the expression profile of NTPDase and ecto-5'-nucleotidase. *PLoS One* **2012**;7:e31205
159. Eichin D, Laurila JP, Jalkanen S, Salmi M. CD73 Activity is Dispensable for the Polarization of M2 Macrophages. *PLoS One* **2015**;10:e0134721
160. Matos ME, Schnier GS, Beecher MS, Ashman LK, William DE, Caligiuri MA. Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells. *J Exp Med* **1993**;178:1079-84
161. Yu J, Mao HC, Wei M, Hughes T, Zhang J, Park IK, *et al.* CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> human NK-cell subsets. *Blood* **2010**;115:274-81
162. Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* **2008**;15:226-33



163. Schepis D, Gunnarsson I, Eloranta ML, Lampa J, Jacobson SH, Karre K, *et al.* Increased proportion of CD56bright natural killer cells in active and inactive systemic lupus erythematosus. *Immunology* **2009**;126:140-6
164. Fu B, Li X, Sun R, Tong X, Ling B, Tian Z, *et al.* Natural killer cells promote immune tolerance by regulating inflammatory TH17 cells at the human maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**;110:E231-40
165. Morandi F, Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Chiesa S, Imperatori A, *et al.* CD56brightCD16- NK Cells Produce Adenosine through a CD38-Mediated Pathway and Act as Regulatory Cells Inhibiting Autologous CD4+ T Cell Proliferation. *J Immunol* **2015**;195:965-72
166. Synnestvedt K, Furuta GT, Comerford KM, Louis N, Karhausen J, Eltzschig HK, *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. *J Clin Invest* **2002**;110:993-1002
167. Tak E, Jung DH, Kim SH, Park GC, Jun DY, Lee J, *et al.* Protective role of hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent CD39 and CD73 in fulminant acute liver failure. *Toxicol Appl Pharmacol* **2017**;314:72-81
168. Hart ML, Grenz A, Gorzolla IC, Schittenhelm J, Dalton JH, Eltzschig HK. Hypoxia-inducible factor-1alpha-dependent protection from intestinal ischemia/reperfusion injury involves ecto-5'-nucleotidase (CD73) and the A2B adenosine receptor. *J Immunol* **2011**;186:4367-74
169. Ahmad A, Ahmad S, Glover L, Miller SM, Shannon JM, Guo X, *et al.* Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2alpha in pulmonary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**;106:10684-9
170. Spychala J, Kitajewski J. Wnt and beta-catenin signaling target the expression of ecto-5'-nucleotidase and increase extracellular adenosine generation. *Exp Cell Res* **2004**;296:99-108
171. Ryzhov SV, Pickup MW, Chytil A, Gorska AE, Zhang Q, Owens P, *et al.* Role of TGF-beta signaling in generation of CD39+CD73+ myeloid cells in tumors. *J Immunol* **2014**;193:3155-64

172. Li J, Wang L, Chen X, Li L, Li Y, Ping Y, *et al.* CD39/CD73 upregulation on myeloid-derived suppressor cells via TGF-beta-mTOR-HIF-1 signaling in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* **2017**;6:e1320011
173. Mann EH, Chambers ES, Chen YH, Richards DF, Hawrylowicz CM. 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 acts via transforming growth factor-beta to up-regulate expression of immunosuppressive CD73 on human CD4+ Foxp3- T cells. *Immunology* **2015**;146:423-31
174. Regateiro FS, Howie D, Nolan KF, Agorogiannis EI, Greaves DR, Cobbold SP, *et al.* Generation of anti-inflammatory adenosine by leukocytes is regulated by TGF-beta. *Eur J Immunol* **2011**;41:2955-65
175. Xiong L, Wen Y, Miao X, Yang Z. NT5E and FcGBP as key regulators of TGF-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) are associated with tumor progression and survival of patients with gallbladder cancer. *Cell Tissue Res* **2014**;355:365-74
176. Yu J, Liao X, Li L, Lv L, Zhi X, Yu J, *et al.* A preliminary study of the role of extracellular -5'- nucleotidase in breast cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **2017**;53:132-40
177. Niemela J, Henttinen T, Yegutkin GG, Airas L, Kujari AM, Rajala P, *et al.* IFN-alpha induced adenosine production on the endothelium: a mechanism mediated by CD73 (ecto-5'-nucleotidase) up-regulation. *J Immunol* **2004**;172:1646-53
178. Christensen LD, Andersen V, Nygaard P, Bendtzen K. Effects of immunomodulators on ecto-5'-nucleotidase activity on blood mononuclear cells in vitro. *Scand J Immunol* **1992**;35:407-13
179. Barbosa-Morais NL, Irimia M, Pan Q, Xiong HY, Gueroussov S, Lee LJ, *et al.* The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species. *Science* **2012**;338:1587-93
180. Merkin J, Russell C, Chen P, Burge CB. Evolutionary dynamics of gene and isoform regulation in Mammalian tissues. *Science* **2012**;338:1593-9
181. Snider NT, Altshuler PJ, Wan S, Welling TH, Cavalcoli J, Omary MB. Alternative splicing of human NT5E in cirrhosis and hepatocellular carcinoma produces a negative regulator of ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Mol Biol Cell* **2014**;25:4024-33

182. St Hilaire C, Ziegler SG, Markello TC, Brusco A, Groden C, Gill F, *et al.* NT5E mutations and arterial calcifications. *N Engl J Med* **2011**;364:432-42
183. Staff PO. Correction: NT5E mutations that cause human disease are associated with intracellular mistrafficking of NT5E protein. *PLoS One* **2015**;10:e0118252
184. Varadi A. It is all about calcification. *Cell Cycle* **2014**;13:3793
185. Li Q, Price TP, Sundberg JP, Uitto J. Juxta-articular joint-capsule mineralization in CD73 deficient mice: similarities to patients with NT5E mutations. *Cell Cycle* **2014**;13:2609-15
186. Blay J, White TD, Hoskin DW. The extracellular fluid of solid carcinomas contains immunosuppressive concentrations of adenosine. *Cancer Res* **1997**;57:2602-5
187. Jin D, Fan J, Wang L, Thompson LF, Liu A, Daniel BJ, *et al.* CD73 on tumor cells impairs antitumor T-cell responses: a novel mechanism of tumor-induced immune suppression. *Cancer Res* **2010**;70:2245-55
188. Clayton A, Al-Taei S, Webber J, Mason MD, Tabi Z. Cancer exosomes express CD39 and CD73, which suppress T cells through adenosine production. *J Immunol* **2011**;187:676-83
189. Cappellari AR, Pillat MM, Souza HD, Dietrich F, Oliveira FH, Figueiro F, *et al.* Ecto-5'-Nucleotidase Overexpression Reduces Tumor Growth in a Xenograph Medulloblastoma Model. *PLoS One* **2015**;10:e0140996
190. Wettstein MS, Buser L, Hermanns T, Roudnicky F, Eberli D, Baumeister P, *et al.* CD73 Predicts Favorable Prognosis in Patients with Nonmuscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer. *Dis Markers* **2015**;2015:785461
191. Oh HK, Sin JI, Choi J, Park SH, Lee TS, Choi YS. Overexpression of CD73 in epithelial ovarian carcinoma is associated with better prognosis, lower stage, better differentiation and lower regulatory T cell infiltration. *J Gynecol Oncol* **2012**;23:274-81
192. Wang R, Zhang Y, Lin X, Gao Y, Zhu Y. Prognostic value of CD73-adenosinergic pathway in solid tumor: A meta-analysis and systematic review. *Oncotarget* **2017**;8:57327-36
193. Stagg J, Divisekera U, McLaughlin N, Sharkey J, Pommey S, Denoyer D, *et al.* Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2010**;107:1547-52

194. Wang L, Fan J, Thompson LF, Zhang Y, Shin T, Curiel TJ, *et al.* CD73 has distinct roles in nonhematopoietic and hematopoietic cells to promote tumor growth in mice. *J Clin Invest* **2011**;121:2371-82
195. Allard B, Turcotte M, Spring K, Pommey S, Royal I, Stagg J. Anti-CD73 therapy impairs tumor angiogenesis. *Int J Cancer* **2014**;134:1466-73
196. Zhou P, Zhi X, Zhou T, Chen S, Li X, Wang L, *et al.* Overexpression of Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes T-47D human breast cancer cells invasion and adhesion to extracellular matrix. *Cancer Biol Ther* **2007**;6:426-31
197. Wang L, Zhou X, Zhou T, Ma D, Chen S, Zhi X, *et al.* Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **2008**;134:365-72
198. Zhi X, Chen S, Zhou P, Shao Z, Wang L, Ou Z, *et al.* RNA interference of ecto-5'-nucleotidase (CD73) inhibits human breast cancer cell growth and invasion. *Clin Exp Metastasis* **2007**;24:439-48
199. Zhi X, Wang Y, Zhou X, Yu J, Jian R, Tang S, *et al.* RNAi-mediated CD73 suppression induces apoptosis and cell-cycle arrest in human breast cancer cells. *Cancer Sci* **2010**;101:2561-9
200. Zhou X, Zhi X, Zhou P, Chen S, Zhao F, Shao Z, *et al.* Effects of ecto-5'-nucleotidase on human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep* **2007**;17:1341-6
201. Loi S, Pommey S, Haibe-Kains B, Beavis PA, Darcy PK, Smyth MJ, *et al.* CD73 promotes anthracycline resistance and poor prognosis in triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**;110:11091-6
202. Rust S, Guillard S, Sachsenmeier K, Hay C, Davidson M, Karlsson A, *et al.* Combining phenotypic and proteomic approaches to identify membrane targets in a 'triple negative' breast cancer cell type. *Mol Cancer* **2013**;12:11
203. Leth-Larsen R, Lund R, Hansen HV, Laenkholm AV, Tarin D, Jensen ON, *et al.* Metastasis-related plasma membrane proteins of human breast cancer cells identified by comparative quantitative mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **2009**;8:1436-49
204. Lee H, Lin EC, Liu L, Smith JW. Gene expression profiling of tumor xenografts: In vivo analysis of organ-specific metastasis. *Int J Cancer* **2003**;107:528-34

205. Wang L, Tang S, Wang Y, Xu S, Yu J, Zhi X, *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) promotes tumor angiogenesis. *Clin Exp Metastasis* **2013**;30:671-80
206. Spychala J, Lazarowski E, Ostapkowicz A, Ayscue LH, Jin A, Mitchell BS. Role of estrogen receptor in the regulation of ecto-5'-nucleotidase and adenosine in breast cancer. *Clin Cancer Res* **2004**;10:708-17
207. Hausler SF, Montalban del Barrio I, Strohschein J, Anoop Chandran P, Engel JB, Honig A, *et al.* Ectonucleotidases CD39 and CD73 on OvCA cells are potent adenosine-generating enzymes responsible for adenosine receptor 2A-dependent suppression of T cell function and NK cell cytotoxicity. *Cancer Immunol Immunother* **2011**;60:1405-18
208. Hausler SF, Del Barrio IM, Diessner J, Stein RG, Strohschein J, Honig A, *et al.* Anti-CD39 and anti-CD73 antibodies A1 and 7G2 improve targeted therapy in ovarian cancer by blocking adenosine-dependent immune evasion. *Am J Transl Res* **2014**;6:129-39
209. Montalban Del Barrio I, Penski C, Schlahsa L, Stein RG, Diessner J, Wockel A, *et al.* Adenosine-generating ovarian cancer cells attract myeloid cells which differentiate into adenosine-generating tumor associated macrophages - a self-amplifying, CD39- and CD73-dependent mechanism for tumor immune escape. *J Immunother Cancer* **2016**;4:49
210. Aliagas E, Vidal A, Texido L, Ponce J, Condom E, Martin-Satue M. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators Inflamm* **2014**;2014:509027
211. Bowser JL, Broaddus RR. CD73s protection of epithelial integrity: Thinking beyond the barrier. *Tissue Barriers* **2016**;4:e1224963
212. Sadej R, Spychala J, Skladanowski AC. Expression of ecto-5'-nucleotidase (eN, CD73) in cell lines from various stages of human melanoma. *Melanoma Res* **2006**;16:213-22
213. Wang H, Lee S, Nigro CL, Lattanzio L, Merlano M, Monteverde M, *et al.* NT5E (CD73) is epigenetically regulated in malignant melanoma and associated with metastatic site specificity. *Br J Cancer* **2012**;106:1446-52
214. Stagg J, Divisekera U, Duret H, Sparwasser T, Teng MW, Darcy PK, *et al.* CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res* **2011**;71:2892-900

215. Yegutkin GG, Marttila-Ichihara F, Karikoski M, Niemela J, Laurila JP, Elima K, *et al.* Altered purinergic signaling in CD73-deficient mice inhibits tumor progression. *Eur J Immunol* **2011**;41:1231-41
216. Ohta A, Gorelik E, Prasad SJ, Ronchese F, Lukashev D, Wong MK, *et al.* A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**;103:13132-7
217. Koszalka P, Golunska M, Urban A, Stasilojc G, Stanislawowski M, Majewski M, *et al.* Specific Activation of A3, A2A and A1 Adenosine Receptors in CD73-Knockout Mice Affects B16F10 Melanoma Growth, Neovascularization, Angiogenesis and Macrophage Infiltration. *PLoS One* **2016**;11:e0151420
218. Mittal D, Young A, Stannard K, Yong M, Teng MW, Allard B, *et al.* Antimetastatic effects of blocking PD-1 and the adenosine A2A receptor. *Cancer Res* **2014**;74:3652-8
219. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. Adenosine limits the therapeutic effectiveness of anti-CTLA4 mAb in a mouse melanoma model. *Am J Cancer Res* **2014**;4:172-81
220. Waickman AT, Alme A, Senaldi L, Zarek PE, Horton M, Powell JD. Enhancement of tumor immunotherapy by deletion of the A2A adenosine receptor. *Cancer Immunol Immunother* **2012**;61:917-26
221. Kaji W, Tanaka S, Tsukimoto M, Kojima S. Adenosine A(2B) receptor antagonist PSB603 suppresses tumor growth and metastasis by inhibiting induction of regulatory T cells. *J Toxicol Sci* **2014**;39:191-8
222. Iannone R, Miele L, Maiolino P, Pinto A, Morello S. Blockade of A2b adenosine receptor reduces tumor growth and immune suppression mediated by myeloid-derived suppressor cells in a mouse model of melanoma. *Neoplasia* **2013**;15:1400-9
223. Leclerc BG, Charlebois R, Chouinard G, Allard B, Pommey S, Saad F, *et al.* CD73 Expression Is an Independent Prognostic Factor in Prostate Cancer. *Clin Cancer Res* **2016**;22:158-66
224. Allard B, Pommey S, Smyth MJ, Stagg J. Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res* **2013**;19:5626-35
225. Yang Q, Du J, Zu L. Overexpression of CD73 in prostate cancer is associated with lymph node metastasis. *Pathol Oncol Res* **2013**;19:811-4

226. Mousavi S, Panjehpour M, Izadpanahi MH, Aghaei M. Expression of adenosine receptor subclasses in malignant and adjacent normal human prostate tissues. *Prostate* **2015**;75:735-47
227. Stella J, Bavaresco L, Braganhol E, Rockenbach L, Farias PF, Wink MR, *et al.* Differential ectonucleotidase expression in human bladder cancer cell lines. *Urol Oncol* **2010**;28:260-7
228. Cekic C, Sag D, Li Y, Theodorescu D, Strieter RM, Linden J. Adenosine A2B receptor blockade slows growth of bladder and breast tumors. *J Immunol* **2012**;188:198-205
229. Inoue Y, Yoshimura K, Kurabe N, Kahyo T, Kawase A, Tanahashi M, *et al.* Prognostic impact of CD73 and A2A adenosine receptor expression in non-small-cell lung cancer. *Oncotarget* **2017**;8:8738-51
230. Mediavilla-Varela M, Luddy K, Noyes D, Khalil FK, Neuger AM, Soliman H, *et al.* Antagonism of adenosine A2A receptor expressed by lung adenocarcinoma tumor cells and cancer associated fibroblasts inhibits their growth. *Cancer Biol Ther* **2013**;14:860-8
231. Cekic C, Day YJ, Sag D, Linden J. Myeloid expression of adenosine A2A receptor suppresses T and NK cell responses in the solid tumor microenvironment. *Cancer Res* **2014**;74:7250-9
232. Ryzhov S, Novitskiy SV, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Carbone DP, Biaggioni I, *et al.* Host A(2B) adenosine receptors promote carcinoma growth. *Neoplasia* **2008**;10:987-95
233. Bavaresco L, Bernardi A, Braganhol E, Cappellari AR, Rockenbach L, Farias PF, *et al.* The role of ecto-5'-nucleotidase/CD73 in glioma cell line proliferation. *Mol Cell Biochem* **2008**;319:61-8
234. Xu S, Shao QQ, Sun JT, Yang N, Xie Q, Wang DH, *et al.* Synergy between the ectoenzymes CD39 and CD73 contributes to adenosinergic immunosuppression in human malignant gliomas. *Neuro Oncol* **2013**;15:1160-72
235. Ludwig HC, Rausch S, Schallock K, Markakis E. Expression of CD 73 (ecto-5'-nucleotidase) in 165 glioblastomas by immunohistochemistry and electronmicroscopic histochemistry. *Anticancer Res* **1999**;19:1747-52

236. Quezada C, Garrido W, Oyarzun C, Fernandez K, Segura R, Melo R, *et al.* 5'-ectonucleotidase mediates multiple-drug resistance in glioblastoma multiforme cells. *J Cell Physiol* **2013**;228:602-8
237. Daniele S, Zappelli E, Natali L, Martini C, Trincavelli ML. Modulation of A1 and A2B adenosine receptor activity: a new strategy to sensitise glioblastoma stem cells to chemotherapy. *Cell Death Dis* **2014**;5:e1539
238. Synowitz M, Glass R, Farber K, Markovic D, Kronenberg G, Herrmann K, *et al.* A1 adenosine receptors in microglia control glioblastoma-host interaction. *Cancer Res* **2006**;66:8550-7
239. Coustan-Smith E, Song G, Clark C, Key L, Liu P, Mehrpooya M, *et al.* New markers for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **2011**;117:6267-76
240. Serra S, Horenstein AL, Vaisitti T, Brusa D, Rossi D, Laurenti L, *et al.* CD73-generated extracellular adenosine in chronic lymphocytic leukemia creates local conditions counteracting drug-induced cell death. *Blood* **2011**;118:6141-52
241. Abousamra NK, Salah El-Din M, Hamza Elzahaf E, Esmael ME. Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1 (E-NTPDase1/CD39) as a new prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* **2015**;56:113-9
242. Thomson LF, Ruedi JM, Glass A, Moldenhauer G, Moller P, Low MG, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibodies to the glycosyl phosphatidylinositol-anchored lymphocyte differentiation antigen ecto-5'-nucleotidase (CD73). *Tissue Antigens* **1990**;35:9-19
243. Freundlieb M, Zimmermann H, Muller CE. A new, sensitive ecto-5'-nucleotidase assay for compound screening. *Anal Biochem* **2014**;446:53-8
244. Ripphausen P, Freundlieb M, Brunschweiger A, Zimmermann H, Muller CE, Bajorath J. Virtual screening identifies novel sulfonamide inhibitors of ecto-5'-nucleotidase. *J Med Chem* **2012**;55:6576-81
245. Bhattarai S, Freundlieb M, Pippel J, Meyer A, Abdelrahman A, Fiene A, *et al.* alpha,beta-Methylene-ADP (AOPCP) Derivatives and Analogues: Development of Potent and Selective ecto-5'-Nucleotidase (CD73) Inhibitors. *J Med Chem* **2015**;58:6248-63



246. Baqi Y, Lee SY, Iqbal J, Ripphausen P, Lehr A, Scheiff AB, *et al.* Development of potent and selective inhibitors of ecto-5'-nucleotidase based on an anthraquinone scaffold. *J Med Chem* **2010**;53:2076-86
247. Iqbal J, Saeed A, Raza R, Matin A, Hameed A, Furtmann N, *et al.* Identification of sulfonic acids as efficient ecto-5'-nucleotidase inhibitors. *Eur J Med Chem* **2013**;70:685-91
248. Braganhol E, Tamajusuku AS, Bernardi A, Wink MR, Battastini AM. Ecto-5'-nucleotidase/CD73 inhibition by quercetin in the human U138MG glioma cell line. *Biochim Biophys Acta* **2007**;1770:1352-9
249. Geoghegan JC, Diedrich G, Lu X, Rosenthal K, Sachsenmeier KF, Wu H, *et al.* Inhibition of CD73 AMP hydrolysis by a therapeutic antibody with a dual, non-competitive mechanism of action. *MAbs* **2016**;8:454-67
250. Hay CM, Sult E, Huang Q, Mulgrew K, Fuhrmann SR, McGlinchey KA, *et al.* Targeting CD73 in the tumor microenvironment with MEDI9447. *Oncoimmunology* **2016**;5:e1208875
251. Zukowska P, Kutryb-Zajac B, Toczek M, Smolenski RT, Slominska EM. The role of ecto-5'-nucleotidase in endothelial dysfunction and vascular pathologies. *Pharmacol Rep* **2015**;67:675-81
252. Jalkanen S, Salmi M. VAP-1 and CD73, endothelial cell surface enzymes in leukocyte extravasation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2008**;28:18-26
253. Ohta M, Toyama K, Gutterman DD, Campbell WB, Lemaitre V, Teraoka R, *et al.* Ecto-5'-nucleotidase, CD73, is an endothelium-derived hyperpolarizing factor synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2013**;33:629-36
254. Ichikawa N, Taniguchi A, Kaneko H, Kawamoto M, Sekita C, Nakajima A, *et al.* Arterial Calcification Due to Deficiency of CD73 (ACDC) As One of Rheumatic Diseases Associated With Periarticular Calcification. *J Clin Rheumatol* **2015**;21:216-20
255. Gutierrez LB, Link T, Chaganti K, Motamedi D. Arterial calcification due to CD73 deficiency (ACDC): imaging manifestations of ectopic mineralization. *Skeletal Radiol* **2016**;45:1583-7

256. Markello TC, Pak LK, St Hilaire C, Dorward H, Ziegler SG, Chen MY, *et al.* Vascular pathology of medial arterial calcifications in NT5E deficiency: implications for the role of adenosine in pseudoxanthoma elasticum. *Mol Genet Metab* **2011**;103:44-50
257. McNeill E, Channon KM, Greaves DR. Inflammatory cell recruitment in cardiovascular disease: murine models and potential clinical applications. *Clin Sci (Lond)* **2010**;118:641-55
258. Buchheiser A, Ebner A, Burghoff S, Ding Z, Romio M, Viethen C, *et al.* Inactivation of CD73 promotes atherogenesis in apolipoprotein E-deficient mice. *Cardiovasc Res* **2011**;92:338-47
259. Chadjichristos CE, Scheckenbach KE, van Veen TA, Richani Sarieddine MZ, de Wit C, Yang Z, *et al.* Endothelial-specific deletion of connexin40 promotes atherosclerosis by increasing CD73-dependent leukocyte adhesion. *Circulation* **2010**;121:123-31
260. Koszalka P, Ozuyaman B, Huo Y, Zerneck A, Flogel U, Braun N, *et al.* Targeted disruption of cd73/ecto-5'-nucleotidase alters thromboregulation and augments vascular inflammatory response. *Circ Res* **2004**;95:814-21
261. Fuentes E, Pereira J, Mezzano D, Alarcon M, Caballero J, Palomo I. Inhibition of platelet activation and thrombus formation by adenosine and inosine: studies on their relative contribution and molecular modeling. *PLoS One* **2014**;9:e112741
262. Fuentes E, Badimon L, Caballero J, Padro T, Vilahur G, Alarcon M, *et al.* Protective mechanisms of adenosine 5'-monophosphate in platelet activation and thrombus formation. *Thromb Haemost* **2014**;111:491-507
263. King AE, Ackley MA, Cass CE, Young JD, Baldwin SA. Nucleoside transporters: from scavengers to novel therapeutic targets. *Trends Pharmacol Sci* **2006**;27:416-25
264. Molina-Arcas M, Casado FJ, Pastor-Anglada M. Nucleoside transporter proteins. *Curr Vasc Pharmacol* **2009**;7:426-34
265. Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, *et al.* CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102:9583-8
266. Antonioli L, Blandizzi C, Pacher P, Hasko G. Immunity, inflammation and cancer: a leading role for adenosine. *Nat Rev Cancer* **2013**;13:842-57

267. Schulte G, Fredholm BB. Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* **2003**;15:813-27
268. Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* **2001**;53:527-52
269. Feoktistov I, Biaggioni I. Adenosine A2B receptors. *Pharmacol Rev* **1997**;49:381-402
270. Stagg J, Smyth MJ. Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* **2010**;29:5346-58
271. Fredholm BB, Chern Y, Franco R, Sitkovsky M. Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling. *Prog Neurobiol* **2007**;83:263-76
272. Ohta A, Sitkovsky M. Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. *Nature* **2001**;414:916-20
273. Khoa ND, Montesinos MC, Reiss AB, Delano D, Awadallah N, Cronstein BN. Inflammatory cytokines regulate function and expression of adenosine A(2A) receptors in human monocytic THP-1 cells. *J Immunol* **2001**;167:4026-32
274. Eltzschig HK, Ibla JC, Furuta GT, Leonard MO, Jacobson KA, Enyoloji K, *et al.* Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: role of ectonucleotidases and adenosine A2B receptors. *J Exp Med* **2003**;198:783-96
275. Feoktistov I, Goldstein AE, Ryzhov S, Zeng D, Belardinelli L, Voyno-Yasenetskaya T, *et al.* Differential expression of adenosine receptors in human endothelial cells: role of A2B receptors in angiogenic factor regulation. *Circ Res* **2002**;90:531-8
276. Kolachala V, Asamoah V, Wang L, Obertone TS, Ziegler TR, Merlin D, *et al.* TNF-alpha upregulates adenosine 2b (A2b) receptor expression and signaling in intestinal epithelial cells: a basis for A2bR overexpression in colitis. *Cell Mol Life Sci* **2005**;62:2647-57
277. St Hilaire C, Koupenova M, Carroll SH, Smith BD, Ravid K. TNF-alpha upregulates the A2B adenosine receptor gene: The role of NAD(P)H oxidase 4. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**;375:292-6

278. Lin G, Field JJ, Yu JC, Ken R, Neuberg D, Nathan DG, *et al.* NF-kappaB is activated in CD4+ iNKT cells by sickle cell disease and mediates rapid induction of adenosine A2A receptors. *PLoS One* **2013**;8:e74664
279. Majumdar S, Aggarwal BB. Adenosine suppresses activation of nuclear factor-kappaB selectively induced by tumor necrosis factor in different cell types. *Oncogene* **2003**;22:1206-18
280. Ohta A, Ohta A, Madasu M, Kini R, Subramanian M, Goel N, *et al.* A2A adenosine receptor may allow expansion of T cells lacking effector functions in extracellular adenosine-rich microenvironments. *J Immunol* **2009**;183:5487-93
281. Zhang H, Conrad DM, Butler JJ, Zhao C, Blay J, Hoskin DW. Adenosine acts through A2 receptors to inhibit IL-2-induced tyrosine phosphorylation of STAT5 in T lymphocytes: role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and phosphatases. *J Immunol* **2004**;173:932-44
282. Cekic C, Linden J. Adenosine A2A receptors intrinsically regulate CD8+ T cells in the tumor microenvironment. *Cancer Res* **2014**;74:7239-49
283. Lappas CM. The plant hormone zeatin riboside inhibits T lymphocyte activity via adenosine A2A receptor activation. *Cell Mol Immunol* **2015**;12:107-12
284. Ma SR, Deng WW, Liu JF, Mao L, Yu GT, Bu LL, *et al.* Blockade of adenosine A2A receptor enhances CD8+ T cells response and decreases regulatory T cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* **2017**;16:99
285. Linnemann C, Schildberg FA, Schurich A, Diehl L, Hegenbarth SI, Endl E, *et al.* Adenosine regulates CD8 T-cell priming by inhibition of membrane-proximal T-cell receptor signalling. *Immunology* **2009**;128:e728-37
286. Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, *et al.* A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* **2008**;111:251-9
287. Ehrentraut H, Westrich JA, Eltzschig HK, Clambey ET. Adora2b adenosine receptor engagement enhances regulatory T cell abundance during endotoxin-induced pulmonary inflammation. *PLoS One* **2012**;7:e32416
288. Liang D, Zuo A, Shao H, Chen M, Kaplan HJ, Sun D. Roles of the adenosine receptor and CD73 in the regulatory effect of gammadelta T cells. *PLoS One* **2014**;9:e108932

289. Liang D, Zuo A, Zhao R, Shao H, Born WK, O'Brien RL, *et al.* CD73 Expressed on gammadelta T Cells Shapes Their Regulatory Effect in Experimental Autoimmune Uveitis. *PLoS One* **2016**;11:e0150078
290. Liang D, Zuo A, Zhao R, Shao H, Kaplan HJ, Sun D. Regulation of Adenosine Deaminase on Induced Mouse Experimental Autoimmune Uveitis. *J Immunol* **2016**;196:2646-54
291. Csoka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, Ledent C, *et al.* Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. *FASEB J* **2008**;22:3491-9
292. Alam MS, Kurtz CC, Wilson JM, Burnette BR, Wiznerowicz EB, Ross WG, *et al.* A2A adenosine receptor (AR) activation inhibits pro-inflammatory cytokine production by human CD4+ helper T cells and regulates Helicobacter-induced gastritis and bacterial persistence. *Mucosal Immunol* **2009**;2:232-42
293. Chen M, Liang D, Zuo A, Shao H, Kaplan HJ, Sun D. An A2B Adenosine Receptor Agonist Promotes Th17 Autoimmune Responses in Experimental Autoimmune Uveitis (EAU) via Dendritic Cell Activation. *PLoS One* **2015**;10:e0132348
294. Liang D, Zuo A, Shao H, Chen M, Kaplan HJ, Sun D. A2B adenosine receptor activation switches differentiation of bone marrow cells to a CD11c(+)Gr-1(+) dendritic cell subset that promotes the Th17 response. *Immun Inflamm Dis* **2015**;3:360-73
295. Wilson JM, Kurtz CC, Black SG, Ross WG, Alam MS, Linden J, *et al.* The A2B adenosine receptor promotes Th17 differentiation via stimulation of dendritic cell IL-6. *J Immunol* **2011**;186:6746-52
296. Ohta A, Sitkovsky M. Extracellular adenosine-mediated modulation of regulatory T cells. *Front Immunol* **2014**;5:304
297. Minguet S, Huber M, Rosenkranz L, Schamel WW, Reth M, Brummer T. Adenosine and cAMP are potent inhibitors of the NF-kappa B pathway downstream of immunoreceptors. *Eur J Immunol* **2005**;35:31-41
298. Tomayko MM, Anderson SM, Brayton CE, Sadanand S, Steinel NC, Behrens TW, *et al.* Systematic comparison of gene expression between murine memory and naive B cells demonstrates that memory B cells have unique signaling capabilities. *J Immunol* **2008**;181:27-38

299. Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, la Sala A, *et al.* Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. *Blood* **2003**;101:3985-90
300. Wilson JM, Ross WG, Agbai ON, Frazier R, Figler RA, Rieger J, *et al.* The A2B adenosine receptor impairs the maturation and immunogenicity of dendritic cells. *J Immunol* **2009**;182:4616-23
301. Novitskiy SV, Ryzhov S, Zaynagetdinov R, Goldstein AE, Huang Y, Tikhomirov OY, *et al.* Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. *Blood* **2008**;112:1822-31
302. Panther E, Durk T, Ferrari D, Di Virgilio F, Grimm M, Sorichter S, *et al.* AMP affects intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling, migration, cytokine secretion and T cell priming capacity of dendritic cells. *PLoS One* **2012**;7:e37560
303. Challier J, Bruniquel D, Sewell AK, Laugel B. Adenosine and cAMP signalling skew human dendritic cell differentiation towards a tolerogenic phenotype with defective CD8(+) T-cell priming capacity. *Immunology* **2013**;138:402-10
304. Schnurr M, Toy T, Shin A, Hartmann G, Rothenfusser S, Soellner J, *et al.* Role of adenosine receptors in regulating chemotaxis and cytokine production of plasmacytoid dendritic cells. *Blood* **2004**;103:1391-7
305. Eppell BA, Newell AM, Brown EJ. Adenosine receptors are expressed during differentiation of monocytes to macrophages in vitro. Implications for regulation of phagocytosis. *J Immunol* **1989**;143:4141-5
306. Csoka B, Selmechy Z, Koscsó B, Nemeth ZH, Pacher P, Murray PJ, *et al.* Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors. *FASEB J* **2012**;26:376-86
307. Bouma MG, Jeunhomme TM, Boyle DL, Dentener MA, Voitenok NN, van den Wildenberg FA, *et al.* Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. *J Immunol* **1997**;158:5400-8
308. Cronstein BN, Daguma L, Nichols D, Hutchison AJ, Williams M. The adenosine/neutrophil paradox resolved: human neutrophils possess both A1 and A2

- receptors that promote chemotaxis and inhibit O<sub>2</sub> generation, respectively. *J Clin Invest* **1990**;85:1150-7
309. Yago T, Tsukamoto H, Liu Z, Wang Y, Thompson LF, McEver RP. Multi-Inhibitory Effects of A<sub>2</sub>A Adenosine Receptor Signaling on Neutrophil Adhesion Under Flow. *J Immunol* **2015**;195:3880-9
310. van der Hoeven D, Wan TC, Auchampach JA. Activation of the A<sub>3</sub> adenosine receptor suppresses superoxide production and chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils. *Mol Pharmacol* **2008**;74:685-96
311. Lappas CM, Rieger JM, Linden J. A<sub>2</sub>A adenosine receptor induction inhibits IFN- $\gamma$  production in murine CD4<sup>+</sup> T cells. *J Immunol* **2005**;174:1073-80
312. Harish A, Hohana G, Fishman P, Arnon O, Bar-Yehuda S. A<sub>3</sub> adenosine receptor agonist potentiates natural killer cell activity. *Int J Oncol* **2003**;23:1245-9
313. Subramanian M, Kini R, Madasu M, Ohta A, Nowak M, Exley M, *et al.* Extracellular adenosine controls NKT-cell-dependent hepatitis induction. *Eur J Immunol* **2014**;44:1119-29
314. Nowak M, Lynch L, Yue S, Ohta A, Sitkovsky M, Balk SP, *et al.* The A<sub>2</sub>aR adenosine receptor controls cytokine production in iNKT cells. *Eur J Immunol* **2010**;40:682-7
315. Ryzhov S, Novitskiy SV, Goldstein AE, Biktasova A, Blackburn MR, Biaggioni I, *et al.* Adenosinergic regulation of the expansion and immunosuppressive activity of CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup> cells. *J Immunol* **2011**;187:6120-9
316. Dong K, Gao ZW, Zhang HZ. The role of adenosinergic pathway in human autoimmune diseases. *Immunol Res* **2016**;64:1133-41
317. Liang BT, Jacobson KA. A physiological role of the adenosine A<sub>3</sub> receptor: sustained cardioprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**;95:6995-9
318. Albrecht-Kupper BE, Leineweber K, Nell PG. Partial adenosine A<sub>1</sub> receptor agonists for cardiovascular therapies. *Purinergic Signal* **2012**;8:91-9
319. Koeppen M, Eckle T, Eltzschig HK. Selective deletion of the A<sub>1</sub> adenosine receptor abolishes heart-rate slowing effects of intravascular adenosine in vivo. *PLoS One* **2009**;4:e6784

320. Reichelt ME, Shanu A, Willems L, Witting PK, Ellis NA, Blackburn MR, *et al.* Endogenous adenosine selectively modulates oxidant stress via the A1 receptor in ischemic hearts. *Antioxid Redox Signal* **2009**;11:2641-50
321. Reichelt ME, Willems L, Molina JG, Sun CX, Noble JC, Ashton KJ, *et al.* Genetic deletion of the A1 adenosine receptor limits myocardial ischemic tolerance. *Circ Res* **2005**;96:363-7
322. Chan TO, Funakoshi H, Song J, Zhang XQ, Wang J, Chung PH, *et al.* Cardiac-restricted overexpression of the A(2A)-adenosine receptor in FVB mice transiently increases contractile performance and rescues the heart failure phenotype in mice overexpressing the A(1)-adenosine receptor. *Clin Transl Sci* **2008**;1:126-33
323. Seo SW, Koeppen M, Bonney S, Gobel M, Thayer M, Harter PN, *et al.* Differential Tissue-Specific Function of Adora2b in Cardioprotection. *J Immunol* **2015**;195:1732-43
324. Clark AN, Youkey R, Liu X, Jia L, Blatt R, Day YJ, *et al.* A1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes. *Circ Res* **2007**;101:1130-8
325. Chernogorova P, Zeiser R. Ectonucleotidases in solid organ and allogeneic hematopoietic cell transplantation. *J Biomed Biotechnol* **2012**;2012:208204
326. Tsukamoto H, Chernogorova P, Ayata K, Gerlach UV, Rughani A, Ritchey JW, *et al.* Deficiency of CD73/ecto-5'-nucleotidase in mice enhances acute graft-versus-host disease. *Blood* **2012**;119:4554-64
327. Wang L, Fan J, Chen S, Zhang Y, Curiel TJ, Zhang B. Graft-versus-host disease is enhanced by selective CD73 blockade in mice. *PLoS One* **2013**;8:e58397
328. Lappas CM, Liu PC, Linden J, Kang EM, Malech HL. Adenosine A2A receptor activation limits graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Leukoc Biol* **2010**;87:345-54
329. Ohtsuka T, Changelian PS, Bouis D, Noon K, Harada H, Lama VN, *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) attenuates allograft airway rejection through adenosine 2A receptor stimulation. *J Immunol* **2010**;185:1321-9



330. Sung SJ, Li L, Huang L, Lawler J, Ye H, Rosin DL, *et al.* Proximal Tubule CD73 Is Critical in Renal Ischemia-Reperfusion Injury Protection. *J Am Soc Nephrol* **2017**;28:888-902
331. Chhabra P, Linden J, Lobo P, Okusa MD, Brayman KL. The immunosuppressive role of adenosine A2A receptors in ischemia reperfusion injury and islet transplantation. *Curr Diabetes Rev* **2012**;8:419-33
332. Emamina A, Lapar DJ, Zhao Y, Steidle JF, Harris DA, Laubach VE, *et al.* Adenosine A(2)A agonist improves lung function during ex vivo lung perfusion. *Ann Thorac Surg* **2011**;92:1840-6
333. Wagner CE, Pope NH, Charles EJ, Huerter ME, Sharma AK, Salmon MD, *et al.* Ex vivo lung perfusion with adenosine A2A receptor agonist allows prolonged cold preservation of lungs donated after cardiac death. *J Thorac Cardiovasc Surg* **2016**;151:538-45
334. Stone ML, Sharma AK, Mas VR, Gehrau RC, Mulloy DP, Zhao Y, *et al.* Ex Vivo Perfusion With Adenosine A2A Receptor Agonist Enhances Rehabilitation of Murine Donor Lungs After Circulatory Death. *Transplantation* **2015**;99:2494-503
335. Aggarwal NR, D'Alessio FR, Eto Y, Chau E, Avalos C, Waickman AT, *et al.* Macrophage A2A adenosinergic receptor modulates oxygen-induced augmentation of murine lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2013**;48:635-46
336. Sharma AK, Linden J, Kron IL, Laubach VE. Protection from pulmonary ischemia-reperfusion injury by adenosine A2A receptor activation. *Respir Res* **2009**;10:58
337. Hurley MJ, Mash DC, Jenner P. Adenosine A(2A) receptor mRNA expression in Parkinson's disease. *Neurosci Lett* **2000**;291:54-8
338. Mori A, Shindou T. Modulation of GABAergic transmission in the striatopallidal system by adenosine A2A receptors: a potential mechanism for the antiparkinsonian effects of A2A antagonists. *Neurology* **2003**;61:S44-8
339. Tanganelli S, Sandager Nielsen K, Ferraro L, Antonelli T, Kehr J, Franco R, *et al.* Striatal plasticity at the network level. Focus on adenosine A2A and D2 interactions in models of Parkinson's Disease. *Parkinsonism Relat Disord* **2004**;10:273-80
340. Pinna A, Volpini R, Cristalli G, Morelli M. New adenosine A2A receptor antagonists: actions on Parkinson's disease models. *Eur J Pharmacol* **2005**;512:157-64
341. Dungo R, Deeks ED. Istradefylline: first global approval. *Drugs* **2013**;73:875-82

342. Hauser RA, Cantillon M, Pourcher E, Micheli F, Mok V, Onofrj M, *et al.* Preladenant in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations: a phase 2, double-blind, randomised trial. *Lancet Neurol* **2011**;10:221-9
343. Stocchi F, Rascol O, Hauser RA, Huyck S, Tzontcheva A, Capece R, *et al.* Randomized trial of preladenant, given as monotherapy, in patients with early Parkinson disease. *Neurology* **2017**;88:2198-206
344. Hauser RA, Stocchi F, Rascol O, Huyck SB, Capece R, Ho TW, *et al.* Preladenant as an Adjunctive Therapy With Levodopa in Parkinson Disease: Two Randomized Clinical Trials and Lessons Learned. *JAMA Neurol* **2015**;72:1491-500
345. Beavis PA, Henderson MA, Giuffrida L, Mills JK, Sek K, Cross RS, *et al.* Targeting the adenosine 2A receptor enhances chimeric antigen receptor T cell efficacy. *J Clin Invest* **2017**;127:929-41
346. Beavis PA, Divisekera U, Paget C, Chow MT, John LB, Devaud C, *et al.* Blockade of A2A receptors potently suppresses the metastasis of CD73+ tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**;110:14711-6
347. Mediavilla-Varela M, Castro J, Chiappori A, Noyes D, Hernandez DC, Allard B, *et al.* A Novel Antagonist of the Immune Checkpoint Protein Adenosine A2a Receptor Restores Tumor-Infiltrating Lymphocyte Activity in the Context of the Tumor Microenvironment. *Neoplasia* **2017**;19:530-6
348. Beavis PA, Milenkovski N, Henderson MA, John LB, Allard B, Loi S, *et al.* Adenosine Receptor 2A Blockade Increases the Efficacy of Anti-PD-1 through Enhanced Antitumor T-cell Responses. *Cancer Immunol Res* **2015**;3:506-17
349. Etique N, Grillier-Vuissoz I, Lecomte J, Flament S. Crosstalk between adenosine receptor (A2A isoform) and ERalpha mediates ethanol action in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep* **2009**;21:977-81
350. Leone RD, Lo YC, Powell JD. A2aR antagonists: Next generation checkpoint blockade for cancer immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J* **2015**;13:265-72
351. Young A, Mittal D, Stannard K, Yong M, Teng MW, Allard B, *et al.* Co-blockade of immune checkpoints and adenosine A2A receptor suppresses metastasis. *Oncoimmunology* **2014**;3:e958952

352. Herzog TJ. The current treatment of recurrent ovarian cancer. *Curr Oncol Rep* **2006**;8:448-54
353. Bookman MA. Standard treatment in advanced ovarian cancer in 2005: the state of the art. *Int J Gynecol Cancer* **2005**;15 Suppl 3:212-20
354. Bukowski RM, Ozols RF, Markman M. The management of recurrent ovarian cancer. *Semin Oncol* **2007**;34:S1-15
355. Gilks CB. Subclassification of ovarian surface epithelial tumors based on correlation of histologic and molecular pathologic data. *Int J Gynecol Pathol* **2004**;23:200-5
356. Geisler JP, Hatterman-Zogg MA, Rathe JA, Buller RE. Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **2002**;94:61-7
357. Hilton JL, Geisler JP, Rathe JA, Hattermann-Zogg MA, DeYoung B, Buller RE. Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst* **2002**;94:1396-406
358. Lengyel E. Ovarian cancer development and metastasis. *Am J Pathol* **2010**;177:1053-64
359. Naora H, Montell DJ. Ovarian cancer metastasis: integrating insights from disparate model organisms. *Nat Rev Cancer* **2005**;5:355-66
360. Masoumi Moghaddam S, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH. Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev* **2012**;31:143-62
361. Barbolina MV, Moss NM, Westfall SD, Liu Y, Burkhalter RJ, Marga F, *et al.* Microenvironmental regulation of ovarian cancer metastasis. *Cancer Treat Res* **2009**;149:319-34
362. Zhang Y, Tang H, Cai J, Zhang T, Guo J, Feng D, *et al.* Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett* **2011**;303:47-55
363. Cai J, Tang H, Xu L, Wang X, Yang C, Ruan S, *et al.* Fibroblasts in omentum activated by tumor cells promote ovarian cancer growth, adhesion and invasiveness. *Carcinogenesis* **2012**;33:20-9
364. Ayantunde AA, Parsons SL. Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol* **2007**;18:945-9

365. Adam RA, Adam YG. Malignant ascites: past, present, and future. *J Am Coll Surg* **2004**;198:999-1011
366. Kipps E, Tan DS, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer* **2013**;13:273-82
367. Ahmed N, Riley C, Oliva K, Stutt E, Rice GE, Quinn MA. Integrin-linked kinase expression increases with ovarian tumour grade and is sustained by peritoneal tumour fluid. *J Pathol* **2003**;201:229-37
368. Lane D, Robert V, Grondin R, Rancourt C, Piche A. Malignant ascites protect against TRAIL-induced apoptosis by activating the PI3K/Akt pathway in human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* **2007**;121:1227-37
369. Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Piche A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am J Cancer Res* **2012**;2:566-80
370. Kassim SK, El-Salahy EM, Fayed ST, Helal SA, Helal T, Azzam Eel D, *et al.* Vascular endothelial growth factor and interleukin-8 are associated with poor prognosis in epithelial ovarian cancer patients. *Clin Biochem* **2004**;37:363-9
371. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Cannon MJ, Pecorelli S, Parham GP. Secretion of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* **1999**;20:177-81
372. Byrne AT, Ross L, Holash J, Nakanishi M, Hu L, Hofmann JI, *et al.* Vascular endothelial growth factor-trap decreases tumor burden, inhibits ascites, and causes dramatic vascular remodeling in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* **2003**;9:5721-8
373. Perren TJ, Swart AM, Pfisterer J, Ledermann JA, Pujade-Lauraine E, Kristensen G, *et al.* A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *N Engl J Med* **2011**;365:2484-96
374. Burger RA, Brady MF, Bookman MA, Fleming GF, Monk BJ, Huang H, *et al.* Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med* **2011**;365:2473-83
375. Runyon BA, Hoefs JC, Morgan TR. Ascitic fluid analysis in malignancy-related ascites. *Hepatology* **1988**;8:1104-9
376. Latifi A, Luwor RB, Bilandzic M, Nazaretian S, Stenvers K, Pyman J, *et al.* Isolation and characterization of tumor cells from the ascites of ovarian cancer patients: molecular phenotype of chemoresistant ovarian tumors. *PLoS One* **2012**;7:e46858

377. Ahmed N, Stenvers KL. Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research. *Front Oncol* **2013**;3:256
378. Zeimet AG, Reimer D, Sopper S, Boesch M, Martowicz A, Roessler J, *et al.* Ovarian cancer stem cells. *Neoplasma* **2012**;59:747-55
379. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**;98:10869-74
380. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, *et al.* Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**;98:13790-5
381. Tothill RW, Tinker AV, George J, Brown R, Fox SB, Lade S, *et al.* Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome. *Clin Cancer Res* **2008**;14:5198-208
382. Verhaak RG, Tamayo P, Yang JY, Hubbard D, Zhang H, Creighton CJ, *et al.* Prognostically relevant gene signatures of high-grade serous ovarian carcinoma. *J Clin Invest* **2013**;123:517-25
383. Gao B, Lindemann K, Anderson L, Fereday S, Hung J, Alsop K, *et al.* Serous ovarian and primary peritoneal cancers: A comparative analysis of clinico-pathological features, molecular subtypes and treatment outcome. *Gynecol Oncol* **2016**;142:458-64
384. Nelson BH. The impact of T-cell immunity on ovarian cancer outcomes. *Immunol Rev* **2008**;222:101-16
385. Chu CS, Kim SH, June CH, Coukos G. Immunotherapy opportunities in ovarian cancer. *Expert Rev Anticancer Ther* **2008**;8:243-57
386. Lavoue V, Thedrez A, Leveque J, Foucher F, Henno S, Jauffret V, *et al.* Immunity of human epithelial ovarian carcinoma: the paradigm of immune suppression in cancer. *J Transl Med* **2013**;11:147
387. Hwang WT, Adams SF, Tahirovic E, Hagemann IS, Coukos G. Prognostic significance of tumor-infiltrating T cells in ovarian cancer: a meta-analysis. *Gynecol Oncol* **2012**;124:192-8

388. Marth C, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, Deibl M, Doppler W, *et al.* Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. *Am J Obstet Gynecol* **2004**;191:1598-605
389. Milne K, Kobel M, Kalloger SE, Barnes RO, Gao D, Gilks CB, *et al.* Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. *PLoS One* **2009**;4:e6412
390. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, *et al.* Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinomas, Non-Small Cell Lung Carcinoma and Mesothelioma, Endometrial and Ovarian Carcinomas, Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck, Genitourinary Carcinomas, and Primary Brain Tumors. *Adv Anat Pathol* **2017**;24:311-35
391. Clarke B, Tinker AV, Lee CH, Subramanian S, van de Rijn M, Turbin D, *et al.* Intraepithelial T cells and prognosis in ovarian carcinoma: novel associations with stage, tumor type, and BRCA1 loss. *Mod Pathol* **2009**;22:393-402
392. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* **2004**;10:942-9
393. Wolf D, Wolf AM, Rumpold H, Fiegl H, Zeimet AG, Muller-Holzner E, *et al.* The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **2005**;11:8326-31
394. Brtnicky T, Fialova A, Lastovicka J, Rob L, Spisek R. Clinical relevance of regulatory T cells monitoring in the peripheral blood of ovarian cancer patients. *Hum Immunol* **2015**;76:187-91
395. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, *et al.* Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2005**;102:18538-43

396. Hermans C, Anz D, Engel J, Kirchner T, Endres S, Mayr D. Analysis of FoxP3+ T-regulatory cells and CD8+ T-cells in ovarian carcinoma: location and tumor infiltration patterns are key prognostic markers. *PLoS One* **2014**;9:e111757
397. Nielsen JS, Sahota RA, Milne K, Kost SE, Nesslinger NJ, Watson PH, *et al.* CD20+ tumor-infiltrating lymphocytes have an atypical CD27- memory phenotype and together with CD8+ T cells promote favorable prognosis in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **2012**;18:3281-92
398. Eisenthal A, Polyvkin N, Bramante-Schreiber L, Misonznik F, Hassner A, Lifschitz-Mercer B. Expression of dendritic cells in ovarian tumors correlates with clinical outcome in patients with ovarian cancer. *Hum Pathol* **2001**;32:803-7
399. Zhang Z, Huang J, Zhang C, Yang H, Qiu H, Li J, *et al.* Infiltration of dendritic cells and T lymphocytes predicts favorable outcome in epithelial ovarian cancer. *Cancer Gene Ther* **2015**;22:198-206
400. Kryczek I, Zou L, Rodriguez P, Zhu G, Wei S, Mottram P, *et al.* B7-H4 expression identifies a novel suppressive macrophage population in human ovarian carcinoma. *J Exp Med* **2006**;203:871-81
401. Kryczek I, Wei S, Zhu G, Myers L, Mottram P, Cheng P, *et al.* Relationship between B7-H4, regulatory T cells, and patient outcome in human ovarian carcinoma. *Cancer Res* **2007**;67:8900-5
402. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* **2001**;19:683-765
403. Abrahams VM, Straszewski SL, Kamsteeg M, Hanczaruk B, Schwartz PE, Rutherford TJ, *et al.* Epithelial ovarian cancer cells secrete functional Fas ligand. *Cancer Res* **2003**;63:5573-81
404. Penson RT, Kronish K, Duan Z, Feller AJ, Stark P, Cook SE, *et al.* Cytokines IL-1beta, IL-2, IL-6, IL-8, MCP-1, GM-CSF and TNFalpha in patients with epithelial ovarian cancer and their relationship to treatment with paclitaxel. *Int J Gynecol Cancer* **2000**;10:33-41
405. Leffers N, Gooden MJ, de Jong RA, Hoogeboom BN, ten Hoor KA, Hollema H, *et al.* Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic

- lesions of advanced stage ovarian cancer. *Cancer Immunol Immunother* **2009**;58:449-59
406. Tran E, Nielsen JS, Wick DA, Ng AV, Johnson LD, Nesslinger NJ, *et al.* Polyfunctional T-cell responses are disrupted by the ovarian cancer ascites environment and only partially restored by clinically relevant cytokines. *PLoS One* **2010**;5:e15625
407. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **2009**;114:1141-9
408. Dong HP, Elstrand MB, Holth A, Silins I, Berner A, Trope CG, *et al.* NK- and B-cell infiltration correlates with worse outcome in metastatic ovarian carcinoma. *Am J Clin Pathol* **2006**;125:451-8
409. Reinartz S, Schumann T, Finkernagel F, Wortmann A, Jansen JM, Meissner W, *et al.* Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int J Cancer* **2014**;134:32-42
410. Curiel TJ, Cheng P, Mottram P, Alvarez X, Moons L, Evdemon-Hogan M, *et al.* Dendritic cell subsets differentially regulate angiogenesis in human ovarian cancer. *Cancer Res* **2004**;64:5535-8
411. Webb JR, Milne K, Nelson BH. PD-1 and CD103 Are Widely Coexpressed on Prognostically Favorable Intraepithelial CD8 T Cells in Human Ovarian Cancer. *Cancer Immunol Res* **2015**;3:926-35
412. Webb JR, Milne K, Kroeger DR, Nelson BH. PD-L1 expression is associated with tumor-infiltrating T cells and favorable prognosis in high-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **2016**;141:293-302
413. Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, Soo RA. De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *Lancet Oncol* **2017**;18:e731-e41
414. Walunas TL, Lenschow DJ, Bakker CY, Linsley PS, Freeman GJ, Green JM, *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* **1994**;1:405-13
415. Francisco LM, Sage PT, Sharpe AH. The PD-1 pathway in tolerance and autoimmunity. *Immunol Rev* **2010**;236:219-42



416. Yang YF, Zou JP, Mu J, Wijesuriya R, Ono S, Walunas T, *et al.* Enhanced induction of antitumor T-cell responses by cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 blockade: the effect is manifested only at the restricted tumor-bearing stages. *Cancer Res* **1997**;57:4036-41
417. Hodi FS, Mihm MC, Soiffer RJ, Haluska FG, Butler M, Seiden MV, *et al.* Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**;100:4712-7
418. Hodi FS, Butler M, Oble DA, Seiden MV, Haluska FG, Kruse A, *et al.* Immunologic and clinical effects of antibody blockade of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 in previously vaccinated cancer patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**;105:3005-10
419. Krempski J, Karyampudi L, Behrens MD, Erskine CL, Hartmann L, Dong H, *et al.* Tumor-infiltrating programmed death receptor-1+ dendritic cells mediate immune suppression in ovarian cancer. *J Immunol* **2011**;186:6905-13
420. Wei H, Zhao L, Li W, Fan K, Qian W, Hou S, *et al.* Combinatorial PD-1 blockade and CD137 activation has therapeutic efficacy in murine cancer models and synergizes with cisplatin. *PLoS One* **2013**;8:e84927
421. Duraiswamy J, Freeman GJ, Coukos G. Therapeutic PD-1 pathway blockade augments with other modalities of immunotherapy T-cell function to prevent immune decline in ovarian cancer. *Cancer Res* **2013**;73:6900-12
422. Lu L, Xu X, Zhang B, Zhang R, Ji H, Wang X. Combined PD-1 blockade and GITR triggering induce a potent antitumor immunity in murine cancer models and synergizes with chemotherapeutic drugs. *J Transl Med* **2014**;12:36
423. Guo Z, Wang X, Cheng D, Xia Z, Luan M, Zhang S. PD-1 blockade and OX40 triggering synergistically protects against tumor growth in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One* **2014**;9:e89350
424. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, Minami M, Kawaguchi A, Murayama T, *et al.* Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients With Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J Clin Oncol* **2015**;33:4015-22
425. Gaillard SL, Secord AA, Monk B. The role of immune checkpoint inhibition in the treatment of ovarian cancer. *Gynecol Oncol Res Pract* **2016**;3:11

426. Abiko K, Mandai M, Hamanishi J, Yoshioka Y, Matsumura N, Baba T, *et al.* PD-L1 on tumor cells is induced in ascites and promotes peritoneal dissemination of ovarian cancer through CTL dysfunction. *Clin Cancer Res* **2013**;19:1363-74
427. Hamanishi J, Mandai M, Iwasaki M, Okazaki T, Tanaka Y, Yamaguchi K, *et al.* Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2007**;104:3360-5
428. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, *et al.* Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* **2012**;366:2455-65
429. Ojalvo LS, Nichols PE, Jelovac D, Emens LA. Emerging immunotherapies in ovarian cancer. *Discov Med* **2015**;20:97-109
430. Stockert E, Jager E, Chen YT, Scanlan MJ, Gout I, Karbach J, *et al.* A survey of the humoral immune response of cancer patients to a panel of human tumor antigens. *J Exp Med* **1998**;187:1349-54
431. Yakirevich E, Sabo E, Lavie O, Mazareb S, Spagnoli GC, Resnick MB. Expression of the MAGE-A4 and NY-ESO-1 cancer-testis antigens in serous ovarian neoplasms. *Clin Cancer Res* **2003**;9:6453-60
432. Hassan R, Kreitman RJ, Pastan I, Willingham MC. Localization of mesothelin in epithelial ovarian cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2005**;13:243-7
433. Ho M, Hassan R, Zhang J, Wang QC, Onda M, Bera T, *et al.* Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* **2005**;11:3814-20
434. Ali-Fehmi R, Chatterjee M, Ionan A, Levin NK, Arabi H, Bandyopadhyay S, *et al.* Analysis of the expression of human tumor antigens in ovarian cancer tissues. *Cancer Biomark* **2010**;6:33-48
435. Lanitis E, Dangaj D, Hagemann IS, Song DG, Best A, Sandaltzopoulos R, *et al.* Primary human ovarian epithelial cancer cells broadly express HER2 at immunologically-detectable levels. *PLoS One* **2012**;7:e49829

436. Kalli KR, Oberg AL, Keeney GL, Christianson TJ, Low PS, Knutson KL, *et al.* Folate receptor alpha as a tumor target in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **2008**;108:619-26
437. Knutson KL, Krco CJ, Erskine CL, Goodman K, Kelemen LE, Wettstein PJ, *et al.* T-cell immunity to the folate receptor alpha is prevalent in women with breast or ovarian cancer. *J Clin Oncol* **2006**;24:4254-61
438. Wang L, Ma J, Liu F, Yu Q, Chu G, Perkins AC, *et al.* Expression of MUC1 in primary and metastatic human epithelial ovarian cancer and its therapeutic significance. *Gynecol Oncol* **2007**;105:695-702
439. Tholander B, Lindgren A, Taube A, Stenson S. Immunohistochemical detection of CA-125 and carcinoembryonic antigen in ovarian tumors in relation to corresponding preoperative serum levels. *Int J Gynecol Cancer* **1992**;2:263-70
440. Marks JR, Davidoff AM, Kerns BJ, Humphrey PA, Pence JC, Dodge RK, *et al.* Overexpression and mutation of p53 in epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **1991**;51:2979-84
441. Senzer N, Barve M, Kuhn J, Melnyk A, Beitsch P, Lazar M, *et al.* Phase I trial of "bi-shRNAi(furin)/GM-CSF DNA/autologous tumor cell" vaccine (FANG) in advanced cancer. *Mol Ther* **2012**;20:679-86
442. Oh J, Barve M, Matthews CM, Koon EC, Heffernan TP, Fine B, *et al.* Phase II study of Vigil(R) DNA engineered immunotherapy as maintenance in advanced stage ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **2016**;143:504-10
443. Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, *et al.* Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res* **2011**;17:4550-7
444. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, *et al.* A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **2006**;12:6106-15
445. Youlden DR, Cramb SM, Dunn NA, Muller JM, Pyke CM, Baade PD. The descriptive epidemiology of female breast cancer: an international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol* **2012**;36:237-48

446. Berry DA, Cronin KA, Plevritis SK, Fryback DG, Clarke L, Zelen M, *et al.* Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N Engl J Med* **2005**;353:1784-92
447. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **2000**;406:747-52
448. Kittaneh M, Montero AJ, Gluck S. Molecular profiling for breast cancer: a comprehensive review. *Biomark Cancer* **2013**;5:61-70
449. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, *et al.* The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* **1984**;312:513-6
450. Hudis CA. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *N Engl J Med* **2007**;357:39-51
451. Holbro T, Hynes NE. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2004**;44:195-217
452. Hervent AS, De Keulenaer GW. Molecular mechanisms of cardiotoxicity induced by ErbB receptor inhibitor cancer therapeutics. *Int J Mol Sci* **2012**;13:12268-86
453. Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, *et al.* The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* **2003**;11:495-505
454. Di Fiore PP, Pierce JH, Kraus MH, Segatto O, King CR, Aaronson SA. erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH/3T3 cells. *Science* **1987**;237:178-82
455. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* **2002**;2:489-501
456. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2001**;2:127-37
457. Ghosh R, Narasanna A, Wang SE, Liu S, Chakrabarty A, Balko JM, *et al.* Trastuzumab has preferential activity against breast cancers driven by HER2 homodimers. *Cancer Res* **2011**;71:1871-82
458. Moscatello DK, Holgado-Madruga M, Godwin AK, Ramirez G, Gunn G, Zoltick PW, *et al.* Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* **1995**;55:5536-9

459. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **1987**;235:177-82
460. Nahta R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol* **2012**;2012:428062
461. Steffensen KD, Waldstrom M, Jeppesen U, Jakobsen E, Brandslund I, Jakobsen A. The prognostic importance of cyclooxygenase 2 and HER2 expression in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* **2007**;17:798-807
462. Noske A, Schwabe M, Weichert W, Darb-Esfahani S, Buckendahl AC, Sehouli J, *et al.* An intracellular targeted antibody detects EGFR as an independent prognostic factor in ovarian carcinomas. *BMC Cancer* **2011**;11:294
463. Wen W, Chen WS, Xiao N, Bender R, Ghazalpour A, Tan Z, *et al.* Mutations in the Kinase Domain of the HER2/ERBB2 Gene Identified in a Wide Variety of Human Cancers. *J Mol Diagn* **2015**;17:487-95
464. Imai K, Takaoka A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer. *Nat Rev Cancer* **2006**;6:714-27
465. Leveque D, Gigou L, Bergerat JP. Clinical pharmacology of trastuzumab. *Curr Clin Pharmacol* **2008**;3:51-5
466. Baselga J, Tripathy D, Mendelsohn J, Baughman S, Benz CC, Dantis L, *et al.* Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **1996**;14:737-44
467. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, *et al.* Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* **1999**;17:2639-48
468. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* **2001**;344:783-92

469. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, *et al.* Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* **2005**;353:1673-84
470. Cho HS, Mason K, Ramyar KX, Stanley AM, Gabelli SB, Denney DW, Jr., *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* **2003**;421:756-60
471. Junttila TT, Akita RW, Parsons K, Fields C, Lewis Phillips GD, Friedman LS, *et al.* Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941. *Cancer Cell* **2009**;15:429-40
472. Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ, Ramsey EE, Holmes R, Keenan EJ, *et al.* NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* **1998**;58:5123-9
473. Molina MA, Codony-Servat J, Albanell J, Rojo F, Arribas J, Baselga J. Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Res* **2001**;61:4744-9
474. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, *et al.* Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* **1997**;151:1523-30
475. Kumar R, Yarmand-Bagheri R. The role of HER2 in angiogenesis. *Semin Oncol* **2001**;28:27-32
476. Izumi Y, Xu L, di Tomaso E, Fukumura D, Jain RK. Tumour biology: herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* **2002**;416:279-80
477. Gianni L, Romieu GH, Lichinitser M, Serrano SV, Mansutti M, Pivot X, *et al.* AVEREL: a randomized phase III Trial evaluating bevacizumab in combination with docetaxel and trastuzumab as first-line therapy for HER2-positive locally recurrent/metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **2013**;31:1719-25
478. Iannello A, Ahmad A. Role of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in the efficacy of therapeutic anti-cancer monoclonal antibodies. *Cancer Metastasis Rev* **2005**;24:487-99

479. Cooley S, Burns LJ, Repka T, Miller JS. Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Exp Hematol* **1999**;27:1533-41
480. Ali HR, Provenzano E, Dawson SJ, Blows FM, Liu B, Shah M, *et al.* Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann Oncol* **2014**;25:1536-43
481. Leyland-Jones B, Gelmon K, Ayoub JP, Arnold A, Verma S, Dias R, *et al.* Pharmacokinetics, safety, and efficacy of trastuzumab administered every three weeks in combination with paclitaxel. *J Clin Oncol* **2003**;21:3965-71
482. Stemmler HJ, Schmitt M, Willems A, Bernhard H, Harbeck N, Heinemann V. Ratio of trastuzumab levels in serum and cerebrospinal fluid is altered in HER2-positive breast cancer patients with brain metastases and impairment of blood-brain barrier. *Anticancer Drugs* **2007**;18:23-8
483. Lipton A, Kostler WJ, Leitzel K, Ali SM, Sperinde J, Weidler J, *et al.* Quantitative HER2 protein levels predict outcome in fluorescence in situ hybridization-positive patients with metastatic breast cancer treated with trastuzumab. *Cancer* **2010**;116:5168-78
484. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* **2002**;20:719-26
485. Metzger-Filho O, Winer EP, Krop I. Pertuzumab: optimizing HER2 blockade. *Clin Cancer Res* **2013**;19:5552-6
486. Agus DB, Akita RW, Fox WD, Lewis GD, Higgins B, Pisacane PI, *et al.* Targeting ligand-activated ErbB2 signaling inhibits breast and prostate tumor growth. *Cancer Cell* **2002**;2:127-37
487. Swain SM, Kim SB, Cortes J, Ro J, Semiglazov V, Campone M, *et al.* Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA study): overall survival results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* **2013**;14:461-71
488. de Azambuja E, Holmes AP, Piccart-Gebhart M, Holmes E, Di Cosimo S, Swaby RF, *et al.* Lapatinib with trastuzumab for HER2-positive early breast cancer (NeoALTTO):

- survival outcomes of a randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial and their association with pathological complete response. *Lancet Oncol* **2014**;15:1137-46
489. Rusnak DW, Lackey K, Affleck K, Wood ER, Alligood KJ, Rhodes N, *et al.* The effects of the novel, reversible epidermal growth factor receptor/ErbB-2 tyrosine kinase inhibitor, GW2016, on the growth of human normal and tumor-derived cell lines in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **2001**;1:85-94
490. Taskar KS, Rudraraju V, Mittapalli RK, Samala R, Thorsheim HR, Lockman J, *et al.* Lapatinib distribution in HER2 overexpressing experimental brain metastases of breast cancer. *Pharm Res* **2012**;29:770-81
491. Saleem A, Searle GE, Kenny LM, Huiban M, Kozlowski K, Waldman AD, *et al.* Lapatinib access into normal brain and brain metastases in patients with Her-2 overexpressing breast cancer. *EJNMMI Res* **2015**;5:30
492. de Melo Gagliato D, Jardim DL, Marchesi MS, Hortobagyi GN. Mechanisms of resistance and sensitivity to anti-HER2 therapies in HER2+ breast cancer. *Oncotarget* **2016**;7:64431-46
493. Kovtun YV, Goldmacher VS. Cell killing by antibody-drug conjugates. *Cancer Lett* **2007**;255:232-40
494. Barok M, Joensuu H, Isola J. Trastuzumab emtansine: mechanisms of action and drug resistance. *Breast Cancer Res* **2014**;16:209
495. Krop IE, Kim SB, Gonzalez-Martin A, LoRusso PM, Ferrero JM, Smitt M, *et al.* Trastuzumab emtansine versus treatment of physician's choice for pretreated HER2-positive advanced breast cancer (TH3RESA): a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* **2014**;15:689-99
496. Dokter W, Ubink R, van der Lee M, van der Vleuten M, van Achterberg T, Jacobs D, *et al.* Preclinical profile of the HER2-targeting ADC SYD983/SYD985: introduction of a new duocarmycin-based linker-drug platform. *Mol Cancer Ther* **2014**;13:2618-29
497. van der Lee MM, Groothuis PG, Ubink R, van der Vleuten MA, van Achterberg TA, Loosveld EM, *et al.* The Preclinical Profile of the Duocarmycin-Based HER2-Targeting ADC SYD985 Predicts for Clinical Benefit in Low HER2-Expressing Breast Cancers. *Mol Cancer Ther* **2015**;14:692-703



498. Chung A, Cui X, Audeh W, Giuliano A. Current status of anti-human epidermal growth factor receptor 2 therapies: predicting and overcoming herceptin resistance. *Clin Breast Cancer* **2013**;13:223-32
499. Ritter CA, Perez-Torres M, Rinehart C, Guix M, Dugger T, Engelman JA, *et al.* Human breast cancer cells selected for resistance to trastuzumab in vivo overexpress epidermal growth factor receptor and ErbB ligands and remain dependent on the ErbB receptor network. *Clin Cancer Res* **2007**;13:4909-19
500. She QB, Chandarlapaty S, Ye Q, Lobo J, Haskell KM, Leander KR, *et al.* Breast tumor cells with PI3K mutation or HER2 amplification are selectively addicted to Akt signaling. *PLoS One* **2008**;3:e3065
501. Yao E, Zhou W, Lee-Hoeflich ST, Truong T, Haverty PM, Eastham-Anderson J, *et al.* Suppression of HER2/HER3-mediated growth of breast cancer cells with combinations of GDC-0941 PI3K inhibitor, trastuzumab, and pertuzumab. *Clin Cancer Res* **2009**;15:4147-56
502. Berns K, Horlings HM, Hennessy BT, Madiredjo M, Hijmans EM, Beelen K, *et al.* A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer. *Cancer Cell* **2007**;12:395-402
503. Nagata Y, Lan KH, Zhou X, Tan M, Esteva FJ, Sahin AA, *et al.* PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* **2004**;6:117-27
504. Serra V, Markman B, Scaltriti M, Eichhorn PJ, Valero V, Guzman M, *et al.* NVP-BEZ235, a dual PI3K/mTOR inhibitor, prevents PI3K signaling and inhibits the growth of cancer cells with activating PI3K mutations. *Cancer Res* **2008**;68:8022-30
505. Janiszewska M, Liu L, Almendro V, Kuang Y, Paweletz C, Sakr RA, *et al.* In situ single-cell analysis identifies heterogeneity for PIK3CA mutation and HER2 amplification in HER2-positive breast cancer. *Nat Genet* **2015**;47:1212-9
506. Utermark T, Rao T, Cheng H, Wang Q, Lee SH, Wang ZC, *et al.* The p110alpha and p110beta isoforms of PI3K play divergent roles in mammary gland development and tumorigenesis. *Genes Dev* **2012**;26:1573-86

507. Pupa SM, Menard S, Morelli D, Pozzi B, De Palo G, Colnaghi MI. The extracellular domain of the c-erbB-2 oncoprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene* **1993**;8:2917-23
508. Anido J, Scaltriti M, Bech Serra JJ, Santiago Josefatz B, Todo FR, Baselga J, *et al.* Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *EMBO J* **2006**;25:3234-44
509. Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, Guzman M, Cortes J, *et al.* Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **2007**;99:628-38
510. Xia W, Liu LH, Ho P, Spector NL. Truncated ErbB2 receptor (p95ErbB2) is regulated by heregulin through heterodimer formation with ErbB3 yet remains sensitive to the dual EGFR/ErbB2 kinase inhibitor GW572016. *Oncogene* **2004**;23:646-53
511. Scaltriti M, Chandarlapaty S, Prudkin L, Aura C, Jimenez J, Angelini PD, *et al.* Clinical benefit of lapatinib-based therapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast tumors coexpressing the truncated p95HER2 receptor. *Clin Cancer Res* **2010**;16:2688-95
512. Sperinde J, Jin X, Banerjee J, Penuel E, Saha A, Diedrich G, *et al.* Quantitation of p95HER2 in paraffin sections by using a p95-specific antibody and correlation with outcome in a cohort of trastuzumab-treated breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **2010**;16:4226-35
513. Pedersen K, Angelini PD, Laos S, Bach-Faig A, Cunningham MP, Ferrer-Ramon C, *et al.* A naturally occurring HER2 carboxy-terminal fragment promotes mammary tumor growth and metastasis. *Mol Cell Biol* **2009**;29:3319-31
514. Ward TM, Iorns E, Liu X, Hoe N, Kim P, Singh S, *et al.* Truncated p110 ERBB2 induces mammary epithelial cell migration, invasion and orthotopic xenograft formation, and is associated with loss of phosphorylated STAT5. *Oncogene* **2013**;32:2463-74
515. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**;144:646-74
516. Lesniak D, Sabri S, Xu Y, Graham K, Bhatnagar P, Suresh M, *et al.* Spontaneous epithelial-mesenchymal transition and resistance to HER-2-targeted therapies in HER-2-positive luminal breast cancer. *PLoS One* **2013**;8:e71987

517. Gupta P, Srivastava SK. HER2 mediated de novo production of TGFbeta leads to SNAIL driven epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer. *Mol Oncol* **2014**;8:1532-47
518. Burnett JP, Korkaya H, Ouzounova MD, Jiang H, Conley SJ, Newman BW, *et al.* Trastuzumab resistance induces EMT to transform HER2(+) PTEN(-) to a triple negative breast cancer that requires unique treatment options. *Sci Rep* **2015**;5:15821
519. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, *et al.* Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clin Cancer Res* **2004**;10:5650-5
520. Arnould L, Gelly M, Penault-Llorca F, Benoit L, Bonnetain F, Migeon C, *et al.* Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer: an antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *Br J Cancer* **2006**;94:259-67
521. Varchetta S, Gibelli N, Oliviero B, Nardini E, Gennari R, Gatti G, *et al.* Elements related to heterogeneity of antibody-dependent cell cytotoxicity in patients under trastuzumab therapy for primary operable breast cancer overexpressing Her2. *Cancer Res* **2007**;67:11991-9
522. Carson WE, Parihar R, Lindemann MJ, Personeni N, Dierksheide J, Meropol NJ, *et al.* Interleukin-2 enhances the natural killer cell response to Herceptin-coated Her2/neu-positive breast cancer cells. *Eur J Immunol* **2001**;31:3016-25
523. Repka T, Chiorean EG, Gay J, Herwig KE, Kohl VK, Yee D, *et al.* Trastuzumab and interleukin-2 in HER2-positive metastatic breast cancer: a pilot study. *Clin Cancer Res* **2003**;9:2440-6
524. Mani A, Roda J, Young D, Caligiuri MA, Fleming GF, Kaufman P, *et al.* A phase II trial of trastuzumab in combination with low-dose interleukin-2 (IL-2) in patients (PTS) with metastatic breast cancer (MBC) who have previously failed trastuzumab. *Breast Cancer Res Treat* **2009**;117:83-9
525. Kohrt HE, Houot R, Weiskopf K, Goldstein MJ, Scheeren F, Czerwinski D, *et al.* Stimulation of natural killer cells with a CD137-specific antibody enhances trastuzumab efficacy in xenotransplant models of breast cancer. *J Clin Invest* **2012**;122:1066-75

526. Spiridon CI, Ghetie MA, Uhr J, Marches R, Li JL, Shen GL, *et al.* Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* **2002**;8:1720-30
527. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* **2000**;6:443-6
528. Vajdic CM, van Leeuwen MT. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* **2009**;125:1747-54
529. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **2015**;348:69-74
530. Bei R, Masuelli L, Moriconi E, Visco V, Moretti A, Kraus MH, *et al.* Immune responses to all ErbB family receptors detectable in serum of cancer patients. *Oncogene* **1999**;18:1267-75
531. Montgomery RB, Makary E, Schiffman K, Goodell V, Disis ML. Endogenous anti-HER2 antibodies block HER2 phosphorylation and signaling through extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Res* **2005**;65:650-6
532. Beano A, Signorino E, Evangelista A, Brusa D, Mistrangelo M, Polimeni MA, *et al.* Correlation between NK function and response to trastuzumab in metastatic breast cancer patients. *J Transl Med* **2008**;6:25
533. Herrmann F, Lehr HA, Drexler I, Sutter G, Hengstler J, Wollscheid U, *et al.* HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC class I antigen-processing pathway. *Cancer Res* **2004**;64:215-20
534. Choudhury A, Charo J, Parapuram SK, Hunt RC, Hunt DM, Seliger B, *et al.* Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines. *Int J Cancer* **2004**;108:71-7
535. Mimura K, Ando T, Poschke I, Mougiakakos D, Johansson CC, Ichikawa J, *et al.* T cell recognition of HLA-A2 restricted tumor antigens is impaired by the oncogene HER2. *Int J Cancer* **2011**;128:390-401
536. Stagg J, Loi S, Divisekera U, Ngiow SF, Duret H, Yagita H, *et al.* Anti-ErbB-2 mAb therapy requires type I and II interferons and synergizes with anti-PD-1 or anti-CD137 mAb therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**;108:7142-7

537. Charlebois R, Allard B, Allard D, Buisseret L, Turcotte M, Pommey S, *et al.* PolyI:C and CpG Synergize with Anti-ErbB2 mAb for Treatment of Breast Tumors Resistant to Immune Checkpoint Inhibitors. *Cancer Res* **2017**;77:312-9
538. Knutson KL, Clynes R, Shreeder B, Yeramian P, Kemp KP, Ballman K, *et al.* Improved Survival of HER2+ Breast Cancer Patients Treated with Trastuzumab and Chemotherapy Is Associated with Host Antibody Immunity against the HER2 Intracellular Domain. *Cancer Res* **2016**;76:3702-10
539. Salgado R, Denkert C, Campbell C, Savas P, Nuciforo P, Aura C, *et al.* Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. *JAMA Oncol* **2015**;1:448-54
540. Loi S, Michiels S, Salgado R, Sirtaine N, Jose V, Fumagalli D, *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. *Ann Oncol* **2014**;25:1544-50
541. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, *et al.* Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *J Clin Oncol* **2013**;31:860-7
542. Mattarollo SR, Loi S, Duret H, Ma Y, Zitvogel L, Smyth MJ. Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. *Cancer Res* **2011**;71:4809-20
543. Oda N, Shimazu K, Naoi Y, Morimoto K, Shimomura A, Shimoda M, *et al.* Intratumoral regulatory T cells as an independent predictive factor for pathological complete response to neoadjuvant paclitaxel followed by 5-FU/epirubicin/cyclophosphamide in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* **2012**;136:107-16
544. West NR, Kost SE, Martin SD, Milne K, Deleeuw RJ, Nelson BH, *et al.* Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and

- good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. *Br J Cancer* **2013**;108:155-62
545. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rebe C, *et al.* In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol* **2011**;224:389-400
546. Seo AN, Lee HJ, Kim EJ, Kim HJ, Jang MH, Lee HE, *et al.* Tumour-infiltrating CD8+ lymphocytes as an independent predictive factor for pathological complete response to primary systemic therapy in breast cancer. *Br J Cancer* **2013**;109:2705-13
547. Brown JR, Wimberly H, Lannin DR, Nixon C, Rimm DL, Bossuyt V. Multiplexed quantitative analysis of CD3, CD8, and CD20 predicts response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* **2014**;20:5995-6005
548. Quail DF, Joyce JA. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. *Nat Med* **2013**;19:1423-37
549. Munn DH, Bronte V. Immune suppressive mechanisms in the tumor microenvironment. *Curr Opin Immunol* **2016**;39:1-6
550. Demaria S, Bhardwaj N, McBride WH, Formenti SC. Combining radiotherapy and immunotherapy: a revived partnership. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **2005**;63:655-66
551. Apetoh L, Ladoire S, Coukos G, Ghiringhelli F. Combining immunotherapy and anticancer agents: the right path to achieve cancer cure? *Ann Oncol* **2015**;26:1813-23
552. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* **2006**;6:715-27
553. Roby KF, Taylor CC, Sweetwood JP, Cheng Y, Pace JL, Tawfik O, *et al.* Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis* **2000**;21:585-91
554. Cho S, Sun Y, Soisson AP, Dodson MK, Peterson CM, Jarboe EA, *et al.* Characterization and evaluation of pre-clinical suitability of a syngeneic orthotopic mouse ovarian cancer model. *Anticancer Res* **2013**;33:1317-24
555. Greenaway J, Moorehead R, Shaw P, Petrik J. Epithelial-stromal interaction increases cell proliferation, survival and tumorigenicity in a mouse model of human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **2008**;108:385-94

556. Gharwan H, Bunch KP, Annunziata CM. The role of reproductive hormones in epithelial ovarian carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer* **2015**;22:R339-63
557. Kobayashi H, Iwai K, Niuro E, Morioka S, Yamada Y, Ogawa K, *et al.* The conceptual advances of carcinogenic sequence model in high-grade serous ovarian cancer. *Biomed Rep* **2017**;7:209-13
558. Chiriva-Internati M, Yu Y, Mirandola L, Jenkins MR, Chapman C, Cannon M, *et al.* Cancer testis antigen vaccination affords long-term protection in a murine model of ovarian cancer. *PLoS One* **2010**;5:e10471
559. Sanches R, Kuiper M, Penault-Llorca F, Aunoble B, D'Incan C, Bignon YJ. Antitumoral effect of interleukin-12-secreting fibroblasts in a mouse model of ovarian cancer: implications for the use of ovarian cancer biopsy-derived fibroblasts as a vehicle for regional gene therapy. *Cancer Gene Ther* **2000**;7:707-20
560. House CD, Hernandez L, Annunziata CM. Recent technological advances in using mouse models to study ovarian cancer. *Front Oncol* **2014**;4:26
561. Liao JB, Ovenell KJ, Curtis EE, Cecil DL, Koehnlein MR, Rastetter LR, *et al.* Preservation of tumor-host immune interactions with luciferase-tagged imaging in a murine model of ovarian cancer. *J Immunother Cancer* **2015**;3:16
562. Petkov SP, Heuts F, Krotova OA, Kilpelainen A, Engstrom G, Starodubova ES, *et al.* Evaluation of immunogen delivery by DNA immunization using non-invasive bioluminescence imaging. *Hum Vaccin Immunother* **2013**;9:2228-36
563. Szabova L, Yin C, Bupp S, Guerin TM, Schlomer JJ, Householder DB, *et al.* Perturbation of Rb, p53, and Brca1 or Brca2 cooperate in inducing metastatic serous epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* **2012**;72:4141-53
564. Muller WJ, Sinn E, Pattengale PK, Wallace R, Leder P. Single-step induction of mammary adenocarcinoma in transgenic mice bearing the activated c-neu oncogene. *Cell* **1988**;54:105-15
565. Fry EA, Taneja P, Inoue K. Clinical applications of mouse models for breast cancer engaging HER2/neu. *Integr Cancer Sci Ther* **2016**;3:593-603
566. Stagg J, Sharkey J, Pommey S, Young R, Takeda K, Yagita H, *et al.* Antibodies targeted to TRAIL receptor-2 and ErbB-2 synergize in vivo and induce an antitumor immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**;105:16254-9

567. Rovero S, Amici A, Di Carlo E, Bei R, Nanni P, Quaglino E, *et al.* DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J Immunol* **2000**;165:5133-42
568. Zhang H, Wang Q, Montone KT, Peavey JE, Drebin JA, Greene MI, *et al.* Shared antigenic epitopes and pathobiological functions of anti-p185(her2/neu) monoclonal antibodies. *Exp Mol Pathol* **1999**;67:15-25
569. Park S, Nedrow JR, Josefsson A, Sgouros G. Human HER2 overexpressing mouse breast cancer cell lines derived from MMTV.f.HuHER2 mice: characterization and use in a model of metastatic breast cancer. *Oncotarget* **2017**;8:68071-82
570. Song H, Kim TO, Ma SY, Park JH, Choi JH, Kim JH, *et al.* Intratumoral heterogeneity impacts the response to anti-neu antibody therapy. *BMC Cancer* **2014**;14:647
571. Domcke S, Sinha R, Levine DA, Sander C, Schultz N. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat Commun* **2013**;4:2126
572. Fleury H, Communal L, Carmona E, Portelance L, Arcand SL, Rahimi K, *et al.* Novel high-grade serous epithelial ovarian cancer cell lines that reflect the molecular diversity of both the sporadic and hereditary disease. *Genes Cancer* **2015**;6:378-98
573. Elenbaas B, Spirio L, Koerner F, Fleming MD, Zimonjic DB, Donaher JL, *et al.* Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. *Genes Dev* **2001**;15:50-65
574. Casas E, Kim J, Bendesky A, Ohno-Machado L, Wolfe CJ, Yang J. Snail2 is an essential mediator of Twist1-induced epithelial mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* **2011**;71:245-54
575. Ghuwalewala S, Ghatak D, Das P, Dey S, Sarkar S, Alam N, *et al.* CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Res* **2016**;16:405-17
576. Raspollini MR, Castiglione F, Rossi Degl'innocenti D, Amunni G, Villanucci A, Garbini F, *et al.* Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol* **2005**;16:590-6
577. Ma C, Zhang Q, Ye J, Wang F, Zhang Y, Wevers E, *et al.* Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol* **2012**;189:5029-36



578. Kooi S, Zhang HZ, Patenia R, Edwards CL, Platsoucas CD, Freedman RS. HLA class I expression on human ovarian carcinoma cells correlates with T-cell infiltration in vivo and T-cell expansion in vitro in low concentrations of recombinant interleukin-2. *Cell Immunol* **1996**;174:116-28
579. Matsushita N, Ghazizadeh M, Konishi H, Araki T. Association of ovarian tumor epithelium coexpressing HLA-DR and CA-125 antigens with tumor infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *J Nippon Med Sch* **2003**;70:40-4
580. Syn N, Wang L, Sethi G, Thiery JP, Goh BC. Exosome-Mediated Metastasis: From Epithelial-Mesenchymal Transition to Escape from Immunosurveillance. *Trends Pharmacol Sci* **2016**;37:606-17
581. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D, *et al.* Human CD4+ CD39+ regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73+ exosomes or CD73+ cells. *Clin Exp Immunol* **2014**;177:531-43
582. Smyth LA, Ratnasothy K, Tsang JY, Boardman D, Warley A, Lechler R, *et al.* CD73 expression on extracellular vesicles derived from CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells contributes to their regulatory function. *Eur J Immunol* **2013**;43:2430-40
583. Peng P, Yan Y, Keng S. Exosomes in the ascites of ovarian cancer patients: origin and effects on anti-tumor immunity. *Oncol Rep* **2011**;25:749-62
584. Battke C, Ruiss R, Welsch U, Wimberger P, Lang S, Jochum S, *et al.* Tumour exosomes inhibit binding of tumour-reactive antibodies to tumour cells and reduce ADCC. *Cancer Immunol Immunother* **2011**;60:639-48
585. Morello S, Capone M, Sorrentino C, Giannarelli D, Madonna G, Mallardo D, *et al.* Soluble CD73 as biomarker in patients with metastatic melanoma patients treated with nivolumab. *J Transl Med* **2017**;15:244
586. Guo Z, Wang H, Meng F, Li J, Zhang S. Combined Trabectedin and anti-PD1 antibody produces a synergistic antitumor effect in a murine model of ovarian cancer. *J Transl Med* **2015**;13:247
587. Duraiswamy J, Kaluza KM, Freeman GJ, Coukos G. Dual blockade of PD-1 and CTLA-4 combined with tumor vaccine effectively restores T-cell rejection function in tumors. *Cancer Res* **2013**;73:3591-603

588. Rimawi MF, Mayer IA, Forero A, Nanda R, Goetz MP, Rodriguez AA, *et al.* Multicenter phase II study of neoadjuvant lapatinib and trastuzumab with hormonal therapy and without chemotherapy in patients with human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: TBCRC 006. *J Clin Oncol* **2013**;31:1726-31
589. Prat A, Baselga J. Dual human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) blockade and hormonal therapy for the treatment of primary HER2-positive breast cancer: one more step toward chemotherapy-free therapy. *J Clin Oncol* **2013**;31:1703-6
590. Savas P, Salgado R, Denkert C, Sotiriou C, Darcy PK, Smyth MJ, *et al.* Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat Rev Clin Oncol* **2016**;13:228-41
591. Chaffer CL, San Juan BP, Lim E, Weinberg RA. EMT, cell plasticity and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **2016**;35:645-54
592. Galang CK, Garcia-Ramirez J, Solski PA, Westwick JK, Der CJ, Neznanov NN, *et al.* Oncogenic Neu/ErbB-2 increases ets, AP-1, and NF-kappaB-dependent gene expression, and inhibiting ets activation blocks Neu-mediated cellular transformation. *J Biol Chem* **1996**;271:7992-8
593. Merkhofer EC, Cogswell P, Baldwin AS. Her2 activates NF-kappaB and induces invasion through the canonical pathway involving IKKalpha. *Oncogene* **2010**;29:1238-48
594. Biswas DK, Shi Q, Baily S, Strickland I, Ghosh S, Pardee AB, *et al.* NF-kappa B activation in human breast cancer specimens and its role in cell proliferation and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2004**;101:10137-42
595. Supernat A, Markiewicz A, Welnicka-Jaskiewicz M, Seroczynska B, Skokowski J, Sejda A, *et al.* CD73 expression as a potential marker of good prognosis in breast carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* **2012**;20:103-7