Université de Bordeaux
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité : Microbiologie - Immunologie
Laboratoire ImmunoConcept UMR – CNRS 5164

Thèse en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Présentée et soutenue publiquement
Le 17 Décembre 2019 par
Charlotte DOMBLIDES

Identification des mécanismes immunométaboliques impliqués dans l'activation des lymphocytes T γδ tissulaires humains dans le cancer

DIRECTEUR DE THESE

Monsieur le Professeur Patrick BLANCO

Membres du jury

Monsieur Alain RAVAUD	PU-PH, Université de Bordeaux	Président
Monsieur Olivier ADOTEVI	PU-PH, Université de Franche-Comté	Rapporteur
Madame Clotilde ALVES-GUERRA	CR CNRS, Université de Paris Descartes	Rapportrice
Madame Julie DECHANET-MERVILLE	DR CNRS, Université de Bordeaux	Examinatrice
Monsieur Franck PAGES	PU-PH, Université de Paris Descartes	Examinateur
Madame Maya SALEH	PU, Université de McGill (Canada)	Examinatrice
Monsieur Benjamin FAUSTIN	CR CNRS, Université de Bordeaux	Membre invité

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement mes 2 rapporteurs, le Dr Clotilde Alves-Guerra et le Pr Olivier Adotevi d'avoir pris le temps de rapporter ce travail de thèse.

Je remercie le Pr Alain Ravaud de me faire l'honneur de présider ce jury, encore une fois. Je vous remercie également pour votre soutien infaillible dans la réalisation de mon projet professionnel.

Je remercie le Pr Patrick Blanco d'avoir été mon directeur de thèse. Patrick, je te remercie pour ton enthousiasme inébranlable, et surtout pour tes « alors, des results ?! ».

Je remercie le Dr Benjamin Faustin, qui m'a encadrée pendant cette thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour travailler sur ces beaux projets, merci pour ton enthousiasme et pour nos échanges scientifiques autour de l'univers de l'immuno-oncologie.

Je remercie également vivement le Pr Maya Saleh et le Pr Franck Pagès d'avoir accepté de juger ce travail de thèse en tant qu'examinateurs.

Je remercie le Dr Julie Déchanet-Merville d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en qualité d'examinatrice. Julie, je te remercie également de m'avoir accueillie dans ton groupe, merci pour ton soutien et ta présence bienveillante. Grâce à toi, le gamma-delta, cette petite bête que personne n'a finalement encore jamais observé, n'a plus de secrets pour moi.

Un grand merci à toute l'équipe du laboratoire ImmunoConcept, présents ou seulement de passage, de m'avoir accueillie dans le laboratoire. Merci pour votre présence, pour les bons moments passés au cours de ces 4 années, pour nos discussions (scientifiques ou non). Ce fut un plaisir de réaliser ce travail avec vous, et j'espère pouvoir continuer pendant encore longtemps. Votre soutien dans les périodes difficiles m'a fait chaud au cœur !

Merci à l'équipe des gamma-delta-istes, avec qui j'ai grandi pendant ces 4 années. J'ai acquis avec vous une rigueur et une ouverture d'esprit, lors des labmeetings ou de nos conversations au café le matin. Nous avons surtout partagé un super congrès dont je garde de bons souvenirs.

Merci aux différentes plateformes avec qui j'ai collaboré, et en particulier Jacqueline Plissonneau de l'UMR 5234, et le Pr Xavier Santarelli de l'ENSTBB, qui ont permis de faire avancer ce travail. Merci également à Isabelle Soubeyran et Valérie Velasco de l'Institut Bergonié, qui ont permis la réalisation de ce travail de recherche.

Merci à Isabelle Mahouche, pour ta présence et ton soutien indéfectible, pour ton sourire et ta bonne humeur permanente, pour nos discussions, nos fous rires et tes précieux conseils pour les manips mais pas que ! Ce fut un très grand plaisir de travailler avec toi et j'espère que nous garderons ce lien d'amitié.

Je remercie aussi Lydia, travailleuse de l'ombre, pour l'expertise que tu nous as apportée dans la réflexion autour des différents projets et pour ta relecture attentive des articles.

Merci à mes 2 « petits », Félix Lefort et Marie Decraecker, d'avoir abattu tant de boulot pour faire avancer les projets. Sans vous, mon travail de thèse n'aurait jamais pu avancer aussi vite.

Merci à toutes les belles rencontres qui ont abouti à de belles amitiés, Hannah, Layal, Caro, Laure, Céline et tous les autres. Je m'excuse pour les oubliés, mais il y en a eu tellement !

Merci à toute l'équipe médicale et paramédicale du service d'oncologie de Saint-André, de m'avoir accompagnée depuis le début de mon internet, mais aussi dans ce grand projet, merci pour votre bonne

humeur malgré les situations difficiles auxquelles nous sommes confrontés. Par votre présence et votre soutien, vous m'avez permise de réaliser cette thèse !

Merci à tous mes amis qui ont supporté mes râlages incessants pendant ces 4 années de thèse, ça n'a pas dû être facile. Promis, je vais faire un effort pour la suite !

Je remercie très fort ma famille, les présents, mais aussi ceux qui sont partis trop tôt et qui nous manquent terriblement. Merci de m'accompagner dans ce long voyage, dans les hauts mais aussi dans les bas ! Ce projet, je n'aurais jamais pu le concevoir sans vous. J'espère que vous êtes fiers de moi !

Merci également à Evelyne et Yves, loin des yeux mais près du cœur. Merci de m'avoir accueillie comme vous l'avez fait, merci pour votre soutien et votre bonne humeur.

Merci à Tsuki, la Princesse, et Naya, dit Slurp, pour leur ronron-thérapie quotidienne réconfortante.

Et je garde le meilleur pour la fin. Je te remercie tout particulièrement, Alexandre. Tu m'as accompagnée dans ce deuxième projet (et pas des moindres), tu m'as soutenue lors des difficultés (et il y en a eu, jusqu'à la fin). Je ne pourrai pas entreprendre tout ça sans toi, merci de m'épauler au quotidien. Merci pour ta patience et ton soutien dans tous mes choix professionnels. Promis, c'est la dernière thèse !

Un immense merci à tous, et je m'excuse par avance pour les personnes que j'aurais oubliées !

TABLE DES MATIERES

I. Place de l'immunité dans l'histoire naturelle du cancer 7
a. Le concept d'immunoediting résume les interactions complexes entre tumeur et système immunitaire 7
b. La réponse immunitaire antitumorale efficace : un mécanisme finement régulé 9
c. Les différents types d'immunothérapies 10
L'immunothérapie passive : injection de cytokines, cytotoxicité médiée par les anticorps et transfert adoptif de lymphocytes T 11
L'immunothérapie active : vaccinothérapie et virus oncolytiques 11
d. Le ciblage de la réponse immunitaire antitumorale en 2019 12
e. Les lymphocytes T : acteurs primordiaux de la réponse immunitaire antitumorale 14
II. Les lymphocytes T γδ, un sous-type rare mais fondamental dans la réponse immunitaire 15
a. Caractéristiques du récepteur à l'antigène des LT γδ 16
1. Structure du TCR γδ 16
2. Diversité du TCR γδ 17
b. Ontogénie des LT γδ 19
1. Les progéniteurs lymphoïdes 19
2. Développement des LT αβ 19
3. Développement des LT γδ 19
4. Mécanismes impliqués dans la différenciation en LT αβ ou LT γδ 20
5. Différents phénotypes : innate-like versus adaptatif 21
6. Evolution du répertoire des LT γδ chez l'Homme 22
c. Mécanismes de reconnaissance de la tumeur par les LT γδ (Figure 10) 22
1. Les LT Vδ2Vγ9 23
2. Les LT γδ Vδ2 négatifs 25
3. Les ligands communs aux LT γδ Vδ2 positifs et Vδ2 négatifs 25
a. Les récepteurs de la famille des NKR (Natural Killer Receptors) 25
b. Les autres récepteurs exprimés par les LT γδ 26
d. Régulation de l'activation des LT γδ 26
e. Implication des LT γδ dans l'homéostasie tissulaire : l'exemple de l'intestin (Figure 12) 27
f. Implication des LT γδ dans la tumorigénèse 29
1. Rôle antitumoral des LT γδ 29
a. Observations du rôle antitumoral des LT γδ 29
b. Mécanismes pouvant expliquer leur effet antitumoral 29
Fonction globale d'immunosurveillance tissulaire 29
Fonctions cytotoxiques directes (Figure 13A) 30
Sécrétion de cytokines et de chémokines (Figure 13A) 31
Rôle de cellule présentatrice d'antigènes (Figure 13B) 31
Maturation des cellules dendritiques (Figure 13B) 31
Rôle dans l'activation des LB grâce à leur fonction « follicular helper » (Figure 13B) 32
Rôle dans l'activation des lymphocytes NK (Figure 13B) 32
2. Rôle paradoxal protumoral des LT γδ 32
a. Observations du rôle protumoral des LT γδ 32
b. Mécanismes d'action de leur effet protumoral (Figure 14) 33
3. Plasticité des LT γδ 35
g. Les LT γδ comme cible thérapeutique dans le cancer 35
1. Rationnel 35
2. Expansion ex vivo des LT γδ autologues avant leur réinjection 35
3. Stimulation in vivo des LT γδ 36
4. Nouvelles approches ciblant les LT γδ (Sebestyen et al., 2019) 38
h. Conclusion 39
III. La voie de l'inflammasome et de la production de l'IL-18 40
a. Récepteurs de l'immunité innée et signaux de danger 40

b. Les constituants de l'inflammasome 40
c. Modalités d'activation de l'inflammasome 42
1. Assemblage de l'inflammasome 42
2. Détection des signaux de danger 43
a. Interaction directe : rôle de senseur cytosolique 43
b. Absence d'interaction directe entre le signal de danger et l'inflammasome 44
3. Particularités de la caspase-8 45
d. Fonctions des inflammasomes 46
1. Sécrétion de cytokines de la famille de l'IL-1 46
a. L'IL-1β 46
b. L'IL-18 46
2. Mort cellulaire par pyroptose 47
3. Rôle dans le maintien de l'intégrité des épithéliums 48
e. Régulation de l'activation de l'inflammasome 49
a. Régulation au niveau transcriptionnel 50
b. Régulation post-transcriptionnelle 50
c. Régulation post-traductionnelle 51
f. Rôle de l'inflammasome dans le cancer 51
1. Rôle antitumoral des constituants de l'inflammasome (Figure 19) 52
a. Rôle protecteur caspase-dépendant (Figure 19A) 52
b. Rôle protecteur caspase-indépendant (Figure 19B) 55
2. Rôle pro-tumoral des constituants de l'inflammasome 57
a. La prolifération et la survie cellulaires (Figure 20A) 57
Les cytokines : IL-1β et IL-18 57
Les constituants de la voie de l'inflammasome 59
b. L'angiogenèse (Figure 20B) 60
c. Rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse et le processus métastatique (Figure 20C) 60
d. Induction d'un environnement immunosuppresseur (Figure 20D) 62
3. Approches thérapeutiques de l'inflammasome 63
a. L'inflammasome comme marqueur pronostic et prédictif en oncologie 63
b. Comment cibler l'inflammasome en thérapeutique anticancéreuse ? 64
Les traitements anticancéreux conventionnels 64
Thérapies ciblant spécifiquement les constituants de l'inflammasome (Figure 21) 66
Inflammasome et microbiote 66
g. Conclusion 67
IV. Place du métabolisme dans la régulation de la réponse immunitaire 69
a. Le métabolisme cellulaire physiologique 69
b. Le métabolisme de la cellule tumorale 70
c. Le métabolisme des cellules immunitaires 72
1. Les lymphocytes T (Figure 23) 73
Les cellules T naïves 73
Activation des LT et reprogrammation métabolique 73
Métabolisme cellulaire et phénotype des LT 75
Les lymphocytes T mémoires 75
Les lymphocytes T régulateurs 76
2. Les cellules dendritiques (Figure 24) 76
3. Les macrophages (Figure 25) 77
d. Effet du métabolisme tumoral sur l'activité des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral (Domblides et al., 2019) 79
1. La production des lactates induit une acidification délétère du milieu (Figure 26) 79
2. Rôle de l'Indoléamine 2,3-Dioxygenase (IDO) et de la Tryptophan Dioxygénase (TDO) dans la déplétion en tryptophane et la production d'intermédiaires toxiques (Figure 27) 82

3. Les mutations d'Isocitrate Déshydrogénase (IDH), responsables de la production d'oncométabolites (Figure 28) 84
4. Les conditions d'hypoxie dans la tumeur ont un effet protumoral et immunosuppresseur (Figure 29) 86
e. Conclusion 88
V. Objectifs de thèse 89
VI. Projet 1 : Rôle pronostic de l'expression épithéliale des constituants de l'inflammasome dans le cancer colorectal 90
a. Prognostic role of inflammasome components in human colorectal cancer (submitted) 91
b. Epithelial innate immune sensor NLRC4 impairs metastatic colorectal cancer (submitted) .. 108
c. Procédé *in vitro* de pronostic d'un cancer associé à l'inflammation, kits et utilisations correspondantes : la signature épithéliale NLRC4/NLRP6/IL-18 dans le cancer colorectal (brevet BV2017-041) 133
VII. Projet 2 : Rôle du métabolisme tumoral dans l'activation des cellules immunitaires 144
a. Human γδ TCR sensing of AMPK-dependent metabolic tumour reprogramming through recognition of EphA2 (submitted) 144
b. Identification de cibles immunométaboliques et caractérisation de leur effet en pathologie cancéreuse 178
Contexte 178
Objectif du projet 179
Méthodes 179
Lignées cellulaires et conditions de culture 179
Purification et expansion de LTγδ 179
Purification des peptides (Figure 31) 180
Résultats et discussion 182
Purification et expansion des LT γδ Vδ2 négatifs 182
Modulation de la réponse immunitaire des LT γδ par les lignées de cancer du colon 182
Modulation de la réponse immunitaire des LT γδ par les lignées de cancer du poumon 184
Effet des peptides purs sur les LT γδ Vδ2 négatifs 188
Effet des peptides purs sur les lymphocytes B 192
Conclusion 193
VIII. Discussion générale 195
IX. Conclusion générale 199
X. Bibliographie 201

Liste des Figures

Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses décrites par Hanahan et Weinberg. 8
Figure 2 : Les 3 phases de la théorie de l'immunoediting. 9
Figure 3 : Le cycle de l'immunité antitumorale. 10
Figure 4 : Points de contrôle immunitaire faisant l'objet d'un ciblage en thérapie anticancéreuse. 13
Figure 5 : Systèmes immunitaires innée et adaptatif. 15
Figure 6 : Structure du complexe du TCR γδ. 16
Figure 7 : Transduction du signal TCR γδ lors de l'activation du lymphocyte T. 17
Figure 8 : Structure des loci des gènes des chaines γ et δ du TCR humain, et recombinaison génique aboutissant au transcrit. 18
Figure 9 : Différenciation des lymphocytes T en LT γδ et LT αβ dans le thymus murin. 20
Figure 10 : Mécanismes de la reconnaissance des cellules tumorales par les LT γδ. 23
Figure 11 : Voies de la synthèse de l'isopentenyl PP. 24
Figure 12 : Immunosurveillance et réparation de l'épithélium intestinal. 28
Figure 13 : Fonctions antitumorales des LT γδ. 30
Figure 14 : Fonctions protumorales des LT γδ. 34
Figure 15 : Schéma des différents constituants de l'inflammasome humain et formation de la plateforme. 42
Figure 16 : Mécanisme d'activation des principaux inflammasomes chez l'Homme. 44
Figure 17 : Signalisation via les TLR : exemple du TLR5 activé par la flagelline extracellulaire. 45
Figure 18: Signalisations induites par l'IL-1β et l'IL-18. 47
Figure 19: Mécanismes de l'effet antitumoral de certains constituants de l'inflammasome, en fonction de leur expression hématopoïétique ou épithéliale. 53
Figure 20: Mécanismes de l'effet protumoral des constituants de l'inflammasome, en fonction de leur expression hématopoïétique ou épithéliale. 58
Figure 21: Ciblage thérapeutique de la cascade de l'inflammasome. 67
Figure 22 : Le métabolisme cellulaire normal. 70
Figure 23: Reprogrammation métabolique conduisant à l'activation et la polarisation des lymphocytes T. 74
Figure 24: Reprogrammation métabolique conduisant à l'activation et la polarisation des cellules dendritiques. 76
Figure 25: Reprogrammation métabolique conduisant à l'activation et la polarisation des macrophages. 78
Figure 26 : Mécanismes de la production de lactates par les cellules tumorales, et effets sur le système immunitaire. 80
Figure 27 : Métabolisme du tryptophane dans les cellules tumorales, et effets sur le système immunitaire. 82
Figure 28 : Effets des mutations d'IDH1. 85
Figure 29 : Conséquences de l'hypoxie tissulaire, et effets sur le système immunitaire. 87
Figure 30 : La reprogrammation métabolique des cellules de cancer du poumon favorise le relargage de molécules solubles immunomodulatrices sur les LT γδ. 179
Figure 31 : Méthodologie d'isolement des peptides. 180
Figure 32 : Pureté des LT γδ obtenus après tri négatif à partir de PBMC d'un donneur sain. 182
Figure 33 : Profils de séparation en chromatographie d'exclusion pour les surnageants des cellules HT29 cultivées en milieu glucose (A), galactose (B) et AICAR (C). 183
Figure 34 : Profils d'activation obtenus sur les LT γδ Vδ2 négatifs après culture avec les différentes fractions issues de la chromatographie d'exclusion pour les surnageants glucose (A), galactose (B) et AICAR (C). 183
Figure 35 : Profils de séparation en chromatographie d'exclusion pour les surnageants des cellules SKMES cultivées en milieu glucose (A), galactose (B) et AICAR (C). 184

Figure 36 : Profils d'activation obtenus sur les LT γδ Vδ2 négatifs après culture avec les différentes fractions issues de la chromatographie d'exclusion pour les conditions glucose (A), galactose (B) et AICAR (C). 185
Figure 37 : Profils de séparation en chromatographie d'exclusion pour les échantillons de fractions issus des surnageants RPMI 1 (A) et RPMI 2 (B), galactose 3 (B) et AICAR 4 (C). 186
Figure 38 : Profils d'activation obtenus sur les LT γδ Vδ2 négatifs avec les différents groupes de fractions issus de la des milieux glucose (A et B), galactose (C) et AICAR (D). 187
Figure 39 : Profils d'activation des LT γδ Vδ2 négatifs non expandus exposés à des doses croissantes des 5 peptides identifiés. 188
Figure 40 : Profils d'activation des LT γδ expandus en milieu IL-15 provenant d'un donneur sain, exposés à des doses croissantes des 5 peptides identifiés. 189
Figure 41 : Profils d'activation des LT γδ expandus en milieu IL-2/IL-15 provenant de patients greffés rénaux infectés par le CMV, exposés à des doses croissantes de 4 peptides identifiés. 190
Figure 42 : Profils d'activation des LT γδ provenant de patients infectés par le CMV expandus en milieu IL-2/IL-15, exposés à des doses croissantes des 5 peptides identifiés. 191
Figure 43 : Effet du peptide 26 sur la fonction des lymphocytes B et des Tfh. 193
Figure 44 : Le métabolisme, un acteur central de l'immunité antitumorale. 199

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Principales études cliniques ayant utilisé la stimulation ex vivo des LT γδ autologues en thérapie anticancéreuse 36
Tableau 2 : Principales études cliniques ayant utilisé la stimulation in vivo des LT γδ autologues en thérapie anticancéreuse 37
Tableau 3 : Principaux PAMP et DAMP identifiés pour les différents constituants de l'inflammasome. 43

I. Place de l'immunité dans l'histoire naturelle du cancer

a. Le concept d'immunoediting résume les interactions complexes entre tumeur et système immunitaire

L'immuno-oncologie présente un essor important avec l'avènement de thérapies anticancéreuses dont le rôle n'est pas, contrairement aux chimiothérapies, de cibler directement les cellules tumorales, mais plutôt d'activer les cellules du système immunitaire afin de leur réapprendre à détruire les cellules cancéreuses. Malgré un développement important depuis seulement une dizaine d'années, le rôle du système immunitaire dans la tumorigénèse est étudié depuis longtemps. Ainsi, les premières constatations remontent à la fin du XIX^{ème} siècle, suite aux observations de William B. Coley. Il s'agissait d'un chirurgien qui exerçait à New-York. Après avoir perdu une jeune patiente d'un sarcome du bras qui avait métastasé peu de temps après la chirurgie, il entreprit un travail d'analyse rétrospective des dossiers de sarcome dans son établissement. Il remarqua une corrélation entre infection post-opératoire à *Streptococcus* et évolution favorable des sarcomes osseux, avec en particulier le dossier d'un patient toujours en vie à 7 ans d'un sarcome cervical compliqué d'un érysipèle. Il établit donc un protocole de recherche clinique consistant à injecter un lysat bactérien de *Streptococcus pyogenes* et *Serratia marcescens* en intratumoral. Le premier patient fut traité en 1896, permettant une régression d'un sarcome et une rémission clinique pendant 8 ans, avant une rechute conduisant au décès du patient (Wiemann and Starnes, 1994). D'autres arguments plus récents sont ensuite venus étayer la théorie de W. B. Coley. Tout d'abord, il a été noté une augmentation de l'incidence des cancers dans les populations de patients immunodéprimés, comme les patients greffés traités par immunosuppresseurs (Hollenbeak et al., 2005) ou ceux vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Shiels et al., 2009). De plus, les personnes atteintes de maladies génétiques associées à un dysfonctionnement de certaines cellules de l'immunité innée telles que les NK ont plus de risque de développer un cancer (Kobayashi, 1985). Il existe également des arguments issus de modèles précliniques. Ainsi, il a été observé une plus grande incidence des tumeurs chez les souris immunodéficientes, qu'elles soient privées de lymphocytes T (LT), lymphocytes natural killer (NK) ou incapables de produire de l'interféron gamma (IFNγ). De plus, des modèles de souris Rag déficientes (incapables de réaliser les réarrangements permettant l'expression d'un récepteur de surface et donc n'ayant pas de LT ou de lymphocytes B (LB)) exposées à des carcinogènes développent plus de tumeurs sarcomateuses que les souris non déficientes.

L'ensemble de ces éléments permettent d'introduire le concept d'immunosurveillance, proposé dans les années 60 par Ehrlich, Burnet et Thomas. Selon cette théorie, les cellules immunitaires d'un organisme surveillent en permanence l'hôte et le protègent de l'émergence d'un cancer. Lorsque le système immunitaire est défaillant, pour une raison innée ou acquise, celui-ci ne peut plus surveiller et éliminer les cellules anormales, expliquant la précocité, le nombre et/ou l'agressivité des tumeurs.

Malgré toutes ces observations, Hanahan et Weinberg ne font pas du tout mention de l'impact du système immunitaire dans la tumorigénèse lors de la parution de leurs « hallmarks » du cancer en 2000 (Figure 1A). Ces « hallmarks » correspondent aux éléments fondamentaux qui caractérisent le phénotype d'une cellule tumorale, et leur première version ne prend en compte que la cellule tumorale. Ce n'est qu'en 2010 qu'apparaissent les concepts d'échappement tumoral à la réponse immunitaire et d'inflammation favorisant le cancer, en introduisant la notion d'interaction avec l'hôte et son microenvironnement (Hanahan and Weinberg, 2011) (Figure 1B). Cette actualisation est due à l'évolution du concept d'immunosurveillance. En effet, les interactions entre le système immunitaire et les cellules cancéreuses sont plus complexes, car bidirectionnelles. Ainsi, le système immunitaire peut

avoir un rôle protumoral en sélectionnant les cellules résistantes du fait d'une pression de sélection constante. Le concept d'immunosurveillance a donc laissé place à celui de l'immunoediting, proposé par Robert Schreiber (Schreiber et al., 2011).

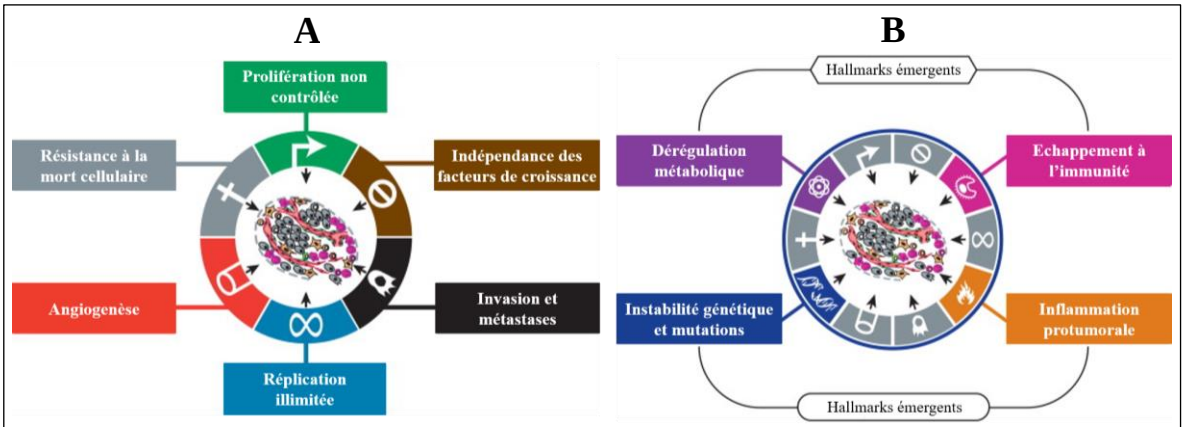


Figure 1 : Caractéristiques des cellules cancéreuses décrites par Hanahan et Weinberg.
A : Altérations de la physiologie cellulaire présentées par les cellules cancéreuses, telles qu'elles avaient été initialement décrites en 2000. Il existe alors 6 modifications majeures expliquant le phénotype tumoral.
B : Actualisation des caractéristiques de la cellule cancéreuse faite en 2011 à la lumière de l'avancement des connaissances scientifiques du cancer. Quatre nouvelles altérations ont été ajoutées, relatant pour certaines des interactions entre la tumeur et le microenvironnement. *D'après Hanahan et Weinberg. Cell 2001 et Hanahan et Weinberg. Cell 2011.*

L'immunoediting se déroule selon 3 phases (Figure 2). La première phase (Figure 2A) correspond à l'immunosurveillance et est une étape d'élimination, pendant laquelle le système immunitaire va être capable de reconnaitre les cellules tumorales et de les éliminer. Cette phase prend place pendant toute la vie de l'individu, puisque l'organisme génère de manière continue des clones cellulaires tumoraux qui doivent être éliminés de manière efficace. Elle met en jeu différents acteurs du système immunitaire, principalement de l'immunité innée, que sont les cellules natural killer NK et les LT exprimant un TCR gamma delta (LT γδ), les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules T natural killer NKT. Elle est suivie par une seconde phase, dite d'équilibre (Figure 2B). Cette phase est liée à la sélection de clones tumoraux partiellement résistants à l'immunité, qui ne seront donc pas éliminés mais simplement maintenus à l'état pauci-cellulaire et infra-clinique. Les acteurs immunitaires impliqués dans cette phase sont différents, et plutôt en lien avec l'immunité adaptative, tels que les LT $CD4^+$ ou $CD8^+$. En effet, leur déplétion dans des modèles murins de carcinogénèse induite montre que leur absence permet un développement plus rapide des tumeurs, alors que l'absence de cellules NK n'a pas d'impact (Koebel et al., 2007). Il s'agit d'une phase d'équilibre dynamique avec interactions constantes entre les 2 protagonistes, réalisant une sélection de cellules tumorales de plus en plus résistantes à la réponse immunitaire antitumorale. Elle peut durer plusieurs années et va parfois être suivie par une dernière phase, dite d'échappement immunitaire (Figure 2C). La pression du système immunitaire sur les clones tumoraux a conduit à la sélection de clones non immunogènes résistants à la destruction par les cellules immunitaires (immunosélection) et/ou capables d'induire une tolérance immunitaire (immunosubversion). Ces cellules vont alors pouvoir proliférer et évoluer en une tumeur qui deviendra cliniquement symptomatique. Les cellules tumorales vont être sélectionnées et échapper à la réponse immunitaire antitumorale, soit par l'absence d'expression ou la modification des antigènes de surface (mutations des antigènes tumoraux, perte d'expression des molécules du CMH de classe I), soit l'insensibilité à l'IFNγ qui induit normalement la mort cellulaire programmée, soit la perte de l'expression de molécules coactivatrices des cellules immunitaires, soit la surexpression de molécules coinhibitrices. D'un autre côté, l'immunosubversion est associée à une modification du phénotype des

cellules immunitaires pour un phénotype plutôt protumoral par la production de cytokines immunosuppressives puissantes telles que l'IL-6 ou le TGFβ.

Le concept d'immunoediting a pu être observé dans des modèles précliniques. Ainsi, les tumeurs issues de modèles murins $Rag^{-/-}$ greffées à des souris immunocompétentes étaient incapables de se développer. A l'inverse, les tumeurs issues de souris immunocompétentes pouvaient proliférer dans des modèles immunodéficients (Kim et al., 2007b; Teng et al., 2008). Il existe ainsi une sélection dans les souris immunocompétentes des clones les plus résistants à l'immunité antitumorale, alors que l'absence de cellules immunitaires laisse la place libre à l'ensemble des clones tumoraux plus immunogènes chez les souris immunodéficientes (Bui and Schreiber, 2007). Ces clones immunogènes peuvent donc plus facilement être éliminés par le système immunitaire des souris immunocompétentes.

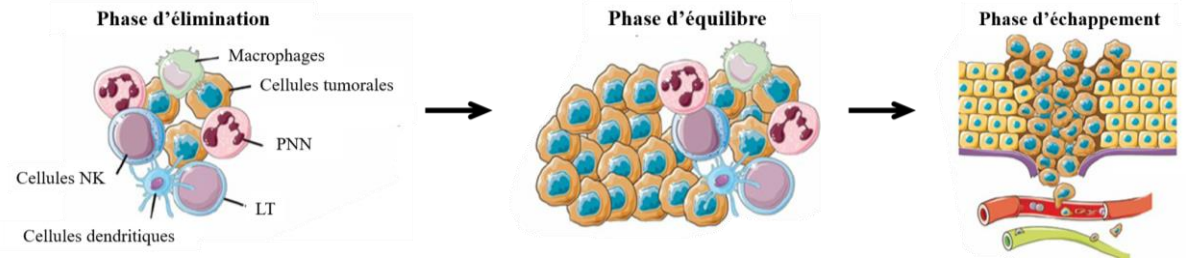


Figure 2 : Les 3 phases de la théorie de l'immunoediting.
L'immunoediting se déroule selon 3 phases. **(A)** La première phase correspond à l'immunosurveillance et est une étape d'élimination. **(B)** Elle est suivie par une seconde phase d'équilibre liée à la sélection de clones tumoraux de plus en plus résistants à la réponse immunitaire antitumorale. Elle peut durer plusieurs années. **(C)** Elle va parfois être suivie par une dernière phase d'échappement immunitaire conduisant à l'installation d'un cancer cliniquement perceptible. *D'après Schreiber et al. Science. 2011.*

b. La réponse immunitaire antitumorale efficace : un mécanisme finement régulé

La réponse immunitaire antitumorale a été récemment résumée dans le cycle de Chen et Mellmann (Chen and Mellman, 2013) (Figure 3). Ce cycle regroupe plusieurs étapes finement régulées pour permettre une réponse immunitaire optimale. Ainsi, lors de la mort de la cellule tumorale induite par les LT (étape 1), celle-ci va relarguer dans le microenvironnement des antigènes tumoraux (néoantigènes) qui vont être récupérés par les cellules présentatrices d'antigènes, notamment les cellules dendritiques (CD) (étape 2). Ces cellules vont alors migrer dans le ganglion de drainage le plus proche où elles vont complexer l'antigène à une molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) afin de pouvoir le présenter aux cellules lymphoïdes : CMH de classe I pour les LT $CD8^+$ et CMH de classe II pour les LT $CD4^+$ (étape 3). Dans le ganglion, le LT dont le TCR est spécifique de l'antigène va reconnaitre l'antigène et s'activer. C'est l'étape la plus critique qui va déterminer le type de réponse immunitaire (antitumorale ou protumorale) en agissant sur la balance entre LT effecteurs et LT régulateurs. Le LT va alors pouvoir migrer via la circulation sanguine (étape 4) jusqu'à la tumeur sous l'action de cytokines chémoattractantes (les chémokines). Il va traverser la paroi des vaisseaux en migrant par diapédèse (étape 5) avant de se rendre au contact des cellules tumorales où il va reconnaitre spécifiquement les cellules tumorales par son TCR (étape 6). Une fois la synapse immunologique formée, le LT activé va alors détruire la cellule tumorale par différents mécanismes : la libération de granules cytotoxiques (perforine, granzyme B) ou l'activation de la voie Fas/Fas-ligand ou de la voie Trail/Trail-R.

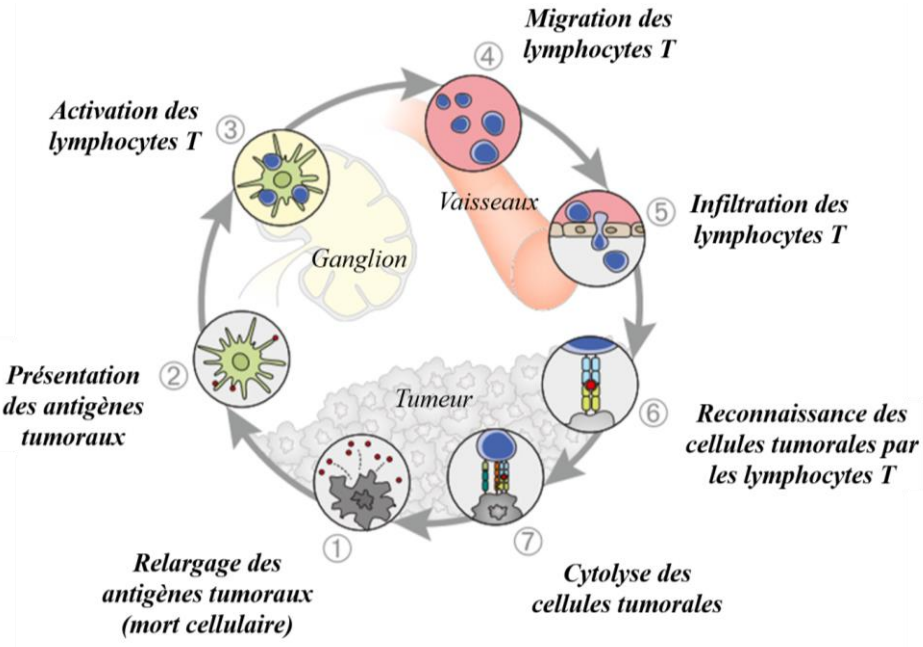


Figure 3 : Le cycle de l'immunité antitumorale.
Le cycle de l'immunité est un processus finement régulé permettant la reconnaissance et la destruction des cellules tumorales. Ce cycle est divisé en 7 étapes majeures. Ainsi, il débute par le relargage des antigènes tumoraux suite à la lyse cellulaire (1) et se termine par la reconnaissance (6) et la lyse des cellules tumorales par le LT (7). *D'après Mellman et al. Immunity 2013.*

Chez les patients atteints d'un cancer, ce cycle n'est pas efficace, conduisant à un phénomène de tolérance du cancer une fois installé. Ceci est lié au fait qu'à chaque étape du cycle peut intervenir un mécanisme de résistance propre (Teng et al., 2015) : état tolérogène des CD incapables de présenter l'antigène ou privilégiant le phénotype régulateur des LT, défaut de migration des LT au site tumoral (tumeurs dites « froides »), défaut d'accès de la tumeur par les LT (exclusion immunitaire), ou inhibition des LT au sein de la tumeur par des facteurs cellulaires et/ou humoraux du microenvironnement tumoral (tumeurs dites « chaudes »). L'effet sur la tumorigénèse de l'infiltrat immunitaire correspond à une balance entre phénotypes protumoraux et phénotypes antitumoraux. En effet, les cellules immunitaires sont plastiques. Ainsi, sous l'influence de facteurs immunosuppresseurs cellulaires ou solubles contenus dans le microenvironnement tumoral, les cellules immunitaires peuvent entrer en anergie ou se reprogrammer vers un phénotype protumoral.

c. Les différents types d'immunothérapies

L'immunothérapie antitumorale est un traitement qui vise à stimuler les défenses immunitaires et à leur réapprendre à reconnaitre et détruire les cellules cancéreuses. Elle ne s'attaque pas directement à la cellule tumorale, et permet un retour à l'étape d'équilibre de l'immunoediting. Plusieurs approches d'immunothérapies ont été développées au cours du temps. On peut distinguer 2 types d'immunothérapies : l'immunothérapie passive qui n'induit pas de mémoire immunologique, et l'immunothérapie active qui induit une mémoire immunologique.

L'immunothérapie passive : injection de cytokines, cytotoxicité médiée par les anticorps et transfert adoptif de lymphocytes T

La plus ancienne stratégie d'immunothérapie consiste à stimuler la réponse immunitaire par des molécules solubles, les cytokines. Les cytokines sont synthétisées par les cellules immunitaires avec pour but d'induire des signaux de prolifération, de survie et d'activation de manière autocrine et paracrine. Certaines cytokines peuvent *a contrario* avoir un effet inhibiteur. Les principales cytokines utilisées sont l'interleukine-2 (IL-2), utilisée dans le cancer du rein, et l'interféron alpha dans certaines hémopathies et les mélanomes. L'interféron, contrairement à l'IL-2, permet d'activer le système immunitaire mais a également un effet antitumoral en bloquant directement la prolifération cellulaire. Néanmoins, la toxicité importante de ces molécules rend leur utilisation compliquée en pratique clinique, puisqu'elles induisent des syndromes de relargage cytokinique pouvant être létaux, ou des syndromes pseudo-grippaux mal tolérés.

L'ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) correspond à une cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps. Ainsi, les anticorps vont bloquer une voie de signalisation majeure de la cellule en amont du récepteur qu'ils ciblent. Ils vont également, par l'intermédiaire de leur fragment Fc, attirer et activer des cellules effectrices du système immunitaire, telles que les macrophages, les cellules NK ou les lymphocytes T gamma delta qui expriment le récepteur au fragment Fc (FcR). Ceci induit la phagocytose et/ou leur activité cytotoxique. Les anticorps peuvent également être conjugués à des molécules de chimiothérapie et jouer un rôle de vecteur pour amener le composé cytotoxique dans la cellule tumorale lors de l'internalisation du complexe anticorps/récepteur, afin d'en limiter les effets secondaires. C'est le cas par exemple du TDM-1 dans le cancer du sein (anticorps ciblant Her2 couplé à l'emtansine), ou au Rova-T (anticorps ciblant DLL3 lié à la tesirine) dans le cancer du poumon.

Les anticorps peuvent également être modifiés pour être des assemblages permettant de cibler différentes cellules et de les rapprocher dans le cadre d'une synapse immunologique artificielle. Ce sont les BiTE (Bi-specific T-cell Engager), ou anticorps bispécifiques, qui vont rapprocher les cellules ciblées avec des cellules immunitaires qui n'ont pas besoin d'exprimer le FcR, dont les lymphocytes T cytotoxiques. C'est ainsi que le Blinatumomab cible le CD3 à la surface des lymphocytes T et le CD19 des lymphocytes B, lui permettant d'avoir obtenu une autorisation de commercialisation en Amérique du Nord dans les leucémies aigues lymphoblastiques B en rechute.

Certaines immunothérapies correspondent à des lymphocytes T récupérés d'un patient et modifiés. Cette stratégie a été développée en 2002 et correspond au transfert adoptif de LT. Les lymphocytes T autologues sont prélevés, modifiés grâce à des vecteurs viraux pour exprimer un TCR chimérique qui reconnait les cellules tumorales du même patient et expandus *ex vivo* avant réinjection. Elles vont alors détruire les cellules tumorales. Ce sont les CAR (Chimeric Antigen Receptor) T-cells. Elles sont très efficaces dans les hémopathies malignes, moins dans les tumeurs solides. Néanmoins, ici encore, les effets secondaires à l'injection (syndromes pseudo-grippaux sévères, syndrome de fuite capillaire, choc hypovolémiques…) rendent leur utilisation complexe à mettre en œuvre.

L'immunothérapie active : vaccinothérapie et virus oncolytiques

La vaccinothérapie est une autre forme d'immunothérapie, dont l'objectif va être l'expansion *in vivo* de lymphocytes T spécifiques d'un antigène tumoral, mais également de produire une mémoire immunitaire et une réponse à long terme. Il peut également s'agir de cibler des antigènes de différenciation (Melan A, PSA), des antigènes du groupe *cancer testis* (MAGE, NY-ESO1), des

antigènes mutés (β-caténine, Ras), des antigènes surexprimés (Her2/neu, ACE), des antigènes viraux (EBV, hépatites…). Plusieurs vaccins thérapeutiques existent à ce jour mais seuls quelques-uns ont une application réelle en routine. On peut citer comme exemple le BCG dans le cancer de la vessie, le sipuleucel-T qui cible l'antigène phosphatase acide prostatique dans le cancer de prostate (Provenge®), le GSK1572932A qui cible MAGE-A3 dans le cancer du poumon, la vaccination ciblant gp100 dans le mélanome. Les adjuvants au vaccin ont un rôle important, notamment lorsqu'il s'agit de GM-CSF.

Les virus oncolytiques utilisent des virus génétiquement modifiés pour détruire spécifiquement les cellules tumorales après infection. La réplication virale intratumorale induit la mort des cellules tumorales, favorisant le relargage de son contenu cytoplasmique et l'activation de la réponse immunitaire. Le plus avancé correspond au T-VEC (Talimogène Laherparepvec) dans le mélanome. Il s'agit d'un herpes virus HSV-1 atténué et modifié qui, en se répliquant, va faire produire du GM-CSF stimulant la réponse immunitaire. D'autres virus peuvent être utilisés, tels que les coxsackies, les réovirus et les adénovirus.

Néanmoins, l'ensemble de ces stratégies d'immunothérapies n'a pas permis d'obtenir des taux de réponse suffisants pour leur permettre une application large en routine. De plus, les effets secondaires de ces traitements sont potentiellement très sévères et parfois mortels, déséquilibrant le rapport bénéfice/risque et ne les faisant pas privilégier chez les patients atteints d'un cancer. En revanche, d'autres stratégies thérapeutiques ont eu un développement plus spectaculaire avec des applications importantes en clinique.

d. Le ciblage de la réponse immunitaire antitumorale en 2019

La compréhension de la place de l'immunité dans la réponse antitumorale a permis le développement de traitements visant à réactiver cette immunité. Ce sont ces traitements qui ont connu un développement plus important que les précédentes immunothérapies décrites. En effet, ces traitements ont montré en clinique leur efficacité dans le traitement de plusieurs types tumoraux différents et ont obtenu il y a quelques années maintenant des autorisations d'utilisation en routine dans des indications de plus en plus larges. Ces traitements sont des inhibiteurs des points de contrôles du système immunitaires (Inhibiteurs de Checkpoints Immunitaires ou ICI). Il existe actuellement 2 cibles principales pour lesquelles des thérapeutiques spécifiques existent et sont validées en oncologie. La première, appelée CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein-4), intervient dans la phase de présentation de l'antigène dans les organes lymphoïdes. La seconde est impliquée plus tardivement dans le cycle de l'immunité, dans la phase de reconnaissance et de destruction de la tumeur, et correspond à l'axe PD-1/PD-L1 (Programmed cell Death-1/Programmed Death-Ligand-1) (Figure 4) (Ribas, 2012). Il s'agit de molécules coinhibitrices exprimées par les cellules immunitaires afin de permettre un rétrocontrôle négatif et une régulation de l'activation des lymphocytes en condition physiologique. Ainsi, après activation, les LT vont être inhibés par activation de ces récepteurs, afin d'éviter une activation prolongée pouvant être à l'origine de dégâts cellulaires et tissulaires importants. Dans le cancer, ce mécanisme d'inhibition est détourné par la cellule tumorale qui va donc surexprimer les ligands de ces récepteurs pour inhiber de manière continue les cellules lymphoïdes et induire un état d'anergie dans lequel les cellules immunitaires ne sont plus capables de s'activer. Les anticorps qui ont été développés ont donc pour objectif de lever l'inhibition du système immunitaire en bloquant l'interaction entre le ligand tumoral et le récepteur à la surface des cellules immunitaires (Figure 4).

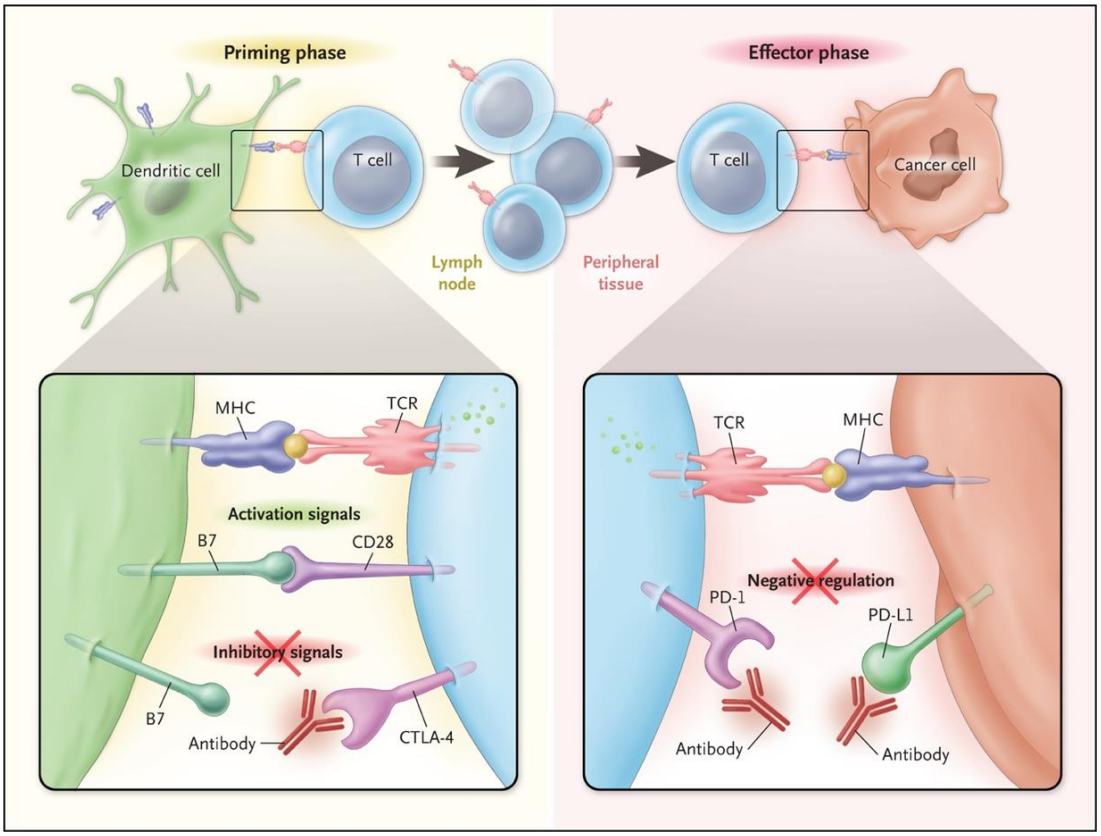


Figure 4 : Points de contrôle immunitaire faisant l'objet d'un ciblage en thérapie anticancéreuse.
Gauche : La phase d'initiation de la réponse immunitaire débute par la présentation de l'antigène associé au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Ce complexe va être reconnu par le TCR du lymphocyte T (LT). Ce signal nécessite, pour induire l'activation complète du LT, un second signal médié par les récepteurs coactivateurs de la famille B7, reconnus par le CD28 à la surface du LT. Afin d'éviter une activation non contrôlée, il existe une surexpression du récepteur inhibiteur CTLA-4 qui reconnait aussi les molécules de la famille B7. Les anti-CTLA-4 vont bloquer l'interaction entre CTLA-4 et B7, permettant une levée de l'inhibition du LT au niveau de cette première phase.
Droite : Le LT activé va reconnaitre la cellule cancéreuse par interaction entre son TCR et l'antigène présenté par le CMH. Le LT exprime un autre récepteur coinhibiteur, PD-1. La cellule tumorale va surexprimer le ligand, PD-L1, pour induire l'inhibition du LT et échapper à la cytolyse. Les anti-PD-1 /anti-PD-L1 sont des antagonistes qui bloquent l'interaction entre PD-1 et PD-L1 et lever cette inhibition, permettant de rétablir la cytolyse tumorale.
D'après Ribas et al. N Engl J Med 2012.

L'objectif de ces immunothérapies n'est donc pas d'éradiquer complètement la tumeur, mais de revenir, dans le concept de l'immunoediting, à un état d'équilibre dans lequel les cellules tumorales sont contrôlées pendant une durée plus ou moins prolongée, en l'absence de symptômes cliniques. Il s'agit donc de rétablir la balance phénotypique des cellules immunitaires en favorisant le phénotype antitumoral. Les taux de réponse obtenus avec ces molécules sont compris entre 10% et 40%, avec certains patients présentant des maladies stabilisées sur de longues périodes.

Néanmoins, ces traitements ont plusieurs problématiques à ce jour non résolues. Tout d'abord, elles sont associées à des toxicités rares mais parfois sévères, du fait de l'apparition de phénomènes auto-immuns, qui ne sont pas prévisibles. Tous les organes de l'individu peuvent être touchés. Ces toxicités peuvent ainsi être létales, et souvent elles n'autorisent pas la réadministration du traitement au patient. Une autre problématique correspond à l'absence de biomarqueurs prédictifs de réponse à ces traitements. Ainsi, seule la surexpression de PD-L1 en immunohistochimie est validée, pour certaines molécules seulement, et la détermination des patients susceptibles de répondre ou de ne pas répondre n'est pas optimale. Cela revient donc actuellement à exposer beaucoup de patients à ces molécules avec

un risque de toxicités sévères et invalidantes, mais aussi un risque d'hyperprogression ou d'échec thérapeutique. Enfin, tous les types tumoraux ne sont pas sensibles à ces molécules. C'est notamment le cas du cancer du côlon. En effet, seuls les cancers présentant une instabilité microsatellitaire (dits MSI pour MicroSatellite Instability) semblent en bénéficier, en raison d'une charge mutationnelle plus élevée qui génère des néoantigènes tumoraux probablement essentiels à l'activité antitumorale des lymphocytes T (Passardi et al., 2017). A l'inverse, les taux de réponse chez les patients ne présentant pas cette anomalie (dits MSS pour MicroSatellite Stable) sont faibles, et d'autres cibles thérapeutiques doivent être trouvées afin d'améliorer la survie de ce groupe.

Il existe donc un besoin crucial d'identifier de nouveaux biomarqueurs prédictifs de réponse à ces molécules pour augmenter les taux de réponse à ces traitements. Mais il est également essentiel de détecter de nouvelles cibles immunologiques afin d'élargir l'immunothérapie à d'autres types tumoraux qui ne sont pas sensibles aux traitements actuels.

e. Les lymphocytes T : acteurs primordiaux de la réponse immunitaire antitumorale

Même si certaines immunothérapies ciblent les cellules myéloïdes, les LT tissulaires représentent une cible privilégiée pour ces traitements. En effet, les tumeurs sont pour la plupart massivement infiltrées par les cellules lymphoïdes. Cet infiltrat est corrélé au pronostic des patients atteints de tumeurs, puisqu'associé à un bon pronostic pour les LT $CD4^+$ et les $CD8^+$, les LT mémoires, mais plutôt un mauvais pronostic pour les LT régulateurs (Treg) $FoxP3^+$ (Geng et al., 2015). Cet infiltrat immunitaire semble également pouvoir, dans certains cas, être corrélé aux réponses observées sous ICI. C'est ainsi le cas pour l'infiltration en cellules myéloïdes (macrophages et cellules dendritiques) et en LT de type Th1 dans le cancer du poumon (Herbst et al., 2014).

La population de LT regroupe un nombre important de sous-populations, qui ont des rôles différents. Les LT se séparent ainsi en 2 populations principales en fonction de leur T cell receptor (TCR) : les LT αβ, majoritaires, et les LT γδ, plus minoritaires. Les LT αβ ont été largement étudiés et sont considérés comme les LT «conventionnels» car ils reconnaissent un peptide complexé au CMH. Ils sont constitués de LT exprimant les récepteurs CD4 ou CD8. Les LT $CD4^+$ dits « helper » reconnaissent le CMH de classe II et sont capables de sécréter différents types de cytokines, qui ont des fonctions complémentaires ou contraires. Les LT $CD8^+$ sont dits « tueurs », reconnaissent le CMH de classe I et, une fois activés, ont une activité cytotoxique. Ces LT quittent le thymus à la naissance en étant déjà des cellules matures naïves, et ils vont se différencier en périphérie, en fonction des signaux cellulaires et solubles reçus par la cellule.

En revanche, les LT γδ représentent un sous-type plus rare mais néanmoins important de cellules immunitaires infiltrant les tissus, puisqu'ils jouent un rôle crucial dans l'immunosurveillance tissulaire. Ce sont des lymphocytes non conventionnels qui ont des caractéristiques partagées avec les cellules de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. Elles sont très conservées au cours de l'évolution et entre les espèces, présentes dans les vertébrés les plus primitifs. La littérature oppose souvent les systèmes immunitaires inné et adaptatif, comme 2 entités bien distinctes avec une immunité discontinue. En réalité, l'immunité est un continuum et les LT γδ permettent de faire le lien, au même titre que les NKT,

entre ces 2 systèmes et de créer une cohérence dans la réponse immunitaire, avec des fonctions non redondantes (Figure 5).

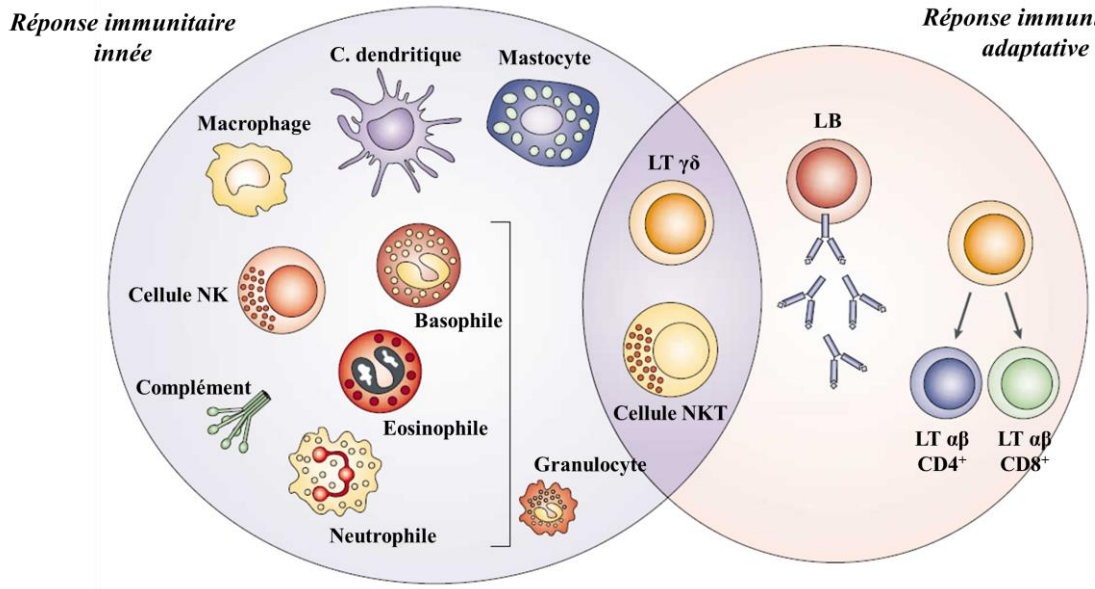


Figure 5 : Systèmes immunitaires innée et adaptatif.
Le système immunitaire inné correspond à la première ligne de défense, avec une réponse rapide en cas d'agression. Elle permet d'induire dans un second temps une réponse adaptative, plus longue à se mettre en place car elle nécessite une phase préalable de sélection, d'activation et de prolifération des cellules lymphoïdes. Les LT γδ et les cellules NKT sont à la frontière entre ces 2 systèmes, et présentent des caractéristiques communes à la réponse innée et la réponse adaptative. *D'après Dranoff et al. Nat Rev Canc 2004.*

L'analyse transcriptomique de plusieurs lignées cellulaires a ainsi montré que leur signature moléculaire était une combinaison de celle des cellules NK et des LT αβ (Pont et al., 2012). Ils jouent un rôle prépondérant dans la surveillance tissulaire et la défense contre les agressions infectieuses, physiques, chimiques ou tumorales et constituent probablement des cellules primordiales qui interviennent dès les prémices de la carcinogénèse (Adams et al., 2015; Silva-Santos et al., 2015). C'est pourquoi il semblerait que ces cellules puissent constituer une cible importante dans le développement de nouvelles stratégies d'immunothérapie anticancéreuse.

II. Les lymphocytes T γδ, un sous-type rare mais fondamental dans la réponse immunitaire

Ils ont été découverts en 2 temps dans les années 1980. Tout d'abord, une équipe américaine a mis en évidence un 3ème gène codant pour une chaine polypeptidique dont la structure était similaire à celle des chaines du TCR αβ, et correspondant au gène de la chaine γ présent dans un LT hybride γ/αβ (Saito et al., 1984). Quelques années plus tard, la chaine δ a été découverte dans le locus de la chaine α, présentant un réarrangement très précoce dans le développement thymique (Chien et al., 1987). Même si ces cellules sont connues depuis plus de 30 ans maintenant, les LT γδ ont été moins étudiés que les autres populations immunitaires, en partie du fait de leur faible représentation dans le sang, les rendant difficiles à isoler.

a. Caractéristiques du récepteur à l'antigène des LT γδ

1. Structure du TCR γδ

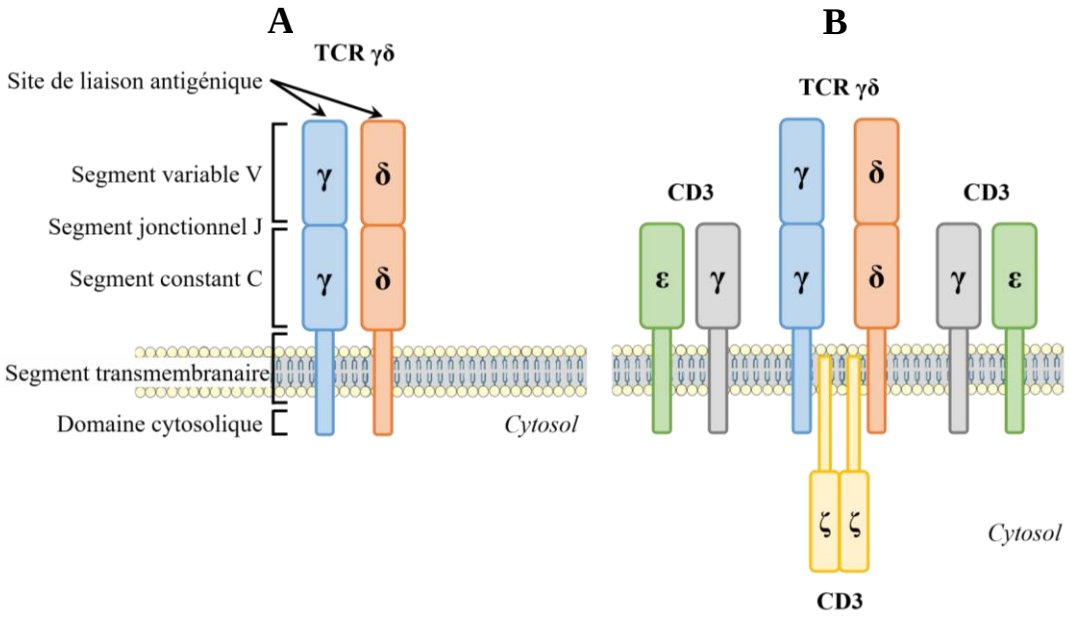


Figure 6 : Structure du complexe du TCR γδ.
A : Le TCR γδ est formé d'une chaine γ et d'une chaine δ. Chaque chaine est constituée d'un segment variable qui porte le site de liaison antigénique, un segment jonctionnel qui fait la liaison avec le segment constant. Le site de liaison antigénique est porteur de domaines hypervariable CDR1, CDR2 et CDR3.
B : Chaque chaine du TCR γδ est associée à un hétérodimère CD3 γε. Les dimères CD3 sont porteurs, dans leur partie intracellulaire, de domaines ITAM qui permettent la transduction du signal d'activation aux éléments cytosoliques.

Le TCR a été totalement identifié dans les années 2000 (Allison et al., 2001). C'est un récepteur hétérodimérique qui est constitué de 2 chaines polypeptidiques, une chaine γ et une chaine δ, dont chacune est un membre de la superfamille des immunoglobulines (Ig). Chaque chaine est ainsi constituée d'un domaine extracellulaire variable V en N-terminal de liaison à l'antigène, un domaine jonctionnel J, un domaine constant C, un domaine transmembranaire et un court domaine intracellulaire (Figure 6A). Chaque chaine est associée à un CD3, et la liaison du TCR à son antigène induit un changement de conformation du CD3 permettant la transduction du signal (Figure 6B). Les CD3 sont des complexes protéiques membranaires constitués de 4 chaines différentes (γ, δ, ε et ζ) associées en hétérodimères et en homodimères. Les 3 premières chaines sont des protéines transmembranaires appartenant à la superfamille des Ig, qui ne portent qu'un seul domaine Ig extracellulaire. Leur domaine intracellulaire contient un unique motif d'activation des récepteurs immuns basé sur la tyrosine ou ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif), qui est nécessaire pour la signalisation du TCR. En revanche, CD3 ζ possède un domaine extracellulaire plus court et 3 motifs ITAM intracellulaires.

Le TCR αβ est associé à des hétérodimères CD3γε ou CD3δε et un dimère CD3ζζ. La liaison du TCR à son antigène induit un changement de conformation du complexe CD3 permettant la transduction du signal intracellulaire. Pour le TCR γδ, les choses sont un peu différentes. En effet, les domaines C du TCR ont une structure différente et ne nécessitent pas forcément de s'associer au complexe CD3. Ce TCR est formé par les mêmes dimères CD3, mais la plupart ne contient que des dimères CD3γε, du fait d'un manque de CD3δ (Hayes and Love, 2002). On retrouve également un autre membre de la famille du CD3ζ : le FcRγ, correspondant à la chaine commune aux récepteurs au fragment constant des IgG et IgE (Park et al., 1995). Le FcRγ peut s'associer en homodimère ou en hétérodimère à la chaine CD3ζ

(Orloff et al., 1990). La liaison du TCR γδ avec l'antigène n'induit pas de changement de conformation du CD3 mais permet quand même l'activation du LT γδ. Ainsi, il y a phosphorylation des domaines ITAM, ce qui permet le recrutement de ZAP70 (Zeta Associated Protein 70), une phosphotyrosine kinase intracellulaire essentielle pour l'activation de la signalisation d'aval (Figure 7). ZAP70 va alors permettre la phosphorylation de SLP-76 et de LAT permettant l'activation de plusieurs voies intracellulaires : PKC pour NF-κB, Grb2 pour la voie des MAPK, et PLCγ pour la signalisation calcique (Smith-Garvin et al., 2009).Cette activation est supérieure à celle du TCR αβ, avec une activation plus forte de la voie des MAPK, une mobilisation calcique plus importante et une prolifération cellulaire plus soutenue (Hayes and Love, 2002).

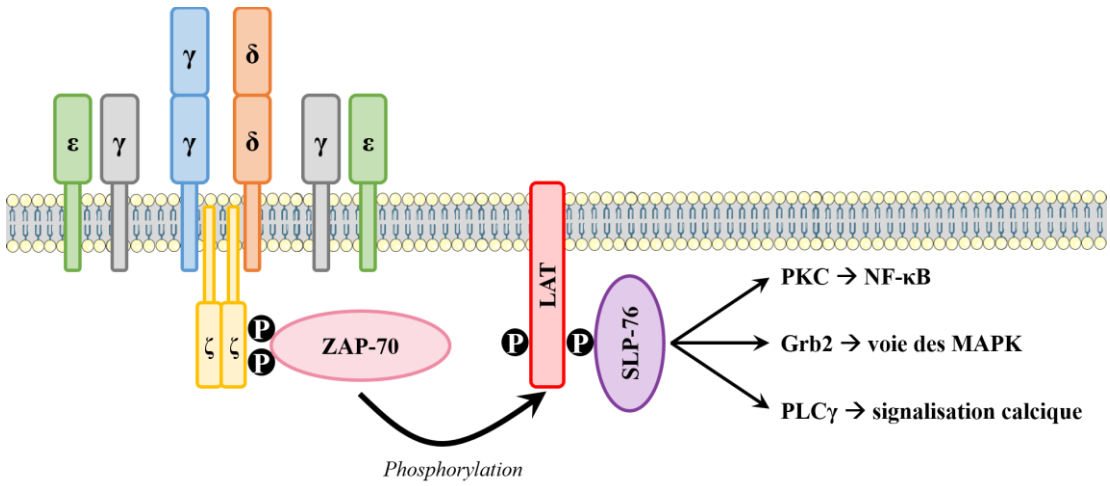


Figure 7 : Transduction du signal TCR γδ lors de l'activation du lymphocyte T.
L'interaction du complexe TCR/CD3 avec l'antigène induit la phosphorylation du domaine intracellulaire des sous-unités CD3 ζζ et de ZAP-70, qui va à son tour phosphoryler LAT. Ceci induit la formation d'une plateforme sous la membrane cellulaire comprenant SLP-76. *In fine*, l'activation du TCR permet l'activation de plusieurs voies impliquées dans la prolifération et les fonctions effectrices du LT : PKC qui active le facteur de transcription NF-κB, Grb2 qui active la voie des MAP kinases, et PLCγ qui induit une signalisation calcique.
Grb2 : Growth factor Receptor-Bound protein 2 ; LAT : Linker for Activation of T cells ; PKC : Protein Kinase C ; PLCγ : Phospholipase C γ ; SLP-76 : Src homology 2 (SH2) domain containing Leukocyte Protein of 76 kDa ; ZAP-70 : Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa.

2. Diversité du TCR γδ

Le TCR doit présenter une certaine diversité afin de pouvoir reconnaitre un large panel d'antigènes et de protéger au mieux l'hôte des agents provenant de l'environnement extérieur. Comme pour le TCR αβ, les chaines du TCR γδ vont être formées grâce à des recombinaisons à partir d'un nombre limité de gènes codant pour les segments variable V, de diversité D, de jonction J ou constant C. Les 2 sites géniques γ et δ ont des compositions différentes en segments V, D, J et C. Ainsi, il existe chez l'Homme 14 gènes V (mais seulement 6 fonctionnels), 5 gènes J et 2 gènes C pour la chaine γ, présents sur le chromosome 7. La chaine δ, elle, est située sur le chromosome 14 chez l'Homme et compte 8 gènes V (mais seulement 3 fonctionnels), 4 gènes J, 3 gènes D et un gène unique C (Figure 8) (Legut et al., 2015). De plus, le locus de la chaine δ étant situé dans le locus de la chaine α, certains gènes de la partie variable de la chaine α qui peuvent se réarranger avec des gènes de la partie constante de la chaine δ. En tout, 8 gènes V peuvent se réarranger avec le gène Cδ. La chaine γ est donc formée par recombinaison VJC alors que la chaine δ est formée par recombinaison VDJC. Ces recombinaisons se font par réarrangements géniques somatiques permis par la présence dans les lymphocytes d'enzymes spécifiques nommées RAG1 et RAG2 (Recombinant-Activating Gene).

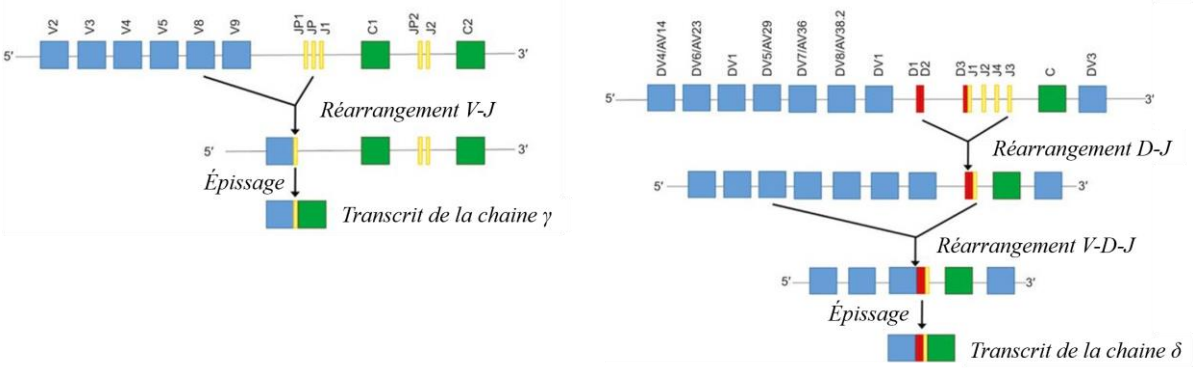


Figure 8 : Structure des loci des gènes des chaines γ et δ du TCR humain, et recombinaison génique aboutissant au transcrit.
Dans le locus de la chaine γ se produit une recombinaison aléatoire entre les segments V et J. Pour la chaine δ, il existe une recombinaison aléatoire entre les segments D et J puis V et D-J. Il existe une possibilité d'addition et/ou excision aléatoire de nucléotides entre les segments V et J. Le segment V comprend 2 régions hypervariables, CDR1 et CDR2. La troisième, CDR3, est formée par les recombinaisons jonctionnelles V-(D)-J. *Legut et al. Cellular and Molecular Immunology, 2015.*

Il existe ainsi plusieurs types de diversités : *combinatoire* par recombinaisons aléatoires de différents segments géniques, *jonctionnelle* par addition et/ou excision aléatoire de N-nucléotides au niveau des régions jonctionnelles, duplications/inversions ou lecture bidirectionnelle des segments D (Chien and Konigshofer, 2007). Du fait d'un plus faible nombre de gènes V fonctionnels par rapport au TCR αβ, la diversité combinatoire des LT γδ est bien inférieure à celle des autres LT (Chien and Bonneville 2006). Au final, leur diversité théorique est cependant plus importante de par la diversité jonctionnelle qui génére les régions hypervariables. Les régions hypervariables ou CDR (Complementary-Determining Region) sont au nombre de 3. C'est le CDR3, formé par les recombinaisons jonctionnelles V-(D)-J, qui constitue une zone critique pour la reconnaissance antigénique, au même titre que ce qui est observé pour les Ig ou le TCR αβ. La chaine γ, qui n'a pas de segment D, a un nombre limité de recombinaisons jonctionnelles possibles. En revanche, la chaine δ a un potentiel de recombinaisons et une diversité plus large, en raison de duplications ou d'inversions des segments D, d'une lecture bidirectionnelle des segments D, avec possibilités d'insertions ou de délétions aléatoires de nucléotides au niveau de chaque jonction. En plus de la variabilité de séquence, il existe également une grande variabilité de taille au niveau de la partie extracellulaire du TCR γδ. En effet, la longueur des boucles CDR et en particulier du CDR3 est variable, influençant également la structure du TCR et la reconnaissance des antigènes. Les CDR3α et CDR3β du TCR αβ ont des longueurs similaires, conduisant à une surface plane. Ceci peut être expliqué par le fait que les 2 chaines du TCR αβ ont besoin de rentrer en contact avec le CMH pour activer le TCR. En revanche, la longueur du CDR3 de la chaine δ est plus importante et variable que celle de la chaine γ qui est court et peu variable, et ressemble plus à la région hypervariable des Ig (Chien and Konigshofer, 2007). Ceci permet au TCR γδ de s'adapter à des structures antigéniques très différentes comme les Ig.

Ainsi, cela confère une variabilité supplémentaire par rapport aux LT αβ, avec des inégalités de longueur du TCR. Ceci s'apparente plus à ce qui peut être observé au niveau des Ig, rendant le TCR γδ plus proche des Ig que du TCR αβ. En effet, les CDR3 des chaines lourdes des immunoglobulines sont longs et variables là où ceux des chaines légères sont similaires au TCR αβ, courts et peu variables, ce qui reflète la nécessité pour les immunoglobulines de reconnaitre aussi bien des petites molécules que des agents pathogènes plus volumineux. Au total, le TCR γδ a une diversité théorique de 10^{18} contre 10^{16} pour le TCR αβ et 10^{11} pour les immunoglobulines (Davis and Bjorkman, 1988).

b. Ontogénie des LT γδ

Les LT γδ sont les premières cellules à apparaitre pendant la vie intra-utérine car elles vont jouer un rôle très précoce dans la protection immunitaire néonatale puisque les cellules présentatrices d'antigène et *a fortiori* les LT αβ sont encore immatures (Vantourout and Hayday, 2013a).

1. Les progéniteurs lymphoïdes

Les progéniteurs lymphoïdes apparaissent dans la moelle osseuse et atteignent le thymus où ils traversent la paroi endothéliale par diapédèse. Lors de leur arrivée dans le thymus, les progéniteurs sont dits double négatifs et représentent 5% des cellules thymiques. En effet, ils n'expriment pas le TCR, le CD3, le CD4 et le CD8. Ce sont donc les mêmes progéniteurs pour les LT αβ ou les LT γδ. Au niveau génétique, les gènes du TCR sont en position germinale à ce stade, ce qui signifie qu'ils sont non fonctionnels car non réarrangés. Les réarrangements du TCR débutent au stade double négatif 2 ($CD44^+$ $CD25^+$) et s'achèvent au stade double négatif 3 ($CD44^-$ $CD25^+$) (Fahl et al., 2014).

2. Développement des LT αβ

Dans le thymus, 60% des thymocytes double négatif ($CD4^-$ et $CD8^-$) vont se multiplier et réarranger la chaine β, qui va s'associer dans un pré-TCR à la partie constante de la chaine α. La cellule va alors recevoir un signal de survie par l'intermédiaire du CD3, et devient une cellule double positive ($CD4^+$ et $CD8^+$), qui réarrange par la suite la chaine α, formant un LT αβ. Cette étape marque la différenciation définitive en LT αβ. Ces cellules vont alors subir une double sélection, positive (capacité à s'activer après avoir reconnu le CMH) puis négative (pour éliminer les cellules ayant la capacité de s'activer après avoir reconnu un peptide du soi). Ceci permet de sélectionner les LT αβ capables de reconnaitre un antigène présenté par le CMH en éliminant les lymphocytes autoréactifs.

3. Développement des LT γδ

Les LT γδ ont un développement différent des LT αβ. Ce développement a été bien décrit dans des modèles murins. Les LT γδ sont les premiers LT à apparaitre dans le thymus (à partir de progéniteurs provenant du foie fœtal) des vertébrés, vers le $12^{ème}$ jour chez la souris lorsque les réarrangements des TCR β, δ et γ débutent dans les thymocytes double négatifs $CD44^+$ et $CD25^+$ (Figure 9) (Fahl et al., 2014; Kreslavsky et al., 2010). Les LT γδ représentent environ 1% à 2% des thymocytes, et atteignent 10% des thymocytes au $16^{ème}$ jour chez la souris, avant de diminuer en raison de la prolifération des progéniteurs αβ $CD4^+$ $CD8^+$ (Lauritsen et al., 2006). Ils expriment précocement leur TCR dans le thymus, où ils ne résident que peu de temps avant de partir dans la circulation périphérique et les organes résidents. Néanmoins, ils restent prédominants pendant les stades précoces du développement fœtal. La maturation se fait par vagues très régulées chez la souris, afin de contrôler leur répertoire et de leur donner leur tropisme spécifique. Ainsi, les premières cellules LT γδ à apparaitre correspondent aux Vγ5Vδ1 au $12^{ème}$ jour de développement. Ces cellules vont ensuite migrer dans la peau pour former les DETC (Dendritic Epidermal T Cells). Vers le $13^{ème}$ jour apparaissent ensuite les Vγ6Vδ1, qui restent jusqu'au $20^{ème}$ jour avant de migrer vers l'utérus, le poumon et la langue grâce à l'expression du CCR6 en surface. Les Vγ4 apparaissent vers le $16^{ème}$ jour et migrent vers les poumons, la circulation périphérique, la rate et les ganglions, puis les Vγ1 sont les derniers à apparaitre, vers le $18^{ème}$ jour, avant de migrer dans le sang périphérique, la rate et les ganglions.

La maturation des LT γδ a été principalement décrite dans des modèles murins, mais elle semble être similaire chez l'Homme, en débutant vers la huitième semaine de développement intra-utero, avec

des vagues de migration successives qui se font au troisième trimestre de la grossesse. Il semble que la première vague de LT γδ, correspondant aux Vγ9Vδ2, qui migrent vers la périphérie (foie, sang et épithéliums). Ils apparaissent dès le stade fœtal pour être majoritaires vers la 23ème semaine (6 mois), puis diminuent progressivement jusqu'à la naissance (Dimova et al., 2015). Ils voient leur pool augmenter progressivement jusqu'à 8 ans pour devenir majoritaires dans la circulation périphérique. D'autres réarrangements se font après la naissance, notamment les Vδ1 et Vδ3, qui se localiseront par la suite dans les tissus, au niveau des barrières (Kalyan and Kabelitz, 2013). A l'âge adulte, les LT γδ représentent entre 0,5% et 16% des LT totaux, avec une moyenne de 4%, avec les mêmes pourcentages dans les organes lymphoïdes secondaires (Chien et al., 2014a). Dans les organes périphériques, les pourcentages sont plus variables, et les LT γδ peuvent représenter jusqu'à 50% des LT, notamment dans les épithéliums.

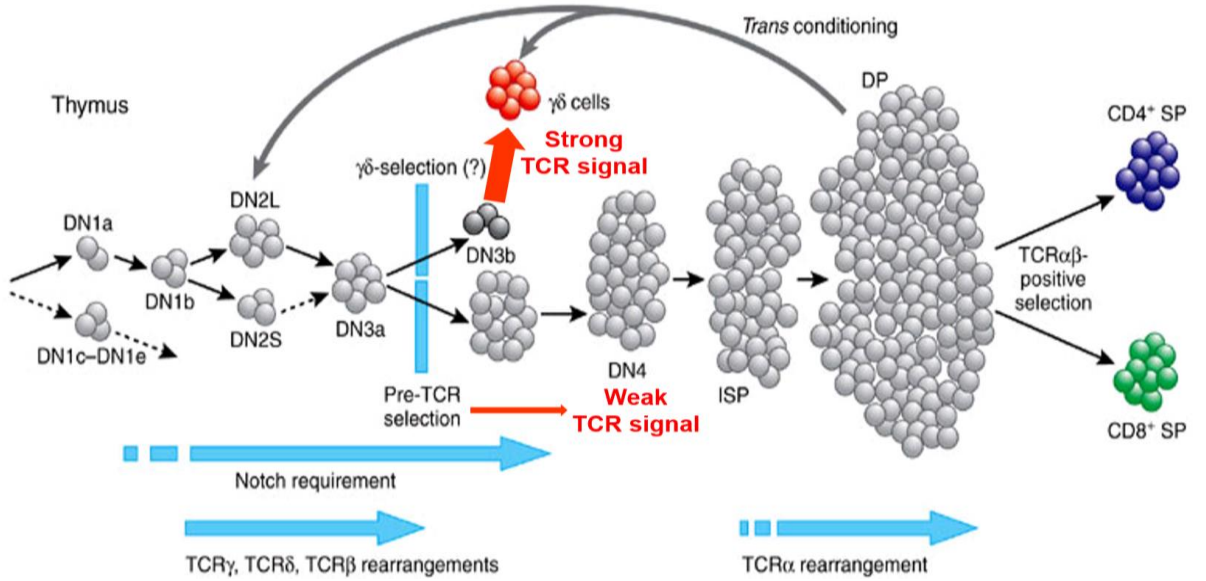


Figure 9 : Différenciation des lymphocytes T en LT γδ et LT αβ dans le thymus murin.
Dans le thymus murin, la différenciation des LT en LT γδ ou LT αβ intervient dès le stade DN3, en fonction du signal reçu par le TCR. En effet, un signal fort permet la différenciation en LT γδ alors qu'un faible signal via le TCR oriente le LT vers une différenciation en LT αβ. *D'après Hayday et al. Nat Immunol 2007.*

4. Mécanismes impliqués dans la différenciation en LT αβ ou LT γδ

Les mécanismes qui permettent d'orienter la différenciation soit en LT γδ ou soit en LT αβ ne sont pas encore élucidés, et 2 modèles s'opposent : le modèle stochastique et le modèle instructionnel. Le premier modèle stipule que la différenciation en LT γδ ou en LT αβ est prédéterminée au niveau génétique avant même l'expression du TCR dont elle est indépendante. Selon le second modèle, plus simple, c'est le TCR qui détermine quelle va être la différenciation du LT (pré-TCR ou TCR γδ). Un autre modèle a été proposé pour réconcilier ces 2 approches. Il dépend plutôt de l'intensité de la stimulation du TCR (Figure 9) (Hayes et al., 2005). Selon ce nouveau modèle, un thymocyte double négatif qui reçoit un signal fort par le TCR se différencie en LT γδ alors que celui qui reçoit un signal plus faible va se différencier en LT αβ.

Dans des modèles murins, la perte d'expression du CD24 avait initialement été décrite comme étant le facteur corrélé à une différenciation irréversible des LT en LT αβ ou LT γδ (Kreslavsky et al., 2008; Lauritsen et al., 2009). Néanmoins, il semblerait qu'un autre marqueur, le CD73, soit plus associé à une différenciation irréversible chez la souris, puisque les LT γδ $CD24^+$ $CD73^+$ ont perdu leur capacité

à revenir vers une différenciation en LT αβ (Coffey et al., 2014). De plus, toujours dans les modèles murins, plus de 90% des LT γδ du sang périphérique expriment le CD73. Néanmoins, chez l'Homme, aucune donnée ne permet d'affirmer cela.

5. Différents phénotypes : innate-like versus adaptatif

Une fois différenciés en LT γδ, les lymphocytes vont avoir également une phase de maturation thymique pendant laquelle ils vont, contrairement aux LT αβ, acquérir leurs fonctions. Les fonctions effectrices des LT γδ s'acquièrent selon 2 types de modèles. Le premier est le modèle de prédétermination, donc TCR-indépendant (Serre and Silva-Santos, 2013). Elle se fait en amont ou pendant l'expression du TCR. Plusieurs observations vont dans ce sens, en particulier dans le cas des LT γδ produisant de l'IL-17. Ainsi, il a été montré que ces cellules, dans leur état immature, présentaient des sous-populations, basées sur l'expression Vγ, enrichies en certains facteurs de transcription (Narayan et al., 2012). Par exemple, il existe une expression de RORγt pour les cellules sécrétant de l'IL-17, avec une programmation transcriptionnelle différente en fonction des chaines exprimées, ce qui souligne une corrélation entre le programme transcriptionnel, l'expression des chaines Vγ et la fonction des cellules. Néanmoins, ces observations ont été réalisées dans des LT γδ exprimant le CD24 donc immatures, dont 25% expriment déjà le CD73, marqueur de différenciation lié à une stimulation du TCR. Ceci remet en cause la validité de cette hypothèse.

C'est pourquoi un autre modèle a été proposé, dépendant du TCR (Muñoz-Ruiz et al., 2017). Selon ce modèle, l'intensité de la stimulation reçue par le TCR, en plus d'induire une différenciation en LT αβ ou LT γδ, va permettre de déterminer la fonction des LT γδ, et différencier plusieurs types de cellules. Une très forte stimulation va favoriser le phénotype dit innate-like dans le thymus. Ces cellules « innate-like » acquièrent leur fonction dans le thymus, et possèdent un TCR invariant ou avec un répertoire restreint. Il s'agit d'une population plutôt monoclonale (Vantourout and Hayday, 2013a), pouvant s'activer rapidement et fonctionnant malgré une absence d'expansion clonale. Elles peuvent se diviser en 2 groupes selon les cytokines produites, IL-17 ou IFNγ (Ribot et al., 2010). Il existe également des cellules innate-like qui sont capables de répondre rapidement à une stimulation purement cytokinique (Wencker et al., 2014), sans engagement du TCR, pour produire de l'IL-17 sous l'impulsion de l'IL-1β, l'IL-7 et de l'IL-23 (Michel et al., 2012; Sutton et al., 2012), ou pour produire de l'IFNγ sous l'impulsion de l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18 (Barros-Martins et al., 2016). A l'inverse, les LT γδ adaptatifs, qui reçoivent une stimulation moins forte par le TCR, quittent très tôt le thymus, en tant que cellules naïves exprimant, et conservent une certaine plasticité lors de leur arrivée en périphérie où elles acquièrent leurs fonctions sécrétrices. Elles peuvent aussi développer des capacités de mémoire. Ainsi, une faible stimulation va permettre une différenciation en cellules produisant de l'IL-17, alors qu'une stimulation moyenne favorise la production de l'IFNγ, puisqu'elle induit une diminution de l'expression de RORγt associée à un phénotype IL-17.

Il semble qu'il y ait une corrélation entre la fonction sécrétrice et la localisation, puisqu'on retrouve dans la rate principalement des cellules produisant de l'IFNγ, dans les ganglions des cellules produisant de l'IL-17. De même, la localisation au sein d'un même organe peut être déterminée par le type de sécrétion, comme c'est le cas dans la peau, où l'épiderme est infiltré de cellules sécrétant de l'IFNγ (les DETC), et le derme de cellules sécrétant de l'IL-17. Enfin, il existe aussi une corrélation entre la fonction effectrice et le type de TCR exprimé : Vγ2 pour l'IL-17, Vγ1 pour l'IFNγ, Vγ1.1 pour la cosécrétion d'IFNγ et d'IL-4 (O'Brien and Born, 2010). Chez l'Homme, les LT γδ vont plutôt

produire de l'IFNγ, mais peuvent, dans des conditions d'inflammation importante, produire de l'IL-17. Dans le cas des LT γδ humains, l'acquisition de leur fonction n'est pas très bien comprise.

6. Evolution du répertoire des LT γδ chez l'Homme

Les LT γδ sont des cellules largement réparties dans le corps, à la fois dans la circulation sanguine, où ils représentent une faible partie des cellules immunitaires (moins de 5%) et dans les tissus, majoritairement au niveau des barrières avec le milieu extérieur (poumon, peau, intestin) (Bonneville et al., 2010). Leur tropisme tissulaire est déterminé par les chaines exprimées à leur surface et les récepteurs aux chémokines. Les TCR exprimés vont donc être différents en fonction des tissus dans lesquels les LT γδ vont migrer, mais sont relativement homogènes voire invariants dans un même tissu suggérant un lien entre le tropisme et la spécificité antigénique.

Chez l'Homme, le répertoire des LT γδ évolue au cours de la vie (De Rosa et al., 2004). A la naissance, les LT γδ ont une grande diversité jonctionnelle. Les Vδ1$^+$ sont majoritaires et représentent 50% des LT γδ totaux, les Vδ2$^+$ 25% et les Vδ3$^+$ 25% également. Le répertoire se restreint rapidement après la naissance (vers l'âge de 1 an) afin de privilégier les Vγ9Vδ2 qui vont avoir un phénotype plutôt de cellules mémoires, capables de produire facilement de l'IFNγ et des granules cytotoxiques (De Rosa et al., 2004). Il semble que cela soit dû aux stimulations antigéniques répétées par l'environnement ou à des infections virales chroniques (Kalyan and Kabelitz, 2013; Pitard et al., 2008a). En parallèle, le pool de Vδ1$^+$, majoritaire initialement, diminue pour atteindre moins de 10% à l'âge adulte, mais ces cellules conservent un phénotype naïf en périphérie. Cependant, leur réponse à un virus très prévalent, le Cytomégalovirus, fait que leur proportion devient majoritaire dans une large part de la population générale et chez laquelle leur phénotype devient celui de cellules mémoires très différenciées (Pitard et al., 2008a). Elles sont plutôt localisées dans les tissus, probablement car elles reconnaissent des antigènes plus présents dans les organes.

c. Mécanismes de reconnaissance de la tumeur par les LT γδ (Figure 10)

Les sous-types de LT γδ sont différents de ceux des LT αβ. Ainsi, pour ces derniers, la distinction se fait sur la reconnaissance antigénique et les cytokines relarguées (Th1, Th2, Th9 ou Th17). En revanche, la séparation entre les différents sous-types de LT γδ est moins évidente. Les LT γδ sont classiquement distingués selon les chaines γ et δ qu'ils expriment (O'Brien et al., 2001). Il existe 2 grands sous-types de LT γδ, les Vδ2$^+$ et les Vδ2$^-$ (Bottino et al., 1988). Les mécanismes de reconnaissance de ces 2 sous-populations sont différents.

Les LT γδ reconnaissent l'antigène de manière indépendante du CMH sous forme de molécules non apprêtées (Schild et al., 1994, Born et al., 2013). Les antigènes reconnus sont non conventionnels car non peptidiques, généralement non reconnus par les LT αβ. Ces antigènes peuvent être de nature protéique, lipidique, ou être des carbohydrates (Born et al., 2013). Les LT γδ sont capables de reconnaitre de manière rapide des pathogènes extérieurs (antigènes du non-soi) ou des signaux de stress (comme les modifications des antigènes du soi en lien avec une agression). Ils constituent ainsi la première ligne de défense du soi, expliquant leur rôle majeur dans la surveillance et l'homéostasie tissulaire des barrières (Chien et al., 2014a).

1. Les LT Vδ2Vγ9

Les LT γδ qui expriment une chaine δ de type Vδ2 expriment le plus souvent la chaine Vγ9. Ils sont générés très tôt dans la vie fœtale (entre les 8ème et 15ème semaines) chez l'Homme. Ce sont les LT γδ les plus étudiés car circulants donc facilement accessibles. Les LT Vδ2Vγ9 sont majoritairement retrouvés dans la circulation sanguine où ils représentent plus de 75% des LT γδ circulants. Leur TCR reconnait des phosphoantigènes produits par de nombreux microorganismes (bactéries, champignons, parasites et par les cellules transformées, et ce de manière indépendante du CMH (Jomaa et al., 1999). Ces phosphoantigènes sont des métabolites phosphorylés non peptidiques très conservés car retrouvés chez les Vertébrés mais aussi chez les micro-organismes. Leur production peut se faire selon 2 voies différentes. Tout d'abord, ils peuvent être produits en tant qu'intermédiaires du métabolisme de la voie du mévalonate, comme c'est le cas pour l'Isopentenyl PyroPhosphate (IPP) chez les Vertébrés (Figure 11). Ils peuvent également être issus d'une autre voie de biosynthèse des isoprénoïdes, la voie DOXP, présente chez de nombreux micro-organismes, qui produit le 1-Hydroxy-2-methyl-2-buten-4-yl-4-diphosphate (HDMAPP), transformé en (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-pyrophosphate (HM-BPP) (Figure 11) (Gober et al., 2003). La reconnaissance de ces phosphoantigènes est dépendante du TCR Vγ9Vδ2, conduit à sa signalisation et à l'activation rapide de ERK1/2, p38 MAPK et JNK, induisant une signalisation via la voie NF-κB, et le relargage d'IFNγ et TNFα (Cipriani et al., 2002).

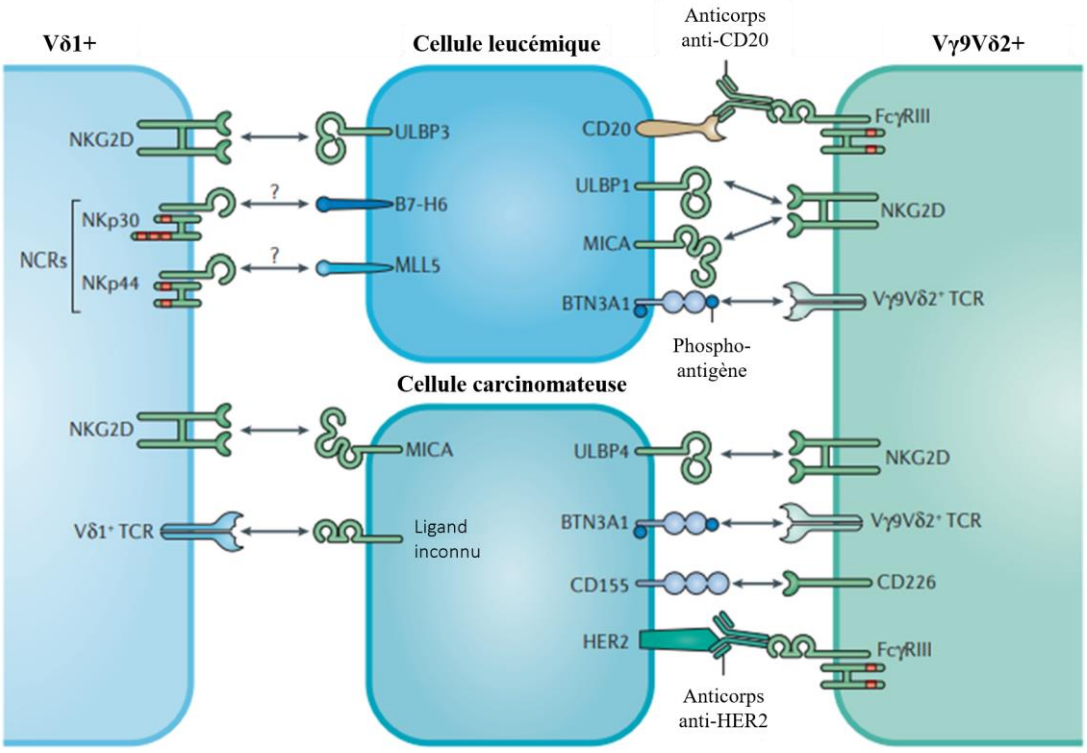


Figure 10 : Mécanismes de la reconnaissance des cellules tumorales par les LT γδ.
Les récepteurs exprimés par les LT γδ et leurs ligands sont mieux connus pour les Vδ2$^+$ que pour les Vδ2$^-$. La reconnaissance peut se faire grâce à différents récepteurs, dont le TCR, les récepteurs de la famille NKR, ou le FcγRIII. BTN3A1 : Butyrophilin 3A1 ; MICA : MHC class I-related Chain A ; ULBP : UL16-Binding Protein. *D'après Silva Santos et al. Nature Reviews Immunology 2015.*

Chez l'Homme, les cellules utilisent la voie du mévalonate pour synthétiser l'isoprénoïde et l'IPP qui a une bioactivité très faible sur les LT Vγ9Vδ2, de l'ordre du micromolaire. Les concentrations intracellulaires sont tellement faibles qu'elles ne permettent pas d'activer les LT en conditions physiologiques. En revanche, l'HMB-PP microbien a une bioactivité beaucoup plus importante, de

l'ordre du picomolaire, et est donc capable de permettre aux LT γδ de discerner les microorganismes ou les cellules infectées des cellules saines. De leur côté, les cellules tumorales voient leurs concentrations intracellulaires d'IPP augmenter du fait d'une dérégulation de la voie du mévalonate, ce qui les rend visibles du système immunitaire (Gober et al., 2003). Les niveaux d'IPP intracellulaires peuvent également être augmentés de manière thérapeutique par l'administration de bisphosphonates, en inhibant la farnesyl diphosphate synthase (Kunzmann et al., 1999). Ceci bloque cette enzyme qui métabolise l'IPP, ce qui induit une augmentation des taux intracellulaires d'IPP, permettant une reconnaissance par les LT γδ (Kondo et al., 2011). C'est ainsi que les bisphosphonates se sont retrouvés utilisés dans des essais cliniques d'expansion *ex vivo* de LT γδ avant réinjection chez des patients atteints d'un cancer. Un analogue de l'IPP a également été synthétisé, le bromohydrine diphosphate (BrHPP), pour activer les LT de manière puissante à des concentrations plus faibles (Espinosa et al., 2001).

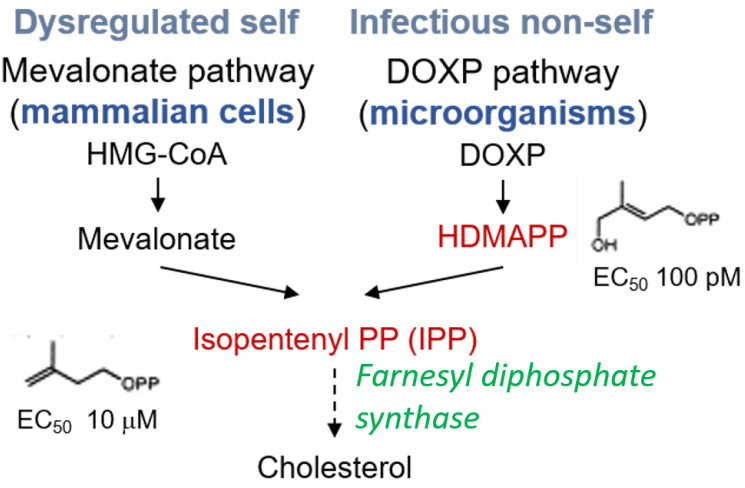


Figure 11 : Voies de la synthèse de l'isopentenyl PP.
Il existe 2 voies de production de l'IPP. Chez l'Homme, l'HMG-CoA est transformée, dans la voie du mévalonate, en IPP. Chez les micro-organismes, c'est la voie DOXP qui produit du HMB-PP transformée ensuite en HDMAPP puis en IPP.
DOXP : 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate ; HDMAPP : 1-Hydroxy-2-methyl-2-buten-4-yl-4-diphosphate.

Les phosphoantigènes ne sont pas directement reconnus par le TCR mais sont nécessaires à la modification d'une protéine qui va induire directement ou indirectement une activation du TCR Vγ9Vδ2 (Allison et al., 2001; Harly et al., 2012). Cette protéine est la butyrophiline-3 (BTN3-A1 ou CD277), apparentée à la famille des molécules B7. BTN3-A1 est une glycoprotéine transmembranaire formée par 2 domaines extracellulaires ressemblant aux Ig et un domaine intracellulaire de signalisation. Elle est présente sur toutes les cellules normales et les cellules tumorales. La liaison des métabolites se fait sur BTN3-A1 au niveau du domaine intracellulaire, dans le domaine B30.2, ce qui modifie la conformation et la mobilité membranaire de la protéine et permet l'activation du TCR par un mécanisme encore incomplètement élucidé (reconnaissance directe ? intervention d'une autre partenaire protéique ?). Il a été montré que la réactivité des LT γδ vis-à-vis des phosphoantigènes était abrogée en cas d'absence de BTN3-A1, et qu'il était possible de la restaurer après réexpression de BTN3-A1. Ceci suggère que l'activation des LT γδ par les phosphoantigènes accumulés en intracellulaire passe par la fixation des phosphoantigènes sur BTN3-A1 dans sa partie intracellulaire et la reconnaissance de modifications de sa partie extracellulaire, selon un processus de signalisation « in-out » (Wang et al., 2013). La F1-ATPase est une autre protéine qui interagit avec l'apolipoprotéine A-1 dont une étude

suggère qu'elle pourrait être également impliquée dans la reconnaissance des phosphoantigènes par le TCR (Scotet et al., 2005).

2. Les LT γδ Vδ2 négatifs

Les LT γδ non Vδ2 expriment majoritairement la chaine Vδ1 mais peuvent également exprimer la chaine Vδ3, et façon bien moins fréquente les chaines Vδ4 à Vδ8. Les LT γδ Vδ1 expriment indifféremment les chaines Vγ2, Vγ3, Vγ4, Vγ5, Vγ8 ou Vδ9. Ces LT γδ sont minoritaires dans le sang mais majoritaires dans les tissus. Les Vδ1 se retrouvent ainsi notamment dans l'intestin, le poumon, le derme, la rate et le foie. Les autres sont représentés par les Vδ3, localisés dans le sang, le foie et en cas d'expansion après infection CMV ou HIV (Wu et al., 2017),. La localisation des autres populations est moins connue. De par leur localisation tissulaire, ils jouent un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie tissulaire.

Les ligands reconnus par le TCR de ce sous-type de LT γδ sont moins bien connus, du fait de leur localisation tissulaire qui rend complexe leur analyse. De manière certaine, ils ne sont pas capables de reconnaitre les phosphoantigènes. En revanche, il semble que la famille des protéines de type CD1 soit reconnue par certains de ces TCR, en particulier le CD1c et le CD1d pour certains Vδ1. Le CD1 est une molécule proche du CMH de classe I (Faure et al., 1990; Uldrich et al., 2013) qui sert à présenter surtout des lipides et des glycolipides (Spada et al., 2000; Stanic et al., 2003). La reconnaissance se fait au niveau de la partie extracellulaire du CD1d. L'Endothelial Protein C Receptor (EPCR) est également une molécule pouvant être reconnue par un TCR Vδ2$^-$. Il s'agit d'une molécule qui présente 20% d'homologie de séquence avec le CMH I et le CD1. C'est un des ligands identifiés du clone LES Vγ4Vδ5 (Willcox et al., 2012a). Enfin, l'annexin A2 induite par les conditions hypoxiques peut être reconnue par certains TCR Vδ3 et Vδ1(Marlin et al., 2017a).

3. Les ligands communs aux LT γδ Vδ2 positifs et Vδ2 négatifs

a. Les récepteurs de la famille des NKR (Natural Killer Receptors)

Les LT γδ Vγ9Vδ2 expriment des récepteurs retrouvés également à la surface des cellules NK. Parmi les récepteurs activateurs, le principal correspond au NKG2D. C'est un récepteur transmembranaire appartenant à la famille des récepteurs de type C-lectine. Il est exprimé par tous les LT γδ mais aussi les NK et certains LT αβ CD8$^+$. NKG2D peut être activé par la surexpression de MICA/B (Xu et al., 2011) ainsi que par les molécules de la famille ULBP (UL16 Binding Protein) (Catellani et al., 2007; Kondo et al., 2011; Lança et al., 2010). La reconnaissance par NKG2D de MICA semble 1000 fois plus forte qu'avec le TCR (Xu et al., 2011). Les molécules de la famille de ULBP1-6 ne sont pas normalement exprimées à la surface des cellules saines, mais sont retrouvées surexprimées par de nombreuses cellules tumorales (Lanier, 2015). Les ligands du NKG2D sont donc produits lors de stress cellulaires, et en particulier pendant la tumorigénèse (Champsaur and Lanier, 2010; Gasser et al., 2005). Ces récepteurs jouent donc un rôle également important dans l'immunosurveillance du processus de cancérisation (Guerra et al., 2008). Ce récepteur joue également un rôle majeur de costimulateur lors de l'interaction du lymphocyte avec sa cellule cible (Bonneville et al., 2010). Lors de son activation, NKG2D va se lier dans le cytosol à DAP10 qui va activer à la fois la voie PI3K et la voie MAPK. De plus, il pourrait également être capable d'activer à lui seul le lymphocyte en l'absence de mise en jeu du TCR.

b. Les autres récepteurs exprimés par les LT γδ

Les LT γδ expriment également d'autres types de récepteurs. Ainsi, on retrouve le CD226 ou DNAM-1, qui est une glycoprotéine de la famille des Ig, qui reconnait la nectin-like 5 (CD155) exprimée à la surface des cellules tumorales. Son blocage par des anticorps antagonistes induit une diminution de la cytotoxicité des LT γδ et de la production d'IFNγ dans un modèle de carcinome hépatocellulaire (Toutirais et al., 2009).

Certains LT γδ peuvent exprimer également le CD16 ou FcγRIIIA, comme les cellules NK. Il s'agit d'un récepteur présentant une affinité particulière pour le fragment constant des IgG, dont la fixation induit un signal similaire à celui observé lors de l'activation du TCR. Ceci conduit au phénomène d'ADCC ainsi qu'à la lyse des cellules cibles reconnues par les anticorps. L'anticorps fait ainsi le pont entre le CD16 du lymphocyte et l'antigène spécifique à la surface de la cellule (CD20 par exemple), permettant le ciblage spécifique et la lyse de la cellule.

Les LT γδ Vδ1 peuvent enfin exprimer des récepteurs NKp dans certaines conditions d'activation particulières *in vitro*, et en particulier NKp30 qui reconnaissent des molécules de la famille B7 telles que B7-H6 à la surface des cellules tumorales (Correia et al., 2011). Ils peuvent également exprimer un récepteur NKp44 qui reconnait MLL5, une lysine methyltransferase impliquée dans la différenciation hématopoïétique et le contrôle du cycle cellulaire. Elle est normalement située dans le noyau, mais l'isoforme reconnue par NKp44 se situe dans le cytoplasme et le réticulum endoplasmique, avant expression à la surface cellulaire. MLL5 est donc exprimée dans les tissus normaux, mais l'isoforme reconnue par NKp44 n'est exprimée par les cellules tumorales (Baychelier et al., 2013).

d. Régulation de l'activation des LT γδ

Du fait de leur reconnaissance d'auto-antigènes, l'activation des LT γδ est finement régulée afin d'éviter une activation anarchique et non contrôlée qui pourrait être responsable de lésions tissulaires (Ribeiro et al., 2015).

Le premier niveau de régulation des LT γδ correspond, comme les LT αβ, à l'expression de récepteurs coactivateurs. Ainsi, il existe 2 types de récepteurs de costimulation à la surface des cellules lymphoïdes : le CD28 et les récepteurs de la famille du TNF. Le CD28 est un récepteur costimulateur de la famille des immunoglobulines qui joue un rôle important dans la survie et la prolifération via la production d'IL-2. Ce récepteur n'est pas requis pour la différenciation en cellules sécrétant de l'IFNγ ou de l'IL-17 (Laird et al., 2013). Les récepteurs de la famille du TNF comprennent CD27, CD30 et CD137. Le CD27 est impliqué dans la différenciation en cellule sécrétant de l'IFNγ, en plus du signal TCR dans le thymus (Ribot et al., 2009). Chez la souris, ce récepteur permet de caractériser les cellules sécrétant de l'IFNγ ($CD27^+$) et celles produisant de l'IL-17 ($CD27^-$). Ce récepteur joue également un rôle majeur en périphérie dans la régulation dans un contexte d'activation par des phosphoantigènes, régulant l'activation, la survie, la prolifération et la sécrétion de cytokines proinflammatoires (DeBarros et al., 2011). Le CD30 est un autre récepteur de la famille du TNFR qui joue un rôle dans la signalisation intracellulaire calcique après activation par le TCR (Biswas et al., 2000). Ce récepteur favorise la polarisation IL-17. Enfin, CD137 (4-1BB) joue un rôle dans la polarisation IFNγ (Maniar et al., 2010).

Les LT γδ expriment également des récepteurs de coinhibition, permettant d'éviter leur activation non contrôlée. Ainsi, les LT γδ expriment PD-1, largement utilisé en thérapeutique anticancéreuse. PD-1 joue un rôle inhibiteur sur la production d'IFNγ et sur leurs fonctions cytotoxiques (Iwasaki et al., 2011). Ce récepteur est couplé à des motifs ITIM inhibiteurs dans le cytoplasme (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif). Ces motifs induisent un blocage de la signalisation en aval du TCR, une activation de PTEN qui inhibe la voie PI3K/AKT. L'ensemble induit une diminution de la production d'IL-2, cytokine majeure pour la survie et la prolifération lymphocytaire. En revanche, les LT γδ expriment peu CTLA-4, mais plutôt BTLA. Il appartient à la famille de molécules CD28, mais il porte des domaines ITIM qui vont inhiber l'activation des LT γδ. Il a également été montré que l'activation de BTLA (B- and T-Lymphocyte Attenuator) induisait la diminution de la signalisation via le TCR lorsque celui-ci reconnait les phosphoantigènes, induisant une diminution de la prolifération et de l'activation des Vγ9Vδ2 (Gertner-Dardenne et al., 2013). Enfin, il intervient dans la régulation de la population de LT γδ sécrétant de l'IL-17 (Bekiaris et al., 2013).

Le 3ème niveau de régulation de l'activation des LT γδ correspond aux cytokines présentent dans le microenvironnement. Les cytokines jouent un rôle important dans l'activation des LT γδ, par l'influence qu'elles ont sur leur différenciation, leur prolifération, leur survie et la régulation fine de leurs fonctions. Ainsi, l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15 sont nécessaires pour leur développement (Baccala et al., 2005), la déplétion de l'IL-7 dans l'épithélium thymique murin induit la diminution des LT γδ à l'âge adulte dans les organes (Shitara et al., 2013). De plus, elles jouent un rôle important dans le maintien des LT γδ dans les organes, avec l'IL-7 pour le derme et l'IL-15 pour l'intestin. Ces cytokines sont nécessaires pour obtenir une réponse effectrice optimale en plus de la stimulation du TCR. De plus, l'IL-2 ou l'IL-15 seules, en l'absence de stimulation du TCR, sont des cytokines qui vont permettre la différenciation en LT γδ produisant de l'IFNγ. En revanche, l'IL-1β, l'IL-18, l'IL-12, l'IL-21 et l'IL-23 sont essentielles pour leurs fonctions. En contexte inflammatoire, l'IL-12 et l'IL-18 induisent la sécrétion d'IFNγ alors que l'IL-1β et l'IL-23 vont favoriser l'orientation vers la sécrétion d'IL-17. Enfin, chez l'Homme, l'IL-21 est une cytokine qui va favoriser les fonctions de « follicular helper » des LT γδ (Bansal et al., 2012).

e. Implication des LT γδ dans l'homéostasie tissulaire : l'exemple de l'intestin (Figure 12)

Les LT γδ sont des cellules que l'on retrouve de manière prépondérante dans les tissus. Ils sont souvent enchâssés entre les cellules de l'épithélium et sont alors nommés lymphocytes intra-épithéliaux (IEL). Le rôle des IEL est de maintenir une homéostasie et l'intégrité des tissus afin de préserver l'hôte des agressions physiques, chimiques et de pathogènes et, au niveau intestinal, de limiter la fuite de l'eau et des nutriments, de permettre l'organisation de l'épithélium et la réparation des lésions tissulaires. Ces barrières vont également avoir un rôle d'échange avec l'extérieur au niveau du poumon, de la peau et de l'intestin, essentiel à l'intégrité de l'hôte (Nielsen et al., 2017).

Les IEL intestinaux ont été beaucoup étudiés chez la souris. Ainsi, les LT γδ murins qui colonisent l'intestin sont préférentiellement Vγ7et migrent dans l'intestin autour de la naissance de la souris (Takagaki et al., 1989). Ils sont plus nombreux dans l'intestin grêle que dans le côlon. Leur maintien homéostasique dans l'intestin dépend de l'IL-15 sécrétée par les cellules épithéliales locales, mais aussi de l'activation de la voie du récepteur de l'aryl hydrocarbone (AhR), dont la perte induit un

défaut de capacité à survivre dans les tissus (Li et al., 2011). Ces LT γδ sont remarquablement mobiles contrairement aux IEL de la peau chez la souris, afin de pouvoir se déplacer dans le tissu épithélial intestinal et de jouer leur rôle de sentinelle. Les LT γδ contrôlent également la prolifération des cellules intestinales par la cytokine KGF-1 (Keratinocyte Growth Factor-1), puisque leur absence induit une diminution de leurs capacités prolifératives dans des modèles murins TCR $\delta^{-/-}$ (Chen et al., 2002). Dans ces souris, il existe une augmentation de la perméabilité de l'épithélium intestinal par défaut de maintien des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, qui ne joue plus son rôle de barrière, favorisant le développement de colites et de cancers (Dalton et al., 2006).

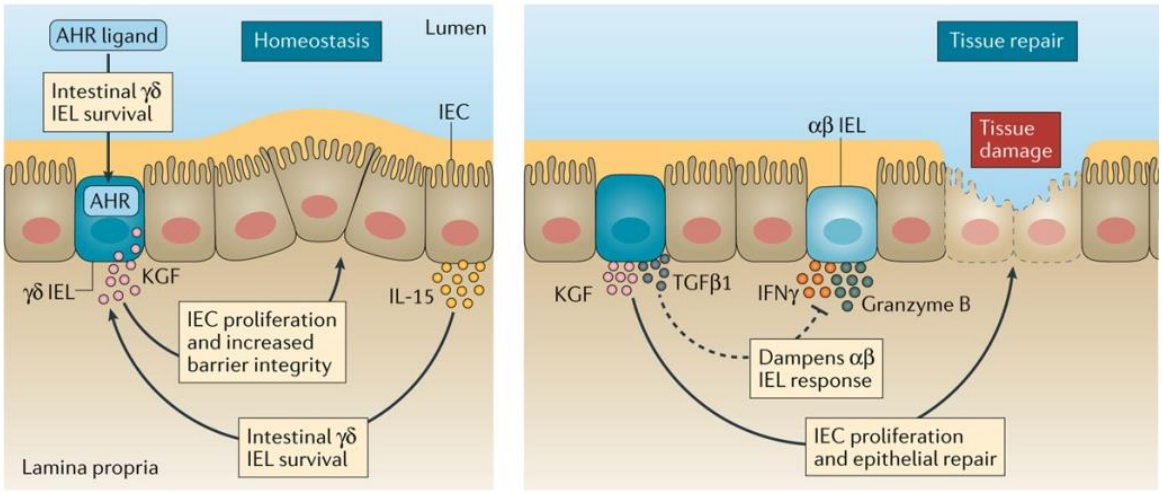


Figure 12 : Immunosurveillance et réparation de l'épithélium intestinal.
La survie et le maintien des LT γδ intraépithéliaux (IEL) dans l'intestin dépend fortement de l'activation de la voie de l'AhR et de la production de l'IL-15 par les cellules épithéliales intestinales (IEC). En retour, les LT γδ intraépithéliaux sécrètent KGF-1, permettant la prolifération des cellules épithéliales, ce qui maintient l'intégrité de la barrière et facilite le processus de réparation tissulaire après une agression. Par la production de TGFβ, les LT γδ inhibent la production d'IFNγ par les LT αβ, mais aussi diminue leur activité cytolytique, bloquant ainsi tous dommages additionnels liés à une inflammation dérégulée induite par la réponse immunitaire. *Nielsen et al. Nat Rev Immunol 2017.*

Les LT γδ vont également permettre de réguler l'inflammation grâce au contrôle microbien permettant la symbiose entre l'hôte et son microbiote. Cette symbiose est maintenue par la minimisation des contacts entre les bactéries et les cellules épithéliales grâce à la production du mucus, aux IgA et aux peptides antimicrobiens (AMP) (Hooper, 2015). Cela permet de limiter la réponse immunitaire contre le microbiote, les phénomènes inflammatoires au niveau de la paroi intestinale et les lésions tissulaires. Ces molécules sont sécrétées par les LT γδ dès qu'une bactérie pénètre dans le tissu et rentre en contact ou dans les cellules intestinales. Elles sont donc produites dès les premiers stades de l'agression, faisant des LT γδ une cellule essentielle dans la défense de l'hôte, agissant en première ligne pour limiter la pénétration et la prolifération des agents pathogènes dans la paroi. Ainsi, par leur localisation basale, les LT γδ limitent l'exposition du système immunitaire aux agents pathogènes et donc les phénomènes inflammatoires aigus et/ou chroniques qui favorisent les maladies inflammatoires et le cancer. Enfin, les LT γδ vont limiter les phénomènes inflammatoires en diminuant la production locale de cytokines proinflammatoires telles que l'IFNγ. Ainsi, l'absence de LT γδ dans des modèles murins induit une inflammation chronique avec des niveaux élevés d'IFNγ, et le transfert adoptif de LT γδ permet de diminuer les colites via l'augmentation de la production de TGFβ (Kühl et al., 2007). Les LT γδ jouent donc un rôle primordial dans l'homéostasie et la dérégulation de leurs fonctions d'immunosurveillance va favoriser les processus inflammatoires chroniques qui favorisent la tumorigénèse.

f. Implication des LT γδ dans la tumorigénèse

Comme toutes les cellules immunitaires, les LT γδ sont des cellules plastiques qui, en fonction du contexte immunologique cellulaire et cytokinique, peuvent détruire les cellules tumorales ou, au contraire, favoriser la prolifération tumorale.

1. Rôle antitumoral des LT γδ

a. Observations du rôle antitumoral des LT γδ

Les LT γδ ont une activité antitumorale certaine une fois activés *in vitro*. Ainsi, il a été montré que la coculture des LT γδ avec des cellules cancéreuses, dans un milieu enrichi en IL-2, induisait la mort cellulaire de différents types de lignées (Lo Presti et al., 2014). Ensuite, *in vitro*, il a été montré que les LT γδ étaient capables de lyser plusieurs types de cellules tumorales autologues ou allogéniques (Maeurer et al., 1996; Paul and Lal, 2016). De plus, dans des modèles murins déficients en LT γδ exposés à des mutagènes, il a été retrouvé une plus forte incidence de carcinomes cutanés (Girardi et al., 2001) ou de carcinomes prostatiques, avec des maladies plus rapidement évolutives (Liu et al., 2008). L'administration de LT γδ amplifiés *ex vivo* dans des souris portant un cancer de prostate permettait d'obtenir des maladies moins avancées, confirmant leur rôle primordial dans l'immunosurveillance et le contrôle de la maladie tumorale une fois en place. Enfin, des études dans des modèles murins de cancer du côlon ont montré que les LT γδ Vδ1 dont l'expansion a été induite par l'infection à CMV injectés à des souris permettaient de diminuer l'évolution métastatique hépatique et pulmonaire des tumeurs (Devaud et al., 2013).

Il existe également des arguments plus cliniques issus de plusieurs pathologies solides ou hématologiques. La première description d'un rôle antitumoral des LT γδ a été faite dans les hémopathies, où il a été observé que les patients présentant un taux élevé de LT γδ circulants avaient également une survie sans maladie prolongée dans le cadre des leucémies aigues après greffe de cellules souches hématopoïétiques (Lamb et al., 1996). De plus, dans les populations de patients ayant bénéficié d'une transplantation rénale qui développent une expansion des LT γδ $V\delta2^-$ du fait d'une infection à CMV, il a été observé une incidence plus faible de cancers (Couzi et al., 2010a). Ceci serait dû au fait qu'il existe des antigènes communs reconnus par les LT γδ entre les cellules infectées et les cellules transformées (Halary et al., 2005a; Willcox et al., 2012a). Enfin, une analyse *in silico* transcriptomique récente sur 7270 échantillons de tumeurs du sein humaines de tous les stades TNM a montré que l'infiltrat en LT γδ était associé à de meilleurs taux de réponse complète, une meilleure survie sans maladie et, pour les tumeurs surexprimant Her2, à une meilleure survie globale (Bense et al., 2017). Le même type d'analyse dans des tumeurs solides et des hémopathies a également apporté un argument en faveur du rôle pronostic positif de l'infiltrat en LT γδ dans les tumeurs, avec un poids plus fort que pour les $CD8^+$ (Gentles et al., 2015a).

b. Mécanismes pouvant expliquer leur effet antitumoral

<u>*Fonction globale d'immunosurveillance tissulaire*</u>

Les LT γδ jouent le rôle de sentinelles des barrières où ils sont des cellules résidentes, formant ainsi la première ligne de défense de l'organisme (Hayday, 2009). Ils sont capables de reconnaitre rapidement des antigènes de stress exprimés à la surface des cellules et des tissus et de les éliminer pour maintenir l'homéostasie des barrières. Ils permettent donc de limiter rapidement la dissémination d'un agent pathogène. Cette action rapide est liée au fait qu'elles n'ont pas besoin de phase de migration et d'expansion clonale. L'expression de ces antigènes de stress ne peut pas être perçue par d'autres cellules

immunitaires, ce qui fait des LT γδ des cellules essentielles pour l'immunité notamment antitumorale. A distance du phénomène aigu, ils jouent aussi un rôle anti-inflammatoire et favorisent la réparation tissulaire comme cela a été montré dans des modèles murins (Carding and Egan, 2002).

Les LT γδ vont ainsi s'activer dans un délai de temps court pour produire des cytokines proinflammatoires et des chémokines permettant de recruter des cellules immunitaires à la fois du système inné, mais aussi de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour activer des cellules immunitaires du système adaptatif. Cette dernière réponse est plus lente à se mettre en place car elle nécessite une phase de différenciation et/ou d'expansion clonale. Cela permet un contrôle rapide de l'agression au niveau du site, ainsi qu'une mise en place de la réponse mémoire en cas de nouvelle agression. Les LT γδ s'intègrent dans cette boucle de manière non redondante. En effet, ils sont capables de reconnaitre des molécules qui ne vont pas être reconnues par les cellules dendritiques, permettant quand même de contrôler tous types d'agressions.

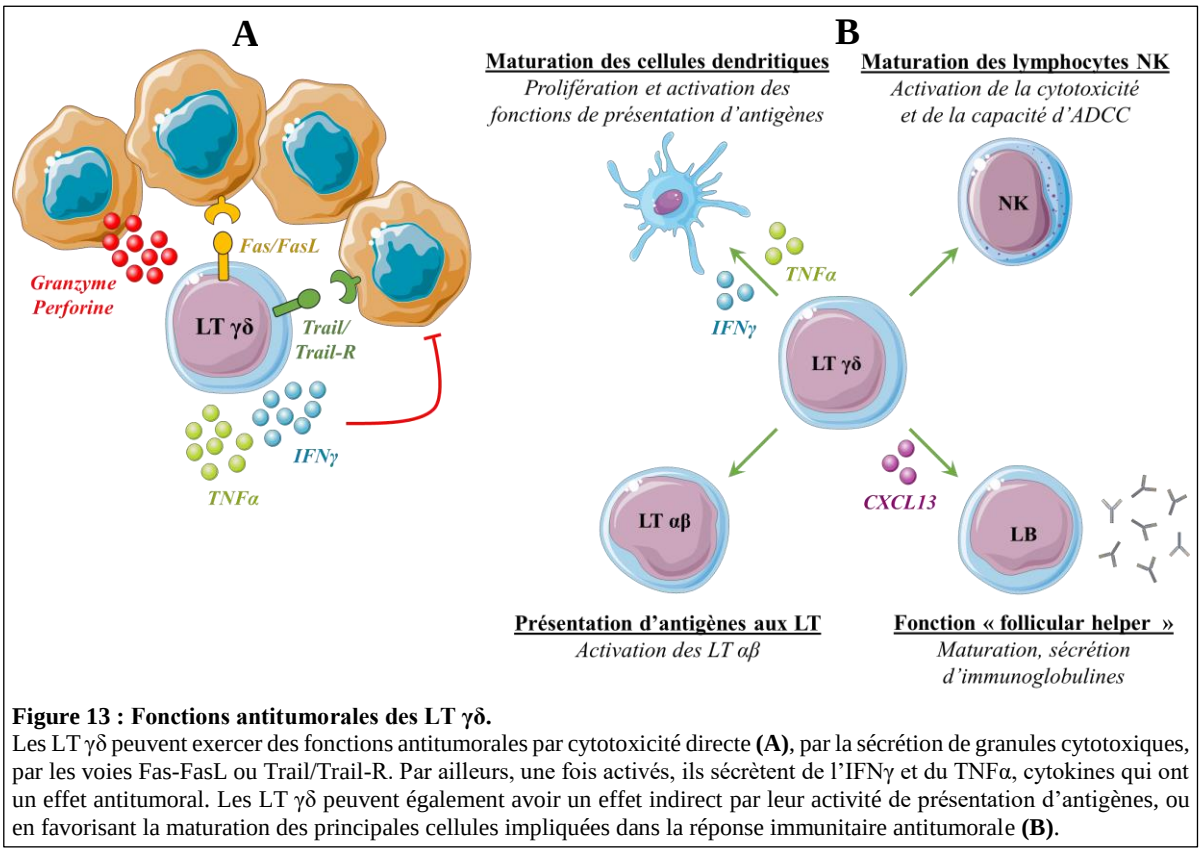


Figure 13 : Fonctions antitumorales des LT γδ.
Les LT γδ peuvent exercer des fonctions antitumorales par cytotoxicité directe **(A)**, par la sécrétion de granules cytotoxiques, par les voies Fas-FasL ou Trail/Trail-R. Par ailleurs, une fois activés, ils sécrètent de l'IFNγ et du TNFα, cytokines qui ont un effet antitumoral. Les LT γδ peuvent également avoir un effet indirect par leur activité de présentation d'antigènes, ou en favorisant la maturation des principales cellules impliquées dans la réponse immunitaire antitumorale **(B)**.

Fonctions cytotoxiques directes (Figure 13A)

Il s'agit de leur principale fonction au niveau des barrières épithéliales, permettant d'éliminer les cellules agressées et de maintenir l'homéostasie. Ils exercent leurs fonctions cytotoxiques par différents mécanismes communs avec d'autres cellules immunitaires. Ainsi, les LT γδ peuvent sécréter des granules cytotoxiques tels que la perforine, la granzyme B ou la granulolysine qui est un puissant agent antibactérien (Qin et al., 2009). Il s'agit de leur principal mode de cytotoxicité. Mais ils peuvent également exprimer à leur surface des ligands tels que FasL, TNFR ou TRAIL (TNF-related Apoptosis Inducing Ligand) reconnus par les récepteurs respectifs, ce qui induit la mort par apoptose de la cellule cible (Silva-Santos et al., 2015). Enfin, ces cellules sont capables d'exercer une activité cytotoxique

indirecte via l'ADCC (Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity) par l'expression du CD16 (Couzi et al., 2012).

Sécrétion de cytokines et de chémokines (Figure 13A)

Les LT γδ vont sécréter différents types de cytokines, certaines proinflammatoires (IFNγ) d'autres anti-inflammatoires (IL-17). Elles vont donc pouvoir avoir des fonctions antagonistes en fonction des informations qu'elles perçoivent de leur environnement.

L'IFNγ est la principale cytokine produite par les LT γδ. Il s'agit d'une cytokine antitumorale, puisqu'elle peut directement inhiber la croissance tumorale et l'angiogenèse (Wu et al., 2014b). Elle va également favoriser l'expression du CMH de classe I par les cellules tumorales, augmentant leur reconnaissance par les LT $CD8^+$ (Gao et al., 2003; Riond et al., 2009). Enfin, l'IFNγ est capable de stimuler la différenciation en macrophages antitumoraux. La différenciation des LT γδ en cellules produisant de l'IFNγ est médiée par l'IL-2 et l'IL-21, associée à une augmentation de l'expression du CD56 et de la réponse cytolytique (Thedrez et al., 2009).

Selon leur polarisation, les LT γδ sont également capables de sécréter de l'IL-17 très rapidement et en grandes quantités, notamment lors d'une infection à *Mycobacterium tuberculosis*. Il a été montré que les LT γδ pouvaient produire très rapidement un certain nombre de cytokines en contexte d'infection, et ce avant même l'apparition des cytokines produites par les LT αβ (Ferrick et al., 1995). Les LT γδ sont les principaux sécréteurs d'IL-17 dans les modèles murins infectieux ou autoimmuns.

Rôle de cellule présentatrice d'antigènes (Figure 13B)

Les LT γδ vont pouvoir également faire le lien entre immunité innée et adaptative par leur faculté à avoir des propriétés de cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, les LT γδ Vγ9Vδ2 humains peuvent exprimer le CMH de classes I et II, des molécules de costimulation comme le CD80, le CD86 ou le CD40, des molécules d'adhésion comme ICAM-1, ou le CCR7 qui joue un rôle dans la migration des cellules vers les ganglions lymphatiques pour activer les LT αβ (Brandes et al., 2005). Ils ont ainsi les mêmes capacités de présentation que les cellules présentatrices habituelles (Himoudi et al., 2012). Néanmoins, leurs propriétés de présentation aux LT αβ $CD8^+$ semblent plus efficaces que celles des cellules dérivant des monocytes (Brandes et al., 2009). Ils vont également surexprimer le CD36, récepteur impliqué dans la récupération de peptides issus des cellules apoptotiques pour leur apprêtement et présentation également exprimé par les cellules dendritiques et les macrophages.

Maturation des cellules dendritiques (Figure 13B)

Les LT γδ peuvent également jouer un rôle indirect sur la présentation d'antigènes en favorisant la maturation des cellules dendritiques. Ainsi, ils vont produire de l'IFNγ ou du TNFα qui vont permettre la différenciation des monocytes en cellules dendritiques au niveau des sites infectieux (Ismaili et al., 2002). Ainsi, la coculture de cellules dendritiques immatures avec des LT γδ stimulés par des phosphoantigènes induit une augmentation de l'expression du CD86 et du CMH de classe I ainsi que la maturation de ces cellules dendritiques en cellules présentatrices d'antigènes (Lo Presti et al., 2016). Ceci nécessite également le contact du LT γδ avec la cellule dendritique via une signalisation CD40/CD40-ligand (Inoue et al., 2012). Ceci permet de favoriser la présentation des antigènes par les cellules dendritiques aux LT αβ. En retour, les cellules dendritiques, une fois maturées, vont augmenter la sécrétion de TNFα par les LT γδ (Devilder et al., 2006).

Rôle dans l'activation des LB grâce à leur fonction « follicular helper » (Figure 13B)

Les LT γδ sont capables d'interagir avec les LB pour favoriser leur activation et leur fonction sécrétrice d'IgA, IgM et IgG. En effet, ils soutiennent la formation de centres germinatifs qui correspondent à l'endroit où se déroulent la sélection et la maturation des LB, et favorisent le phénomène d'hypermutation somatique nécessaire à l'affinité des Ig et la production d'IgE (Zheng et al., 2003). Les LT γδ Vδ2$^+$ synthétisent le CXCL13 après stimulation par le HM-BPP, sous l'influence de l'IL-21 (Vermijlen et al., 2007). Le CXCL13 va interagir avec le CXCR5 des LB, jouant un rôle dans la boucle de rétrocontrôle positif de formation dans les organes lymphoïdes secondaires (Caccamo et al., 2006). L'activation de leurs fonctions « follicular helper » s'associe à l'expression de molécules favorisant la production d'anticorps de haute affinité par les LB (Bansal et al., 2012).

Rôle dans l'activation des lymphocytes NK (Figure 13B)

Enfin, les LT γδ induisent une activation des fonctions cytotoxiques de lymphocytes NK grâce à l'implication du CD137 (4-1BB). Ainsi, il a été montré *in vitro* que ces LT γδ, via l'expression du CD137L, pouvaient activer le CD137 à la surface des cellules NK (Maniar et al., 2010).

2. Rôle paradoxal protumoral des LT γδ

Comme toutes les cellules immunitaires, les LT γδ sont des cellules plastiques qui, selon les signaux perçus du microenvironnement, vont pouvoir avoir des fonctions protumorales. Ces fonctions sont liées à une activité proinflammatoire (polarisation T17 avec sécrétion d'IL-17) et régulatrice (Rei et al., 2015).

a. Observations du rôle protumoral des LT γδ

Ce rôle protumoral a été observé tout d'abord chez la souris, dans plusieurs modèles différents. Il a ainsi été montré que les LT γδ étaient la principale source d'IL-17 dans des modèles murins de fibrosarcome (Wakita et al., 2010). Or l'IL-17 est une cytokine importante protumorale, puisqu'elle favorise le processus de prolifération, angiogenèse et métastase (Yang et al., 2014). Dans ce modèle, les LT γδ T17 circulants provenaient de la tumeur et étaient générés au sein du microenvironnement tumoral par un cocktail cytokinique comprenant l'IL-6, l'IL-23 et le TGFβ. Les LT γδ T17 sont capables, par la sécrétion d'IL-17, de favoriser la croissance tumorale dans plusieurs types de modèles murins, que ce soit le fibrosarcome (Wakita et al., 2010), le carcinome hépatocellulaire (Ma et al., 2014), le cancer ovarien (Rei et al., 2014) ou les métastases pulmonaires (Carmi et al., 2011). Il semble qu'ils s'accumulent plus tardivement dans la maladie, peut-être parce que leur formation est influencée par l'évolution tumorale (Rei et al., 2014). L'IL-17 est également une cytokine immunosuppressive dans le contexte du cancer, puisque dans ces modèles, il a été montré qu'elle induisait la diminution des fonctions cytotoxiques des LT γδ par diminution de l'ARNm de la perforine, mais aussi des lymphocytes T CD8 cytotoxiques qui constituent le premier rempart antitumoral.

Chez l'Homme, leur présence et leur rôle protumoral est moins démontré. Il a été montré, dans le cancer colorectal, que les LT γδ T17 étaient aussi la principale source d'IL-17 (Wu et al., 2014a). L'effraction de la barrière épithéliale intestinale par la tumeur est responsable de l'invasion de bactéries. Ces bactéries vont être digérées par les cellules dendritiques qui ont un profil inflammatoire, afin que les antigènes soient présentés aux cellules immunitaires. Ceci induit la polarisation des LT γδ en T17 qui génèrent une inflammation chronique qui promeut le cancer. L'infiltration de T17 est de plus corrélée à un stade plus avancé de la maladie.

Leur rôle protumoral a également été observé dans le cancer du sein. Ainsi, il a été montré que la présence de LT γδ dans le microenvironnement tumoral était associé à un stade plus avancé de la maladie, une maladie plus agressive avec un envahissement métastatique ganglionnaire plus prononcé (Ma et al., 2012a). Ainsi, leur présence était associée à une moins bonne survie sans rechute et une moins bonne survie globale, il s'agissait donc d'un facteur pronostic indépendant fort. Cet infiltrat était corrélé positivement à l'expression de FoxP3 et négativement à l'infiltrat CD8. De même, il a été possible *in vitro* d'induire l'expression de Foxp3, facteur de transcription associé à un phénotype régulateur, grâce à un cocktail cytokinique comprenant du TGFβ et de l'IL-15 (Casetti et al., 2009; Rezende et al., 2015). Ces LT γδ générés *in vitro* avaient des caractéristiques phénotypiques similaires aux LT régulateurs non LT γδ, puisqu'ils exprimaient le CD25, le CTLA-4 et GITR (Glucocorticoid-Induced TNFR family-Related protein), qui jouent un rôle majeur dans l'inhibition de la prolifération des LT $CD4^+$ (Hua et al., 2013). La tumeur va également pouvoir induire la différenciation des LT γδ en cellules régulatrices par la sécrétion de CXCL10 (Ye et al., 2013a). Dans le cancer du sein, ces les γδ retrouvés dans des biopsies de cancers du sein étaient capables d'inhiber la prolifération des LT naïfs et effecteurs, de bloquer la production d'IL-2 par les CD4 et les CD8 (Peng et al., 2007). Ces résultats ont été confirmés dans des tumeurs de patients, où les LT γδ régulateurs induisaient la sénescence des LT naïfs et effecteurs (Ye et al., 2013b). Ainsi, ils induisaient un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, une diminution de l'expression des molécules de costimulation que sont CD27 et CD28, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion de cytokines connues pour être immunosuppressives comme le TGFβ. Ces cellules sénescentes induisent l'inhibition des cellules naïves. Les LT γδ régulateurs produisent aussi de l'IL-4 et de l'IL-10 et semblent avoir un effet immunosuppresseur *in vitro* plus fort que les CD4 régulateurs (Kühl et al., 2009). Par cette sécrétion, les LT γδ vont également pouvoir contrôler l'expansion des lymphocytes T $CD8^+$ et permettre le recrutement des monocytes et des neutrophiles protumoraux (Beetz et al., 2008; Rhodes et al., 2008). De plus, ces LT γδ induisent, sur les cellules dendritiques, une diminution de l'expression du CD83, confirmant leur caractère sénescent avec problèmes de maturation. Ces cellules dendritiques ont également une diminution du CD80, du CD86 et de HLA-DR, une augmentation de l'expression du PD-L1, favorisant la sénescence des LT, et sécrètent moins d'IL-6, IL-12 et TNFα. Les cellules dendritiques ont donc un défaut de maturation et de signaux de costimulation, avec une altération de leurs capacités de présenter l'antigène. Ces résultats ont été retrouvés dans d'autres modèles tumoraux humains, notamment dans le cancer du pancréas, où l'infiltrat en LT γδ est associé à un pronostic défavorable, une tumorigénèse accrue, un infiltrat moindre en LT CD4 et CD8 et avec un profil anergique des LT (Daley et al., 2016).

b. Mécanismes d'action de leur effet protumoral (Figure 14)

Tout d'abord, les LT γδ T17 vont avoir un effet protumoral direct, via la sécrétion de facteurs proangiogéniques qui permettent de favoriser la prolifération tumorale et la néoangiogénèse, tels que le VEGF. Ainsi, dans les modèles murins, l'absence d'IL-17 était associée à une moindre vascularisation tumorale (Wakita et al., 2010). L'IL-17 augmente ainsi la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse, tels qu'*Ang-2* et *VEGFA*. Chez l'Homme, ce rôle proangiogénique de l'IL-17 a été démontré dans les carcinomes des voies biliaires (Patil et al., 2016). De même, dans l'ovaire, les macrophages recrutés par l'IL-17 sont associés à un phénotype proinflammatoire avec la sécrétion de l'IL-1β, l'IL-6, le TGFβ, CXCL1 et CXCL18, mais aussi proangiogénique avec l'expression de *VEGFA* et *Tie2* qui est un facteur proangiogénique fort dans les monocytes et macrophages (Rei et al., 2014). Ces macrophages exprimant *Tie2* ont un tropisme particulier pour la cavité péritonéale, favorisant ainsi les phénomènes de métastases.

Les LT γδ T17 vont également avoir un rôle majeur dans le recrutement de cellules immunosuppressives, au premier rang desquelles on trouve les MDSC (Myeloid-Derived Suppressive Cells). Ainsi, dans le cancer du côlon, il a été montré que l'IL-17 induisait la sécrétion de cytokines telles que l'IL-8, le TNFα et le GM-CSF, qui vont permettre l'accumulation de MDSC (Wu et al., 2014a). Ceci a été également montré dans le carcinome hépatocellulaire (Ma et al., 2014), où l'IL-17 semble sécrétée suite à la production par les cellules tumorales de CXCL5, qui va se fixer sur CXCR2 et recruter les MDSC. Les MDSC vont à leur tour sécréter de l'IL-1β et de l'IL-23 pour favoriser la polarisation T17 des LT γδ dans une boucle de rétrocontrôle positif.
De plus, l'IL-17 favorise également le recrutement des PNN, ainsi que leur expansion et leur polarisation en phénotype protumoral sous l'influence du G-CSF (Coffelt et al., 2015). Ces PNN inhibent les capacités cytotoxiques des $CD8^+$, favorisant ainsi le processus de métastases ganglionnaires et pulmonaires (Sabbione et al., 2014). L'inhibition des CD8 semble passer par la sécrétion d'iNOS comme cela a été démontré dans le mélanome (Douguet et al., 2016). Ces PNN inhibent aussi les LT γδ antitumoraux circulants (Kalyan et al., 2014).

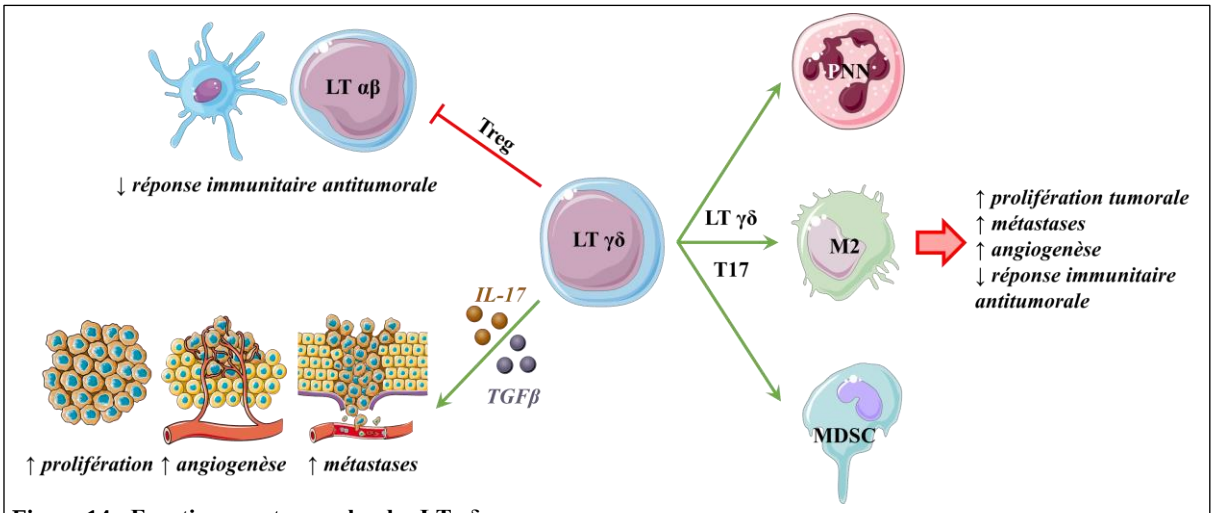


Figure 14 : Fonctions protumorales des LT γδ.
Les LT γδ peuvent avoir un phénotype protumoral via un effet direct sur les cellules tumorales en favorisant la croissance tumorale, l'angiogenèse et le processus métastatique. De plus, leur polarisation en T régulateurs ou en T17 sécrétant de l'IL-17 va inhiber les cellules immunitaires antitumorales, favoriser la tumorigénèse et induire une polarisation protumorale des cellules du système immunitaire.

Certains LT γδ protumoraux, ayant un phénotype régulateur ($FoxP3^+$), vont avoir un effet immunosuppresseur sur différentes populations immunitaires. Ainsi, comme rapporté précédemment, ces LT γδ régulateurs vont être en capacité d'inhiber les LT αβ en inhibant la prolifération des LT naïfs et effecteurs, en inhibant leur sécrétion d'IL-2, et induisent un phénotype sénescent. Ces LT γδ régulateurs ont un effet positif sur le recrutement de cellules myéloïdes et neutrophiles immunosuppresseurs, afin de créer un environnement fortement protumoral. Enfin, les LT γδ induisent la sénescence des cellules dendritiques, via une diminution de leur capacité à maturer et à présenter l'antigène.

Enfin, les LT γδ protumoraux vont être capables de sécréter du TGFβ, une cytokine fortement immunosuppressive, et de l'IL-17 en l'absence de polarisation T17, ce qui favorise la prolifération tumorale, l'angiogenèse et la transition épithélio-mésenchymateuse (Yang and Weinberg, 2008).

3. Plasticité des LT γδ

Comme toutes les cellules immunitaires, les LT γδ sont des cellules plastiques. Ainsi, il a été montré *in vitro* que la culture des LT γδ humains naïfs dans des milieux enrichis de différentes cytokines pouvait conduire à leur polarisation vers différents phénotypes (Lafont et al., 2014). Elles sont ainsi sous l'influence du microenvironnement tumoral. Ceci explique pourquoi les LT γδ peuvent avoir un impact positif ou négatif sur la réponse immunitaire antitumorale en fonction des localisations tumorales et/ou des stades tumoraux. Plusieurs cytokines ou molécules non cytokiniques ont été identifiées comme impliquées dans cette plasticité.

g. Les LT γδ comme cible thérapeutique dans le cancer

1. Rationnel

Ces cellules sont intéressantes à utiliser comme cible en thérapie, car, comme discuté plus haut, elles jouent un rôle majeur dans l'immunosurveillance antitumorale. Elles infiltrent de manière importante un certain nombre de tumeurs (Tosolini et al., 2017), et cette infiltration semble, selon les localisations tumorales, avoir un effet pronostic positif (Gentles et al., 2015a; Meraviglia et al., 2017). De plus, elles reconnaissent les antigènes exprimés par les cellules stressées ou tumorales de manière indépendante du CMH, ce qui permet de les rendre indépendantes de l'un des mécanismes de résistance à l'immunité antitumorale qui est la sous-expression du CMH. La reconnaissance de l'antigène par le TCR est également moins spécifique que pour les LT αβ, du fait d'une chaine moins longue, ce qui leur permet à la fois le ciblage de tumeurs à faible charge mutationnelle, mais aussi d'être indépendantes d'un autre mécanisme de résistance à l'immunité antitumorale qui est la mutation de l'épitope. Par ailleurs, elles sécrètent beaucoup d'IFNγ, qui est la cytokine antitumorale principale. Les cytokines sécrétées vont également pouvoir activer d'autres cellules impliquées dans la réponse immunitaire antitumorale, telles que les macrophages, les cellules dendritiques ou les LT $CD8^+$. Leur activité antitumorale a été démontrée dans plusieurs modèles murins de types tumoraux différents (cancers du sein, de la prostate, de l'ovaire, le mélanome, des lymphomes et leucémies). Enfin, ils peuvent être facilement activés par l'administration de bisphosphonates *in vivo* ou *in vitro* (Dieli et al., 2003). Ceci les rend intéressantes pour élargir le spectre d'efficacité des immunothérapies.

Les LT γδ ont ainsi été utilisés dans de nombreux essais cliniques en particulier en thérapie cellulaire adoptive (Hannani et al., 2012). Plusieurs stratégies peuvent être utilisées (Chitadze et al., 2017) : le transfert adoptif de LT γδ expandus (et activés) *ex vivo*, ou l'augmentation de leur activation *in vivo* par administration d'adjuvants. Malgré les résultats encourageants, il existe une variation importante d'efficacité selon les tumeurs, plusieurs protocoles différents de stimulation et de délivrance de l'immunothérapie (injection d'IL-2 *in vivo*, ou intraveineuse, ou sous-cutanée, ou expansion *ex vivo*…) expliquant la variabilité des résultats entre les essais.

2. Expansion ex vivo des LT γδ autologues avant leur réinjection

L'objectif était pour la plupart de les expandre *ex vivo* et de les activer avant de les réinjecter aux patients atteints d'un cancer, avec pour certains une stimulation *in vivo* par bisphosphonates et/ou IL-2 (Tableau 1). Ce sont les LT γδ Vγ9Vδ2 qui ont été uniquement étudiés, du fait de la facilité d'accessibilité des cellules par prélèvement sanguin simple et surtout de la possibilité de les activer in vivo ou ex-vivo avec des phosphoantigènes. Cette stratégie de transfert adoptif a été utilisée dans 11 essais thérapeutiques avec des taux de contrôle de la maladie compris entre 24% et 75%. Elle est

intéressante car les toxicités restent acceptables, elle ne nécessite pas de conditionnement myéloablatif des patients contrairement aux greffes de cellules souches hématopoïétiques, et elle a permis d'obtenir des réponses durables dans plusieurs types de cancers. Néanmoins, la plupart des patients ont progressé par la suite. Ceci est probablement lié au fait que les Vδ2$^+$ font plus d'AICD (Activation-Induced Cell Death) et persistent moins longtemps dans le sang que les Vδ1, permettant une réponse immunitaire antitumorale moins durable (Siegers and Lamb, 2014). De plus, il s'agit d'une technique longue et potentiellement coûteuse, avec des résultats limités. Elle ne peut donc pas s'inscrire dans la prise en charge de tumeurs agressives d'évolution rapide.

Tableau 1 : Principales études cliniques ayant utilisé la stimulation *ex vivo* des LT γδ autologues en thérapie anticancéreuse.

Etude	Traitements administrés	Cancer	N	Réponses obtenues
Bennouna et al. Cancer Immunol Immunother 2008	BrHPP	Rein	10	60% stabilisations
Abe et al. Exp Hematol 2009	Bisphosphonates	Myélome	6	66% stabilisations
Nakajima et al. J Cardiothorac Surg 2010	Bisphosphonates	Poumon	10	30% stabilisations
Kobayashi et al. Cancer Immunol Immunother 2011	Bisphosphonates et BrHPP	Rein	11	9% réponses complètes 45% stabilisations
Kobayashi et al. Cancer Immunol Immunother 2007	2M3B1PP	Rein	7	43% réponses
Nicol et al. Br J Cancer 2011	Bisphosphonates	Tumeurs solides	18	25% réponses 16% stabilisations
Noguchi et al. Cytotherapy 2011	Bisphosphonates	Tumeurs solides	25	12% réponses partielles 12% stabilisations
Sakamoto et al. J Immunother 2011	Bisphosphonates	Poumon	15	40% stabilisations
Cui et al. Int J Cancer 2014	Cytokines et radiofréquence	CHC	6	Allongement survies globale et sans progression
Wada et al. Cancer Med 2014	Bisphosphonates et LT γδ injectés en intrapéritonéal	Estomac	7	Diminution de l'ascite chez 2/7 patients
Aoki et al. Cytotherapy 2017	Chimiothérapie (gemcitabine) et bisphosphonates	Colon	28	Pas de différence en survie, mais plus de LT γδ chez les patients sans rechute
Izumi et al. Cytotherapy 2013	Bisphosphonates	Colon	6	83% réponses

3. Stimulation in vivo des LT γδ

Toutes les études ont ciblé les LT Vγ9Vδ2 en utilisant soit des phosphoantigènes soit des aminobiphosphonates. La première étude à avoir démontré un intérêt clinique a été celle de Wilhelm dans le myélome multiple (Wilhelm et al., 2003a) (Tableau 2). Les patients (n=19) ont reçu de faibles doses d'IL-2 associées au pamidronate, un bisphosphonate. La première partie de la cohorte (n=10) a reçu le traitement avec des doses croissantes d'IL-2, ne permettant pas d'obtenir de réponse tumorale. En revanche, dans la seconde partie, les patients étaient sélectionnés sur la réactivité aux bisphosphonates des LT γδ prétestés *in vitro*. Dans cette cohorte, une activation a été retrouvée chez 55% des patients avec des taux de réponses cliniques de 33%. De plus, le traitement était bien toléré.

Néanmoins, il y avait peu de réponses prolongées observées, du fait d'une persistance insuffisante des LT γδ dans le sang comme discuté plus haut, et par le fait que les bisphosphonates sont des molécules qui sont rapidement et massivement captées par les os, limitant leur biodisponibilité.

Une phase I a par ailleurs été réalisée chez 18 patients atteints d'un cancer de la prostate métastatique résistant à la castration (Dieli et al., 2007). Dans le groupe de patients recevant le zoledronate avec l'IL-2 à faibles doses en sous-cutané, une meilleure survie a été observée, corrélée à un nombre plus important de LT γδ et un profil plutôt en lien avec une sécrétion importante d'IFNγ. De même, dans le cancer du sein, une phase I a été effectuée évaluant le zolédronate avec de faibles doses d'IL-2 en sous-cutané (Meraviglia et al., 2010). Cette combinaison thérapeutique a permis une expansion des LT Vγ9Vδ2 et a été bien tolérée, avec des taux de contrôle de la maladie de 30%.

Tableau 2 : Principales études cliniques ayant utilisé la stimulation *in vivo* des LT γδ autologues en thérapie anticancéreuse.

Etude	Traitements administrés	Cancer	N	Réponses obtenues
Wilhelm et al. Blood 2003	Bisphosphonates	Hémopathies lymphoïdes	19	16% réponses partielles 16% stabilisations
Dieli et al. Cancer Res 2007	Bisphosphonates	Prostate hormono-résistant	18	16% réponses partielles 27% stabilisations
Bennouna et al. Cancer Immunol Immunother 2010	BrHPP	Rein, gynécologie, digestif	28	42% stabilisations
Meraviglia et al. Clin Exp Immunol 2010	Bisphosphonates	Sein	10	10% réponses partielles 20% stabilisations
Lang et al. Cancer Immunol Immunother 2011	Bisphosphonates	Rein	12	16% stabilisations
Kunzmann et al. J Immunother 2012	Bisphosphonates	Rein, mélanome, LAM	21	9% réponses 16% à 42% stabilisations
Pressey et al. Medicine 2016	Bisphosphonates	Neuroblastome	4	25% stabilisations

Au-delà de l'utilisation des bisphosphonates, il est également possible de stimuler les LT γδ en utilisant le phosphostim ou BrHPP. Ainsi, il a été évalué chez 28 patients atteints de carcinomes rénaux, en association à de faibles doses d'IL-2 en sous-cutané (Bennouna et al., 2010). Il a ainsi été observé une expansion des LT γδ chez ces patients traités. C'est pourquoi une phase II a été développée chez les patients atteints d'un lymphome folliculaire en rechute (Gertner-Dardenne et al., 2009). Le traitement a permis une expansion des LT Vγ9Vδ2 chez près de 9 patients sur 10, dans la semaine qui a suivi l'administration du traitement. Néanmoins, malgré la poursuite des injections, le taux a diminué progressivement, signifiant une difficulté à maintenir des taux élevés de LT Vγ9Vδ2.

D'autres stratégies existent afin d'améliorer l'activité antitumorale des LT γδ. Ainsi, il est possible d'utiliser leur fonction d'ADCC pour améliorer leur effet antitumoral, en générant des anticorps bispécifiques permettant par exemple de cibler le récepteur CD16 sur le LT γδ et Her2 sur les cellules tumorales mammaires (Capietto et al., 2011). Ceci permet ainsi d'inhiber la prolifération tumorale de manière plus importante et d'augmenter l'infiltration par des LT γδ dans la tumeur dans des modèles murins de cancers du sein surexprimant Her2. D'autres stratégies ont été développées. L'une d'entre elles consiste à augmenter l'expression des ligands de récepteurs costimulateurs par des modifications

épigénétiques, comme c'est le cas en utilisant des inhibiteurs d'HDAC (5-azacytidine ou acide valproïque pour le NKG2D), ou le témozolomide dans le glioblastome (Chitadze et al., 2016; Suzuki et al., 2010). Enfin, une autre stratégie a été de tenter de diminuer le contexte immunosuppresseur, notamment en inhibant l'axe PD-1/PD-L1 ou en bloquant la COX2, ce qui diminue la formation de PGE2 par les cellules tumorales (Gonnermann et al., 2015).

Néanmoins, les essais impliquant ces cellules ont uniquement utilisé les LT Vγ9Vδ2, majoritaires dans le sang, même si ce ne sont pas les principales cellules infiltrant les tumeurs. Elles ne sont pas présentes chez les souris, limitant son évaluation dans des modèles murins à des modèles de souris immunodéficientes avec xénogreffes. De plus, ces thérapies semblent efficaces sur les LT Vγ9Vδ2 avec des résultats en clinique qui restent limités, du fait d'un épuisement rapide des LT (anergie induite par une stimulation antigénique répétée) et de l'induction de la mort cellulaire liée à l'activation de la cellule (Fournié et al., 2013). Ainsi, la durée de vie périphérique de ces LT γδ était trop faible et la diminution des taux périphériques de ces cellules induisait une progression de la maladie, alors que les patients qui conservaient les cellules gardaient une bonne réponse clinique. Enfin, leur efficacité sur les LT $V\delta2^-$ n'a pas été évaluée, alors que ces cellules sont majoritaires dans les tissus et sont probablement au centre de la réponse immunitaire antitumorale. La pénétration tissulaire des drogues suscitées n'est pas connue, donc leur efficacité sur cette sous-population tissulaire est inconnue. Tous ces éléments expliquent pourquoi ces essais, même prometteurs, n'ont pas permis d'obtenir d'indication en routine.

4. Nouvelles approches ciblant les LT γδ (Sebestyen et al., 2019)

Afin d'améliorer l'efficacité thérapeutique des LT γδ, plusieurs stratégies nouvelles ont été développées. Ces stratégies ne visent plus uniquement à cibler les $V\delta2^+$ mais utilisent également les $V\delta2^-$. Devant le manque d'efficacité du recrutement des LT γδ avec les bisphosphonates, d'autres stratégies reposant sur les LT γδ résidants dans les tissus sont en cours d'étude. Ainsi, l'utilisation d'anticorps bispécifiques ciblant à la fois le TCR γδ et l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) exprimé par les cellules tumorales semble prometteuse, permettant un ciblage précis de la tumeur et des LT γδ, limitant potentiellement les toxicités (de Bruin et al., 2017). L'injection intratumorale des LT γδ peut également être un moyen de contourner les difficultés à recruter ces cellules au site de la tumeur. Ces LT γδ peuvent alors être modifiés pour être rendus chimiorésistants, permettant l'association d'une chimiothérapie à cette immunothérapie. C'est ce qui a été testé dans le glioblastome, tumeur exprimant des ligands du NKG2D pouvant être reconnus par les LT γδ (Lamb et al., 2013). De plus, le témozolomide, molécule de chimiothérapie classiquement utilisée dans ce type de tumeur, augmente l'expression des ligands du NKG2D par la tumeur dans des modèles *in vivo*, les rendant plus sensibles à la lyse par les LT γδ. La modification génétique des LT γδ pour les rendre résistants à cette chimiothérapie permettait *in vitro* d'augmenter la lyse tumorale.

D'autres équipes ont tenté d'améliorer l'efficacité antitumorale en enrichissant les cellules transférées en Vδ1, en réalisant une expansion *ex vivo* en présence d'IL-4 et d'agonistes du TCR et une différenciation sous le contrôle de l'IL-15 (Almeida et al., 2016). Ces cellules ont alors pour particularité d'exprimer de manière plus importante les récepteurs de l'immunité innée tels que le NKG2D, DNAM1, NKp30 et NKp44, récepteurs essentiels à l'activité cytolytique (Correia et al., 2011).

Les résultats intéressants obtenus avec les CAR T-cell à partir des LT αβ ont poussé à développer cette stratégie avec des LT γδ. Les LT γδ utilisés sont principalement des Vδ2 du fait de

leur grande abondance et la facilité de collecte. Cette approche semble intéressante en termes d'efficacité mais surtout de tolérance, avec probablement un taux moindre de syndromes de relargage cytokinique, comme observé avec les cellules NK (Li et al., 2018b). Enfin, les avancées en termes d'engineering cellulaire ont permis de développer des LT αβ qui expriment le TCR γδ après transduction virale, permettant de combiner les capacités prolifératives et de mémoire des LT αβ et l'activité antitumorale des LT γδ par reconnaissance d'un large panel d'antigènes. Ceci permettrait de contourner les écueils liés à l'injection de LT γδ, à savoir leur persistance faible, leurs faibles capacités prolifératives et leur transformation en LT γδ sécrétant de l'IL-17, qui joue un rôle protumoral. Cette stratégie est actuellement testée en phase I chez les patients atteints d'hémopathies en rechute (NTR6541).

h. Conclusion

L'immunothérapie anticancéreuse connait actuellement un essor important avec des résultats encourageants dans certains types de cancers. Néanmoins, un certain nombre de cancers ne sont pas sensibles aux immunothérapies actuelles, et pour ceux qui le sont, seule une petite proportion de patients répond à ces traitements. De plus, les biomarqueurs permettant de sélectionner les patients susceptibles de répondre ne sont pas encore bien identifiés. Or ces traitements sont potentiellement toxiques du fait de la levée de mécanismes d'inhibition de l'auto-immunité, mais également coûteux. En conséquence, cela revient à exposer beaucoup de patients à des traitements inefficaces voire toxiques. Il existe donc actuellement un besoin urgent de trouver des biomarqueurs prédictifs de réponse, mais aussi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques de l'immunité antitumorale qui pourraient sensibiliser le microenvironnement aux inhibiteurs actuels, afin d'améliorer la survie des patients atteints d'un cancer.

Parmi les nouvelles cibles à l'étude, les LT γδ, par leur fonction d'immunosurveillance au sein des épithéliums et leur forte infiltration tissulaire, constituent une cible prometteuse, seule ou en association avec des chimiothérapies ou d'autres immunothérapies. Contrairement aux LT αβ, leurs fonctions ainsi que la régulation de leur activation sont mal connus. Il existe donc encore beaucoup de choses à comprendre pour permettre d'utiliser de manière optimale les LT γδ en thérapie anticancéreuse. L'activation *in vivo* des LT γδ semble être la voie la plus simple et la plus prometteuse. Cette activation a pour le moment été développée en administrant des molécules exogènes synthétiques, qui n'activent que les Vγ9Vδ2. Mais la meilleure compréhension des mécanismes d'activation des LT γδ, et particulièrement des LT γδ Vδ2 négatifs, et des différents hallmarks du cancer a permis d'identifier plusieurs voies impliquées dans la régulation de l'activation des LT γδ. La première est représentée par la voie de l'inflammasome au sein des épithéliums sains, qui produit de l'IL-18, cytokine puissante ayant une activité proinflammatoire importante. La seconde voie correspond à celle du métabolisme tumoral, qui est un hallmark émergent mais néanmoins majeur puisqu'il contrôle à la fois les fonctions de la cellule tumorale, mais aussi la polarisation et l'activation des cellules immunitaires. Les métabolites induits par les modifications du métabolisme tumoral, une fois relargués dans le microenvironnement tumoral, semblent avoir un rôle immunomodulateur sur certaines sous-populations immunitaires. De plus, les modifications du métabolisme induisent un stress cellulaire et l'expression par la cellule tumorale d'antigènes de surface qui pourront être reconnus par les LT γδ. Dans ce projet, nous avons donc exploré ces 2 voies de régulation de l'activation des LT γδ afin d'évaluer leur potentielle utilisation en thérapie anticancéreuse, en gardant à l'esprit que le métabolisme tumoral joue un rôle central puisqu'il est capable de moduler l'activation de l'inflammasome.

III. La voie de l'inflammasome et de la production de l'IL-18

La première description de l'inflammasome remonte à 2002, par F. Martinon et J. Tschopp (Martinon et al., 2002a). L'inflammasome correspond à une structure cytosolique de l'immunité innée jouant un rôle majeur dans la détection et l'élimination du danger (infection et/ou stress cellulaire). La détection du danger met en jeu des récepteurs particuliers exprimés principalement dans les lignées myéloïdes (macrophages, cellules dendritiques et polynucléaires) (Guarda et al., 2011) mais aussi dans les cellules lymphoïdes et en particulier dans les lymphocytes T $CD4^+$ (Arbore et al., 2016). Néanmoins, l'expression de l'inflammasome n'est pas exclusive aux cellules hématopoïétiques, puisqu'on en retrouve certains également exprimés dans les cellules épithéliales (Takeuchi and Akira, 2010), en particulier au niveau des épithéliums à l'interface entre l'hôte et l'environnement, participant ainsi à l'intégrité des barrières et à la défense de l'organisme contre les agressions extérieures. Les constituants de l'inflammasome vont être exprimés et activés en réponse à une agression, afin d'activer une voie de signalisation aboutissant à une réponse immunitaire cytokinique permettant l'activation et le recrutement de cellules de l'immunité adaptative.

a. Récepteurs de l'immunité innée et signaux de danger

Les agressions sont détectées par les cellules de l'immunité innée et les cellules épithéliales grâce à des récepteurs particuliers exprimés de façon constitutive et leur permettant de jouer un rôle de sentinelle. Ces récepteurs correspondent aux Pattern Recognition Receptors (PRR). Les PRR sont présents dans l'organisme pour détecter le plus précocement possible des modifications des conditions homéostasiques qui pourraient induire un état pathologique délétère pour l'hôte, et y mettre fin. Les PRR sont des molécules redondantes, puisque plusieurs PRR peuvent reconnaitre le même agent mais de manière différente. Il en existe plusieurs types : les NOD-Like Receptors (NLR), les Toll-like receptors (TLR), les récepteurs aux lectines de type C (CLR) et les récepteurs de type RIG-I (RLR). Les TLR et CLR sont transmembranaires alors que les RLR et les NLR sont cytosoliques.

Ces récepteurs sont capables de détecter des signaux de danger correspondant aux PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) ou aux DAMPs (Danger-Associated Molecular Patterns). Les PAMPs sont des motifs moléculaires caractéristiques des micro-organismes, tels que les éléments des parois bactériennes (peptidoglycanes, lipopolysaccharides), les flagelles bactériens (flagelline), les acides nucléiques viraux ou les mannanes constituant la paroi fongique.
Les DAMPs sont des signaux de danger libérés par les cellules altérées par une agression d'origine physique, chimique, thermique ou lors de la transformation cancéreuse, et qui ne devraient normalement pas se retrouver dans le milieu extracellulaire. C'est le cas de l'ATP, les cristaux d'acide urique et de cholestérol, les acides gras saturés, l'ADN simple et double brin, les protéines du choc thermique, HMGB1 (High–Mobility Group Box 1, protéine constitutive de la chromatine)…

b. Les constituants de l'inflammasome

L'inflammasome est composé par l'assemblage de certains des PRR décrits précédemment, et en particulier les NLR. Il existe 22 NLR chez l'Homme et 34 chez la souris, avec des équivalents chez les plantes. Les NLR sont constitués de différents éléments caractéristiques (Figure 15A).

Tout d'abord, tous les NLR ont un domaine central NOD, ou NACHT (Nucleotide binding and Oligomerization Domain). Ce domaine joue un rôle dans la reconnaissance des récepteurs entre-eux afin de permettre leur assemblage. Leur oligomérisation dans cette plateforme nécessite de l'ATP et c'est pour cette raison que le domaine NOD est porteur d'une activité ATPase. Les NLR ont également un nombre variable de motifs LRR (Leucine-Rich Repeat) en C-terminal de la protéine. Le domaine C-terminal des NLR a une fonction régulatrice puisque, dans certains cas, il joue le rôle de senseur cytosolique du ligand avec lequel il va interagir. Les mécanismes impliqués dans ce recrutement et cette liaison sont encore mal connus. En revanche, les NLR différent par leur extrémité N-terminale, qui permet de les séparer en différentes sous-familles (Lamkanfi and Dixit, 2014; Latz et al., 2013) :

- les NLRC qui contiennent un ou plusieurs domaine(s) effecteur(s) CARD (Caspase-Activating Recruitment Domain) : NOD1, NOD2, NLRC3, NLRC4 et NLRC5. Le domaine CARD permet une interaction homotypique avec le domaine CARD de la pro-caspase-1, sans nécessiter la présence de la protéine adaptatrice ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD).
- les NLRP porteurs d'un domaine PYD (PYrin Domain). Ils sont notés de NLRP1 à NLRP14. Ces NLRP ne sont pas porteurs d'un domaine CARD mais d'un domaine PYD qui permet l'interaction homotypique avec le même motif porté par la protéine adaptatrice ASC. Cette dernière fera l'intermédiaire entre le NLR et la pro-caspase-1. Néanmoins, NLRP1, qui a été le premier NLR à être identifié par immunoprécipitation, présente pour particularité d'être porteur, en C-terminal, d'un domaine FIIND (Function to Find) et d'un domaine CARD. Le rôle du domaine FIIND n'est pas clairement élucidé.
- AIM2 (Absent In Melanoma 2) appartient à la famille IFI16, porteur d'un domaine PYD en N-terminale et d'un domaine HIN-200 en C-terminal. Il nécessite donc l'interaction avec ASC pour recruter la pro-caspase-1.
- 3 familles plus minoritaires : NLRX (NLRX1), NLRA (CIITA) et NLRB (NAIP).

Comme dit précédemment, certains NLR ne peuvent pas directement interagir avec la pro-caspase-1 du fait de l'absence de domaine CARD. La protéine ASC joue donc le rôle d'intermédiaire. C'est une protéine adaptatrice de 22 kDa, composée d'un domaine PYD en N-terminal et d'un domaine CARD en C-terminal (Srinivasula et al., 2002). Le domaine PYD interagit avec le NLR, ce qui permet le démasquage de son domaine CARD qui va se lier avec son homologue sur la pro-caspase-1. La procaspase-1, une protéase à cystéine, est synthétisée sous une proforme inactive de 45 kDa. Elle porte un domaine CARD en N-terminal qui se lie de manière homotypique au domaine CARD des NLR ou de la protéine adaptatrice ASC. En C-terminal, elle présente un domaine catalytique formé de 2 sous-domaines : la sous-unité courte p10 et la sous-unité longue p20. Les sous-unités catalytiques nécessitent un clivage protéolytique pour être libérées et activées, clivage dépendant de la mise en place de l'inflammasome dans le cytosol.

La pro-IL-1β est exprimée sous la forme d'un précurseur inactif de 31 kDa, uniquement en cas de phénomène inflammatoire. Néanmoins, pour sa liaison à son récepteur, elle doit être clivée en sa forme activée correspondant à une sous-unité de 17 kDa (Afonina et al., 2015). La caspase-1 va l'activer en la clivant à 2 endroits distincts, permettant la libération de 2 parties : la forme mature de 17 kDa et une partie de 26 kDa dont la fonction n'est pas connue. Contrairement à la pro-IL-1β, la pro-IL-18 est synthétisée de manière constitutive, et son niveau d'expression va dépendre des stimuli

environnementaux. Elle est synthétisée sous une proforme de 24 kDa, inactive, qui va être clivée par la caspase-1 en sa forme active de 17 kDa.

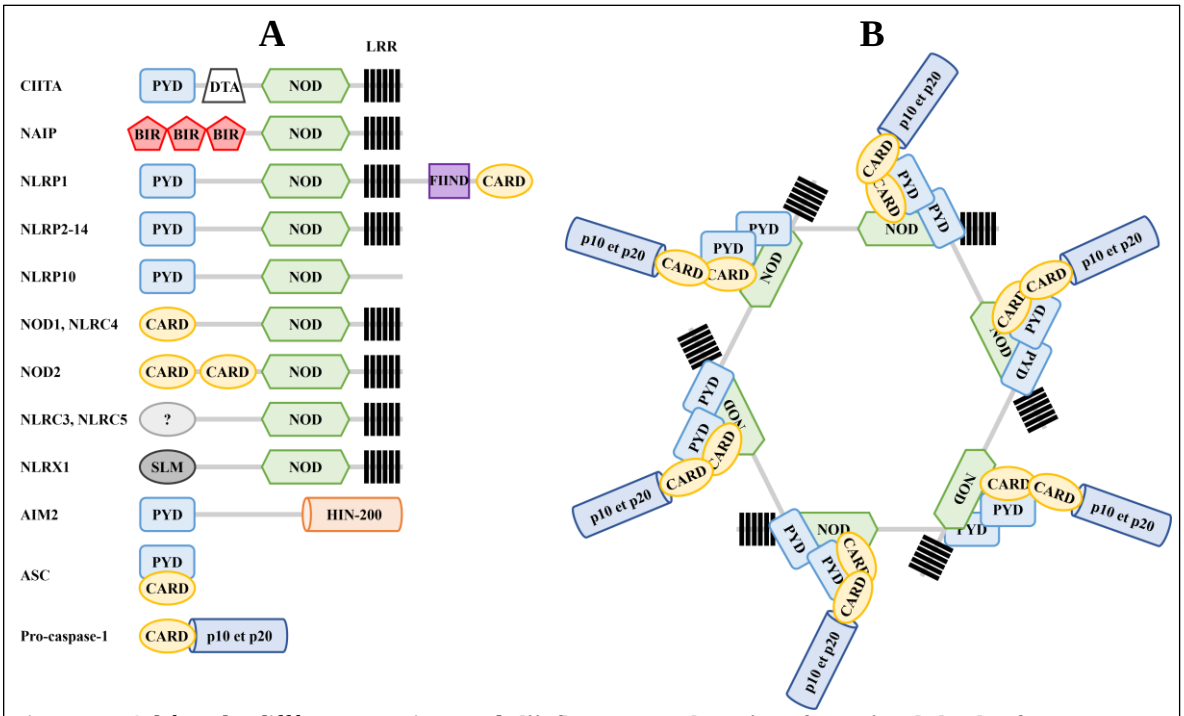


Figure 15 : Schéma des différents constituants de l'inflammasome humain et formation de la plateforme.
A : Structure des différentes familles constituant l'inflammasome : NLRA (CIITA), NLRB (NAIP), NLRP (NLRP1 à NLRP14), NLRC (NLRC3 à NLRC5, NOD1 et NOD2), AIM2, la protéine adaptatrice ASC et la caspase-1.
B : Formation de la plateforme de l'inflammasome. Ici, l'exemple de NLRP3, qui nécessite la protéine adaptatrice ASC pour recruter la caspase-1.
BIR : Baculovirus Inhibitory Repeat ; DTA : domaine de transactivation acide ; CARD : Caspase-Activating Recruitment Domain ; FIIND : Function to Find ; LRR : Leucine-Rich Repeat ; NOD : Nucleotide binding and Oligomerization Domain ; PYD : Pyrin Domain ; SLM : signal de localisation mitochondrial

c. Modalités d'activation de l'inflammasome

1. Assemblage de l'inflammasome

Tous les NLR ne sont pas impliqués dans la constitution de l'inflammasome, et seuls AIM2, NAIP/NLRC4, NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP7, NLRP9 et PYRIN le peuvent. Chaque inflammasome est activé par un stimulus différent (Zhao and Shao, 2015). Une fois le signal activateur détecté, la plateforme de l'inflammasome se met en place dans le cytosol par interaction entre les domaines NOD des NLR. La plateforme va alors recruter les pro-caspase-1, soit directement par interaction CARD-CARD entre le NLR et la pro-caspase-1, soit grâce à la protéine adaptatrice ASC qui est recrutée via les domaines PYD (Figure 15B). Ceci rapproche les pro-caspase-1 pour permettre leur activation en caspase-1. Ainsi, les procaspases-1 vont s'autocliver, dans un premier temps, en p35 et en p10. Dans un second temps, la p35 sera clivée en p20, libérant le domaine CARD. Les sous-unités catalytiques p10 et p20 vont alors former un tétramère correspondant à la caspase activée qui va pouvoir interagir avec les proformes de l'IL-1β et de l'IL-18 pour les activer pour sécrétion (Lamkanfi and Dixit, 2014). La caspase-1 est également capable de cliver pour activation la gasdermine D, impliquée dans la formation de pores membranaires. Les cytokines peuvent être relarguées soit par formation de vésicules membranaires soit par les pores réalisés au travers de la membrane par la gasdermine D. Les constituants de l'inflammasome peuvent aussi être relargués et détectés à leur tour comme DAMPs par les macrophages environnants, provoquant ainsi une boucle d'amplification inflammatoire (Baroja-Mazo

et al., 2014). Enfin, la gasdermine D est également impliquée dans le processus de mort cellulaire par pyroptose.

2. Détection des signaux de danger

Les signaux activant les différents inflammasomes ne sont pas tous identifiés. Ils sont très variés et peuvent provenir d'agents infectieux ou de modifications de l'homéostasie du microenvironnement (Tableau 3). Leur détection peut se faire de 2 façons différentes : soit directement par interaction avec le NLR, soit par interaction indirecte (Figure 16).

Tableau 3 : Principaux PAMP et DAMP identifiés pour les différents constituants de l'inflammasome.

Récepteur	Signal activateur
NLRP1	Toxines de *Bacillus anthracis*, *Toxoplasma gondii*, ATP, MDP
NLRP3	Cristaux, MDP, ATP extracellulaire via le récepteur P2X7, toxines bactériennes, ADN/ARN viraux et bactériens, UVB, particules environnementales (silice, amiante), cathepsine B (déstabilisation phagolysosomale), ROS, efflux de potassium, fibres amyloïdes β
NLRP6	Métabolites issus du microbiote
NLRP12	*Yersinia pestis*, *Salmonella thyphimurium*
NLRC3	LPS, ADN intracellulaire, GMP
NLRC4	Flagelline, T3SS et T4SS, *Salmonella thyphimurium*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* ou *Pseudomonas aeruginosa*
NOD1	Peptydoglycanes bactériens
NOD2	MDP intracellulaire
AIM2	AND double brin (> 80 pb), *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*
NAIP	T3SS, *Legionella pneumophila*
NLRX1	ARN viral

a. Interaction directe : rôle de senseur cytosolique

C'est le cas pour la voie non canonique de NLRP3, pour AIM2 et les NAIP/NLRC4. L'inflammasome NLRP3 présente 2 voies possibles d'activation : la voie canonique, qui implique la caspase-1, et la voie non canonique, qui implique les caspase-4 et caspase-5 chez l'Homme et caspase-11 chez la souris. Ainsi, la voie non canonique de NLRP3 nécessite l'activation en amont de la caspase-4 et la caspase-5 par des facteurs souvent bactériens par liaison directe (Shi et al., 2014). Ces caspases vont être clivées en p26 correspondant à leur forme activée (Kayagaki et al., 2011) (Figure 16B). Elles ont des expressions différentes selon les tissus, avec probablement des activateurs différents et dépendants du tissu dans lequel elles sont exprimées (Lin et al., 2000). La voie non canonique est impliquée dans l'activation inflammasome-dépendante de la caspase-1, dans la sécrétion d'alarmines telles que l'IL-1α et HMGB1, dans la maturation de l'IL-1β et de l'IL-18 dans les cellules épithéliales intestinales et dans l'induction de la pyroptose par activation de la gasdermine D (Knodler et al., 2014).

Pour l'inflammasome NLRC4, ce sont les NAIP qui reconnaissent le signal activateur de manière spécifique et sont des senseurs d'amont de NLRC4 (Figure 16C). Une fois activé, par la flagelline cytosolique par exemple, le NAIP va alors interagir avec NLRC4 qui s'active à son tour en changeant de conformation (Zhang et al., 2015). L'interaction de NAIP avec NLRC4 permet son activation optimale.

Enfin, AIM2 est également capable de s'activer de manière directe (Figure 16D). Ainsi, le domaine HIN-200 peut directement lier l'ADN viral double brin de manière non spécifique de la séquence, ce qui démasque son domaine PYD et permet le recrutement de la protéine ASC.

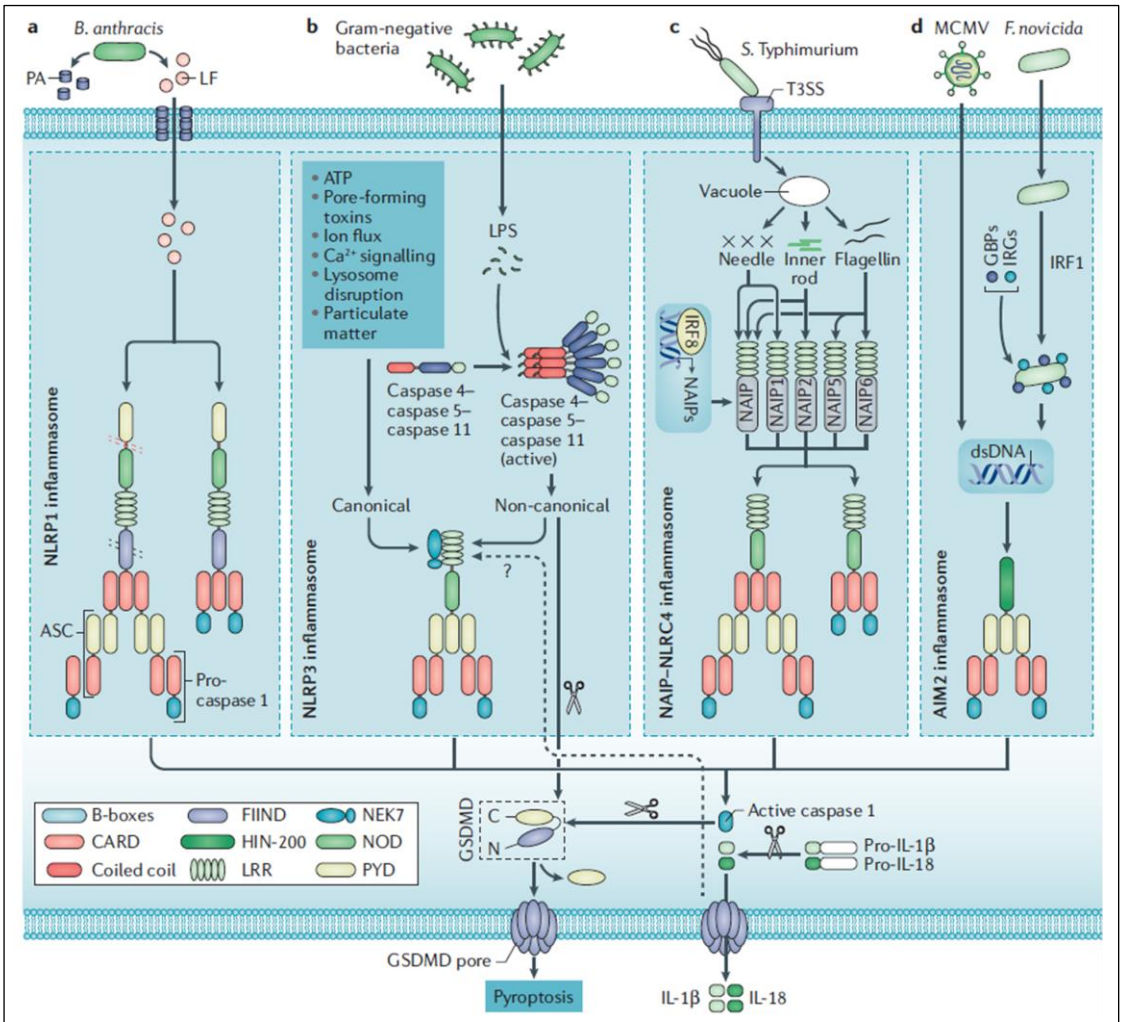


Figure 16 : Mécanisme d'activation des principaux inflammasomes chez l'Homme.
La formation de l'inflammasome peut être activée par différents PAMP ou DAMP qui induisent l'assemblage de la plateforme dans le cytosol. La formation de cette plateforme permet de recruter et d'activer la caspase-1 qui va d'une part cliver et activer l'IL-1β et l'IL-18 et d'autre part induire la pyroptose. La gasdermine est clivée par la caspase-1. Elle est impliquée dans le processus de pyroptose, mais aussi dans la formation de pores membranaires pour le relargage des cytokines. *D'après Karki et Kanneganti Nature 2019.*

b. Absence d'interaction directe entre le signal de danger et l'inflammasome

C'est le cas pour NLRP1 et la voie canonique de NLRP3. Ainsi, l'activation canonique de l'inflammasome NLRP3 nécessite 2 signaux, le premier de « priming » et le second d'assemblage de l'inflammasome (Figure 16B). Le premier signal est considéré comme le signal initiateur de l'expression des gènes codant pour NLRP3 et les cytokines. Il est nécessaire en raison d'une expression basale faible de NLRP3 afin d'éviter les phénomènes inflammatoires chroniques et les lésions cellulaires et tissulaires. Différents récepteurs peuvent induire ce premier signal : les PRR et en particulier les TLR, NOD1, NOD2 ou certains récepteurs aux cytokines (TNFR ou IL-1R) (Franchi et al., 2009). Les TLR sont les activateurs les plus fréquents (Figure 17). Ce sont des récepteurs transmembranaires hautement conservés présentant des domaines extracellulaires LRR de liaison aux PAMP et aux DAMP, et un domaine TIR (Toll/IL-1 Receptor) intracellulaire. Après liaison au ligand, les TLR se dimérisent et réalisent un changement conformationnel, permettant le recrutement de protéines adaptatrices telles que MyD88. Le complexe TLR/MyD88 recrute *in fine* les kinases IKK qui phosphorylent IκB, lié à NF-κB. La phosphorylation d'IκB induit la dissociation du complexe et la libération de NF-κB qui peut alors se

migrer dans le noyau. NF-κB va alors activer l'expression de l'ARNm puis la synthèse de la pro-IL-1β, la pro-IL-18, la pro-caspase-1 et augmenter les taux de NLRP3 (Schroder et al., 2012). Le second signal est médié par les DAMP ou les PAMP (Figure 16B). Ainsi, l'activation de l'inflammasome NLRP3 peut se faire suite à des modifications de la composition du cytosol, par exemple en espèces réactives de l'oxygène (ROS) dont la quantité va être influencée par des toxines ou des cristaux (Zhou et al., 2010), ou par des modifications du potassium intracellulaire (témoin de la formation de pores par des toxines bactériennes) (Muñoz-Planillo et al., 2013). Il va induire l'assemblage de la plateforme cytosolique, mettant en relation les proformes de la caspase-1 qui vont être clivées et activées (Kalyan et al., 2014).

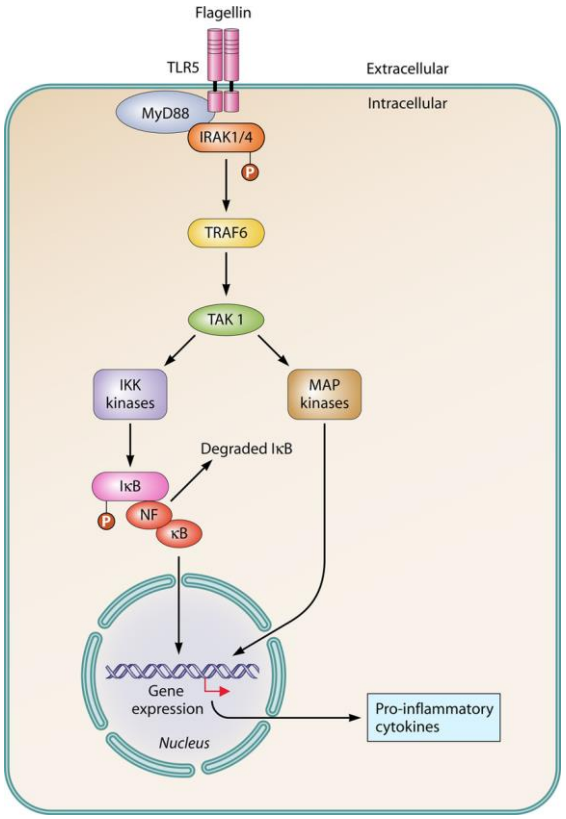


Figure 17 : Signalisation via les TLR : exemple du TLR5 activé par la flagelline extracellulaire.
La fixation de la flagelline au TLR5 induit le recrutement sous-membranaire de MyD88, une protéine adaptatrice qui permet le recrutement et la phosphorylation en cascade de plusieurs kinases. Ceci conduit à l'activation de la voie des MAPK et de NF-κB, qui induit l'expression des cytokines proinflammatoires. *D'après Gupta et al. Clin Vaccine Immunol 2014.*

L'inflammasome NLRP1 ne nécessite pas non plus d'interagir directement avec un facteur de stress (Figure 16A). Ainsi, il lui suffit d'être clivé dans sa partie N-terminale par une protéase pour être activé. C'est le cas par exemple du bacille de l'anthrax, qui produit 2 toxines dont l'une, la toxine létale, constituée de l'antigène protecteur et du facteur létal, est responsable du décès de l'hôte infecté. Le facteur létal est une endopeptidase qui clive les MAPK kinases et les inactive. Cette protéase va être capable de cliver l'extrémité N-terminale de NLRP1, ce qui l'active pour former l'inflammasome NLRP1, probablement par un changement de conformation de la protéine. NLRP1 va alors se fixer à la protéine adaptatrice ASC ou directement à la caspase-1, ce qui va induire la cascade d'activation. Enfin, un autre mécanisme a été précédemment décrit en réponse au Muramyl DiPeptide (MDP), via la reconstitution de l'inflammasome NLRP1 à l'aide de protéines recombinantes (Faustin and Reed, 2013).

3. Particularités de la caspase-8

Il existe un troisième intervenant, la caspase-8, qui est une caspase initiatrice de l'apoptose extrinsèque. Elle nécessite l'intervention de la protéine adaptatrice FADD pour permettre l'interaction entre le domaine DED (Death Effector Domain) de la capase-8 et le domaine PYD de la protéine ASC (Vajjhala et al., 2015). Les inflammasomes NLRP3, NLRC4 et AIM2 vont pouvoir, en l'absence de caspase-1, activer la caspase-8 et ainsi participer à la maturation de l'IL-1β et IL-18 mais aussi à l'induction de l'apoptose (Gurung et al., 2014). Elle peut aussi participer, en amont, au priming des éléments constituants l'inflammasome dans la voie canonique.

d. Fonctions des inflammasomes

1. Sécrétion de cytokines de la famille de l'IL-1

La famille des interleukines de type 1 est composée de 11 membres pouvant avoir des fonctions complémentaires ou opposées. Ainsi, 7 membres ont un rôle pro-inflammatoire et se lient au récepteur de l'IL-1 (IL-1α, IL-1β, IL-18, IL-33, IL-36α, IL-36β, IL-36γ), 2 sont des cytokines antagonistes du récepteur (IL-1R antagoniste (IL-1Ra), IL-36Ra), et 2 ont un rôle anti-inflammatoire (IL-37 et IL-38) (Malik and Kanneganti, 2017). Les gènes de cette famille sont situés sur le chromosome 2 chez l'Homme sauf l'IL-18 situé sur le chromosome 11 et l'IL-33 sur le chromosome 9. Les récepteurs de la famille de l'IL-1, qui comprennent 7 membres différents, possèdent 3 domaines immunoglobulines-like et un domaine TIR (Figure 18). Lorsque le ligand se lie à son récepteur, il existe une activation d'aval dépendante de MyD88 et de NF-κB (Weber et al., 2010).

a. L'IL-1β

La pro-IL-1β est synthétisée uniquement en réponse à un stress, via l'activation des TLR, sous une proforme qui nécessite un clivage par l'inflammasome pour être activée. Une fois clivée en forme active, elle va être relarguée majoritairement à travers les pores formés par la gasdermine D (Semino et al., 2018), même si elle peut être sécrétée par l'intermédiaire de vésicules. Elle va ensuite se lier à son récepteur, l'IL-1R1, ce qui induit un changement conformationnel et la formation d'un complexe hétérodimérique (Figure 18). Ceci permet la mise en contact des domaines TIR des 2 récepteurs, induisant la signalisation d'aval. Le récepteur va alors recruter la protéine adaptatrice MyD88 via son domaine TIR, ce qui va, *in fine,* induire l'activation des facteurs de transcription de la voie des MAPK, mais aussi NF- κB. L'IL-1β a un rôle pléiotrope, et peut avoir des effets contradictoires. Ainsi, elle permet l'activation des fonctions présentatrices d'antigène des CD, stimule la prolifération des LB et leur différenciation en cellules plasmacytoïdes, favorise l'expansion des cellules NK, des LT $CD4^+$ et $CD8^+$, et induit la polarisation Th1, favorisant la sécrétion d'IFNγ. Néanmoins, l'IL-1β est aussi rapportée comme favorisant la polarisation Th2 en induisant l'expression des récepteurs de l'IL-4 à la surface des LT $CD4^+$, et en association avec l'IL-6, elle favorise la polarisation des LT en Th17. En fonction du contexte, elle peut donc avoir des effets contradictoires.

b. L'IL-18

La proforme de l'IL-18 est synthétisée de manière constitutive dans la cellule, contrairement à l'IL-1β, que ce soit dans les cellules immunitaires ou les cellules épithéliales et stromales. L'IL-18 mature va se lier à son récepteur IL-18Rα, ce qui induit le recrutement de la sous-unité IL-18Rβ du complexe, toutes deux portant un domaine TIR intracellulaire (Figure 18). Le recrutement de MyD88 au niveau du récepteur constitué initie le signal de transduction qui va *in fine* activer les facteurs de transcription NF-κB et de la voie des MAPK (Fabbi et al., 2015).

C'est une puissante cytokine pro-inflammatoire. Tout comme l'IL-1β, l'IL-18 va agir sur différentes lignées immunitaires (Siegmund et al., 2001). Les cellules NK sont une des cibles de l'IL-18 puisqu'en réponse à cette cytokine, elles vont exprimer le CCR7 et acquérir leur capacité de migration en réponse au CCL21 dans les organes lymphoïdes secondaires. Là, les cytokines produites par les CD et en particulier l'IL-12 et l'IL-18 activent les fonctions helper des NK, correspondant à la sécrétion d'IFNγ et de TNFα, ce qui augmente l'activation des CD dans une boucle de rétrocontrôle. L'IL-18 a également un effet sur les lignées lymphoïdes. Ainsi, les récepteurs de l'IL-18 sont exprimés à la surface des LB et des LT CD4 et CD8. L'IL-18, en présence d'IL-12 produite par les cellules présentatrices

d'antigènes, va ainsi favoriser leur polarisation en LT Th1 produisant de l'IL-2, de l'IFNγ et du TNFα, et augmente leur activité cytotoxique en particulier via l'expression du Fas-ligand. L'IL-18 augmente également les capacités phagocytiques des cellules immunitaires en augmentant l'expression des ROS, du NO et le relargage cytokinique. Néanmoins, l'IL-18, en l'absence d'IL-12, pourrait également favoriser la polarisation Th2 des LT, favorisant la sécrétion d'IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13. Ainsi, comme l'IL-1β, l'IL-18 peut également avoir un effet contradictoire sur les populations immunitaires.

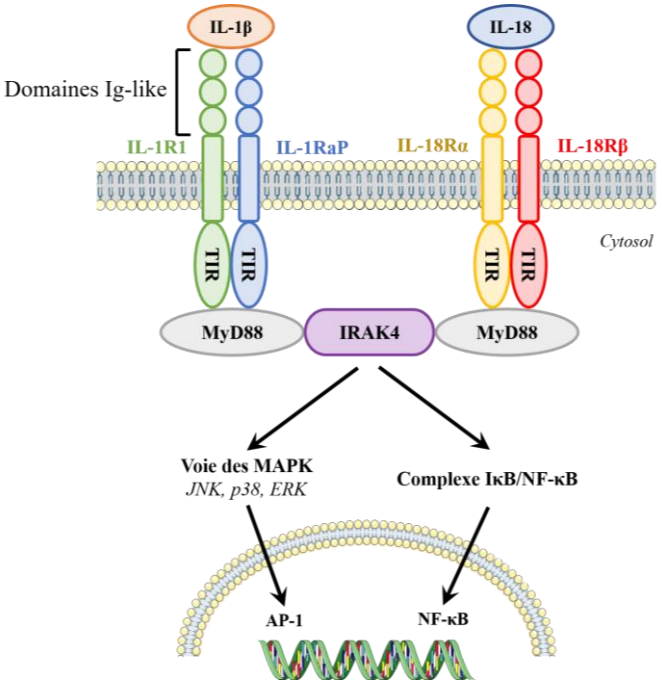


Figure 18: Signalisations induites par l'IL-1β et l'IL-18.
L'interaction de ces cytokines avec leur récepteur propre induit le recrutement sous la membrane plasmique de l'adaptateur MyD88 qui va activer IRAK4, permettant une signalisation via la voie IKK. *In fine*, ceci aboutit à l'activation de la voie des MAPK et de la voie IκB/NF-κB, à la translocation nucléaire de facteurs de transcriptions correspondant et à l'expression des gènes cibles.

L'IL-18BP (IL-18 Binding Protein) est un inhibiteur naturel de l'IL-18, en interagissant avec sa liaison à la chaine α de son récepteur. Il est constitutivement produit par les monocytes/macrophages et se retrouve dans la circulation sanguine. Son expression est induite par l'IFNγ via l'expression de STAT1 dans les cellules myéloïdes, et elle peut être également induite *de novo* dans les cellules épithéliales.

2. Mort cellulaire par pyroptose

La pyroptose est une mort cellulaire programmée mais qui, contrairement à l'apoptose, est immunogène puisqu'elle induit le relargage dans le microenvironnement de molécules normalement intracellulaires (Aachoui et al., 2013). Ces molécules, correspondant à des DAMP, vont permettre l'activation et le recrutement de cellules immunitaires. La pyroptose induit la formation de pores et une atteinte précoce de l'intégrité de la membrane plasmique, associées à une condensation nucléaire et une fragmentation de l'ADN. L'un des éléments essentiels de la pyroptose est le clivage de la gasdermine D par l'une des caspases activées par les constituants de l'inflammasome (Shi et al., 2015). Ainsi, les cellules déficientes en gasdermine D sont résistantes à la pyroptose induite par le LPS. Le clivage de la

gasdermine D libère son domaine N-terminal qui se lie aux membranes cellulaires et va s'oligomériser pour créer des pores dans la paroi. La mort cellulaire par pyroptose peut être favorisée par des agents anticancéreux, tels que l'irradiation γ, les anthracyclines ou l'oxaliplatine (Locher et al., 2010). La pyroptose induit le relargage notamment de l'ATP qui, une fois dans le milieu extracellulaire, va être reconnu par interaction avec les récepteurs purinergiques dont le récepteur P2X7 et activer l'inflammasome NLRP3. Les souris déficientes en récepteur P2X7 ou en NLRP3 n'ont pas la possibilité d'activer les LT $CD8^+$ produisant l'IFNγ après mort des cellules tumorales par pyroptose, et dans ce contexte, les chimiothérapies, qui favorisent la mort cellulaire, sont également inefficaces (Ghiringhelli et al., 2009).

3. Rôle dans le maintien de l'intégrité des épithéliums

L'épithélium joue un rôle majeur de barrière physique entre l'hôte et son environnement, permettant de le protéger contre les agressions extérieures. En effet, les cellules épithéliales sont capables de détecter les signaux de danger grâce à l'expression des PRR. Suite à la reconnaissance des signaux de danger, l'épithélium va sécréter des molécules dont des cytokines (IL-6, TNF-α, IL-1β, IL-18, GM-CSF…) permettant de recruter et activer le système immunitaire (Eckmann et al., 1993; Hastie et al., 1996). Les cellules immunitaires ainsi recrutées vont alors pouvoir défendre l'hôte en éliminant l'agresseur.

L'intestin est le parfait exemple de l'importance du maintien de l'intégrité des épithéliums. C'est également l'organe dans lequel l'inflammasome a été le plus étudié (Palazon-Riquelme and Lopez-Castejon, 2018). L'épithélium y est perpétuellement en contact avec le microbiote commensal et il protège l'organisme des agressions de l'extérieur. Les cellules épithéliales expriment des TLRs à des niveaux différents entre l'apex et la partie basale des cellules, leur permettant de répondre à la fois en cas de contact au niveau de la lumière, mais aussi au niveau basal en cas de disruption épithéliale (Gewirtz et al., 2001). Leur activation dans les cellules épithéliales est conditionnée par l'exposition aux bactéries, qui ne peut se produire que lors d'une lésion épithéliale entrainant une effraction de la barrière. Les cellules épithéliales possèdent donc des senseurs du danger sur leur membrane, les TLRs, et dans le cytosol, les NLR et AIM2. Elles sont donc fortement impliquées dans l'immunité innée, en agissant de concert avec les cellules immunitaires. L'homéostasie intestinale dépend également des cellules sécrétrices, à savoir les cellules caliciformes et les cellules de Paneth, qui sécrètent du mucus et les AMP. Les AMP sont des protéines d'origine naturelle constituées de 12 à 50 acides aminés et ayant des propriétés antibiotiques. Ils sont synthétisés de manière naturelle pour avoir un effet contre différents microorganismes. Ce sont des molécules effectrices de l'immunité innée. Leurs modes d'action ne sont pas encore totalement compris, mais ils peuvent agir en altérant la membrane cellulaire, en interférant avec les acides nucléiques, ou en inhibant certains enzymes. Enfin, les bactéries commensales dans la lumière intestinale participent également à l'intégrité de la barrière, puisqu'elles sécrètent des métabolites tels que des acides gras à chaine courte qui jouent un rôle dans la régulation des fonctions effectrices des cellules immunitaires. En effet, ces métabolites sont captés par des récepteurs couplés aux protéines G à la surface des cellules épithéliales, stimulant l'efflux de potassium qui active l'inflammasome NLRP3 (Macia et al., 2015).

Certains des inflammasomes sont plus particulièrement impliqués dans la physiologie de la barrière intestinale, notamment NLRC4 et NLRP6. NLRC4 joue un rôle important dans la protection de l'épithélium contre l'inflammation chronique responsable de l'apparition de lésions cancéreuses (Hu et

al., 2010; Nordlander et al., 2014). NLRP6 est également un NLR important car il est fortement impliqué dans la régulation de la sécrétion du mucus intestinal, qui participe à la barrière intestinale. Lors des infections, il a été montré que certains inflammasomes étaient impliqués dans l'expulsion et la destruction des cellules épithéliales infectées, par le processus de pyroptose et l'activation de la voie non canonique dépendante de la caspase-4 (Knodler et al., 2014). Ceci a pour but de limiter l'invasion de la bactérie et d'éviter sa dissémination (Rauch et al., 2017; Sellin et al., 2014). La régulation de l'intégrité de l'épithélium intestinal par l'inflammasome dépend de l'IL-1β et l'IL-18, qui régulent à la fois les fonctions effectrices des cellules immunitaires et à la fois les fonctions vasculaires et de réparation tissulaire des cellules épithéliales. Ainsi, l'IL-18 permet le maintien de l'intégrité des barrières en favorisant le maintien des cellules caliciformes qui produisent le mucus, et joue également un rôle dans la régulation du microbiote. En effet, l'IL-18 produite par les cellules épithéliales diminue la différenciation en Th17 liée à l'inflammation et favorise la différenciation en Treg pour limiter les phénomènes inflammatoires chroniques (Harrison et al., 2015). En cas de lésion tissulaire, l'IL-18 augmente et sa sécrétion favorise la sécrétion d'IL-22, diminue l'expression de l'IL-22 binding protein (Muñoz et al., 2015). La perte d'expression de l'IL-22 dans des modèles murins d'infection à *Toxoplasma gondii* induit une diminution de la production de l'IFNγ par les PNN et leur recrutement au site de l'infection. L'IL-22 favorise la transcription de l'IL-18 et la formation de la pro-IL-18, l'IL-22 régule ainsi l'homéostasie de l'expression de la pro-IL-18 au niveau de l'épithélium intestinal, indépendamment du microbiote intestinal, mais cette boucle IL-18/IL-22 joue un rôle dans la régulation du microbiote. Néanmoins, l'IL-18 semble également jouer un rôle dans la pathologie inflammatoire colique. Ainsi, l'inhibition de la caspase-1 dans les cellules épithéliales, dans des modèles murins de colites induites par l'exposition au DSS induit une diminution de la sécrétion de l'IL-18 et diminue les poussées de la maladie, qui sont associées à la tumorigénèse à long terme (Błażejewski et al., 2017). Encore une fois, il existe un rôle contradictoire de cette cytokine.

L'IL-1β est, elle, transitoirement induite par les lésions tissulaires ou les infections. La durée de sécrétion de l'IL-1β joue un rôle dans l'effet de cette cytokine. Ainsi, lorsque la sécrétion est faite sur une courte durée, l'IL-1β induit une sécrétion d'IL-22 pour favoriser les réparations tissulaires. Sur une plus longue durée, des modèles murins ont montré que l'IL-1β augmente la susceptibilité au cancer du côlon induit par les carcinogènes, en favorisant l'inflammation et en limitant les réparations tissulaires.

e. Régulation de l'activation de l'inflammasome

L'assemblage de l'inflammasome est un évènement finement régulé dans les cellules afin d'éviter une mort cellulaire non contrôlée. En effet, il joue un rôle important dans le développement embryonnaire et la reproduction, mais aussi dans le contrôle des pathogènes. Sa dérégulation peut donc conduire à un certain nombre de maladies. Ainsi, les mutations de *NLRP3* induisent des maladies inflammatoires (syndrome CAPS pour cryopyrin associated periodic syndromes) dues à une activation constitutive de l'inflammasome, induisant une fièvre, des inflammations des séreuses et des maladies inflammatoires chroniques cutanées. D'autres NLR peuvent être touchés par des mutations responsables d'un gain de fonction : les mutations de *NLRP1* induisent la maladie d'Addison ou favorisent le vitiligo, les atteintes de *NLRC4* favorisent les entérocolites et le syndrome d'activation macrophagique, l'activation dérégulée d'*AIM2* favorise le psoriasis, les anévrismes de l'aorte abdominale et le lupus érythémateux systémique. Des polymorphismes ont également été rapportés comme favorisant certaines maladies : susceptibilité accrue pour le mélanome en cas de polymorphisme dans les gènes de *NLRP1*

et *NLRP3*, risque accru de développer la maladie de Crohn en cas de polymorphisme de *NOD2* (Verma et al., 2012). Néanmoins, les mécanismes précis régulant l'expression des différents constituants de l'inflammasome ne sont pas encore complètement élucidés, mais des pistes émergent. Tous ces éléments montrent à quel point une régulation optimale de l'activation de l'inflammasome est nécessaire au maintien de l'homéostasie de l'hôte.

a. Régulation au niveau transcriptionnel

Leur régulation se fait dans un premier temps au niveau transcriptionnel. L'activation de l'inflammasome a été plus particulièrement étudiée pour NLRP3, avec plusieurs facteurs de transcription identifiés comme interagissant avec son promoteur. Son activation requiert 2 signaux avant d'arriver à la constitution finale de l'inflammasome. Le premier signal conduit à l'activation de NF-κB et à sa translocation dans le noyau où il va pouvoir activer l'expression de plusieurs gènes. L'activation de NF-κB est également régulée, mais il est retrouvé activé de manière constitutive dans un grand nombre de tumeurs, du fait en partie de l'exposition à de multiples carcinogènes extérieurs (Fan et al., 2013). La dérégulation de NF-κB est un évènement majeur dans la tumorigénèse car il contrôle l'expression de nombreux gènes dont des gènes impliqués dans le contrôle des voies de prolifération, invasion, migration, métastase et angiogenèse, ainsi que la sécrétion de cytokines telles que l'IL-1, l'IL-8, l'IL-6 et le TNFα. Sa dérégulation peut également induire la transcription non contrôlée des gènes de *NLRP3* et des cytokines. Plusieurs autres facteurs de transcription ont également été montrés comme régulant NLRP3. C'est le cas de Sp1 qui est impliqué dans la régulation négative de l'expression de *NLRP3* en interagissant avec son promoteur (Anderson et al., 2008). L'altération de Sp1 est associée à une dérégulation de l'expression de *NLRP3* responsable d'une maladie auto-immune. Un autre facteur, RIPK3, a également été rapporté plus récemment (Moriwaki et al., 2014). Il s'agit d'une kinase impliquée dans la maturation de l'IL-1β dans les macrophages et les cellules dendritiques. La perte d'expression de RIPK3 dans les cellules dendritiques de modèles murins induit une diminution de l'activation des cellules dendritiques du fait d'une diminution de l'expression de NF-κB et une diminution de l'activation de la caspase-1 et de l'IL-1β. Normalement, les lésions épithéliales dans un modèle murin DSS entrainent la translocation des bactéries qui vont être captées par les cellules dendritiques, activant NF-κB, RIPK3 et l'inflammasome. En cas de perte d'expression de RIPK3, les bactéries sont captées par les cellules dendritiques, qui n'activent plus NF-κB, RIPK3 et l'inflammasome.

Le facteur suppresseur de tumeur p53 a également été identifié comme étant un régulateur de l'expression d'un autre NLR, NLRC4 (Sadasivam et al., 2005). Néanmoins, en dehors de la régulation de *NLRP3*, peu de choses sont connues au niveau transcriptionnel, avec une probable implication de la régulation épigénétique.

b. Régulation post-transcriptionnelle

Il existe également des régulations post-transcriptionnelles passant par l'ARN interférence. Le plus étudié correspond à miR-223-3p et son rôle dans la régulation négative de NLRP3. Ainsi, dans les glioblastomes humains, il a été montré que l'expression du miR-223-3p était diminuée, permettant une réexpression de NLRP3 (Ding et al., 2018). L'administration de molécules mimant l'effet de ce micro-ARN diminuait la prolifération cellulaire *in vitro*, ainsi que la sécrétion de cytokines proinflammatoires telles que l'IL-1β, l'IL-8 et l'IL-18. A l'inverse, l'utilisation d'inhibiteurs de miR-223-3p permettait d'induire une augmentation de l'activité de NLRP3. Ce micro-ARN a également été montré comme

impliqué dans l'inhibition de NLRP3 dans un autre modèle de cancer qui est celui du cancer du sein, par un effet sur la prolifération cellulaire et sur la sécrétion de cytokines (Zhang et al., 2019).

c. Régulation post-traductionnelle

Une fois synthétisés, certaines protéines chaperonnes vont maintenir inactifs les constituants de l'inflammasome. C'est le cas de HSP90 (Heat Shock Protein 90) et SGT1 (Suppressor of G2 allele of SKP1), qui interagissent avec NLRP3 dans son domaine LRR (Mayor et al., 2007). Ces 2 protéines semblent essentielles pour l'activation de NLRP3, activation qui dépend donc de leur retrait du récepteur.

Il existe également une régulation négative par l'ajout de résidus sur les NLR afin de bloquer leur oligomérisation et/ou leur activité. Ainsi, les NLR sont le siège d'une ubiquitinylation du domaine LRR, bien décrit pour NLRP3 encore une fois. Sa déubiquitinylation par BRCC3 (BRCA1/2-Containing Complex 3) permet l'activation de l'inflammasome (Py et al., 2013). D'autres protéines de la cascade sont également régulées par ubiquitinylation, notamment la caspase-1 (Labbé et al., 2011) et NOD2 (Yang et al., 2013). Cette régulation des NLR est importante. Ainsi, Pellino3, une ubiquitine ligase, a été retrouvée diminuée dans le côlon de patients atteints de la maladie de Crohn, soulignant l'importance de la régulation par une ubiquitinylation pour limiter les phénomènes inflammatoires chroniques délétères.

La phosphorylation est également une modification post-traductionnelle permettant de réguler l'activité des NLR. Ainsi, la prostaglandine E2 inhibe la formation de l'inflammasome en activant la protéine kinase A (PKA), qui phosphoryle le récepteur NLRP3 en diminuant ainsi son activité ATPase (Mortimer et al., 2016). NLRP3 est également régulée par phosphorylation par d'autres kinases telles que Lyn et Syk (Shio et al., 2009). La régulation de NLRC4 se fait également par phosphorylation d'une sérine en position 533 par la kinase Pkcδ sur le domaine LRR (Qu et al., 2012). Une autre régulation passe par la nitrosylation de NLRP3 par les NOS, ce qui inhibe également la formation de l'inflammasome, mais cette régulation est plus anecdotique (Mishra et al., 2013).

En plus des ajouts de résidus sur la séquence protéiques, les NLR peuvent également être régulés par des modifications de leur conformation 3D. Ainsi, le domaine PYD de NLRP1 contribue également à le maintenir inactif par sa conformation tridimensionnelle, et sa dérégulation induit une activation constitutive qui crée un syndrome de susceptibilité aux cancers (Zhong et al., 2016). NLRC4 présente également une régulation par l'intermédiaire de sa conformation. Ainsi, les récepteurs NAIP induisent une modification de leur conformation permettant de les rendre actifs. NAIP activés vont alors interagir avec NLRC4 qui s'active à son tour en changeant de conformation (Zhang et al., 2015).

Il peut également y avoir une régulation par des molécules entrant en compétition avec la protéine adaptatrice pour bloquer l'activation. C'est ainsi le cas de la protéine POP3 qui porte un domaine PYD (Khare et al., 2014).

f. Rôle de l'inflammasome dans le cancer

La majorité de ce qui est connu de l'inflammasome provient de modèles murins de déficiences en composants de l'inflammasome, avec exposition à des carcinogènes, ou d'études observationnelles

chez l'Homme basées sur l'analyse de l'expression transcriptionnelle des NLRs. De ces études, il ressort que l'inflammasome peut jouer un rôle ambivalent, en fonction du NLR, du modèle tumoral, du site d'expression (cellules épithéliales ou myéloïdes stromales) ou du stade tumoral.

1. Rôle antitumoral des constituants de l'inflammasome (Figure 19)

Les NLR peuvent avoir un effet antitumoral dans certaines tumeurs. Ce rôle antitumoral est en partie lié à l'activité caspase-dépendante et à la sécrétion de cytokines. Ce rôle a été principalement décrit dans des modèles murins. Néanmoins, il a été plus récemment décrit un rôle caspase-indépendant, par le contrôle exercé par les NLR sur des voies essentielles de la tumorigénèse.

a. Rôle protecteur caspase-dépendant (Figure 19A)

Le rôle antitumoral des constituants de l'inflammasome a été initialement décrit comme dépendant de l'activation de la cascade de l'inflammasome. La cytokine IL-18 y joue un rôle primordial, par différents mécanismes : réparation tissulaire, régulation de la prolifération et de l'angiogenèse, recrutement de cellules immunitaires.

Elle est impliquée dans la régénération de la barrière épithéliale intestinale, de manière physiologique et dès les stades précoces de colite, mais aussi dans le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. Le rôle de l'IL-18 a été beaucoup étudié dans des modèles murins de carcinogénèse colique induite par l'AOM et le DSS. L'AOM (azoxyméthane) est un précurseur du méthylazoxyméthanol qui est un puissant carcinogène colique. Il entraine des lésions de l'ADN au niveau des résidus guanine, avec *in fine* la génération de mutations de *KRAS* et de la *β-caténine*. Par ailleurs, le DSS (Dextran Sodium Sulfate) est un proinflammatoire qui accélère la tumorigénèse dans ce contexte. Dans des modèles murins $IL18^{-/-}$, les colites et les polypes étaient plus fréquents, de même que les cancers colorectaux (Salcedo et al., 2010). L'administration d'IL-18 exogène permettait de diminuer la tumorigénèse colique, grâce à la réactivation de STAT1, le recrutement de cellules immunitaires et de la sécrétion d'IFNγ (Zaki et al., 2010a).

De plus, il a été montré dans des modèles murins $NLRP6^{-/-}$ que les cellules immunitaires n'étaient plus capables de limiter les phénomènes inflammatoires dans l'épithélium, induits par l'exposition aux carcinogènes, conduisant à des lésions tissulaires, à une prolifération cellulaire épithéliale non contrôlée et à l'apparition de lésions tumorales (Chen et al., 2011). Ceci était lié à un défaut de sécrétion d'IL-18 et un excès de production de cytokines proinflammatoires telles que TNFα, IL-1β, IL-6, menant à un déséquilibre cytokinique dans l'épithélium. Cet effet protecteur de l'IL-18, bien que très étudié dans les modèles de colon, a également été retrouvé dans d'autres modèles et notamment dans l'hépatocarcinome Ainsi, la diminution de l'expression de NLRP3 dans les cellules parenchymateuses hépatiques était corrélée à une maladie plus agressive et une différenciation tumorale moindre (Wei et al., 2014). L'expression de NLRP3 était en revanche augmentée dans la cirrhose, confirmant l'état d'inflammation chronique favorisant la tumorigénèse. Enfin, dans des modèles murins de carcinomes cutanés induits par des carcinogènes, il a été montré que la diminution de sécrétion d'IL-18 due à la perte d'expression épithéliale de la caspase-1 était associée à l'apparition plus précoce de lésions précancéreuses et cancéreuses (Gasparoto et al., 2014). L'IL-18 va donc avoir un effet en régulant la prolifération des cellules épithéliales et en favorisant le processus de réparation tissulaire de par la régulation qu'elle exerce sur l'IL-22, cytokine impliquée dans la réparation tissulaire, en bloquant l'IL-22 binding protein, régulateur négatif de l'IL-22 (Muñoz et al., 2015).

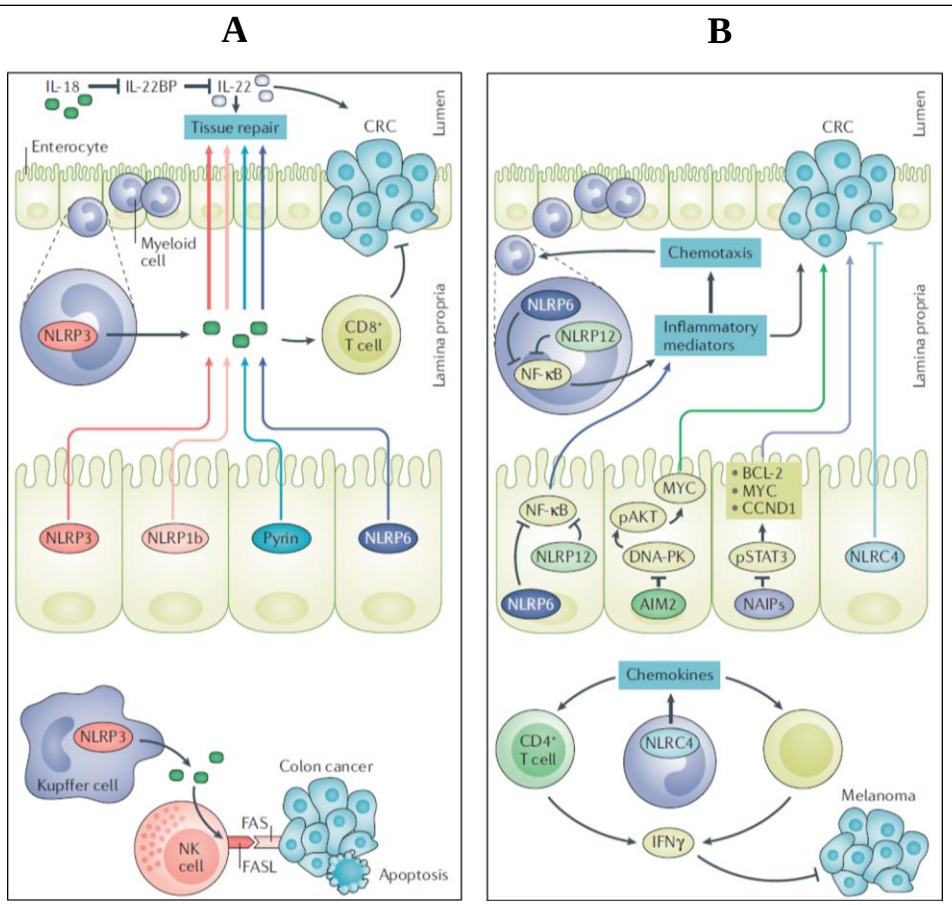


Figure 19: Mécanismes de l'effet antitumoral de certains constituants de l'inflammasome, en fonction de leur expression hématopoïétique ou épithéliale.
Les effets peuvent être dépendants de la caspase-1 et de l'IL-18 **(A)** ou indépendants, par la régulation d'autres mécanismes cellulaires **(B)**. *D'après Karki et Kanneganti Nature Reviews Cancer 2019.*

Néanmoins, cette cytokine peut aussi avoir un rôle paradoxal dans la colitogenèse. Ainsi, dans des modèles de perte d'expression conditionnelle de l'IL-18 dans les entérocytes ou dans les cellules immunitaires du stroma, il a été montré que les souris étaient plus résistantes aux colites induites par le DSS lorsque la délétion de l'IL-18 avait lieu dans les cellules épithéliales (Nowarski et al., 2015). Ceci est dû à l'inhibition par l'IL-18 de la maturation des cellules caliciformes à mucus en régulant leur programme transcriptionnel. La sécrétion d'IL-18 par les cellules épithéliales favoriserait donc la colite dans ces modèles murins. De plus, la délétion de l'IL-18BP, régulateur négatif de l'IL-18 induisait des colites plus sévères, mettant l'accent sur le rôle procolitogénique de l'IL-18 (Sivakumar et al., 2002). Ceci montre que l'IL-18 joue un rôle différent selon le compartiment d'où il est sécrété et en fonction du stade de la maladie. Ainsi, lorsqu'elle est sécrétée précocement, elle permet d'éviter les dommages tissulaires et de favoriser la réparation tissulaire. Néanmoins, une fois la colite installée voire la tumeur développée, elle joue un rôle dans l'inhibition de la maturation des cellules caliciformes pendant la colite, induisant des effractions de la barrière épithéliale, favorisant ainsi l'inflammation chronique et la tumorigénèse.

L'effet de l'IL-18 peut être expliqué de plusieurs façons. Tout d'abord, l'IL-18 joue un rôle majeur dans le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. Ainsi, la diminution de l'IL-18 va induire une diminution de l'infiltrat en cellules essentielles pour la réponse immunitaire antitumorale, de polarisation Th1, qui sont donc moins recrutées et activées au sein de la tumeur. En effet, plusieurs

travaux ont montré un rôle important des cellules NK. Ainsi, dans des modèles murins de métastases hépatiques de cancers du côlon chez des souris déficientes en NLRP3 ou en caspase-1 dans les cellules de Kupffer (macrophages), la croissance tumorale de métastases hépatiques de cancers colorectaux était accélérée du fait d'un déficit de signalisation IL-18 (Dupaul-Chicoine et al., 2015; Molgora et al., 2017). Ceci était lié à un défaut de maturation des cellules NK localisées au niveau hépatique avec diminution de l'expression des ligands de la voie Fas, diminuant leur capacité à détruire les cellules tumorales (contrôle non lié à la sécrétion d'IFNγ) (Dupaul-Chicoine et al., 2015). L'injection d'IL-18 recombinante permettait de restaurer le contrôle des métastases. De même, dans un modèle murin de mélanome avec métastases pulmonaires, l'injection d'IL-18 recombinante permettait de diminuer le nombre de métastases pulmonaires via l'activation des cellules NK (Nishio et al., 2008). De plus, dans un modèle murin NLRP3$^{-/-}$ de sarcomes, l'inhibition de la tumorigénèse dépendait des cellules NK mais aussi de la production de l'IFNγ, sans effet des CD4 ou CD8 (Chow et al., 2012). Cet effet peut s'expliquer par l'accumulation de CCL5 et CXCL9 (2 chémokines importantes pour la migration) produit par les cellules myéloïdes, permettant d'augmenter la fonction antimétastatique des NK. Enfin, dans ces modèles murins de mélanome, l'injection intratumorale de virus oncolytiques coexprimant l'IL-12 et l'IL-18 permettait de diminuer la prolifération tumorale en stimulant la réponse immunitaire antitumorale Th1, en augmentant l'infiltrat en NK, en favorisant la sécrétion d'IFNγ et de GM-CSF, conduisant à l'augmentation de l'activité cytolytique des cellules (Choi et al., 2011).

D'autres cellules peuvent être impliquées dans l'effet antitumoral de l'IL-18. Tout d'abord, dans le colon, l'activation de NLRP3 dans les cellules immunitaires induit la sécrétion d'IL-18, favorisant la production d'IFNγ, l'activation de la voie STAT1 et le recrutement de LT CD8 antitumoraux, en plus des cellules NK (Allen et al., 2010). De plus, la perte d'expression de NLRP3 dans les cellules épithéliales était associée dans des modèles murins à une maladie plus importante du fait d'une sécrétion moindre d'IL-18, induisant un infiltrat plus important en macrophages protumoraux exprimant COX-2 (Zaki et al., 2010b). De même, dans des modèles murins de carcinomes cutanés induits par des carcinogènes, il a été montré que la perte d'expression épithéliale de la caspase-1 était associée à un déséquilibre de la balance entre cellules protumorales et cellules antitumorales, avec un infiltrat moins important en cellules dendritiques, LT CD4, CD8 et mémoires, et une augmentation de l'infiltrat en LT régulateurs et macrophages probablement de polarisation M2, du fait d'un défaut de sécrétion d'IL-18 (Gasparoto et al., 2014). L'IL-18 est donc une cytokine pléiotrope qui va permettre le recrutement et l'activation de plusieurs cellules immunitaires, lymphoïdes et myéloïdes, en plus de ses fonctions sur la réparation tissulaire.

L'IL-18 a également un rôle dans la régulation du microbiote. Ainsi, dans des modèles murins de colite induite par des carcinogènes, il a été montré que l'expression de NLRP1 était associée à une protection contre les phénomènes inflammatoires chroniques non contrôlés, via un rôle du microbiote intestinal (Williams et al., 2015). En effet, il existait une transmissibilité du phénotype protecteur en cas de cohabitation des souris, signifiant un rôle du microbiote intestinal. Il a également été retrouvé une diminution transcriptionnelle de l'expression de NLRP1 dans les cancers du côlon humains, confirmant un rôle antitumoral de NLRP1. Les données de la littérature laissent penser que ce mécanisme de protection serait spécifique des cellules épithéliales intestinales et indépendant du compartiment hématopoïétique.

Enfin, l'IL-18 peut avoir un effet antitumoral indépendamment de la réponse immunitaire antitumorale. Ainsi, il a été rapporté une inhibition de l'angiogenèse tumorale par l'IL-18 (Coughlin et al., 1998). Dans un modèle de cholangiocarcinome murin, l'IL-18, en synergie avec l'IL-12, diminuait le phénotype tumoral des cellules de cholangiocarcinome, via la sécrétion d'IFNγ et l'inhibition de l'angiogenèse. Il semblerait que l'angiogenèse soit limitée par une diminution de la sécrétion de l'angiogénine en présence d'IL-18 (Nagai et al., 2002).

Afin de continuer à échapper à la réponse immunitaire antitumorale, la tumeur va mettre en œuvre plusieurs mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire induite par l'IL-18. Ces mécanismes correspondent à la diminution de l'expression de la proforme de l'IL-18 (Pagès et al., 1999), à une perte d'expression de la caspase-1 limitant le clivage de la proforme de l'IL-18 (Feng et al., 2005), à l'expression d'une proforme résistante au clivage (Gaggero et al., 2004), ou à la surexpression de l'IL-18BP dans certains cancers, qui diminue la biodisponibilité de l'IL-18.

b. Rôle protecteur caspase-indépendant (Figure 19B)

Depuis peu, la littérature rapporte un effet caspase et cytokines indépendant de certains constituants de l'inflammasome. C'est le cas tout d'abord pour NLRC4. Le rôle de NLRC4 dans la tumorigénèse est beaucoup moins décrit que pour les autres constituants. Néanmoins, une étude sur des modèles murins de colites AOM/DSS a montré qu'en l'absence de NLRC4 dans l'épithélium, il existait un nombre plus important de tumeurs, de volume plus important, avec des tumeurs plus agressives comme c'est le cas dans les modèles caspase-$1^{-/-}$, mais avec un potentiel invasif et donc de métastases plus important (Hu et al., 2010). Ceci a été rapporté comme lié à une augmentation de la prolifération cellulaire et une inhibition de l'apoptose dans les phases précoces mais aussi tardives de la tumorigénèse colique. L'induction d'une inflammation par le DSS ne modifiait pas l'infiltration immunitaire entre le modèle sauvage et le modèle NLRC4$^{-/-}$, appuyant un rôle spécifique à l'épithélium de NLRC4 indépendant de la formation de l'inflammasome et de l'intervention du système immunitaire.
L'effet antitumoral caspase indépendant de NLRC4 a également été retrouvé dans d'autres modèles de tumeurs, tels que le mélanome et le carcinome pulmonaire, mais dans le compartiment immunitaire (Janowski et al., 2016). Ainsi, les souris déficientes en NLRC4 dans les cellules hématopoïétiques avaient une prolifération tumorale supérieure et une apoptose moindre indépendamment des protéines ASC et caspase-1. Dans ce travail, il a également été montré que les tumeurs de souris NLRC4$^{-/-}$ avaient des niveaux inférieurs de phosphorylation de STAT3 (du fait d'une sécrétion moindre d'IL-6, activateur de STAT3). C'était associé à une diminution de la sécrétion de l'IFNγ dans le microenvironnement tumoral, du fait d'une activation moindre des LT CD4^{+} Th1 et des CD8^{+}, sans diminution de leur nombre dans la tumeur. Son effet antitumoral est donc lié à une augmentation de la signalisation inflammatoire et l'augmentation de la production d'IFNγ par les CD4 et les CD8 infiltrant le mélanome. Son effet passe par les NAIP, puisque la délétion des NAIP dans l'épithélium induit une augmentation de la carcinogénèse sans réelle majoration de l'inflammation (Allam et al., 2015). Les souris NAIP$^{-/-}$ étaient donc protégées des colites avec une diminution de l'apoptose et de la prolifération des cellules intestinales tout en ayant un excès de tumorigénèse de manière indépendante de l'inflammation. La perte de l'expression des NAIP induit une hyperactivation de STAT3 et une diminution de p53, suggérant un rôle des NAIP dans la protection contre la tumorigénèse dès les stades les plus précoces en favorisant l'élimination des cellules épithéliales altérées par l'inflammation.

NLRP6 joue également un rôle antitumoral, en particulier dans le cancer du côlon, puisqu'il régule la sécrétion de MUC2 par les cellules caliciformes de manière dépendante et indépendante de l'inflammasome. Ainsi, les cellules caliciformes sont les principales cellules à produire le mucus qui protège l'épithélium intestinal de l'hôte des bactéries du microbiote, situées dans la lumière intestinale. Les cellules caliciformes expriment certains TLR qui vont, une fois activés, induire l'activation de NLRP6, qui par une signalisation calcique, permet l'exocytose de MUC2 par la cellule activée mais aussi par les cellules adjacentes (Birchenough et al., 2016). Le déficit épithélial en NLRP6 diminue la sécrétion de mucus par ces cellules, ne permettant pas à l'épithélium de limiter la prolifération bactérienne et favorisant les phénomènes pathogéniques et de colites chroniques (Elinav et al., 2011; Wlodarska et al., 2014). L'activité de NLRP6 est régulée par les métabolites produits par le microbiote, à savoir l'histamine, la taurine et la spermine (Levy et al., 2015). Ainsi, les bactéries commensales du tube digestif peuvent réguler l'assemblage de l'inflammasome dans l'intestin, par la gestion des signaux de stress permettant la sécrétion d'IL-18, régulant négativement la libération des AMP. Le microbiote induit donc NLRP6 pour favoriser la production d'IL-18 et la diminution de la libération de l'AMP et l'absence de l'axe NLRP6/IL-18/AMP favorise la dysbiose. La restauration de l'axe NLRP6/AMP améliore l'évolution des colites. Dans un modèle murin NLRP6$^{-/-}$ ou ASC$^{-/-}$, il a été montré que les souris étaient porteuses d'un microbiote favorisant les phénomènes de colites et que la mise en contact de ces souris avec des souris sauvages favorisaient également les colites chez ces dernières (Hu et al., 2013). Ces souris ont également développé plus de tumeurs sur fond de colite. NLRP6 régule également négativement l'activation de NF-κB dans les cellules myéloïdes et les cellules épithéliales intestinales, de manière caspase-indépendante, ce qui induit une diminution de la production de cytokines inflammatoires et du recrutement de cellules immunitaires, permettant de limiter les phénomènes inflammatoires.
En amont du stade de cancer invasif, l'expression épithéliale de NLRP6 a également été démontrée comme ayant un rôle dans le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales intestinales et dans la limitation de la formation des lésions précancéreuses (Normand et al., 2011). L'analyse des tumeurs dans un modèle murin NLRP6$^{-/-}$ a montré que les souris n'exprimant plus NLRP6 exprimaient plus les gènes de la voie de signalisation Wnt et Notch, gènes impliqués dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et le processus métastatique. Ainsi, la perte de NLRP6 favorise le processus de TEM et donc la progression de lésions précancéreuses vers des lésions invasives.

NLRP12, que ce soit dans l'épithélium ou dans les cellules hématopoïétiques, joue également un rôle antitumoral dans le côlon via la régulation de NF-κB, comme pour NLRP6. Il a ainsi été montré *in vitro* que NLRP12 permettait de diminuer l'expression de NF-κB, diminuant les phénomènes inflammatoires coliques et les cancers du côlon associés aux colites. Dans des modèles murins NLRP12$^{-/-}$, il a été montré que la perte de NLRP12 induisait une susceptibilité accrue aux colites et aux cancers du côlon, avec dans les lésions précancéreuses une augmentation de l'expression et de l'activation de NF-κB et une augmentation de l'activation des voies MAPK et AKT/mTOR dans les tumeurs (Allen et al., 2012; Zaki et al., 2011).

AIM2 semble également avoir un rôle antitumoral indépendant de la formation de l'inflammasome et son absence dans l'épithélium tumoral est associée à un mauvais pronostic dans le cancer colorectal (Dihlmann et al., 2014). En effet, dans les modèles murins AIM2$^{-/-}$, les souris n'avaient pas plus d'inflammation au niveau colique que les souris sauvages, avec des niveaux de sécrétion de cytokines similaires pour l'IL-1β et l'IL-18, mais présentaient plus de tumeurs confortant un rôle

caspase-indépendant d'AIM2. Ainsi, AIM2 inhibe la prolifération incontrôlée des cellules intestinales et favorise la mort cellulaire, probablement en interagissant avec DNA-PK et en l'inhibant. Ceci conduit à la diminution de l'activation d'AKT qui joue un rôle majeur dans la prolifération et la survie cellulaires et en particulier pour les cellules souches (Man et al., 2015; Wilson et al., 2015). Dans ces modèles, les souris étaient porteuses de plus de polypes et d'un volume tumoral supérieur. Ainsi, AIM2 semble contrôler la prolifération des cellules souches intestinales et cancéreuses du fait d'une signalisation aberrante de la voie Wnt et à une augmentation de l'activité d'AKT et de c-Myc, ce qui est corroboré par le fait que les cryptes des souris $AIM2^{-/-}$ contiennent plus de cellules proliférantes et que ces cellules sont capables de former des sphéroïdes plus volumineux *in vitro*. AIM2 contrôle également le cycle cellulaire dans les modèles *in vitro* de cancer du côlon mais aussi d'autres cancers, en phase G2/M, via l'inhibition de cdc2 et une augmentation de l'activité de la cycline D3 et de p21 (Patsos et al., 2010).

Enfin, la protéine adaptatrice ASC est également impliquée dans le développement du cancer. Ainsi, ASC est sous-exprimée dans différents modèles tumoraux (glioblastome, poumon, sein, prostate) du fait d'une hyperméthylation du gène (Collard et al., 2006; Salminen et al., 2014, 2014). ASC agit également sur l'apoptose de manière caspase-indépendante puisqu'il se lie à la protéine Bax en favorisant sa localisation mitochondriale (Ohtsuka et al., 2004).

2. Rôle pro-tumoral des constituants de l'inflammasome

Les constituants de l'inflammasome vont également pouvoir avoir un effet protumoral en agissant sur différentes caractéristiques phénotypiques des cellules tumorales.

a. La prolifération et la survie cellulaires (Figure 20A)

Les cytokines : IL-1β et IL-18

Les cytokines produites lors de l'activation de l'inflammasome peuvent induire la prolifération cellulaire et/ou augmenter la survie des cellules tumorales, de manière autocrine ou paracrine. L'effet des cytokines est variable en fonction du type de cancer, de son stade (tumeur primitive versus métastases (Liu et al., 2013)), ainsi que de la cellule à l'origine de sa sécrétion.

Ainsi, l'IL-1β est une cytokine proinflammatoire pléiotropique fréquemment surexprimée dans les cancers (Pantschenko et al., 2003). Cette cytokine est connue comme ayant un rôle protumoral, au contraire de l'IL-1α, en favorisant dans des modèles murins de mélanome la croissance tumorale et la survie cellulaire (Voronov et al., 2003). Elle est abondante dans le microenvironnement tumoral de cancers du sein chez l'Homme, et des modèles murins de cancers mammaires ont rapporté qu'elle favorisait la translocation nucléaire de la β-caténine (Perez-Yepez et al., 2014). La β-caténine va alors pouvoir induire l'expression de plusieurs molécules impliquées dans la tumorigénèse, et en particulier de c-Myc et CCDN1, fortement impliquées dans la prolifération cellulaire. L'activation de la voie de manière autocrine et/ou paracrine induit également la sécrétion de cytokines protumorales telles que l'IL-8. L'IL-8 est une cytokine qui promeut l'angiogenèse, augmente la prolifération et la survie des cellules cancéreuses et endothéliales, et favorise le processus de migration cellulaire et le chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles au site tumoral (Waugh and Wilson, 2008). Enfin, elle stimule la production par les cellules stromales fibroblastiques de COX-2, sous le contrôle de PKC, qui favorise la prolifération cellulaire tumorale et l'invasion des cellules épithéliales (Zhu et al., 2012).

De plus, dans des modèles de carcinomes coliques, cette cytokine favorisait la formation de sphéroïdes et la prolifération tumorale de lignées tumorales, et augmentait le renouvellement cellulaire de lignées primaires de colon, en générant des cellules souches cancéreuses (Li et al., 2012). Ces cellules

souches sont probablement induites par Zeb1, retrouvé surexprimé dans ces cellules, expression contrôlée par l'IL-1β. Ces cellules cancéreuses sont douées d'une plus grande capacité à migrer et à réaliser la TEM. Cette cytokine semble donc avoir un rôle double, à la fois sur les cellules souches cancéreuses et sur les cellules tumorales déjà établies.

L'IL-1β va avoir un effet différent en fonction de la localisation de son expression. C'est ce qui a été montré récemment dans un modèle de tumeur colorectale (Dmitrieva-Posocco et al., 2019). Ainsi, dans les cellules épithéliales, cette cytokine favorise la croissance tumorale sans effet sur l'infiltration inflammatoire. Dans le compartiment lymphoïde, elle favorise la réponse inflammatoire et la sécrétion d'IL-17 et d'IL-22, augmentant la croissance tumorale et induisant la polarisation Th17, l'expression de RORγt et la sécrétion d'IL-17 protumorale. Enfin, dans le compartiment myéloïde, elle joue plutôt un rôle antitumoral en permettant le contrôle du microbiote et de l'infiltration bactérienne pariétale.

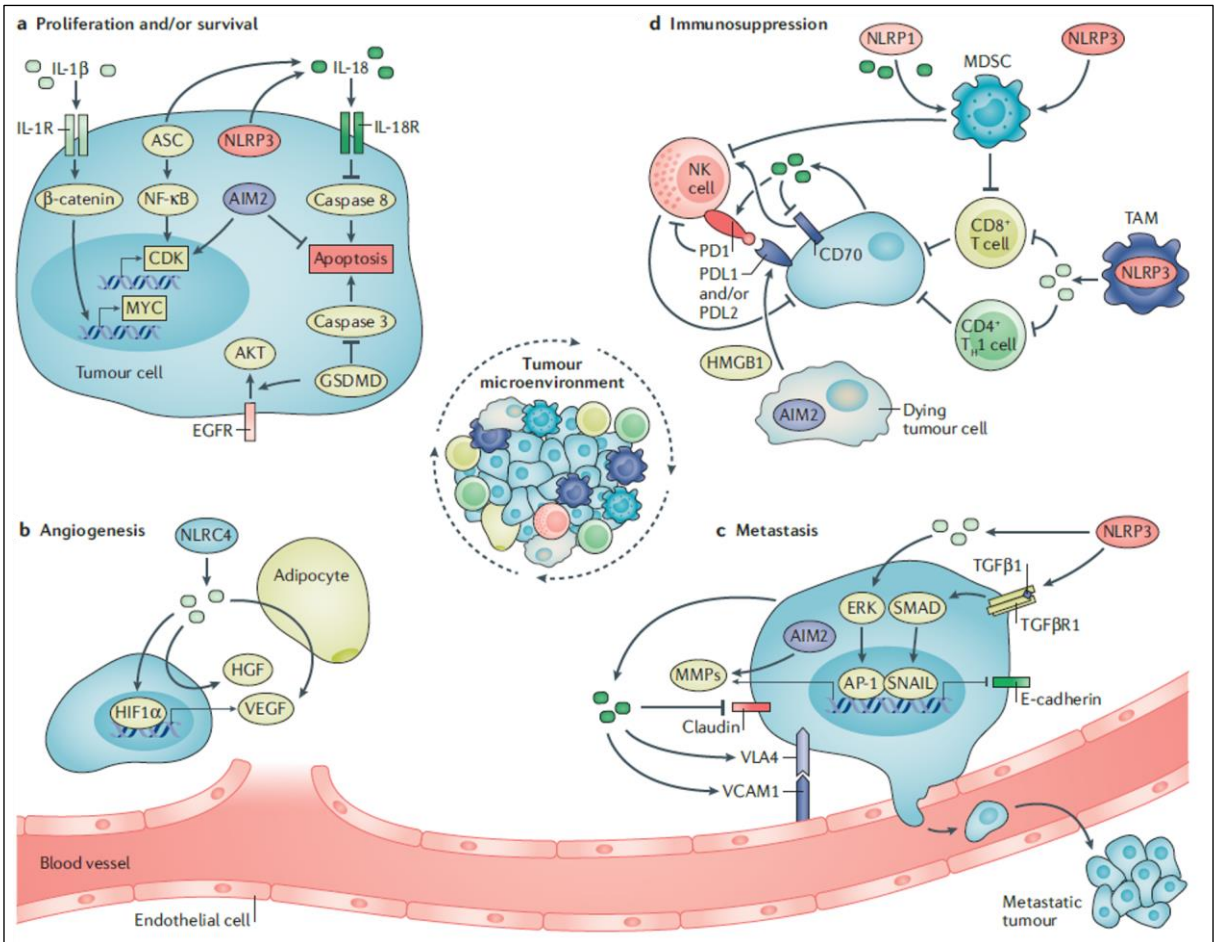


Figure 20: Mécanismes de l'effet protumoral des constituants de l'inflammasome, en fonction de leur expression hématopoïétique ou épithéliale.
L'effet passe par la régulation de la prolifération et la survie **(A)**, l'angiogenèse **(B)**, le processus métastatique **(C)** ou la création d'un environnement immunosuppresseur **(D)**. *D'après Karki et Kanneganti Nature Reviews Cancer 2019.*

Malgré ce qui a été discuté auparavant, l'IL-18 sécrétée par l'épithélium joue également un rôle protumoral en inhibant l'apoptose induite par l'activation de la caspase-8 dans un modèle murin de cancer gastrique, indépendamment de la sécrétion par les cellules myéloïdes (Deswaerte et al., 2018). De plus, la perte d'expression de l'IL-18, mais pas de l'IL-1β dans ce même modèle induisait une inhibition de la formation tumorale en diminuant l'activation de NF-κB (connu pour favoriser la

prolifération cellulaire intestinale), de manière indépendante de son rôle/expression dans les cellules immunitaires du stroma.

Les constituants de la voie de l'inflammasome

Les constituants de l'inflammasome, NLR ou protéine adaptatrice, peuvent aussi favoriser la tumorigénèse, par des mécanismes dépendants ou indépendants de la voie de l'inflammasome. Ainsi, les défauts de régulation de l'inflammasome ont un effet protumoral. C'est le cas des mutations de NLRP1 responsables d'un gain de fonction de la protéine favorisent les carcinomes cutanés (Zhong et al., 2016). Ces mutations touchent les domaines régulateurs négatifs de NLRP1 afin de le maintenir sous sa forme inactive, à savoir PYD ou LRR. Les mutations induisent une activation constitutive de la protéine avec une oligomérisation et une activation de l'inflammasome, induisant une sécrétion basale importante de l'IL-1β par les kératinocytes, responsable d'anomalies cutanées.

NLRP3 joue également un rôle protumoral dans les carcinomes de la tête et du cou. Il est en effet trouvé surexprimé dans ce modèle, avec une corrélation entre le niveau d'expression et la taille tumorale ainsi qu'avec l'envahissement ganglionnaire (Wang et al., 2018). De plus, l'analyse de tissus de patients a montré que NLRP3 était surexprimé dans les cellules épithéliales de ce modèle et était corrélé à des marqueurs de cellules souches (Huang et al., 2017) notamment CD44, sans que le mécanisme ait pu être identifié. Le blocage *in vitro* et *in vivo* de NLRP3 était associé à une diminution de la formation de colonies tumorales et une diminution des marqueurs de cellules souches. Ceci signifie que NLRP3 pourrait réguler, sans que le mécanisme soit connu, la formation des cellules souches cancéreuses et favoriser la tumorigénèse. De plus, dans le cancer du sein, il a été montré que l'inhibition de NLRP3 dans les cellules épithéliales par le miR-223-3p permettait de diminuer la prolifération tumorale et l'immunosuppression (Zhang et al., 2019).
NLRP3 joue également un rôle protumoral lorsqu'il est exprimé dans les macrophages. Ainsi, dans un modèle murin de cancer du poumon induit par des carcinogènes, l'activation de NLRP3 induisait le relargage d'IL-1α et IL-1β par les macrophages infiltrant la tumeur (Terlizzi et al., 2016). Ces macrophages, par les cytokines qu'ils relarguent, favorisent la croissance tumorale pulmonaire. L'inhibition de ces macrophages de phénotype M2 par les bisphosphonates limite la formation tumorale. Dans un modèle murin de carcinogénèse colique induite par un régime alimentaire riche en cholestérol, les cristaux de cholestérol favorisent l'activation de NLRP3 dans les macrophages, ce qui induit le relargage d'IL-1β qui active un programme transcriptionnel dans les cellules cancéreuses favorisant la prolifération cellulaire (Du et al., 2016). Le mécanisme passe par la surexpression des ROS mitochondriaux et l'activation de NLRP3 est dépendante de la voie AMPK-mtROS.

AIM2 peut également avoir un rôle protumoral indépendant de la formation de l'inflammasome. Ainsi, une expression importante d'AIM2 a été retrouvée dans les carcinomes cutanés de patients, avec une expression intermédiaire pour les carcinomes *in situ* et une expression faible pour la kératose actinique (Farshchian et al., 2017). La diminution de l'expression dans des modèles *in vitro* était associée à une plus importante apoptose avec une diminution de l'expression des protéines du cycle cellulaire. De plus, il existait une diminution des capacités d'invasion des cellules avec une diminution de l'expression de métalloprotéinases. Dans des modèles *in vivo*, la diminution de l'expression d'AIM2 était associée à une diminution de la prolifération tumorale et de la néoangiogénèse.

Enfin, il a été montré que la protéine adaptatrice ASC jouait un rôle protumoral en favorisant la prolifération cellulaire colique *in vivo*, via l'accumulation de β-caténine. Dans d'autres modèles

tumoraux de cancer de l'estomac, il a également été rapporté que la protéine ASC régulait positivement NF-κB, fortement impliqué dans la prolifération cellulaire (Deswaerte et al., 2018; Liu et al., 2013). Néanmoins, il semble que la cellule d'origine exprimant ASC joue un rôle différent. Ainsi, lorsqu'ASC est exprimé dans les cellules myéloïdes, il existe une augmentation de l'incidence des tumeurs cutanées, alors que lorsqu'ASC est exprimé dans les kératinocytes, il existe un effet antitumoral (Drexler et al., 2012). La perte d'ASC dans les kératinocytes a un effet protumoral non pas par dérégulation de l'inflammasome, mais plutôt du fait d'une fonction d'ASC indépendante de l'inflammasome, dans le contrôle de la prolifération cellulaire. De plus, la perte d'ASC est associée à une expression moindre de p53 dans les kératinocytes irradiés avec les UVB, perdant ainsi son rôle antitumoral dans les cellules à potentiel tumoral. De même, il semble que le stade la maladie ait une influence. Ainsi, dans des modèles de mélanome non métastatique, l'expression d'ASC induit une diminution de l'expression de NF-κB et un effet antitumoral, alors que dans les modèles métastatiques, l'expression d'ASC induit la sécrétion d'IL-1β, l'expression de NF-κB et un effet protumoral (Liu et al., 2013).

b. L'angiogenèse (Figure 20B)

L'IL-18 semble induire la sécrétion de facteurs proangiogéniques tels que la thrombospondine-1 dans les cellules de carcinome gastrique (Kim et al., 2006a). Ces facteurs proangiogéniques vont à leur tour induire la sécrétion d'IL-18, en particulier pour le VEGF, favorisant par la suite la migration des cellules dans ce modèle en jouant sur les microtubules (Kim et al., 2007a).

L'IL-1β favorise également l'angiogenèse. Ainsi, dans un modèle murin de carcinome bronchique sécrétant de l'IL-1β, il existait une augmentation de la vascularisation tumorale de 250% par rapport à des tumeurs ne surexprimant pas cette cytokine (Saijo et al., 2002). Ceci était lié à une sécrétion plus importante en VEGF, en CXCL2 et en HGF (Hepatocyte Growth Factor). Dans un modèle *in vitro* de cancer du poumon, les cellules stimulées par l'IL-1β exprimaient plus HIF-1α en conditions normoxiques, induisant une activation plus importante du VEGF et de NF-κB ainsi que de COX-2 (Jung et al., 2003). Ainsi, *in vivo*, les cellules exprimant l'IL-1β sont plus agressives et plus angiogéniques que les cellules ne l'exprimant pas (Nakao et al., 2005). Ceci est lié au recrutement de macrophages exprimant COX-2.

c. Rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse et le processus métastatique (Figure 20C)

L'IL-18 est impliquée dans le processus de métastase. Dans un modèle de métastases hépatiques d'un mélanome, l'IL-18 a montré un rôle proangiogénique et prométastatique via l'expression de VCAM1 par les cellules endothéliales des sinusoïdes hépatiques favorisant l'adhésion des cellules de mélanome dans les vaisseaux (Vidal-Vanaclocha et al., 2000). L'administration d'IL-18BP permet d'inhiber VCAM1 et diminue le processus métastatique en diminuant l'adhésion des cellules de mélanome (Carrascal et al., 2003). De même, son inhibition induit également une diminution du nombre de métastases pulmonaires dans un autre modèle murin (Terme et al., 2011). De plus, elle augmente la migration par un autre mécanisme mis en évidence dans un modèle de cancer du sein. Il s'agit de la diminution de l'expression de la claudine, une des molécules les plus importantes impliquées dans les jonctions adhérentes, et en induisant la voie des MAPK (Yang et al., 2015). L'inhibition de l'IL-18 endogène induisait une diminution des capacités de migration de cellules MCF-7. L'effet de l'IL-18 est controversé, puisqu'elle va avoir un effet protumoral et prométastatique dans le mélanome (Vidal-Vanaclocha et al., 2000) mais un effet antimétastatique dans le colon (Dupaul-Chicoine et al.,

2015). Là encore, il existe probablement une ambivalence qui dépend du type de cellule tumorale ainsi que du stade de la maladie.

L'IL-1β a également un rôle important dans le processus métastatique. Ainsi, dans des modèles murins de métastases pulmonaires de mélanome, la perte d'expression de l'IL-1β était associée à moins d'évolution locale et moins de métastases pulmonaires que pour les souris de phénotype sauvage (Voronov et al., 2003). L'administration d'IL-1Ra (antagoniste du récepteur de l'IL-1) permettait de diminuer l'adhésion médiée par l'IL-1β de cellules de mélanome aux hépatocytes murins, diminuant ainsi le volume des métastases et augmentant la survie des souris (Vidal-Vanaclocha et al., 1994). De plus, dans des modèles murins déficients en IL-1β, les fibrosarcomes développés après exposition au MCA évoluaient plus lentement et l'infiltrat immunitaire au point d'injection était plus faible en cellules inflammatoires probablement immunosuppressives (Krelin et al., 2007). Sur le plan mécanistique, l'IL-1β semble favoriser l'invasion par l'augmentation de l'expression et de l'activité de MMP-9 et de phospho-ERK1/2 (Ma et al., 2012b).

NLRP3 va également avoir un effet prométastatique mixte. Tout d'abord, il a un effet inflammasome-dépendant et en particulier IL-1β dépendant. Ainsi, il a été récemment montré que l'expression de NLRP3 et de l'IL-1β dans les macrophages protumoraux M2 augmentait le processus métastatique et le nombre de métastases hépatiques dans un modèle de carcinome colorectal (Deng et al., 2019). Dans ce modèle, l'inhibition de NLRP3 induisait une diminution des métastases hépatiques. Les mêmes résultats ont été retrouvés dans des modèles murins de cancer du sein n'exprimant pas NLRP3 (Guo et al., 2016). L'IL-1β était ainsi retrouvée élevée au niveau des sites métastatiques et les souris déficientes en NLRP3 présentaient moins de métastases pulmonaires. Il est probable que la sécrétion de cette cytokine au niveau des organes cibles des métastases participe à créer le lit tumoral pour faire une niche métastatique. Cette niche est générée grâce au recrutement de cellules immunitaires de phénotype protumoral, telles que les MDSC et les macrophages M2, potentiellement recrutées par le CCL2. L'utilisation d'anti-IL-1R permettait de limiter la prolifération tumorale et les métastases avec un environnement immunosuppressif moins important. De plus, l'inhibition de NLRP3 dans des modèles *in vitro* et *in vivo* diminue la prolifération, la migration et l'invasion des cellules, via l'augmentation de l'expression de l'E-cadhérine et la diminution de la N-cadhérine, profil en faveur de la diminution des phénomènes de la TEM en l'absence de NLRP3.
Il va également jouer un rôle inflammasome indépendant. Ainsi, dans des souris NLRP3$^{-/-}$, le nombre de métastases était diminué par rapport aux souris sauvages ou aux souris déficitaires en caspase-1 ou en IL-1R (Chow et al., 2012). Ce rôle est indépendant de la caspase-1 ou de l'IL-1β. La même chose était observée dans un modèle de sarcome induit après injection de MCA. L'équipe a montré que ce processus était lié à un infiltrat moins important en cellules NK et à la sécrétion d'IFNγ. NLRP3 pourrait favoriser la TEM en augmentant l'expression de SNAIL (Wang et al., 2016a), mais aussi par l'intermédiaire des cytokines TGFβ et TNFα via l'activation de la voie NF-κB. NLRP3 va ainsi être surexprimé pendant la TEM des lignées colorectales et favoriser l'activation de l'axe STAT3 /Snail1. Les mêmes résultats ont été retrouvés dans un modèle de cancer du poumon (Wang et al., 2016b). Dans ce modèle *in vitro*, l'activation de NLRP3 induisait ces modifications via la phosphorylation de molécules fortement impliquées dans les voies tumorales, à savoir Akt, ERK1/2 et CREB, la diminution de l'expression de la E-cadhérine et l'augmentation de celle de Snail.

Il semble que les constituants de l'inflammasome puissent avoir un effet protumoral sur la migration cellulaire dès les stades précoces. Ainsi, NLRP3 joue un rôle protumoral dans les tumeurs bénignes à malignité locale, telles que les gliomes. En effet, il a été montré récemment que l'expression de NLRP3 dans ces tumeurs était corrélée à des grades histopathologiques plus élevés (Yin et al., 2018). *In vitro*, la perte d'expression de NLRP3 dans ce modèle induisait une diminution de la prolifération, la migration/invasion, et favorisait l'apoptose, en diminuant la TEM. Ceci passait par la diminution de la phosphorylation de la protéine AKT et de PTEN. De plus, l'IL-1β contenue dans le microenvironnement tumoral augmente la migration et l'invasion de lignées de gliomes. Il a été montré que l'IL-1 permettait de jouer le rôle de premier signal stimulant NLRP3 et la sécrétion de cytokines dans des modèles *in vitro* de lignées de glioblastomes mais aussi de cellules dérivées de patients, ce qui favorise l'expression de STAT3 et donc la prolifération cellulaire permettant l'évolution vers une tumeur maligne (Hurmath et al., 2014; Tarassishin et al., 2014).

d. Induction d'un environnement immunosuppresseur (Figure 20D)

Enfin, les constituants de l'inflammasome et les cytokines relarguées suite à leur activation vont induire un environnement immunosuppressif. Tout d'abord, l'administration d'IL-18 favorise le processus de métastases de cellules de colon ou de mélanome, en augmentant l'inflammation mais aussi en augmentant l'expression de PD-1 à la surface des cellules NK, les inhibant (Terme et al., 2011). Son inhibition par du siRNA ou par l'IL-18 restaurait l'activité antitumorale des cellules NK. L'IL-18 va également diminuer l'expression de la molécule de costimulation CD70, un ligand du CD27. La diminution du CD70 induit une diminution de l'activation des cellules NK, de leurs fonctions cytotoxiques, et favorise la polarisation des LT en cellules mémoires sénescentes (Kang et al., 2009a). De plus, l'IL-18 favorise la différenciation en MDSC exprimant iNOS et l'arginase-1 qui sont de puissants inhibiteurs de la réponse T (Lim et al., 2014). Enfin, l'IL-18 va également induire l'expression d'inhibiteurs de molécules cytotoxiques telles que le granzyme B dans ce même modèle ou en diminuant la sécrétion d'IFNγ (Majima et al., 2006).

L'IL-1β est également une cytokine à fort potentiel immunosuppresseur, en favorisant le recrutement des MDSC (Song et al., 2005). Le traitement des souris dans un modèle de fibrosarcome avec l'IL-1Ra (antagoniste du récepteur de l'IL-1) permettait de ralentir la progression tumorale et de diminuer l'infiltration en cellules immunosuppressives. La diminution du recrutement de MDSC au site tumoral par cet antagoniste dépend de la diminution de la sécrétion d'IL-6 (Bunt et al., 2007). Enfin, elle favorise la polarisation des cellules stromales vers un phénotype protumoral (fibroblastes) et ce de manière très précoce (Schauer et al., 2011).

NLRP3, par la sécrétion d'IL-1β induite par son activation, va permettre le recrutement des MDSC au sein de la tumeur (van Deventer et al., 2010). Ainsi, l'inhibition de NLRP3 dans les cellules myéloïdes induit une diminution de l'infiltration en MDSC dans des modèles murins, via une diminution de leur capacité à migrer jusqu'au site tumoral. De plus, l'expression forte de NLRP3, induite par le TGFβ et le TNFα du microenvironnement, dans les macrophages de type M2 infiltrant massivement les cancers du pancréas, favorise la polarisation des CD4 en Th2, Th17 et en Treg via la sécrétion d'IL-10 (Daley et al., 2017). Ainsi, dans les modèles murins, la délétion de l'expression de NLRP3 permettait d'avoir un infiltrat plus riche en macrophages de type M1, et une polarisation des CD4 en Th1 avec une sécrétion plus forte de cytokines proinflammatoires. Chez l'Homme, NLRP3 a également été démontrée comme ayant un rôle protumoral chez les patients atteints de carcinomes ORL, avec une surexpression

tissulaire et des taux circulants d'IL-1β élevés (Chen et al., 2018). Ceci est associé dans le modèle murin correspondant à un infiltrat important en cellules immunosuppressives. Ainsi, le blocage de NLRP3 par le MCC950, qui inhibe l'interaction entre NLRP3, ASC et la pro-IL-1β, induit une diminution de l'infiltration par les MDSC, les Treg et les macrophages M2. Le MCC950 diminue aussi l'expression par les LT effecteurs de PD-1 et Tim-3, 2 récepteurs coinhibiteurs impliqués dans l'anergie lymphoïde, et augmente l'infiltrat en CD4 et CD8. Le rôle protumoral de NLRP3 semble être également lié au relargage d'IL-22 par les LT CD4 mémoires, qui est une cytokine puissante à activité protumorale, puisqu'elle stimule la prolifération cellulaire et la néoangiogénèse, elle protège les cellules cancéreuses de l'apoptose, elle favorise le recrutement de cellules immunosuppressives et elle régule la balance entre cytokines pro- et anti-inflammatoires. L'IL-1β sécrétée après activation de NLRP3 dans les cellules immunitaires permettait cette sécrétion d'IL-22 grâce à l'activation des facteurs de transcription AhR et RORγt (Voigt et al., 2017). L'administration à des souris d'Anakinra, un inhibiteur de la signalisation de l'IL-1β, permettait de diminuer la sécrétion d'IL-22 et ralentissait la croissance tumorale dans un modèle de cancer du sein.

NLRP1 induit également le recrutement de MDSC via la production d'IL-18. Ainsi, dans un modèle murin de myélome multiple, l'inhibition de l'IL-18 permettait de limiter l'évolution de la maladie, en favorisant la réponse $CD8^+$ via la limitation de la génération des MDSC (Nakamura et al., 2018).

Ici encore, les composants de l'inflammasome peuvent jouer un rôle immunosuppressif indépendamment de la constitution de l'inflammasome et de la sécrétion de cytokines. C'est le cas pour AIM2, qui favorise le relargage d'alarmines qui vont avoir un effet protumoral. Ainsi, les cellules dendritiques infiltrant les tumeurs pulmonaires, corrélées avec un mauvais pronostic, sécrètent de l'IL-1α à des niveaux très élevés, en lien avec un relargage cytosolique plus important de calcium (Sorrentino et al., 2015). L'activation d'AIM2 induit le relargage de cette cytokine dépendante des IFN de type I. AIM2 permet également l'augmentation de l'expression de PD-L1 via un relargage important d'HMGB1, favorisant la mise en place d'un contexte immunosuppressif et sénescent (Li et al., 2018a). Le blocage d'HMGB1 permettait de restaurer la survie des souris dans un modèle murin de cancer du pancréas.

3. Approches thérapeutiques de l'inflammasome

a. L'inflammasome comme marqueur pronostic et prédictif en oncologie

La modification de l'expression de certains constituants de l'inflammasome peut avoir un rôle pronostic en fonction de la localisation tumorale. Ainsi, une large analyse transcriptomique asiatique a montré que l'expression de *NLRP1, NLRP3, NLRC4* et *AIM2* était diminuée dans l'épithélium du cancer colorectal, par rapport à l'expression dans l'épithélium sain correspondant, alors que *NOD1* et *NOD2* étaient augmentés (Liu et al., 2015). Dans cette étude, il existait une corrélation entre la diminution de l'expression de NLRP3 et AIM2 et le stade TNM de la maladie. De plus, dans le carcinome nasopharyngé, lié à l'infection chronique à EBV, NLRP3, NLRP7, NLRC4, AIM2, ASC et IL-1β étaient surexprimés, avec un effet bénéfique sur la survie de la surexpression de NRLP3 et AIM2 (Chen et al., 2012). Ceci s'explique par le fait que NLRP3 et AIM2 sont activés par des éléments provenant du virus EBV dont l'ADN pour AIM2 et les ROS et l'ATP extracellulaire pour NLRP3. Le traitement de ces cellules par radiothérapie et cisplatine, faisant partie intégrante du traitement de ces carcinomes, induit une activation forte de ces inflammasomes par le relargage de ces éléments. La sécrétion d'IL-1β qui en résulte permettait d'intensifier la réponse immunitaire antitumorale et inhibait, *in vitro* et *in vivo*, la

prolifération tumorale, augmentant la survie dans les modèles murins. Ceci est lié à un recrutement accru de PNN chez les souris, via l'IL-1β, et cela était retrouvé chez les patients (meilleure survie pour les tumeurs infiltrées par les TAN).

Dans les lésions pré-invasives, les constituants de l'inflammasome peuvent constituer un marqueur prédictif du risque de rechute. Ainsi, dans la vessie, l'injection de BCG en intravésical permettait de diminuer l'expression de NLRP4 et NLRP9 dans une cohorte de 20 patients, et leur expression avant traitement était corrélée à un risque plus élevé de rechute après BCG thérapie (Poli et al., 2017). De même, dans le foie sain, la forte expression de NLRP3, NLRC4 et caspase-1 chez des patients opérés d'un carcinome hépatocellulaire était associée à un mauvais pronostic du fait d'un risque plus élevé de rechute (Sonohara et al., 2017).

b. Comment cibler l'inflammasome en thérapeutique anticancéreuse ?

Comme expliqué précédemment, les différents constituants de l'inflammasome peuvent avoir des rôles diamétralement opposés selon l'organe dans lequel ils sont exprimés, et dans un même organe selon le stade de la maladie. Ils doivent donc faire l'objet de thérapeutiques ciblées.

Les traitements anticancéreux conventionnels

L'inflammasome va jouer un rôle dans la réponse aux traitements anticancéreux. Ainsi, dans la leucémie aigüe résistante aux corticoïdes, il a été retrouvé des niveaux élevés d'expression de la caspase-1 et de NLRP3 (Paugh et al., 2015). En effet, l'hypométhylation du promoteur de ces gènes induit leur hyperexpression. La caspase-1 va alors cliver le récepteur des glucocorticoïdes, diminuant ainsi le programme transcriptionnel normalement induit par les corticoïdes et favorisant la résistance au traitement dans la leucémie aigüe.

Les chimiothérapies, en favorisant le relargage du contenu cytosolique, jouent un rôle dans la mort cellulaire immunogénique (Locher et al., 2010). C'est le cas en particulier des anthracyclines, de l'oxaliplatine et des radiations ionisantes. Trois éléments majeurs sont nécessaires pour permettre à la chimiothérapie d'induire une mort cellulaire immunogénique. Le premier engage les complexes protéiques du réticulum endoplasmique. Ainsi, lors de l'administration de chimiothérapies, les cellules tumorales opèrent une translocation de la calréticuline à la surface cellulaire. Ceci correspond à un signal dit « eat-me » pour les cellules dendritiques qui vont phagocyter les cellules tumorales. Le second correspond à HMGB1 qui doit être relarguée par les cellules tumorales mourantes et va se fixer sur le TLR4 à la surface des cellules dendritiques. Enfin, le relargage d'ATP par les cellules mourantes va activer l'inflammasome NLRP3 via le récepteur P2X7R dans les cellules dendritiques, conduisant à l'activation de l'inflammasome et le relargage de cytokines.

Les chimiothérapies vont donc pouvoir induire la mort cellulaire immunogénique et favoriser l'activation des NLR. Néanmoins, dans de nombreux modèles, la sécrétion d'IL-1β, protumorale, contre balance ces effets, d'où l'intérêt d'associer un ciblage de cette cytokine. Ainsi, le 5-FU et la gemcitabine sont 2 molécules capables d'induire l'expression de NLRP3 dans les MDSC *in vitro* et *in vivo* (Bruchard et al., 2013). L'activation de NLRP3 se fait principalement grâce au relargage de la cathepsine B dans le cytoplasme, du fait d'une perméabilisation du lysosome induite par la chimiothérapie. Elle ne dépend pas de la production de ROS ou de l'efflux de potassium. La cathepsine B va alors directement interagir avec NLRP3 au niveau de son domaine LRR. L'inactivation de NLRP3 ou de la caspase-1, qui résulte

en la diminution de la sécrétion de l'IL-1β, augmente l'efficacité antitumorale du 5FU, diminuée à nouveau en cas de déplétion des MDSC. Ceci suggère que cette cytokine diminue l'efficacité du 5FU, et en parallèle augmente la polarisation des CD4 en Th17, qui vont limiter l'efficacité du 5FU. Ainsi, même si ces chimiothérapies détruisent les MDSC et diminuent l'environnement immunosuppresseur, elles vont aussi favoriser l'activation de NLRP3 et la polarisation des CD4 en Th17, favorisant la croissance tumorale, ce qui appuie l'utilisation de l'anakinra dans ces modèles tumoraux.

NLRP3 est aussi activée par l'ATP dans les cellules dendritiques ce qui favorise la mort immunogénique en présence de chimiothérapies telles que les anthracyclines ou l'oxaliplatine (Ghiringhelli et al., 2009). Ainsi, l'ATP relargué par les cellules tumorales mourantes active le récepteur P2X7R des cellules dendritiques. Les souris déficientes en P2X7R, caspase-1 ou NLRP3 n'ont pas la possibilité d'activer les cellules dendritiques et les LT $CD8^+$ produisant l'IFNγ après mort des cellules tumorales par pyroptose, et dans ce contexte, les chimiothérapies sont également inefficaces. Il a également été montré que les polymorphismes du récepteur P2X7R dans le cancer du sein étaient associés à un risque accru de métastases malgré un traitement par anthracyclines. Enfin, l'avastin, anticorps anti-VEGF, est un inhibiteur spécifique du récepteur P2X7 et peut donc avoir un effet antitumoral dans les modèles dans lesquels P2X7 joue un rôle protumoral (Adinolfi et al., 2012).

L'IL-1β diminue également l'efficacité du cisplatine dans le mésothéliome pleural malin (Westbom et al., 2015). Ainsi, les cellules de mésothéliome activent moins *in vitro* les constituants de l'inflammasome, ce qui leur permet d'échapper à l'immunité antitumorale en diminuant la mort cellulaire immunogénique. Le traitement de lignées cellulaires par des chimiothérapies telles que le cisplatine ou la doxorubicine induit l'expression de NLRP3 qui va avoir un effet antitumoral. Néanmoins, la sécrétion d'IL-1β qui résulte de son activation conduit à une diminution de leur effet antitumoral. L'ajout d'Anakinra (qui bloque la cytokine) au cisplatine (qui induit la mort cellulaire immunogénique) en augmente l'efficacité dans des modèles murins de xénogreffe.

Dans d'autres modèles, l'IL-1β augmente la sensibilité des cancers du sein et des fibrosarcomes à la doxorubicine (Mattarollo et al., 2011). Ainsi, dans des modèles murins de tumeurs induites par les carcinogènes, il a été montré que l'efficacité de la doxorubicine était dépendante de l'infiltration en CD8 et la sécrétion en IFNγ. En effet, la doxorubicine induit le recrutement et la prolifération de CD8 spécifiques de l'antigène et l'effet de cette chimiothérapie dans le cancer du sein repose sur la présence d'IL-1β et d'IL-17, partiellement d'IL-12, ainsi que de l'infiltration en LT γδ. Ceci était en adéquation avec ce qui a été retrouvé dans les tissus mammaires de patientes avant toute chimiothérapie, avec une corrélation entre les réponses cliniques à la chimiothérapie et l'infiltration en CD8 et la présence d'IFNγ. Les raisons de cet effet différentiel de l'IL-1β sur la réponse à la chimiothérapie ne sont pas identifiées, et les biomarqueurs qui permettraient de prédire le rôle plutôt protumoral ou antitumoral de l'IL-1β ne sont actuellement pas connus.

Plus récemment, il a été montré qu'il pouvait y avoir un effet synergique entre le ciblage de l'inflammasome par la chimiothérapie et les immunothérapies ciblant les checkpoints immunitaires (Su et al., 2018). Ainsi, dans le cancer du sein avec surexpression d'Her2 sont utilisés dans anticorps ciblant ce récepteur. En plus de leur effet inhibiteur sur Her2, ces anticorps participent à l'ADCP (Antibody-Dependent Cellular Phagocytosis), correspondant à la phagocytose médiée par les anticorps. Les macrophages sont convertis en M2 par ce processus. Ce sont des cellules immunosuppressives car

l'ADCP induit l'expression de PD-L1 et IDO en cas d'exposition aux ICI, ce qui inhibe la réponse immunitaire antitumorale, en particulier celle des NK et LT $CD8^+$. Ceci est lié à AIM2 activé par la libération de l'ADN dans les macrophages et les CD, qui clive cGAS et l'inhibe (diminuant la sécrétion d'interféron de type I). Ceci conduit par la sécrétion d'IL-1β à l'expression de l'IDO et de PD-L1. Dans des modèles murins de cancer du sein traité par le trastuzumab (anti-Her2), il a été montré que ces M2 sont immunosuppresseurs et responsables d'une résistance aux traitements. Le traitement par ICI et anti-IDO pourrait restaurer l'efficacité du trastuzumab.

Thérapies ciblant spécifiquement les constituants de l'inflammasome (Figure 21)

Il existe plusieurs possibilités de ciblage de l'inflammasome. Néanmoins, pour le moment, seuls des inhibiteurs de la cascade de l'inflammasome ont été identifiés. La première correspond au ciblage des éléments activateurs et inhibiteurs de l'expression des constituants de l'inflammasome, mais ceux-ci sont encore mal connus et il n'existe pas pour le moment de ciblage d'amont. Néanmoins, les microARN peuvent avoir un rôle antitumoral. Ainsi, le miR-223, qui joue un rôle inhibiteur sur l'expression de NLRP3 en se liant à son transcrit, inhibe la sécrétion d'IL-1β et va donc avoir un rôle antitumoral dans les cancers dépendants de l'activation de NLRP3.

La seconde stratégie consiste à bloquer l'assemblage de l'inflammasome, en ciblant directement les NLR ou en bloquant leur assemblage en plateforme. Il existe peu de molécules à l'heure actuelle et la plus avancée cible NLRP3 : il s'agit de CRID3 (Cytokine Release Inhibitory Drug 3 ou CP-456773 ou MCC950) (Perera et al., 2018). Cette molécule cible l'oligomérisation d'ASC pendant l'activation de l'inflammasome NLRP3 mais aussi AIM2. Il est également possible de bloquer la caspase-1 par des inhibiteurs spécifiques tels que le thalidomide ou le ritonavir. Le ritonavir, utilisé en thérapie antiviral dans le VIH, a été montré comme capable de diminuer la production d'Il-18 en bloquant la caspase-1 dans des modèles murins de cancer du pancréas (Kast, 2008). Le thalidomide est quant à lui efficace dans le myélome en bloquant la sécrétion d'IL-6 dépendante de l'IL-1β (Keller et al., 2009).

La 3ème stratégie consiste à inhiber les cytokines finalement produites, via l'anakinra (IL-1Ra) qui bloque la signalisation de l'IL-1 après liaison au récepteur, le canakinumab qui se lie spécifiquement à l'IL-1β, ou le rilonacept qui cible l'IL-1 circulante. Ces molécules vont inhiber *in fine* la sécrétion d'IL-6 induite par l'IL-1β. Il est également possible d'inhiber l'IL-18 via l'utilisation de l'IL-18BP qui joue un rôle de leurre pour l'IL-18. Enfin, il est possible de cibler les effecteurs cibles des NLR caspase-indépendants, mais les régulations d'aval sont encore mal connues.

Inflammasome et microbiote

Des études récentes s'intéressent au rôle du microbiote dans la prévention du cancer et dans la réponse aux immunothérapies en oncologie. Ainsi, la modulation du microbiote peut prévenir la survenue du cancer dans des modèles murins (Chung et al., 2019). Dans ce modèle, les probiotiques composés d'*E. faecalis* diminuent l'activation de NLRP3 en diminuant la phagocytose des bactéries. Le traitement préalable de souris exposées au DSS diminue les phénomènes inflammatoires et les colites en activant l'inflammasome NLRP3. Il protège également de l'apparition des cancers coliques sur colite, mais n'a pas d'effet sur les cancers du côlon après leur installation.

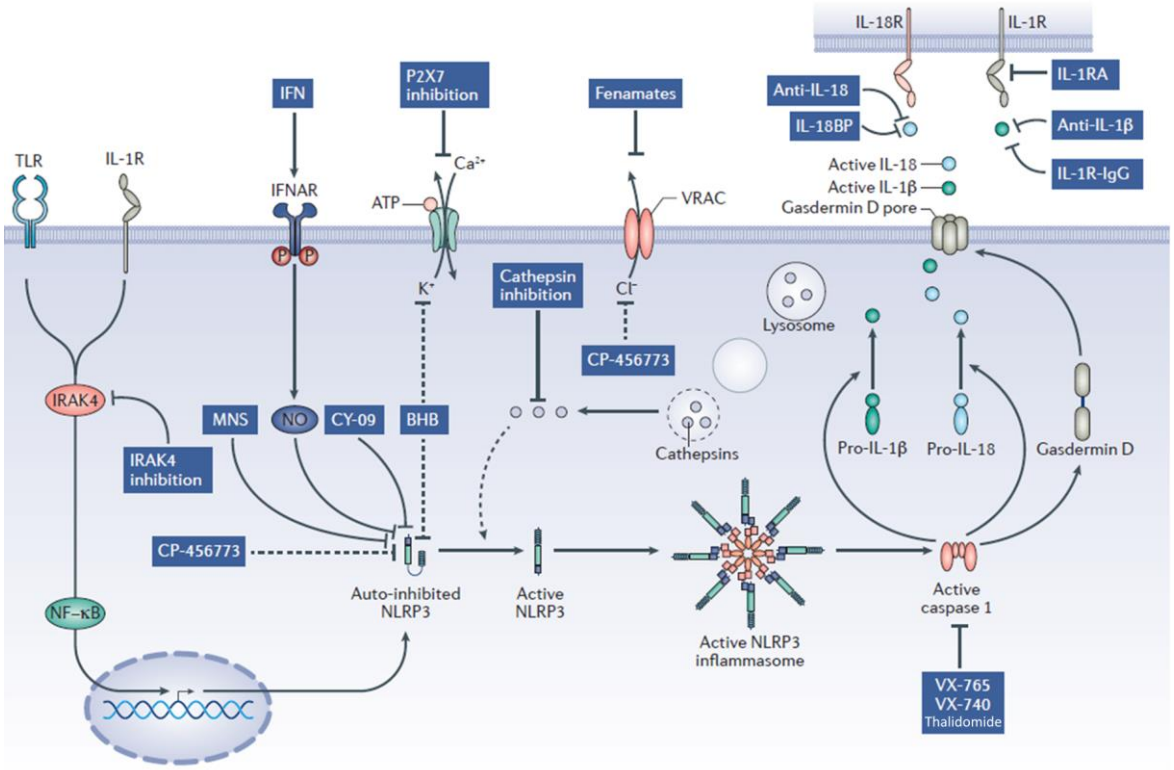


Figure 21: Ciblage thérapeutique de la cascade de l'inflammasome.
L'inflammasome peut être inhibé en cas d'effet protumoral, à différents niveaux : lors de la constitution de la plateforme intracellulaire, lors de l'activation de la caspase-1, ou une fois les cytokines sécrétées. *D'après Mangan et al. Nat Rev Drug Discovery 2018.*

g. Conclusion

Les inflammasomes sont des plateformes intracellulaires qui se mettent en place sous l'influence de différents signaux de danger. Elles vont activer la sécrétion de cytokines proinflammatoires pour le recrutement de cellules immunitaires, mais aussi la pyroptose. Les récepteurs de l'immunité innée qui le constituent jouent donc un rôle majeur de sentinelle et sont au cœur de la réponse immunitaire. Ils ont pour objectif de maintenir l'homéostasie de l'hôte en contrôlant les agressions. Ils participent donc, au même titre que les LT γδ, à l'immunosurveillance. L'activation de l'inflammasome est un mécanisme finement régulé dont la dérégulation peut occasionner des maladies auto-immunes mais aussi favoriser le cancer en permettant une inflammation chronique délétère pour les tissus.

La fonction des LT γδ peut être régulée par l'un des produits de l'activation de l'inflammasome, l'IL-18, qui est une puissante cytokine inflammatoire. C'est le cas particulier des LT γδ Vδ2$^-$ qui sont les LT γδ principalement retrouvés dans les tissus. En effet, *in vitro*, l'IL-18 est capable d'activer la sécrétion d'IFNγ et de TNFα par ces cellules (Guerville et al., 2015). Cet effet s'explique par le fait que l'activation du TCR des LT γδ favorise l'expression de l'IL-18Rβ, une des chaines constitutives du récepteur de l'IL-18. L'IL-18 augmente également leurs fonctions antitumorales en favorisant leur activité cytolytique. Ainsi, dans des modèles murins de mésothéliome, l'injection de LT γδ expandus dans un milieu enrichi en IL-2/IL-18 et stimulés par des bisphosphonates permettait d'allonger la survie des souris (Li et al., 2010). Cet effet était lié à un meilleur contrôle de la prolifération tumorale par les LT γδ prétraités par l'Il-18. En effet, ces LT γδ expandus exprimaient à des niveaux plus élevés le

récepteur NKG2D, les marqueurs de cytolyse ainsi que les marqueurs de survie. De plus, *in vitro*, l'ajout d'IL-18 dans le milieu de culture permettait également d'augmenter la prolifération des LT γδ, leur nombre ainsi que leur survie (Nussbaumer et al., 2013). Enfin, des travaux réalisés dans des modèles d'infection notamment à *S. aureus* ont montré que la sécrétion d'IL-18 suivant l'activation de l'inflammasome NLRC4 était associée à une diminution des taux d'IL-17 sécrétée par les LT γδ T17, permettant de diminuer le recrutement de neutrophiles polarisés par l'IL-17 (Paudel et al., 2019). Dans le cancer, comme décrit précédemment, cette cytokine a plutôt un rôle protumoral.

In vitro, l'IL-18 est retrouvée dans le surnageant de culture de plusieurs types de lignées cellulaires cancéreuses (Guerville et al., 2015). De manière intéressante, il a été retrouvé que certaines d'entre-elles en sécrétaient à des niveaux importants, ce qui s'explique par l'activation de l'inflammasome dans une cellule stressée par la transformation cancéreuse. Néanmoins, d'autres lignées n'en exprimaient pas du tout, comme les lignées de cancer du côlon par exemple. Ceci peut s'expliquer par un mécanisme d'échappement à l'immunité mis en place par la cellule tumorale, afin de ne pas être reconnue et détruite par les cellules immunitaires en général, et les LT γδ en particulier. L'inflammasome et l'IL-18 pourraient donc constituer des cibles thérapeutiques en oncologie, afin d'augmenter la réponse immunitaire antitumorale des LT γδ. Or l'ensemble des données concernant le rôle de l'inflammasome dans la tumorigénèse et la régulation de l'immunité provient principalement de modèles *in vitro*, ou des modèles murins, dans lesquels les analyses tissulaires sont faites dans le tissu de manière globale sans séparer le compartiment épithélial cancéreux de celui immunitaire stromal, ainsi que des analyses au niveau transcriptionnel et non protéique. C'est pourquoi, dans cette première partie de mon travail de thèse, nous avons évalué l'expression protéique *in vivo* des constituants des différents inflammasomes connus dans les tumeurs humaines coliques, et leur impact pronostique en clinique ainsi que la corrélation avec l'infiltrat immunitaire (voir V.a et V.b, articles soumis, et V.c pour le brevet).

Néanmoins, la régulation de l'activation du système immunitaire, en particulier en situation tumorale, est très complexe, impliquant différents intervenants. Ainsi, dans les travaux précédents du laboratoire, l'inhibition de l'IL-18 ou de la caspase-1 *in vitro* ne diminuait pas totalement l'activation des LT γδ, laissant penser que d'autres mécanismes impliquant des molécules solubles intervenaient dans ces modèles (Guerville et al., 2015). Parmi les molécules solubles qui sont susceptibles d'influer sur l'activation et les fonctions des cellules du système immunitaire, les métabolites relargués du fait des modifications du métabolisme de la cellule tumorale représentent une piste sérieuse que nous avons explorée dans la seconde partie de mon travail de thèse.

IV. Place du métabolisme dans la régulation de la réponse immunitaire

Le métabolisme cancéreux est l'un des hallmarks émergents introduits par Hanahan et Weinberg en 2011. En effet, la cellule tumorale entreprend une reprogrammation métabolique permettant de supporter les besoins énergétiques liés à la prolifération cellulaire non contrôlée. La cellule tumorale va donc modifier le métabolisme physiologique afin d'apporter les intermédiaires et nutriments nécessaire pour supporter ses modifications phénotypiques. De même, la mise en place de la réponse immunitaire est également conditionnée par une reprogrammation métabolique afin de permettre l'acquisition des fonctions cellulaires. Ceci induit, dans le microenvironnement tumoral, une compétition pour l'accès aux différents nutriments, mais aussi le relargage par les cellules tumorales de molécules potentiellement inhibitrices pour les cellules du système immunitaire.

a. Le métabolisme cellulaire physiologique

Le glucose est le nutriment le plus utilisé, dans le cadre de la glycolyse. Ainsi, la glycolyse convertit le glucose capté dans le microenvironnement en pyruvate dans le cytoplasme de la cellule (Figure 22). En condition normoxique, le pyruvate pénètre dans la mitochondrie pour être converti en acétyl-CoA par décarboxylation oxydative. L'acétyl-CoA va alors être oxydé en CO_2 dans le cycle du tricarboxylic acid (TCA) ou cycle de Krebs. Cette opération permet la réduction du NAD en NADH et/ou du FAD en $FADH_2$ au niveau de la chaine respiratoire mitochondriale. NADH et $FADH_2$ sont 2 facteurs rédox utilisés dans par les complexes I et II respectivement de la chaîne de transport des électrons pour la phosphorylation oxydative (OXPHOS) afin de créer un gradient de protons suffisant pour convertir l'ADP en ATP grâce à l'ATP synthase. La chaine de transport des électrons est la voie la plus efficiente pour produire de l'énergie, puisque l'OXPHOS génère 36 moles d'ATP à partir d'une mole de glucose (Macintyre and Rathmell, 2013).

Le système des OXPHOS, via la chaine respiratoire, produit des espèces réactives de l'oxygène (ROS), potentiellement responsables, en cas d'accumulation, de lésions cellulaires. Au niveau de la paroi mitochondriale se trouvent des transporteurs particuliers, les UCP (UnCoupling-Protein) qui favorisent l'efflux de protons afin de limiter la production d'ions superoxide par la chaine respiratoire dans la mitochondrie (Esteves and Brand, 2005). Il en existe 3 types, UCP1, le plus ancien connu découvert dans la graisse brune, UCP2 à UCP5, d'expression tissulaire plus large. Néanmoins, UCP2 semble être un des acteurs clés de la régulation du stress oxydatif mitochondrial, impliqué dans la protection contre les dommages cellulaires induits (Brand et al., 2004; Mattiasson and Sullivan, 2006). UCP2 est également impliquée dans le shift d'un métabolisme glycolytique à l'utilisation des acides gras (Dulloo and Samec, 2001; Sheets et al., 2008), et favorise également la glutaminolyse (Nübel et al., 2008).

Les cellules peuvent, en condition physiologique, produire de l'énergie à partir d'autres substrats, notamment les acides gras dans le cadre de la β-oxydation des acides gras (Fatty-Acid Oxydation (FAO)), ou la glutaminolyse. De son côté, la glutaminolyse transforme, dans la mitochondrie, la glutamine en glutamate puis en α-kétoglutarate (αKG) pour alimenter également le cycle de Krebs. Enfin, l'oxydation des acides gras permet de générer du citrate qui va également pouvoir être transformé en acétyl-CoA et alimenter le cycle de Krebs. Enfin, la voie des pentoses phosphates (PPP) est une voie métabolique appendue à la glycolyse, qui permet de soutenir la production des nucléotides en générant du NADPH.

En revanche, en condition hypoxique, la cellule réalise la glycolyse anaérobie, permettant de produire de l'énergie par un processus de fermentation. La mitochondrie, qui fonctionne donc avec de l'oxygène pour la chaine respiratoire, n'est pas fonctionnelle. Ainsi, le pyruvate reste dans le cytoplasme et est transformé en lactates grâce à la lactate déshydrogénase (LDH). Cette voie, plus rapide que l'OXPHOS pour produire de l'énergie, est moins efficace puisqu'elle ne produit que 2 moles d'ATP pour une mole de glucose. Néanmoins, elle permet de générer un certain nombre d'intermédiaires essentiels pour la division cellulaire notamment les lipides, protéines, et acides nucléiques (Lunt and Vander Heiden, 2011).

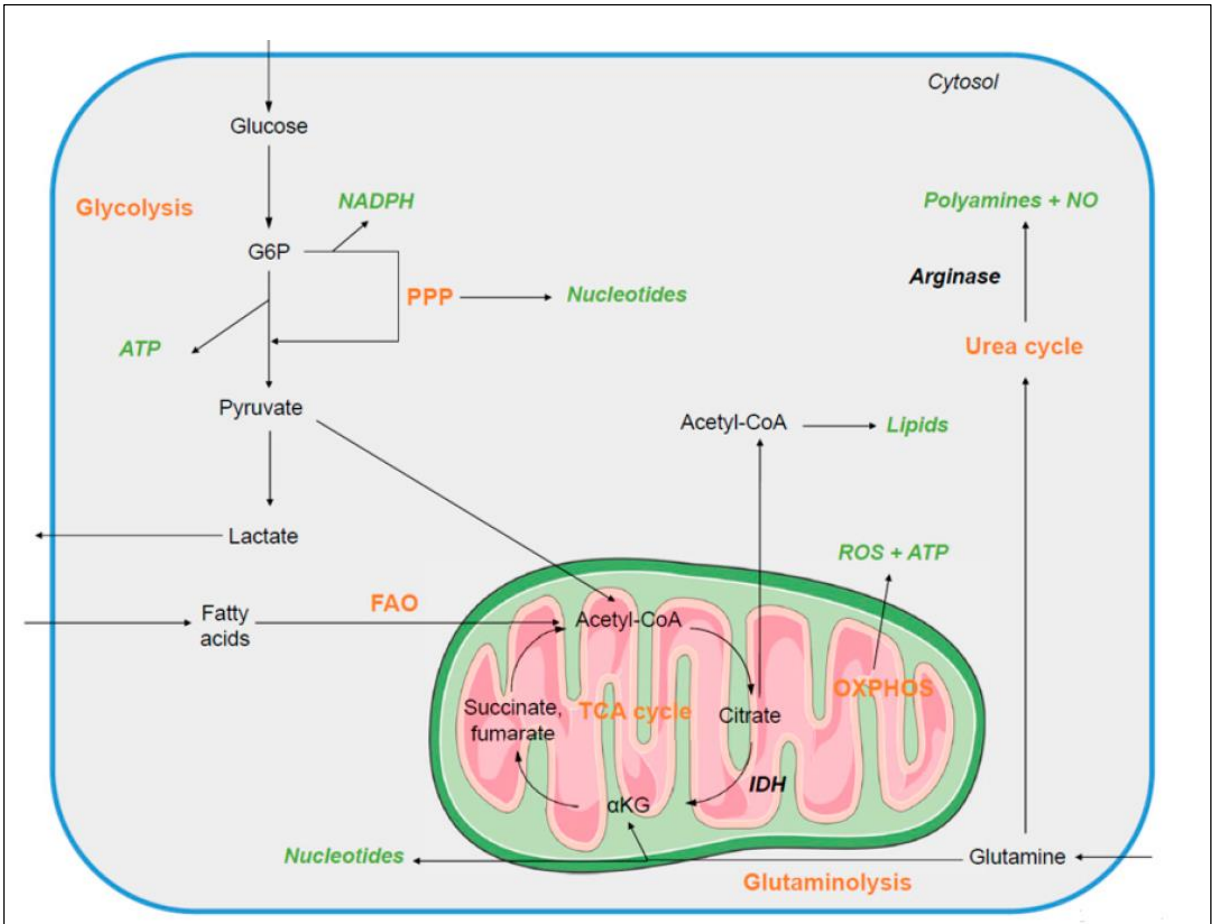


Figure 22 : Le métabolisme cellulaire normal.
Le glucose, capté à partir du microenvironnement, va être utilisé dans la voie de la glycolyse, qui produit à elle seule 2 moles d'ATP. Le pyruvate issu de cette réaction va en grande partie être transformé en acétyl-CoA pour alimenter le cycle de Krebs. Ce cycle, réalisé dans la mitochondrie, génère des intermédiaires de réaction grâce à la chaine respiratoire, qui permettent la synthèse d'ATP : c'est la phosphorylation oxydative (OXPHOS). Les intermédiaires permettent également la production d'acides gras. Le cycle de Krebs peut aussi être alimenté par la β-oxydation des acides gras ou par la glutaminolyse. Enfin, une petite partie du pyruvate reste dans le cytoplasme et sera transformé en lactate pour être éliminé dans le milieu extracellulaire. *D'après Domblides et al. Cells 2019.*

b. Le métabolisme de la cellule tumorale

La cellule tumorale a des besoins énergétiques différents d'une cellule normale afin de supporter la prolifération cellulaire perpétuelle ainsi que les autres processus qui en font une cellule cancéreuse (pour revue, voir (Domblides et al., 2018)). De nombreuses cellules tumorales réalisent la glycolyse en condition aérobie (correspondant à l'effet Warburg), par un processus de reprogrammation métabolique caractérisant maintenant les tumeurs. Ainsi, malgré la présence d'oxygène et d'une mitochondrie fonctionnelle, les cellules tumorales préfèrent réaliser la glycolyse aérobie et la fermentation lactique,

en ne faisant que peu d'OXPHOS (Figure 22). Cette reprogrammation permet de produire peu d'énergie mais beaucoup d'intermédiaires chimiques essentiels pour la génération des cellules filles tumorales. La cellule tumorale va ainsi utiliser principalement le glucose et la glutamine, pour générer un pool suffisant de résidus carbonés dans la cellule, de NADH et de FADH2 pour la production de l'ATP et de NADPH pour maintenir la balance rédox dans la cellule. Cette reprogrammation métabolique induit des modifications dans le microenvironnement tumoral qui vont modifier l'activité des cellules immunitaires.

La faible rentabilité énergétique de cette reprogrammation métabolique impose aux cellules tumorales d'augmenter leur captation de nutriments dans le microenvironnement, induisant une déplétion pour les autres cellules saines (Pavlova and Thompson, 2016). Afin d'augmenter la captation du glucose, la cellule tumorale va ainsi surexprimer les transporteurs membranaires du glucose en particulier GLUT1 (Jones and Thompson, 2009). Pour ce faire, la cellule tumorale devient insensible aux facteurs régulant habituellement cette expression par l'accumulation de mutations dans les voies importantes des MAPK et de Pi3k/Akt/mTOR. La voie mTOR en particulier joue un rôle majeur dans la régulation de la captation du glucose et du métabolisme en général. Elle est induite par l'hypoxie, via la production de HIF-1α. Ainsi, mTOR favorise la translocation de GLUT1 à la surface des cellules tumorales (Zambrano et al., 2010). L'hypoxie va également induire la surexpression d'enzymes glycolytiques intermédiaires de la glycolyse, via l'activation d'Akt (Gottlob et al., 2001). Enfin, les cellules tumorales vont déréguler la balance entre glycolyse et cycle de Krebs en inhibant ce dernier par l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), par les mutations de la fumarate hydratase (FH) et de la succinate déshydrogénase (SDH). Tout ceci conduit à l'augmentation de la disponibilité du glucose pour la cellule tumorale et à son utilisation rapide pour accéder aux besoins énergétiques créés par sa transformation en cellule cancéreuse.

La cellule va également utiliser la glutamine, qui permet d'alimenter le cycle de Krebs, puisqu'il est impliqué dans la production d'acides aminés, de nucléotides et d'acides gras (Mullen et al., 2012). La glutamine permet également la production du glutathion. Cette molécule joue un rôle majeur dans l'homéostasie rédox puisqu'elle existe sous différentes formes oxydo-réductrices. Ainsi, elle permet la détoxication des xénobiotiques ainsi que des oxydants de type peroxyde pour éviter les lésions cellulaires qui favorisent, en son absence, le vieillissement, les pathologies dégénératives, ainsi que le cancer. Le métabolisme de la glutamine est sous la dépendance de c-Myc qui augmente l'expression des transporteurs de la glutamine et des enzymes réalisant son métabolisme (Mannava et al., 2008; Wang et al., 2011). La perte de Rb, une protéine suppresseur de tumeur, survient fréquemment dans les cancers et cette perte induit également une augmentation de la captation de la glutamine (Reynolds et al., 2014).

La cellule tumorale peut également utiliser la voie des folates (Newman and Maddocks, 2017), qui permet la production des nucléotides, les processus de méthylation et la génération du pool de NADH/NADPH. La voie sérine-glycine, dans la mitochondrie, permet de métaboliser le tétrahydrofolate, et est fortement suractivée dans les cellules tumorales. Celles-ci augmentent leur production *de novo* de la sérine ou augmentent sa captation (Possemato et al., 2011). Les cellules sont fortement dépendantes de la sérine, et son inhibition peut induire la mort cellulaire.

Les ROS jouent un rôle important dans le processus tumoral, dans l'initiation et la progression tumorale ainsi que dans sa défense contre le microenvironnement. Les ROS causent ainsi des dommages

au niveau de l'ADN, favorisant le processus de mutagénèse mais également de manière indirecte induisant la prolifération et inhibant l'apoptose cellulaire via l'activation des facteurs NF-κB et AP-1. Ceci explique les niveaux maintenus élevés de ROS dans les cellules tumorales. Le rôle des UCP varie en fonction du stade tumoral. Ainsi, la diminution d'expression des UCP et en particulier de l'UCP2 est associée à une inflammation chronique avec activation de la voie NF-κB dans les modèles de colon, les rendant plus susceptibles à la tumorigénèse (Derdák et al., 2006). Les UCP sont ainsi impliquées dans le processus de vieillissement (Valle et al., 2010). Une fois la tumeur installée, les UCP semblent plutôt surexprimées et être impliquées dans la progression tumorale et le phénomène de chimiorésistance (Ayyasamy et al., 2011; Derdak et al., 2008; Li et al., 2015). Ainsi, la surexpression d'UCP2 *in vitro* inhibe l'accumulation de ROS et l'apoptose induite par les chimiothérapies, favorisant la survie cellulaire à la fois par l'inhibition de p53 mais aussi en favorisant la glycolyse aérobie. Enfin, les UCP pourraient également être impliquées dans la stabilisation du facteur HIF via la redistribution de l'oxygène dans la cellule (Hagen et al., 2003). Ainsi, il existe une diminution des concentrations cellulaires d'oxygène, inhibant la prolyl-hydroxylase et favorisant la translocation nucléaire de HIF, ce qui induit l'angiogenèse protumorale. Néanmoins, des travaux plus récents ont rapporté un rôle plutôt antitumoral des UCP, en particulier dans le cancer du côlon. Ainsi, la surexpression *in vivo* de l'UCP2 a été montrée comme inhibant la croissance tumorale dans des modèles de xénogreffes (Esteves et al., 2014). Cet effet était retrouvé dès l'initiation de la tumeur, que ce soit dans des modèles de carcinogénèse induite ou dans des modèles de prédisposition génétique (Aguilar et al., 2019). Le mécanisme identifié correspond à un shift métabolique en faveur de la synthèse des acides gras via la production de citrate par le cycle du TCA. Ceci induit une surutilisation du NADPH au détriment du contrôle du stress oxydatif par ce facteur réducteur, favorisant ainsi le stress oxydatif dans la cellule en cas de perte d'expression d'UCP2.

La cellule tumorale va donc capter et utiliser de manière très importante le glucose et la glutamine, induisant une déplétion dans le microenvironnement. Les cellules immunitaires, et en particulier les cellules lymphoïdes, ont besoin de ces 2 nutriments pour s'activer. En effet, lors de leur activation, les LT réalisent une reprogrammation métabolique similaire à celle de l'effet Warburg, augmentant leur capacité à capter le glucose et à réaliser la glycolyse (Abdel-Haleem et al., 2017). Ils utilisent également la glutamine pour générer des intermédiaires de réaction permettant de synthétiser des protéines et des lipides (Ramapriyan et al., 2019). Cela induit une compétition métabolique dans le microenvironnement tumorale, avec des LT dépassés par les capacités importantes des cellules tumorales à capter et utiliser les nutriments, induisant une diminution de leur capacité à s'activer et à détruire les cellules tumorales.

c. Le métabolisme des cellules immunitaires

Pour s'activer, les cellules immunitaires réalisent de profondes modifications de leur métabolisme afin de pouvoir exercer leurs fonctions (Warburg, 1956). Les cellules immunitaires présentes dans le microenvironnement tumoral vont donc entrer en compétition avec les cellules tumorales pour avoir accès aux nutriments nécessaires pour leurs fonctions. Néanmoins, les outils mis en place par les cellules tumorales pour induire la surconsommation des nutriments sont plus puissants et vont dépléter le microenvironnement de plusieurs nutriments, inhibant ainsi les cellules immunitaires. Ceci va permettre à la cellule tumorale, en plus de son effet protumoral sur les cellules du stroma, d'inhiber la réponse immunitaire antitumorale et de déréguler la balance entre phénotypes pro- et antitumoraux, afin de pouvoir continuer à proliférer et à disséminer.

1. Les lymphocytes T (Figure 23)

Les cellules T naïves

Les LT naïfs sont dans un état quiescent, dans l'attente de leur sélection antigénique. Ainsi, elles prolifèrent peu. Les LT ont donc un métabolisme catabolique dans lequel les nutriments sont utilisés pour le maintien homéostasique et non pour la biosynthèse. Les cellules naïves vont utiliser les nutriments dans l'OXPHOS pour maintenir les fonctions essentielles de la cellule, avec un faible taux de glycolyse et de glutaminolyse (Pearce and Pearce, 2013). Ce métabolisme est maintenu grâce à des cytokines telles que l'IL-4 et l'IL-7 (Plas et al., 2002; Tan et al., 2001). La quiescence est aussi maintenue par l'inhibition de la voie Akt par TSC1 (Yang et al., 2011).

Activation des LT et reprogrammation métabolique

La reconnaissance de l'antigène par le TCR nécessite une reprogrammation métabolique afin de permettre la prolifération cellulaire et l'acquisition des fonctions des LT, responsables de besoins énergétiques importants. Les cellules vont donc changer leur métabolisme pour l'orienter vers la glycolyse aérobie (anabolisme) avec une surexpression de la voie des PPP, de la glutaminolyse et une augmentation rapide de l'ATP et de la biomasse produite (acides aminés, lipides, acides nucléiques…) (Maciolek et al., 2014). Les LT activés vont en parallèle maintenir l'OXPHOS afin de pouvoir choisir entre OXPHOS et glycolyse aérobie en fonction des nutriments présents dans le microenvironnement. Néanmoins, pour une fonction optimale, la glycolyse aérobie est nécessaire (Chang et al., 2013; Jacobs et al., 2008).

En cas de déprivation en glucose, le LT peut également utiliser la voie de la glutaminolyse (Carr et al., 2010). La glutamine devient alors un nutriment essentiel, et sa déplétion va induire l'arrêt de la prolifération des LT et de la production de cytokines. L'activation des LT est associée à une augmentation de la captation de la glutamine dépendante du CD28, via la surexpression des transporteurs de la glutamine. Leur expression est régulée par l'activation de ERK, qui est TCR-dépendante. Ainsi, la perte d'expression de ces transporteurs induit un défaut d'activation des LT (Carr et al., 2010; Sinclair et al., 2013).

Enfin, il existe une augmentation de la synthèse des acides gras, avec un rôle important de l'ACC1 (Acetyl Coenzyme A Carboxylase 1), enzyme essentielle pour la conversion de l'acétyl-CoA (Lee et al., 2014). La production d'acides gras est essentielle pour la différenciation en T effecteurs et l'expansion de la population cellulaire.

La régulation de cette reprogrammation métabolique se fait à 2 niveaux. Le premier niveau est transcriptionnel, impliquant c-Myc et ERR (Estrogen-Related Receptors) (Gaber et al., 2015). C-Myc promeut la glycolyse aérobie et la glutaminolyse pour produire de l'αKG qui alimente le cycle de Krebs. C-Myc favorise également la production de citrate à partir du glucose en utilisant la voie de la biosynthèse des acides gras (Wang et al., 2011). Ainsi, dans des modèles murins, la délétion de c-Myc inhibait la glycolyse et la glutaminolyse induites par l'activation du TCR, bloquant ainsi l'activation des LT. ERRα est un autre facteur régulateur important. Ainsi, son niveau d'expression augmente pendant l'activation des LT. Il permet d'augmenter l'expression de GLUT-1, la captation du glucose, et les processus mitochondriaux métaboliques. Sa délétion dans des modèles murins induit un défaut d'activation et de prolifération des LT (Michalek et al., 2011a).

Le second niveau de régulation de cette reprogrammation est post-transcriptionnel, via l'activation d'AMPK et la stabilisation de HIF-1α (Gaber et al., 2015). mTOR est un régulateur majeur du métabolisme dans les LT puisqu'il intègre les informations liées aux niveaux de nutriments et d'énergie dans la cellule et dans le microenvironnement, l'état de stress de la cellule et les facteurs de croissance. Son rôle est de réguler les différentes voies métaboliques pour répondre aux besoins du LT au moment de son activation. En effet, la stimulation du CD28 induit une signalisation qui implique la voie Pi3K/Akt/mTOR pour favoriser le métabolisme du glucose et prévenir toute anergie du LT

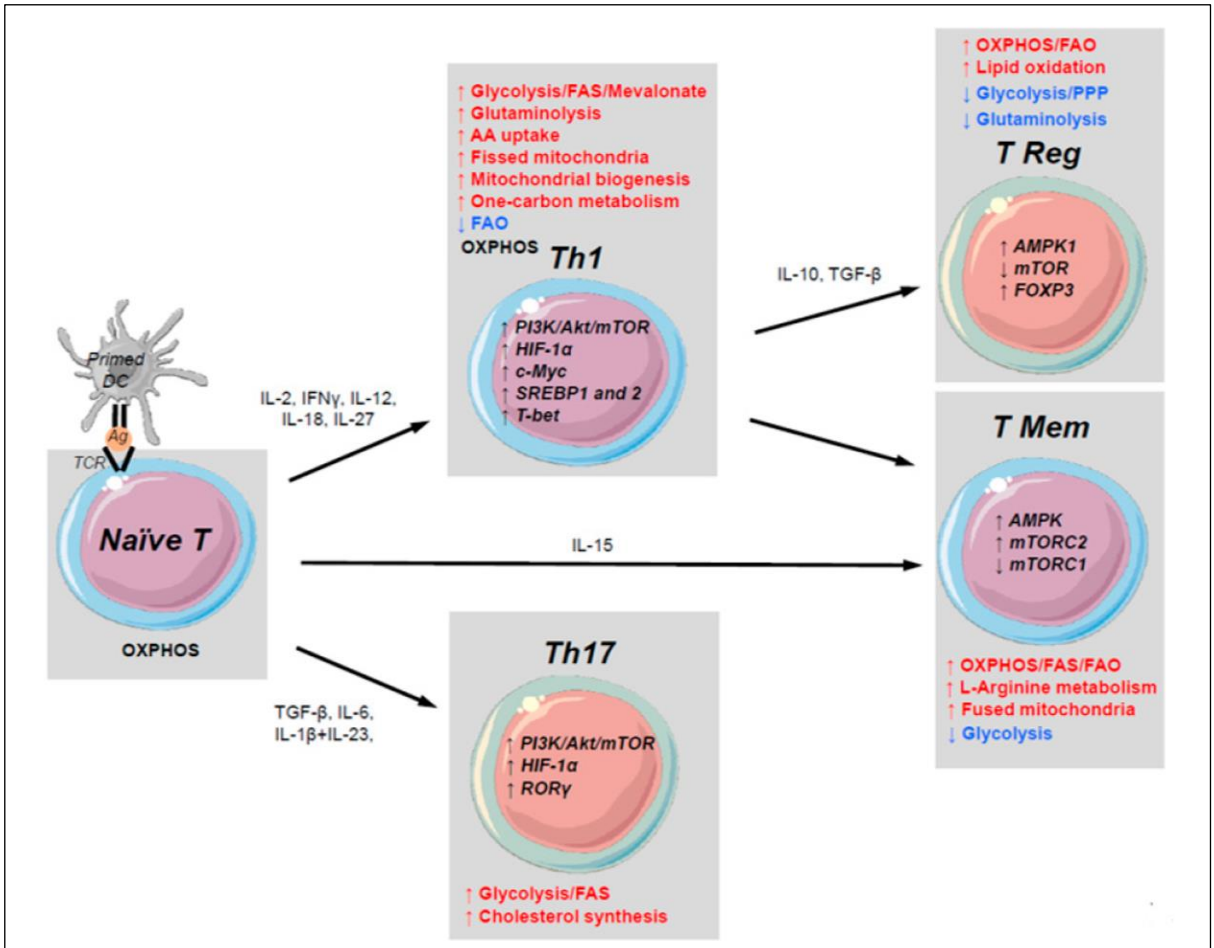


Figure 23: Reprogrammation métabolique conduisant à l'activation et la polarisation des lymphocytes T.
Le métabolisme des LT, en complément des signaux cytokiniques reçus du microenvironnement, va conditionner leur activation et leur polarisation. Les voies métaboliques surexprimées sont indiquées en rouge, celles sous exprimées en bleu et celles inchangées en noir. De même, pour chaque cellule, les enzymes et/ou facteurs de transcription impliqués sont précisés. *D'après Domblides et al. Cells 2018.*

(Frauwirth et al., 2002). Cette voie favorise la translocation à la surface de la cellule du transporteur GLUT-1, évite son internalisation pour dégradation et permet l'expression de transporteurs des acides aminés (MacIver et al., 2013; Powell and Delgoffe, 2010). De plus, la voie mTOR favorise la phosphorylation des enzymes de la glycolyse pour leur activation (Tandon et al., 2011). Ainsi, l'inhibition de la voie de la glycolyse dans des LT induit leur anergie par défaut d'activation.

AMPK est également un senseur métabolique majeur impliqué dans l'activation des LT. Son activation dépend de la balance intracellulaire entre AMP et ATP, qui traduit l'état des ressources énergétiques de la cellule. Ainsi, en cas d'excès d'AMP, elle favorise la synthèse d'ATP par la voie mitochondriale. En parallèle, l'activation d'AMPK inhibe la voie mTOR pour permettre un métabolisme plutôt catabolique (Hardie et al., 2012; MacIver et al., 2011), compatible avec la différenciation en LT

mémoire (Rolf et al., 2013). Mais son activation est également importante pour le développement des fonctions effectrices et la flexibilité métabolique des LT en cas de déprivation en nutriments (Blagih et al., 2015). Ainsi, dans des modèles murins, la perte d'expression d'AMPK induisait, dans ce contexte, un défaut de reprogrammation vers un métabolisme mitochondrial.

HIF-1α est le dernier acteur majeur permettant l'adaptation aux conditions d'hypoxie, puisqu'elle favorise le changement de l'OXPHOS vers la glycolyse aérobie (Kim et al., 2006b). Il est induit par mTORC1, complexe formé entre autre de mTOR et Raptor une protéine assurant sa régulation. La délétion de VHL, un régulateur négatif de HIF-1α, induit l'augmentation de la glycolyse et l'activation dérégulée des LT (Doedens et al., 2013). De plus, il favorise l'accumulation d'un métabolite, le S-2-hydroxyglutarate, qui induit la déméthylation de l'ADN et des histones (Tyrakis et al., 2016). La méthylation de l'ADN et des histones étant impliquée dans la régulation de l'expression des gènes, HIF-1α favorise donc l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, l'activation et les fonctions antitumorales des LT.

Métabolisme cellulaire et phénotype des LT

Les LT Th1, Th2 et Th17 réalisent la glycolyse via l'activation de la voie mTOR (Michalek et al., 2011b). Ainsi, l'inhibition de mTOR ou HIF-1α favorise la polarisation des LT en T régulateurs, même lorsque des cytokines polarisant en Th1/2/17 sont ajoutées dans le milieu de culture (Delgoffe and Powell, 2009; Kopf et al., 2007). En effet, la polarisation Th17 repose surtout sur l'utilisation de la glycolyse dépendante de mTOR et HIF-1α. Ainsi, dans des modèles murins déficients en HIF-1α, l'inhibition de la glycolyse induisait l'absence de différenciation en Th17 (Dang et al., 2011). En contrepartie, il existe une augmentation de la polarisation en T régulateurs, du fait de la surexpression d'AMPK, qui induit une diminution de l'expression de GLUT-1 (Shi et al., 2011). L'activation de mTORC1 polarise les LT en Th1 et celle de mTORC2 (complexe formé de mTOR et de Rictor) en Th2 (Delgoffe et al., 2011). De plus, la LDH-A, qui favorise la glycolyse aérobie dans les Th1, est induite dans les LT activés et promeut l'expression de l'IFNγ grâce au maintien de fortes concentrations d'acétyl-CoA qui joue un rôle dans l'acétylation et des histones et l'expression du gène de l'IFNγ (Peng et al., 2016). De même, l'expression du gène de l'IFNγ est sous dépendance de GAPDH, une enzyme glycolytique, ce qui conditionne également l'activation des LT (Chang et al., 2013).

Les lymphocytes T mémoires

Lors de la transformation en LT mémoires, les cellules changent vers un métabolisme catabolique pour permettre la quiescence et la persistance à long terme. Le ratio AMP/ATP augmente, ce qui active l'AMPK et conduit à la promotion de la β-oxydation des acides gras pour apporter des intermédiaires au cycle de Krebs pour la synthèse d'ATP (OXPHOS). Ainsi, le traitement de souris avec de la metformine, un activateur indirect de l'AMPK, induisait la β-oxydation des acides gras et favorisait ainsi la différenciation des LT en phénotype mémoire, en diminuant leur différenciation en LT effecteurs (Pearce et al., 2009). La β-oxydation des acides gras est essentielle pour leur différenciation en LT mémoires, leur persistance à long terme ainsi que leur réactivation une fois l'antigène revu. Les LT mémoires vont, après un nouveau contact avec l'antigène, se différencier rapidement, ce qui est permis par une augmentation importante de la masse mitochondriale grâce à l'activité de l'AMPK et grâce à une chaine respiratoire plus développée. Ceci permet une augmentation très rapide du flux glycolytique suite à l'activation du complexe TCR/CD28, via l'activation d'Akt et mTORC2 pour produire du pyruvate et alimenter l'OXPHOS (Gubser et al., 2013). Ces cellules mémoires sont essentielles dans la

réponse immunitaire antitumorale et peuvent expliquer les réponses prolongées observées avec les ICI chez l'Homme ou dans des modèles murins (Klebanoff et al., 2005). Ceci permet aux LT mémoires d'être moins sensibles à l'immunosuppression induite dans la tumeur. La masse mitochondriale semble jouer un rôle central dans ces cellules. Ainsi, il a été montré que les LT infiltrant les tumeurs ont un défaut de masse mitochondriale (Scharping et al., 2016). Ceci est lié à un défaut d'expression de PGC-1α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator-1α), qui régule la biogénèse mitochondriale, du fait de l'activation répétée d'Akt dans ces cellules. Ainsi, lors de la réactivation, le LT ne peut pas augmenter la masse mitochondriale, ce qui induit un défaut du métabolisme oxydatif des LT et donc de leur activation.

Les lymphocytes T régulateurs

Les LT régulateurs ont un métabolisme qui repose principalement sur l'oxydation des lipides avec un rôle majeur de la voie du mévalonate (Michalek et al., 2011b; Zeng et al., 2013). Les LT régulateurs sont également dépendants de la glycolyse, mais moins de la glutaminolyse que les LT effecteurs (Ho et al., 2015; Newton et al., 2016). La glycolyse induit en effet l'expression de FoxP3, le facteur de transcription principal de ces cellules. Ils expriment ainsi fortement AMPK et peu mTOR, ce qui joue également un rôle important dans leur polarisation (Sharma et al., 2015).

2. Les cellules dendritiques (Figure 24)

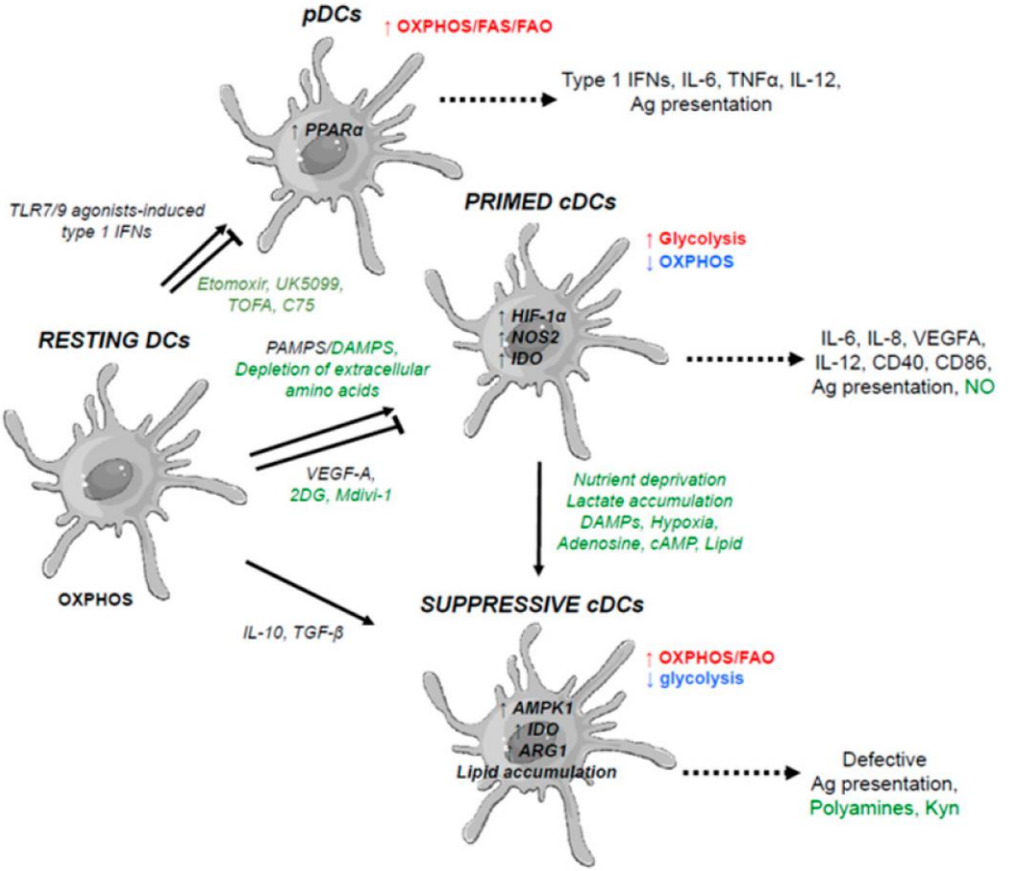


Figure 24: Reprogrammation métabolique conduisant à l'activation et la polarisation des cellules dendritiques.
Le métabolisme des cellules dendritiques, en complément des signaux reçus du microenvironnement, va conditionner leur activation et leur polarisation. Les voies métaboliques surexprimées sont indiquées en rouge et celles sous exprimées en bleu. De même, pour chaque cellule, les enzymes et/ou facteurs de transcription impliqués sont précisés. *D'après Domblides et al. Cells 2018.*

Les cellules dendritiques quiescentes utilisent principalement l'OXPHOS et la β-oxydation des acides gras. Après stimulation des TLR, elles diminuent l'OXPHOS et augmentent la glycolyse (Krawczyk et al., 2010). Ceci permet de supporter l'acquisition de nouvelles fonctions cellulaires plutôt que d'aider à la prolifération, en générant des intermédiaires métaboliques. Ainsi, cela produit de l'ATP qui est nécessaire pour leur survie sur des phases d'activation plus tardives, grâce à l'activation de HIF-1α et de la voie Pi3K/Akt. Ceci induit l'augmentation de la captation du glucose par l'augmentation d'expression de GLUT-1, de l'activité des hexokinases et phosphofructokinases, et la diminution du métabolisme oxydatif de la mitochondrie et la β-oxydation des acides gras. Ainsi, la perte d'expression de HIF-1α dans des modèles murins induisait la diminution de la captation du glucose, l'inhibition de la maturation des cellules dendritiques, résultant en un défaut d'activation des LT (Jantsch et al., 2008). La diminution de l'OXPHOS est également favorisée par iNOS qui inhibe la réoxydation du NADH dans la mitochondrie par la production de NO, et l'activation de la voie Pi3K/Akt qui inhibe AMPK.

En hypoxie, l'activation de HIF-1α induit l'expression des gènes de la glycolyse, favorisant la maturation de ces cellules dans les modèles murins (Jantsch et al., 2008) mais pouvant de l'autre côté altérer leur capacité de migration et leur différenciation (Mancino et al., 2008). Néanmoins, l'hypoxie génère de l'adénosine et des lactates qui rendent les cellules dendritiques tolérogènes (Yang et al., 2010). L'adénosine induit en effet l'expression d'AMPK qui inhibe la glycolyse et permet un switch vers l'OXPHOS, limitant ainsi son activation. Ces cellules dendritiques tolérogènes vont donc sécréter des molécules à fort potentiel immunosuppresseur telles que l'IL-6, l'Il-10 ou le TGFβ (Novitskiy et al., 2008).

3. Les macrophages (Figure 25)

La polarisation des macrophages M1 ou M2 est régulée par le métabolisme. Les macrophages de type M1 jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre les pathogènes grâce à la sécrétion de nombreuses cytokines proinflammatoires telles que l'IL-6, l'Il-1 et l'IL-12, les espèces réactives du nitrogènes et les espèces réactives de l'oxygène (Murray and Wynn, 2011). Ils peuvent également inhiber les cellules immunosuppressives et amplifier la réponse Th1 (Biswas and Mantovani, 2010). Les macrophages peuvent aussi se différencier en type M2 (phénotype alternatif) après stimulation par l'IL-4, l'IL-10 ou les glucocorticoïdes. Ces cellules ont plutôt un effet anti-inflammatoire en réduisant la sécrétion des cytokines inflammatoires, et en favorisant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 ou le TGFβ. Ils ont également pour capacité de favoriser la progression tumorale et le remodelage tissulaire, notamment en sécrétant des molécules proangiogéniques telles que le VEGF. Comme les autres cellules immunitaires, les macrophages sont des cellules plastiques qui seront modelées par la tumeur et son microenvironnement.

Les macrophages M1, lorsqu'ils rentrent en contact avec l'IFNγ et le LPS, opèrent une reprogrammation métabolique permettant de majorer le flux glycolytique. Cette reprogrammation est contrôlée par la voie mTOR/HIF-1α, ce qui induit une diminution de la voie mitochondriale permettant l'accumulation d'intermédiaires métaboliques qui induisent une expression de l'IL-1β et du TNF (Biswas, 2015; Dietl et al., 2010). L'acidification du milieu, par l'accumulation d'acide lactique d'origine tumorale, induit une inhibition de la sécrétion par les M1 de ces cytokines. Le succinate semble être l'intermédiaire ayant le plus d'effet. Ainsi, il favorise le programme transcriptionnel proinflammatoire tout en diminuant le programme anti-inflammatoire. La succinate déshydrogénase, en

association avec des modifications du potentiel de la membrane mitochondriale, va favoriser la production mitochondriale de ROS par le macrophage, qui sont essentiels à ses fonctions cytotoxiques (Mills et al., 2016). HIF-1α est un facteur de transcription essentiel pour les macrophages M1 (Cramer et al., 2003). Ainsi, en condition hypoxique, il existe une expression de HIF-1α, qui, comme décrit précédemment, favorise l'expression des enzymes de la glycolyse, induit la production d'espèces réactives du nitrogène, et diminue l'activité du cycle de Krebs pour permettre la production de ROS (Peyssonnaux et al., 2005). Dans des modèles murins, la perte d'expression de HIF-1α induisait la diminution de la synthèse d'ATP par les macrophages, résultant dans la diminution de leur capacité de migration, d'invasion et d'agrégation. Ces cellules étaient également moins aptes à s'activer en présence du stimulus adapté, ce qui est en faveur d'un rôle important de HIF-1α dans l'acquisition des fonctions proinflammatoires (Mills et al., 2016).

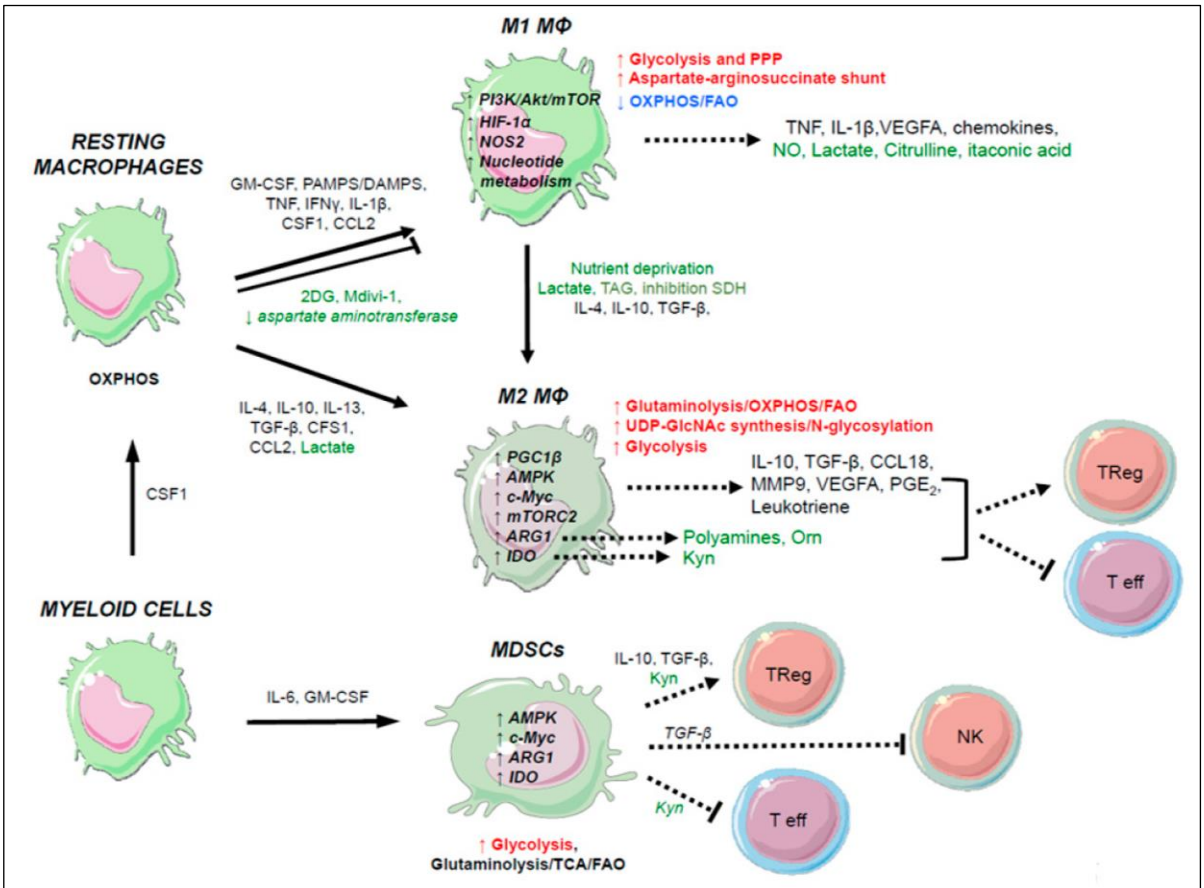


Figure 25: Reprogrammation métabolique conduisant à l'activation et la polarisation des macrophages.
Le métabolisme des macrophages, en complément des signaux reçus du microenvironnement, va conditionner leur activation et leur polarisation. Les voies métaboliques surexprimées sont indiquées en rouge, celles sous exprimées en bleu et celles inchangées en noir. De même, pour chaque cellule, les enzymes et/ou facteurs de transcription impliqués sont précisés. *D'après Domblides et al. Cells 2018.*

En revanche, lorsque les M2 sont activés par l'IL-4 et l-IL-13, il existe un switch métabolique vers l'OXPHOS, l'oxydation des acides gras, tout en maintenant la glycolyse (Huang et al., 2016). L'augmentation de la glycolyse fait intervenir mTORC2 et STAT6, qui vont activer le facteur de transcription IRF4 (Interferon Regulatory Factor 4) pour favoriser la polarisation en M2. Ainsi, la perte d'expression de mTORC2 induit l'inhibition de la croissance tumorale et de l'immunité. C-Myc joue également un rôle majeur dans la polarisation en M2 (Pello et al., 2012). En effet, c-Myc favorise la glycolyse aérobie, la glutaminolyse et l'oxydation des acides gras (Wang et al., 2011). L'accumulation

d'acide lactique du fait de l'augmentation de la glycolyse augmente l'expression de l'arginase-1, du VEGFA et d'autres marqueurs M2, induisant ainsi leur fonction immunosuppressive (Colegio et al., 2014). Les principaux facteurs de transcription impliqués dans cette polarisation sont STAT6 et PGC-1β. Ainsi, PGC-1β est un régulateur transcriptionnel important de la voie de l'OXPHOS (Vats et al., 2006). Ainsi, sa perte d'expression dans des modèles murins limite leur activation *in vitro*. PGC-1β régule ainsi la balance entre M1 et M2, en diminuant les premiers au profit des seconds. Enfin, les M2 vont également pouvoir utiliser fortement la glutaminolyse en surexprimant les gènes de la voie (Jha et al., 2015), ainsi que la voie de l'oxydation des acides gras (Odegaard and Chawla, 2011).

Ces macrophages, ont des profils d'utilisation des acides aminés différents : les M1 utilisent l'arginine comme substrat pour l'iNOS pour la cytotoxicité, alors que les M2 utilisent ce même aminoacide pour l'arginase-1 (Murray and Wynn, 2011). L'arginase-1 est une enzyme impliquée dans le cycle de l'urée qui va capter l'arginine aux dépends de l'oxyde nitrique synthase, qui n'en dispose plus pour générer du NO. Il va donc y avoir une diminution de la synthèse d'éléments impliqués dans la cytotoxicité, au profit du processus de réparation tissulaire via la prolifération cellulaire et la synthèse de collagène. L'IDH (Isocitrate DésHydrogénase) correspond à un carrefour essentiel pour la polarisation en M1. Ainsi, l'expression d'IDH est inhibée, ce qui induit l'accumulation de citrate puisqu'il s'agit d'une enzyme qui métabolise normalement l'isocitrate en αKG. De ce fait, pour maintenir la production des intermédiaires du cycle de Krebs, la cellule compense grâce au cycle de l'aspartate-argininosuccinate. Ce shunt crée un lien entre le cycle de Krebs et le cycle de l'urée grâce au fumarate et au malate. Ceci permet de régénérer l'arginine, pour permettre de continuer à synthétiser du NO par l'iNOS, ou pour la synthèse du glutamate qui alimente le cycle de Krebs pour poursuivre la production de succinate. L'aspartate, produit par transamination du glutamate et de l'oxaloacétate dans la mitochondrie, est relargé dans le cytosol où il joue un rôle de donneur de groupement nitrogène dans le cycle de l'urée après transformation en argininosuccinate. L'équilibre entre ces 2 cycles est régulé par les transporteurs des différents intermédiaires situés entre la mitochondrie et le cytosol.

d. Effet du métabolisme tumoral sur l'activité des cellules immunitaires dans le microenvironnement tumoral (Domblides et al., 2019)

La cellule tumorale va tenter d'échapper à la réponse immunitaire antitumorale, en agissant sur tous les acteurs du système immunitaire et à toutes les étapes du cycle de la réponse immunitaire de Mellman et Chen.

1. La production des lactates induit une acidification délétère du milieu (Figure 26)

Les cellules tumorales, par la glycolyse aérobie, vont induire la production importante de lactates. Les lactates vont s'accumuler dans le cytoplasme de la cellule tumorale mais aussi dans le milieu extracellulaire et ne seront pas assez éliminés (De Milito et al., 2010). La cellule présente des transporteurs membranaires, notamment MCT4 (Mono-Carboxylate Transporter 4), qui éliminent le lactate en captant des protons. MCT4 permet ainsi de réguler le pH intracellulaire, afin d'éviter les effets de l'acidification du pH intracellulaire sur la survie, la prolifération et la motilité (Chambard and Pouyssegur, 1986; Pouysségur et al., 1984).

La cellule tumorale va également surexprimer la Carbonic Anhydrase IX (CA-IX) membranaire, qui augmente encore un peu plus l'acidification du milieu (Chiche et al., 2009). Son expression est

régulée par la voie HIF, et sa surexpression est un facteur de mauvais pronostic et de progression métastatique (Hussain et al., 2007). Il s'agit d'une enzyme qui catalyse la transformation du CO_2 en bicarbonate et en protons. Elle joue un rôle dans la limitation de l'acidification du milieu intracellulaire et dans la régulation des niveaux d'ATP. En surexprimant CA-IX, la cellule tumorale va pouvoir réguler son métabolisme et limiter l'acidification cytoplasmique en régulant finement l'efflux du lactate (Mazzio et al., 2012). Elle va également contrôler le pH extracellulaire pour promouvoir leur prolifération et leur survie. En effet, les lactates sont impliqués dans le phénotype tumoral. A de fortes concentrations, ils peuvent favoriser la dégradation de la matrice extracellulaire, et donc la migration des cellules (Baumann et al., 2009). L'acide lactique peut également induire la production par les fibroblastes associés aux tumeurs d'acide hyaluronique et de TGFβ (Rudrabhatla et al., 2006), et la surexpression du CD44 par les cellules tumorales pour retenir l'acide hyaluronique à leur surface et permettre la migration. L'acidification permet également de promouvoir la prolifération des cellules, donc la surconsommation de nutriments, aux dépens des cellules immunitaires. L'acidification a également un effet pro-angiogénique en activant la voie de l'HIF (Polet and Feron, 2013), mais aussi en favorisant la sécrétion d'IL-8 par les cellules endothéliales et de VEGF par les macrophages et cellules endothéliales (Végran et al., 2011). Enfin, l'acidification est associée à une augmentation de la survie cellulaire (DeClerck and Elble, 2010; Sattler et al., 2010) et de la radiorésistance (47). Néanmoins, en cas d'acidification trop importante du milieu extracellulaire, la cellule tumorale va diminuer sa consommation de glucose et donc sa production de lactates, augmenter le programme transcriptionnel qui contrôle l'OXPHOS pour limiter l'acidification, dans une boucle de rétrocontrôle négatif.

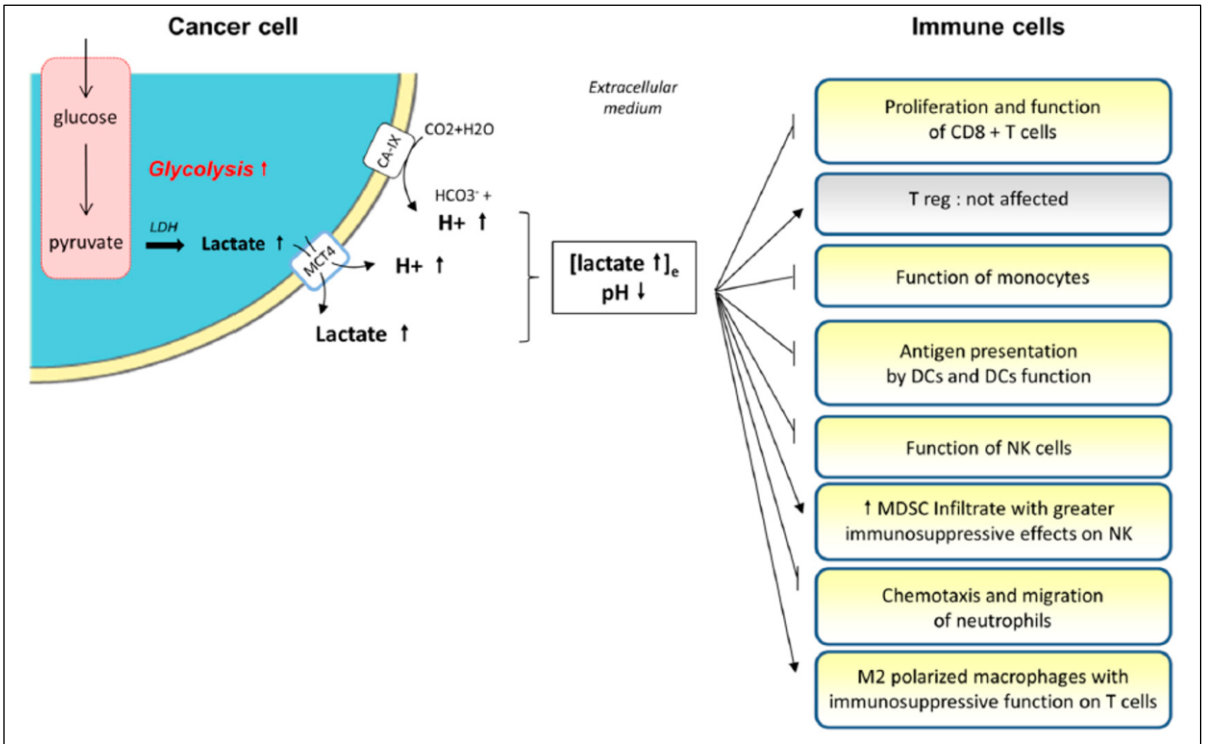


Figure 26 : Mécanismes de la production de lactates par les cellules tumorales, et effets sur le système immunitaire. La majoration de la glycolyse aérobie (effet Warburg) dans la cellule tumorale favorise la production de lactates qui vont être éliminés dans le microenvironnement de manière active pour éviter l'acidification du cytosol de la cellule. En conséquence, le pH extracellulaire diminue, phénomène majoré par la surexpression fréquente de CA-IX qui produit des protons. Les lactates, par l'acidification ou par leur accumulation, vont avoir un effet inhibiteur sur les cellules immunitaires antitumorales et favorisent le recrutement et l'activité des cellules protumorales telles que les MSDC ou les macrophages M2. *D'après Domblides et al. Cells 2019.*

A l'inverse, l'acidification du milieu extracellulaire induit un blocage de l'efflux des lactates contenus dans le cytoplasme des LT (Fischer et al., 2007). Cela favorise l'anergie des LT et en particulier des CD8, en diminuant la prolifération après stimulation antigénique, et ce dès le premier contact avec les lactates (Calcinotto et al., 2012). Cet effet est lié à la réduction de l'expression du TCR, de STAT5 et l'activation d'ERK en cas d'exposition brève, l'acidification agit sur leur fonction en diminuant leur capacité à sécréter des cytokines activatrices, à lyser les cellules tumorales en diminuant la production de granzyme B. De plus, une exposition plus prolongée favorise l'apoptose des cellules T, pas seulement par l'acidification du milieu puisque le traitement du milieu avec l'acide chlorhydrique n'induit pas l'apoptose des LT. Le lactate agit donc avec un mécanisme propre. Ces effets sont probablement dus à l'altération de l'activation TCR-dépendante de JNK, c-Jun et p38 (Mendler et al., 2012). En revanche, les lactates n'affectent pas les LT régulateurs car leur métabolisme dépend plutôt de l'oxydation des acides gras comme décrit plus haut.

L'accumulation des lactates est également délétère pour les monocytes, en diminuant leur capacité à sécréter du TNF, mais n'atteint pas leur viabilité (Dietl et al., 2010). Ceci est lié à l'expression par les monocytes de MCT-1 et MCT-4 qui, du fait du gradient de pH, augmentent la récupération par les monocytes des lactates extracellulaires pour libérer dans le milieu extracellulaire plus de protons afin de lutter contre l'acidification. Ceci inhibe leur capacité à produire des ROS et donc limite leurs capacités cytotoxiques. En effet, l'acidification va induire une modification dans le programme transcriptionnel en réduisant l'expression des gènes proinflammatoires : ils ralentissent la phosphorylation et l'activation d'Akt, impliqué dans la glycolyse, et diminuent NF-κB qui régule l'expression des cytokines et des chémokines (Peter et al., 2015). De même, les lactates favorisent le déséquilibre de la balance M1/M2 en faveur des M2 (Colegio et al., 2014).

L'acidification ne modifie pas la différenciation en cellule dendritique. Néanmoins, elle altère leur capacité à présenter l'antigène et à activer les LT (Gottfried et al., 2006). Ceci est lié à la sécrétion par les cellules tumorales et les cellules dendritiques protumorales d'IL-6 et de M-CSF, qui ont un fort potentiel protumoral. Les cellules tumorales vont également, sous l'influence des lactates, produire de l'IL-23 qui joue un rôle dans la promotion de la prolifération tumorale (Langowski et al., 2006). L'IL-23 va induire la production de l'IL-6, l'IL-17 et le TNFα. Ce sont des cytokines majeures proinflammatoires protumorales mais qui ne favorisent pas l'infiltration immunitaire en diminuant la sécrétion d'IFNγ par les LT Th1. L'IL-23 va également agir sur la matrice en induisant l'expression des métalloprotéinases notamment MMP-9, en augmentant l'angiogenèse et en diminuant l'infiltration par les $CD8^+$ par défaut d'accessibilité de la tumeur pour les LT (Shime et al., 2008).

Enfin, les lactates induisent l'expression de HIF-1α dans les macrophages, favorisant l'expression de l'arginase-1 et d'iNOS par les macrophages M2 (Ohashi et al., 2013). Les lactates vont aussi diminuer la fonction des cellules NK en diminuant, comme pour les CD8, leur expression du granzyme B et de la perforine et diminution de l'expression des récepteurs activateurs dont NKp46, essentiel à leur fonction cytotoxique. Les lactates augmentent également l'infiltration en MDSC et diminuent l'attraction des polynucléaireS neutrophiles (Lardner, 2001).

2. *Rôle de l'Indoléamine 2,3-Dioxygenase (IDO) et de la Tryptophan Dioxygénase (TDO) dans la déplétion en tryptophane et la production d'intermédiaires toxiques (Figure 27)*

C'est une des voies du métabolisme qui présente le plus d'avancées en clinique, avec des molécules testées dans des essais de phases II/III chez l'Homme. Il existe 3 isoformes de ces enzymes qui sont impliquées dans la voie du tryptophane : IDO1, IDO2 et TDO2. Ces isoformes ont une expression tissulaire variable (Théate et al., 2015) : IDO1, exprimée dans les ganglions, la rate, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules stromales, est induite par les cytokines proinflammatoires telles que l'IFNγ (Friberg et al., 2002). TDO2, exprimée dans le foie, le placenta et le cerveau, est induite par le tryptophane et les glucocorticoïdes et

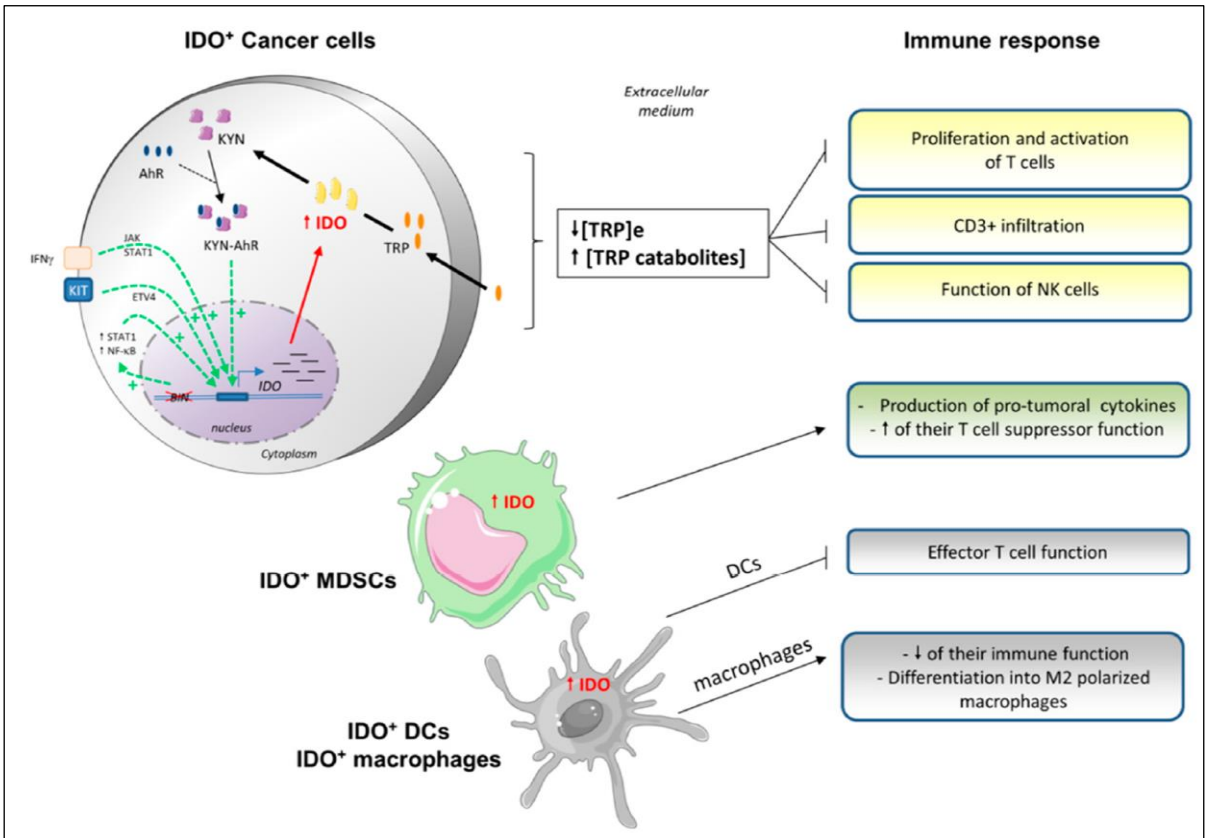


Figure 27 : Métabolisme du tryptophane dans les cellules tumorales, et effets sur le système immunitaire.
IDO est une enzyme fréquemment surexprimée dans les tumeurs, mais aussi dans certaines cellules immunitaires, ce qui induit une déprivation en tryptophane dans le microenvironnement tumoral, mais aussi le relargage de métabolites immunosuppresseurs. La déplétion en tryptophane, acide aminé essentiel, et/ou l'accumulation de catabolites toxiques induit une inhibition du recrutement et de l'activation des cellules immunitaires antitumorales. En parallèle, il existe une polarisation protumorale des cellules du système immunitaire, pour contribuer à la tumorigénèse. *D'après Domblides et al. Cells 2019.*

IDO2 est exprimée dans les cellules neuronales, les hépatocytes et les cellules dendritiques (Heng et al., 2016). Ce sont des enzymes cytosoliques qui catalysent la première étape du catabolisme du tryptophane dans la voie de la kynurénine. Le métabolisme du tryptophane est essentiel dans la production du NAD^+. IDO est activée de manière puissante par l'IFNγ, qui active JAK/STAT et induit l'expression de STAT1 et STAT3 (Zhai et al., 2015). La kynurénine, son métabolite, interagit avec le récepteur AhR, et peut aussi induire l'expression d'IDO1 via la voie STAT3, dans une boucle de rétrocontrôle.

Dans les cellules tumorales, IDO1 est exprimée de différentes manières. Dans certaines tumeurs, IDO1 est plutôt exprimée dans les sites riches en lymphocytes, du fait de la sécrétion d'IFNγ et correspond à un mécanisme de résistance. Dans d'autres tumeurs, l'expression d'IDO1 est constitutive

et les tumeurs sont entourées de moins de lymphocytes. Ainsi, *in vitro*, certaines lignées cellulaires expriment constitutivement IDO malgré l'absence d'IFNγ (Spranger et al., 2013), du fait de mutations de Bin1 (Muller et al., 2005). Bin1 est un gène suppresseur de tumeur qui code pour une protéine adaptatrice, comme sous-exprimé dans beaucoup de cancers, ce qui promeut la prolifération, migration et survie des cellules (Prendergast et al., 2011). La perte de Bin1 induit, *in vivo*, l'augmentation des taux intracellulaires de STAT1 et NF-κB, surexprimant ainsi IDO. Ces modifications sont également retrouvées dans l'environnement péritumoral mais pas à distance, du fait de modifications induites par la tumeur. La surexpression d'IDO peut se faire également sous la dépendance c-Kit via l'activation d'ETS variant 4 (ETV4), ou par la liaison du complexe kynurénine-AhR sur ses éléments de réponse, ce qui active STAT3 (Litzenburger et al., 2014). L'expression qui en résulte d'IDO1 et de l'IL-6 va induire de manière autocrine/paracrine l'expression de STAT3. Dans la cellule tumorale, IDO favorise les processus d'échappement immunitaire, l'invasion, l'angiogenèse, ainsi que le les processus d'inflammation chronique (Muller et al., 2010). Ainsi, les souris déficientes en IDO1 ont une tumorigénèse limitée, développent moins de métastases pulmonaires, ont des taux plus bas d'IL-6 et ont donc une meilleure survie (Smith et al., 2012). Elles ont également moins d'angiogenèse dans les poumons en condition physiologique.

De plus, IDO est surexprimée dans les cellules tumorales mais aussi dans les cellules du microenvironnement tumoral, telles que les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules endothéliales. Le blocage de la prolifération se fait de 2 façons : la déplétion du tryptophane qui active GCN2 (General Control Nonderepressible 2) (kinase qui détecte le déficit en acides aminés en se liant à l'ARN de transfert non chargé) et inhibe mTOR, et la toxicité des métabolites du tryptophane notamment la kynurénine (Cheong and Sun, 2018). Tout d'abord, sa surexpression induit une déplétion en tryptophane dans le microenvironnement tumoral, ce qui altère les fonctions des cellules immunitaires, favorisant la tolérance immunitaire (Munn et al., 2004). Les LT sont très sensibles à la déprivation du tryptophane dans le microenvironnement tumoral, ce qui favorise l'anergie et l'inhibition de la prolifération (Mellor et al., 2002). L'accumulation d'ARNt-tryptophane induit des signaux de stress médiés par GCN2 qui phopsohryle le facteur de transcription EIF2α. L'activation de GCN2 induit la polarisation des LT CD4 en LT régulateurs (Fallarino et al., 2006). La déprivation induit également une diminution de leur activation dépendante de l'antigène, la sous-expression de la chaine ζ du TCR, l'inhibition des facteurs de la signalisation d'aval du TCR notamment la voie des MAPK, et l'activation de l'autophagie via l'inhibition de mTORC1 et de PKC-θ. En plus d'un défaut de fonctionnalité, l'expression d'IDO conduit également à une diminution de l'infiltration en CD3 (Brandacher et al., 2006). Enfin, la déprivation augmente la sensibilité des LT à l'apoptose induite par la voie Fas (Lee et al., 2002).

Le catabolisme du tryptophane génère également des métabolites qui peuvent être toxiques pour les cellules immunitaires. La kynurénine est l'un d'entre-eux (McGaha et al., 2012) par ses interactions avec AhR (Opitz et al., 2011). AhR a un rôle de régulation de la réponse immunitaire, de l'inflammation et de la carcinogenèse. Le complexe kynurénine-AhR migre dans le noyau et induit l'expression de gènes proinflammatoires, ce qui explique son rôle protumoral et d'échappement à la réponse immunitaire. Le complexe a un effet sur les CD8 et les Th1 via l'induction de la caspase-8 et du cytochrome c (Frumento et al., 2002), mais pas les Th2. D'autres métabolites du tryptophane, dont l'acide 3-hydroxyanthranilique (3HAA), bloquent l'activation des LT, induisent l'apoptose via la déplétion du glutathion et l'inhibition de NF-κB (Hayashi et al., 2007). Les cellules NK sont également

touchées par ces catabolites, ce qui va altérer leur capacité à détruire les cellules tumorales en diminuant l'activation de récepteurs importants tels que le NKG2D et NKp46 (Della Chiesa et al., 2006).

Les cellules dendritiques peuvent exprimer IDO, ce qui leur confère un rôle protumoral tolérogène par l'activation des LT régulateurs via leur TCR et la signalisation Akt/mTOR qui favorise leur différenciation en T helper (Munn and Mellor, 2016). En effet, il existe une inhibition de l'activation de mTOR par la déprivation en acide aminé, et une activation de GCN2 et la surexpression de PTEN, via l'expression de PD1 et de la neuropiline-1. Les métabolites du tryptophane vont aussi favoriser l'expansion de LT et leur différenciation en LT régulateurs grâce à l'expression du TGFβ et de FoxP3 (Mezrich et al., 2010). Les LT régulateurs induit par ces cellules dendritiques expriment en retour le CTLA-4 qui augmente l'expression d'IDO par les cellules dendritiques (Grohmann et al., 2002). Ces cellules dendritiques vont également pouvoir inhiber directement les fonctions effectrices des LT en bloquant leur production d'IL-12 et en favorisant la production d'IL-10 et de TGFβ (Grohmann et al., 2003). Ces cytokines vont également maintenir le phénotype tolérogène des cellules dendritiques en diminuant leur capacité à présenter l'antigène.
L'expression d'IDO dans les cellules dendritiques est favorisée par différents éléments : l'IL-6 sécrétée par la tumeur et/ou les cellules immunitaires, PGE2 et le TNFα qui induisent l'expression de PKA, par molécules coinihibitrices telles que CTLA-4, CD200 et GITR via IRF-1 ou STAT1 ou par une boucle de rétrocontrôle positif avec le TGF-β qui active la voie non canonique de NF-κB et la phosphorylation d'IKKα.

Dans les macrophages, le 3-HAA inhibe la sécrétion du NO en bloquant l'expression d'iNOS, ce qui conduit à la perte des fonctions cytotoxiques des macrophages et favorise leur polarisation en M2 (Wang et al., 2014). A l'inverse, l'expression d'iNOS induit l'inhibition d'IDO dans une boucle de rétrocontrôle négatif afin de limiter l'immunosuppression.

Enfin, les MDSC sont des cellules qui ont un haut niveau d'IDO et ont une importante capacité d'inhibition des cellules immunitaires (Yu et al., 2013). IDO1 induit l'expression de cytokines protumorales telles que l'IL-6 permettant de recruter également des MDSC et augmentant l'expression d'IDO dans une boucle de rétrocontrôle.

3. Les mutations d'Isocitrate Déshydrogénase (IDH), responsables de la production d'oncométabolites (Figure 28)

IDH a 3 isoformes, IDH1, IDH2 et IDH3, codés par 5 gènes (IDH1, IDH2, IDH3A, IDH3B et IDH3G) (Dalziel, 1980). IDH1 est exprimée dans le cytosol des cellules eucaryotes, dans les peroxysomes, alors qu'IDH2 et IDH3 sont exprimées dans la mitochondrie. IDH1 catalyse la conversion de l'isocitrate en αKG dans le processus de décarboxylation oxydative. Cette réaction est réversible, restaurant l'isocitrate qui peut également être métabolisé en acétyl-CoA. Les produits de l'activation d'IDH1 sont des intermédiaires du cycle de Krebs en conditions normoxiques, alors qu'IDH1 catalyse la réaction inverse à savoir la conversion de l' αKG en isocitrate en cas d'hypoxie.

L'expression des isoformes d'IDH varie selon les tumeurs. IDH1 est mutée dans les tumeurs cérébrales, les leucémies myéloïdes aigues, le syndrome myélodysplasique, les lymphomes T, les sarcomes (Dimitrov et al., 2015). Les mutations surviennent fréquemment au niveau du site 132 dans la poche catalytique de l'enzyme, poche qui lie l'isocitrate et le NADPH, avec une substitution d'une

arginine (R132x). La plus fréquente est une substitution pour une histidine, alors que les mutations d'IDH2 surviennent plutôt sur l'arginine 172 ou 140 (Clark et al., 2016). Les mutations d'IDH1, fréquentes dans les gliomes et les glioblastomes secondaires, semblent survenir tôt dans la tumorigénèse, avec un profil d'expression différent entre les glioblastomes primaires ou secondaires (Watanabe et al., 2009). Les primaires sont plutôt associés à une perte de PTEN, une amplification d'EGFR et une perte d'hétérozygotie du chromosome 10, alors que les secondaires sont associés à des mutations d'ATRX, une perte de p53 et une perte d'hétérozygotie du chromosome 19 (Dimitrov et al., 2015). Les mutations d'IDH1 sont systématiquement associées à des mutations de TP53 ou une codélétion 1p19q. En effet, les mutations d'IDH1 ne sont pas suffisantes pour induire la tumorigénèse et nécessitent d'autres altérations génomiques. Les mutations d'IDH1 sont associées à de meilleures réponses aux traitements. De plus, ces mutations sont associées à l'expression de néoantigènes faisant de ces tumeurs des cibles privilégiées dans les stratégies de vaccination antitumorale.

L'affinité du mutant d'IDH1 pour l'isocitrate est diminuée mais elle est augmentée pour l'αKG, ce qui déséquilibre la balance entre la forme normale et la forme mutée au profit de la forme mutée (Cairns and Mak, 2013). Les mutants IDH1 catalysent la transformation de l'αKG en R-2-hydroxyglutarate (R-2-HG), ce qui consomme du NADPH (Dang et al., 2009). R-2-HG est un oncométabolite et est nécessaire pour maintenir le phénotype tumoral dans les cellules mutées IDH1 (Kang et al., 2009b). Ce métabolite est maintenu à de faibles concentrations par la 2-HG déshydrogénase dans les cellules normales pour en limiter les effets négatifs, en convertissant le 2-HG en αKG. Les mutations d'IDH1 induisent une augmentation des concentrations du 2-HG telle que le processus de dégradation ou de recyclage est dépassé. Son accumulation dans les cellules du cerveau augmente le risque de développer une tumeur (Aghili et al., 2009).

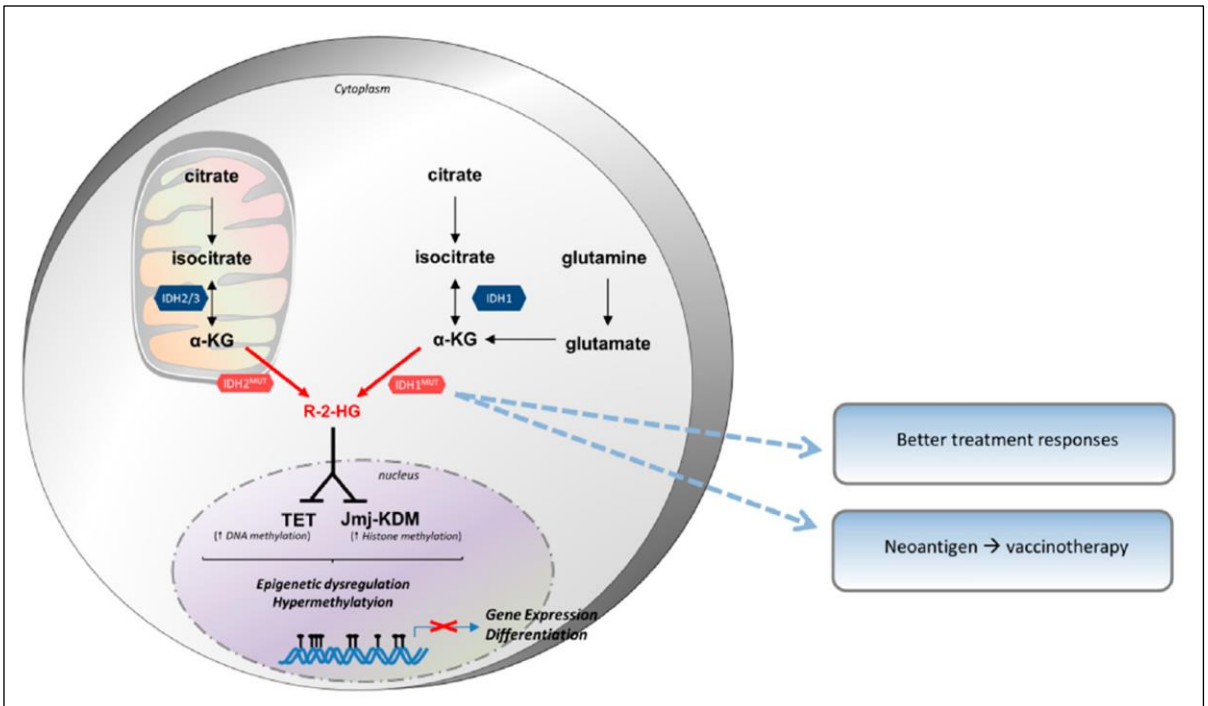


Figure 28 : Effets des mutations d'IDH1.
Les mutations d'IDH1 induisent une diminution de l'affinité de l'enzyme pour son substrat, l'α-kétoglutarate, tout en générant de nouvelles fonctions conduisant à la production de R-2-hydroxyglutarate. L'accumulation de cet oncométabolite promeut la progression tumorale en inhibant des dioxygénases impliquées dans la régulation de la méthylation de l'ADN et des histones. Ceci conduit à l'altération des profils d'expression de gènes impliqués dans la différenciation cellulaire. *D'après Domblides et al. Cells 2019.*

Les mutations induisent une activation constitutive de l'enzyme et modifient l'interaction entre l'isocitrate et IDH1. IDH1 mutée va former des hétérodimères avec IDH1 sauvage, exerçant un effet dominant négatif ce qui diminue l'activité globale d'IDH1. Les mutations d'IDH1 sont associées à un stress oxydatif plus important avec des taux élevés de ROS, contribuant au risque accru de cancer (Latini et al., 2003). R-2-HG est un inhibiteur compétitif d'une diooxygénase dépendante du 2-OG en se liant au site de liaison de l'αKG dans la poche catalytique. Ainsi, il bloque l'enzyme. Les dioxygénases dépendantes du 2-OG sont des enzymes impliquées dans la régulation de la méthylation de l'ADN et des histones. Ceci conduit donc à une hyperméthylation via l'inhibition des protéines TET qui sont normalement impliquées dans la déméthylation de l'ADN, et des protéines de la famille Jumanji qui normalement enlèvent les groupements méthyl des histones (Cairns and Mak, 2013). Enfin, l'accumulation du R-2-HG inhibe la prolyl hydroxylase (PHD) et la dégradation de HIF-1α, favorisant la formation tumorale, la croissance et la survie. Les mutants IDH1 induisent également la voie NF-κB dépendante de HIF-1α, régulant la prolifération des cellules tumorales.

4. Les conditions d'hypoxie dans la tumeur ont un effet protumoral et immunosuppresseur (Figure 29)

L'hypoxie est un élément essentiel du tissu tumoral, du fait d'une limitation de la diffusion de l'oxygène et d'une vascularisation anormale. HIF-1 est activé en condition d'hypoxie, et est un régulateur majeur de l'homéostasie de l'oxygène. C'est une molécule centrale qui permet la réponse à l'hypoxie, grâce aux ajustements transcriptionnels nécessaires. HIF-1 est un hétérodimère fait de 2 sous-unités : HIF-1α et HIF-1β (Wang and Semenza, 1995). Ces 2 sous-unités interagissent avec l'ADN, mais la sous-unité α est la plus importante dans le cancer. HIF-1α est produite en réponse à la diminution de l'oxygène cellulaire, alors que l'autre sous-unité est produite de manière constitutive (Jiang et al., 1996). L'hydroxylation de HIF-1α sur les prolines ou les asparagines permet une régulation post-traductionnelle en fonction de la disponibilité de l'oxygène (Masoud and Li, 2015).

En situation normoxique, HIF est hydroxylé par PHD2 qui n'est active qu'en présence d'oxygène. Son hydroxylation permet la liaison à VHL qui est une protéine suppressive de tumeur car lorsqu'elle interagit avec HIF-1α, elle induit le recrutement d'une E3 ubiquitine ligase ce qui oriente HIF-1α vers le protéasome pour sa dégradation. En cas d'hypoxie, PHD2 est inactive, ce qui stabilise HIF-1α qui va alors pouvoir interagir avec CBP. HIF-1α se transloque dans le noyau et va se lier à HIF-1β, formant un hétérodimère qui régule la transcription de plusieurs gènes. L'hydroxylation des résidus asparagine de HIF par FIH-1 inhibe la liaison à CBP (Lando et al., 2002). HIF-1α est un facteur de transcription puissant qui se fixe sur les éléments de réponse à l'hypoxie, dont VEGF, LDH-A et PDK1, faisant que HIF-1α est fortement impliqué dans l'angiogenèse et dans le switch de l'OXPHOS vers la glycolyse aérobie (Kim et al., 2006b).

Les cellules tumorales surexpriment HIF-1α du fait de l'hypoxie dans le microenvironnement tumoral dû à une prolifération cellulaire importante et à une altération de la vascularisation avec une disponibilité faible de l'oxygène au centre des tumeurs. HIF-1α a également une régulation non dépendante de l'oxygène, puisqu'il peut être induit par les voies classiques telles que MAPK ou mTOR (Semenza, 2009). Des oncométabolites, dont le fumarate et le succinate, peuvent induire la stabilisation de HIF-1α en inhibant PHD2 (Kaelin and Ratcliffe, 2008). L'hypoxie va avoir un effet sur les cellules tumorales. Ainsi, l'expression de HIF va induire des protéines impliquées dans le phénotype tumoral (PDGF, TGFα, TGFβ, MMP1, CXCR4). La surexpression de HIF-1α favorise également le maintien

des cellules souches, l'immortalisation, la transition épithélio-mésenchymateuse, l'invasion, la reprogrammation métabolique, la radiorésistance… (Semenza, 2012). La reprogrammation métabolique induite par l'hypoxie favorise le switch de l'OXPHOS vers la glycolyse en augmentant la captation du glucose via l'induction des enzymes de cette voie métabolique (LDH-A, PKM, hexokinases) et du transporteur GLUT1. Enfin, HIF-1α favorise l'autophagie permettant la résistance à la cytolyse par les cellules immunitaires (Noman et al., 2011). Enfin, HIF-1α permet également le recrutement des progéniteurs des cellules endothéliales et des péricytes pour favoriser l'angiogenèse.

L'hypoxie a également un effet sur les cellules immunitaires myéloïdes. Ainsi, les macrophages ont un effet protumoral dépendant de HIF, ce qui explique le recrutement important des macrophages dans les zones tumorales hypoxiques. De plus, HIF-1α induit la sécrétion, par les cellules tumorales, d'une puissante chémokine attractante pour les monocytes et macrophages, le Stromal cell-Derived Factor-1 alpha (SDF-1α) (Du et al., 2008). L'hypoxie permet également le recrutement des cellules myéloïdes de la moelle, via la sécrétion de chémokines et le VEGF (Lin et al., 2012).

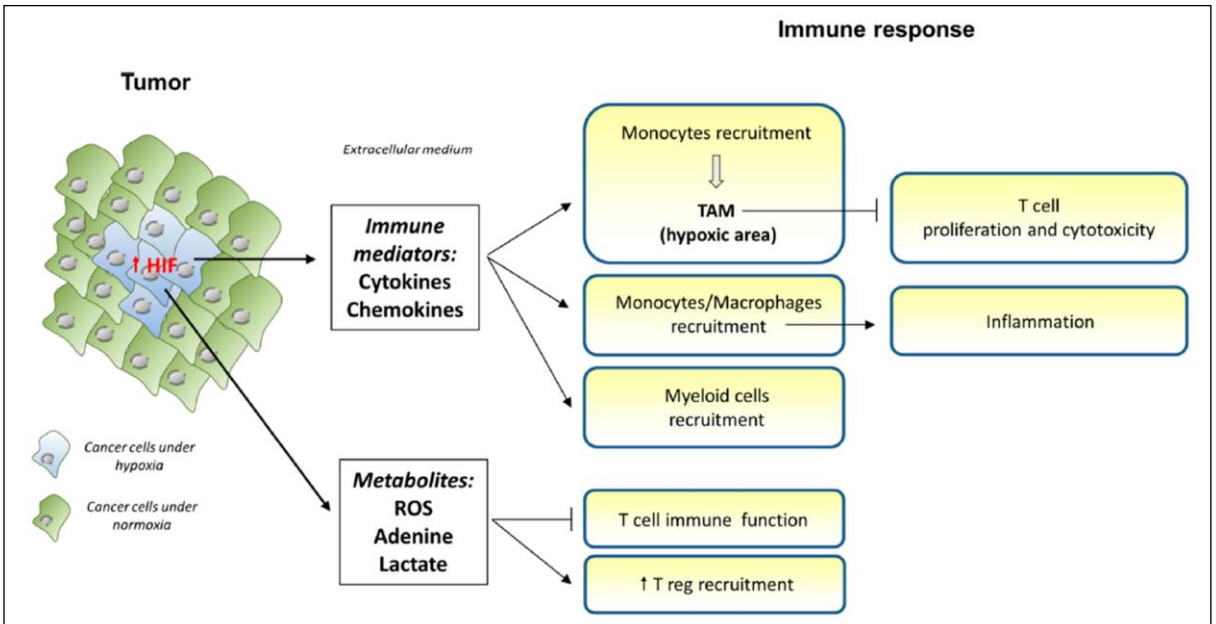


Figure 29 : Conséquences de l'hypoxie tissulaire, et effets sur le système immunitaire.
L'hypoxie tissulaire favorise l'activation de HIF dans la tumeur. HIF-1α en particulier favorise l'expression et le relargage de cytokines et chémokines qui permettent le recrutement et l'activation des MDSC et des macrophages protumoraux. De plus, l'hypoxie induit la production de métabolites immunosuppresseurs en inhibant l'activation des LT antitumoraux et en permettant la polarisation des LT en LT régulateurs. *D'après Domblides et al. Cells 2019.*

L'hypoxie est aussi impliquée dans la modification de la réponse des LT via la production de différents métabolites. Tout d'abord, l'hypoxie induit l'accumulation extracellulaire de l'adénosine, connue comme étant immunosuppresseur. Pour ce faire, elle inhibe l'adénosine déaminase, l'adénosine kinase, augmente l'activité catalytique des nucléotidases CD39 et CD73, et inhibe l'expression des transporteurs impliqués dans la captation de l'adénosine (Casanello et al., 2005). De plus, l'hypoxie bloque également les LT via la production de radicaux libres de l'oxygène et la régulation par HIF-1α d'un programme transcriptionnel immunosuppressif. Ainsi, les ROS sont produits par les cellules tumorales et les cellules stromales et sont relargués dans le milieu extracellulaire du fait d'une inefficacité de la chaine respiratoire dans la mitochondrie. Ils inhibent la translocation de NF-κB dans le noyau ainsi que la production de cytokines. Les ROS vont aussi induire la dégradation du complexe formant le TCR (Kono et al., 1996). Par ailleurs, l'hypoxie augmente le recrutement des LT régulateurs

via la production de CCL28 qui interagit avec CXCR10, la production de la neuropiline-1 qui attire les Treg et la sécrétion du TGF-β (Deng et al., 2013; Facciabene et al., 2011; Hansen et al., 2012). Enfin, HIF-1α contribue à la glycolyse aérobie, ce qui déprive les cellules en glucose mais produit également des lactates qui, comme expliqué plus haut, inhibent les fonctions antitumorales de LT.

e. Conclusion

Le métabolisme cellulaire est un processus complexe impliquant une machinerie cellulaire élaborée qui, en situation tumorale, va être totalement détournée par la cellule cancéreuse afin de subvenir le plus rapidement à ses besoins énergétiques. Ceci va induire à la fois une déplétion en substrats énergétiques essentiels dans le microenvironnement de par la surconsommation des cellules tumorales, mais également le relargage de métabolites potentiellement toxiques et/ou les modifications des conditions physico-chimiques du microenvironnement. L'ensemble de ces éléments participe à la génération d'un microenvironnement immunosuppresseur.

Les LT γδ, au même titre que leurs homologues les LT αβ, vont se retrouver impactés par ces modifications. Peu de données sont rapportées dans la littérature concernant l'impact du métabolisme tumoral sur les LT γδ et la réflexion se fait par analogie avec les LT αβ. Néanmoins, du fait de leur implication forte dans le processus d'immunosurveillance, ces interactions sont de plus en plus étudiées. La voie du mévalonate, décrite précédemment, en est l'illustration la plus parlante. En effet, la cellule tumorale dérégule son métabolisme à tel point qu'elle voit ses concentrations intracellulaires d'IPP augmenter ce qui la rend détectable pour les LT γδ. C'est un levier d'action intéressant en thérapeutique anticancéreuse. L'intrication du métabolisme tumoral avec l'activation du système immunitaire semble intervenir dès les stades les plus précoces de la tumorigénèse. Ainsi, il a été rapporté dans la littérature que l'hypercholestérolémie pouvait, par l'hyperméthylation de certains gènes dans les cellules souches hématopoïétiques, avoir un effet sur la différenciation médullaire des LT γδ et des cellules NKT (Tie et al., 2017). Ceci passe par l'interférence ARN (miR101c) qui inhibe la protéine TET et induit le processus de méthylation. Il existe, dans ce cas, un sur-risque de développer un cancer colorectal dans les modèles murins.

L'hypoxie va également avoir un impact sur l'activation des LT γδ. Ainsi, l'annexin A2, une alarmine surexprimée par de nombreux cancers, est impliquée dans la régulation des fonctions membranaires en réponse à des modifications de l'homéostasie cellulaire. Cette alarmine est reconnue par les LT γδ (Marlin et al., 2017). *In vitro*, il a été montré que les cellules placées en hypoxie surexprimaient HIF-1α qui, à son tour induit la surexpression de l'annexin A2 (Huang et al., 2011). La réoxygénation de ces cellules favorise également la production de ROS qui vont activer l'inflammasome et induire l'expression de l'annexin A2.

Nous avons étudié les interactions entre le métabolisme tumoral et le système immunitaire selon 2 approches différentes. La première a fait suite à l'identification par le laboratoire d'un nouvel antigène de stress reconnu par les LT γδ. Il s'agit de la protéine EphA2 (Ephrin Type-A Receptor 2) reconnue par le TCR d'un sous-type de LT γδ, exprimant le TCR Vγ9Vδ1 (voir VI.a, article soumis). Nous avons montré que les modifications du métabolisme tumoral pouvaient induire l'expression d'antigènes de stress *in vitro*, qui permettront l'activation des LT γδ et de leurs fonctions antitumorales. La seconde approche a été celle de l'analyse exploratoire du surnageant de culture de ces mêmes cellules tumorales reprogrammées (voir partie VI.b). En effet, nous avons constaté que, après reprogrammation, les

surnageants de culture des cellules tumorales avaient un effet immunomodulateur sur les LT γδ. Après plusieurs séries de séparation par chromatographie de ces surnageants, nous avons identifié différents peptides dont certains semblent avoir un potentiel immunomodulateur intéressant pour une application en thérapeutique antitumorale.

V. Objectifs de thèse

Les LT γδ, par leur fonction d'immunosurveillance au sein des épithéliums et leur forte infiltration tissulaire, constituent une cible thérapeutique prometteuse en oncologie, seule ou en association avec des chimiothérapies ou d'autres immunothérapies. L'activation *in vivo* des LT γδ semble être la voie la plus simple et la plus prometteuse. La meilleure compréhension des mécanismes d'activation des LT γδ, et particulièrement des LT γδ Vδ2 négatifs qui infiltrent les tumeurs, et des différents hallmarks du cancer a permis d'identifier plusieurs voies interconnectées dans l'activation des LT γδ. Dans ce travail de thèse, nous avons exploré 3 voies différentes, toutes régulées par le métabolisme tumoral qui joue donc un rôle central. En effet, de nombreuses données de la littérature montrent que le métabolisme tumoral est capable, par les modifications cellulaires et du microenvironnement, de polariser les cellules immunitaires pour permettre la tumorigénèse (Domblides et al., 2018; Domblides et al., 2019). Ces différentes voies de régulation de l'immunité pourraient constituer autant de cibles thérapeutiques potentielles en immuno-oncologie.

L'objectif de ce travail de thèse a donc été d'identifier les molécules immunomodulatrices susceptibles de modifier la fonction des cellules immunitaires en général et des LT γδ Vδ2 négatifs en particulier. Nous avons donc axé ce travail sur 2 voies différentes mais qui sont néanmoins interconnectées : la voie de l'inflammasome et la voie du métabolisme tumoral. En effet, le métabolisme tumoral induit la production, dans la cellule ou dans le microenvironnement tumoral, de molécules capables d'activer certains constituants de l'inflammasome.

Dans une première partie, nous avons étudié l'impact de l'expression épithéliale des constituants de l'inflammasome dans un modèle de cancer du côlon. L'activation de la voie de l'inflammasome au sein des épithéliums sains induit la production de l'IL-18, cytokine puissante ayant une activité proinflammatoire importante et impliquée dans l'homéostasie colique. Néanmoins, des données obtenues *in vitro* dans le laboratoire ont retrouvé une sécrétion diminuée de l'IL-18 dans certains modèles tumoraux dont le cancer du côlon. Nous avons donc analysé l'expression des constituants chez l'Homme dans le cancer colorectal, ainsi que la corrélation entre cette expression et les paramètres cliniques. L'objectif à plus long terme est d'identifier les voies de régulation de son expression et son activation, afin d'évaluer son potentiel ciblage en thérapeutique anticancéreuse.

Dans une seconde partie, nous avons étudié les interactions entre le métabolisme tumoral et le système immunitaire selon 2 approches différentes. La première a permis l'identification d'un nouvel antigène de stress, EphA2, dont l'expression est induite par la reprogrammation métabolique des cellules tumorales, et qui constitue une cible du TCR des LT γδ. La seconde approche a été celle de l'analyse exploratoire du surnageant de culture de ces mêmes cellules tumorales reprogrammées afin d'identifier des molécules immunomodulatrices sécrétées dans le milieu. Nous avons également souhaité évaluer leur effet sur la régulation de l'activité d'autres cellules immunitaires.

VI. Projet 1 : Rôle pronostic de l'expression épithéliale des constituants de l'inflammasome dans le cancer colorectal

L'IL-18, produit de l'activation de l'inflammasome, est une cytokine fortement impliquée dans l'homéostasie colique. *In vitro,* il a été retrouvé une diminution de la sécrétion de cette cytokine dans certaines lignées cancéreuses et en particulier dans les lignées coliques. Ceci peut s'expliquer par un mécanisme d'échappement à l'immunité mis en place par la cellule tumorale, afin de ne pas être reconnue et détruite par les cellules immunitaires en général, et les LT γδ en particulier. L'inflammasome et l'IL-18 pourraient donc constituer des cibles thérapeutiques en oncologie, afin d'augmenter la réponse immunitaire antitumorale des LT γδ. Néanmoins, l'ensemble des données concernant le rôle de l'inflammasome dans la tumorigénèse et la régulation de l'immunité provient principalement de modèles *in vitro,* ou des modèles murins, dans lesquels les analyses tissulaires sont faites dans le tissu de manière globale sans séparer le compartiment épithélial cancéreux de celui immunitaire stromal, ainsi que des analyses au niveau transcriptionnel et non protéique. C'est pourquoi, dans cette première partie de mon travail de thèse, nous avons évalué l'expression protéique chez l'Homme des constituants des différents inflammasomes connus dans les tumeurs humaines coliques, et leur impact pronostique en clinique ainsi que la corrélation avec l'infiltrat immunitaire.

Nous avons retrouvé une diminution de l'expression de l'ensemble des constituants de l'inflammasome dans l'épithélium tumoral en comparaison de l'épithélium sain. Néanmoins, seules les diminutions d'expression de NLRC4, NLRP6 et l'IL-18 étaient corrélées à un pronostic péjoratif et à un stade TNM plus avancé (maladie plus agressive). De plus, seules les diminutions de l'expression de NLRC4 et l'IL-18 étaient corrélées à un infiltrat lymphocytaire diminué. L'association de ces 3 marqueurs en une signature épithéliale permet de mieux stratifier les patients en termes de pronostic, et fait l'objet d'un dépôt de brevet. Nous avons donc généré une lignée réexprimant NLRC4 dans un premier temps, pour étudier les mécanismes impliqués dans l'effet observé chez les patients. Dans les premiers résultats obtenus, nous avons retrouvé une diminution de la prolifération tumorale *in vitro* de lignées métastatiques coliques par la réexpression de NLRC4, ainsi qu'une expression des gènes de la voie de l'interféron de type I en transcriptomique. Ces derniers résultats nécessitent encore d'être confirmés *in vitro*.

Cette première partie a permis de générer une signature protéique épithéliale qui pourrait, si elle est validée, permettre de mieux stratifier les patients et d'aider les cliniciens dans la décision thérapeutique. Il s'agit de l'un des premiers travaux à montrer, chez l'Homme, un effet antitumoral de l'expression épithéliale de NLRC4, NLRP6 et l'IL-18 dans les cancers colorectaux, ainsi qu'une corrélation avec le pronostic et l'infiltrat immunitaire. A terme, l'objectif est de mieux comprendre les mécanismes d'amont et d'aval afin d'évaluer leur potentiel ciblage en thérapeutique anticancéreuse.

a. Prognostic role of inflammasome components in human colorectal cancer (submitted)

Domblides C.[1,2,*], Soubeyran I.[3], Lartigue L.[4], Mahouche I.[4], Lefort F.[1,2], Decraecker M.[2], Velasco V.[3], Bertoldi D.[5], Racine V.[5], Déchanet-Merville J.[1], Blanco P.[1,6], Faustin B.[1,7,*].

[1]ImmunoConcEpt Laboratory, CNRS UMR 5164, Bordeaux University, Bordeaux 33076, France, Bordeaux, France.
[2]Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-André, Bordeaux University Hospital-CHU, Bordeaux, France.
[3]Department of Biopathology, Institut Bergonié, Comprehensive Cancer Center, Bordeaux, France.
[4]INSERM, U1218 ACTION, F-33000 Bordeaux, France.
[5]QuantaCell, 2 Allée du Doyen Georges Brus, Pessac 33600, France.
[6]Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, FHU ACRONIM, Bordeaux, France.
[7]Immunology Discovery, Janssen Research and Development, 3210 Merryfield Row, San Diego, CA 92121, USA.

*current address correspondence:
Benjamin Faustin, PhD
Immunology Discovery, Janssen Research and Development
3210 Merryfield Row
San Diego, CA 92121, USA.
email: bfaustin@its.jnj.com
email: cdomblides@immuconcept.org

Running Title: Prognostic role of inflammasomes in human colorectal cancer

ABSTRACT

Immunotherapy is one of the most promising approaches for the treatment of several types of cancer. However, because of low response rates, there is a crucial need to identify new therapeutic targets to improve patients' outcomes. Inflammasomes are critically involved in maintaining the gut epithelium homeostasis, playing a crucial role in immunosurveillance and tumorigenesis. We investigated the expression of various inflammasome components in colonic epithelial cells, at the protein level in patient tissues, and identified their prognostic impact in the development of human colorectal cancer (CRC). In a 104 patient's cohort, we found that all inflammasome components were downregulated in human CRC. However, loss of epithelial expression (but not stromal) of NLRP6, caspase-1, and IL-18 was associated with a poorer clinical prognosis with an increased mortality of 72%, 58% and 68% respectively. Consistently, the loss of those components was also associated to disease progression into metastasis. The loss of IL-18, but not NLRP6, was associated to modification of tumour immune infiltrates with lower $CD3^+$ T cells and a trend to lower cytotoxic T cells. Finally, we found that combined downregulation of IL18 and NLRP6 was associated with a worse outcome in patients. Indeed, 5-year survival rates were 26% for the $NLRP6^{low}/IL\text{-}18^{low}$ tumours, with an 85% higher risk of death, compared to 64.4% for the entire cohort. This was associated to a more aggressive disease in presence of downregulation ($p<0.0001$), and with a trend to lower lymphoid cell infiltration. In conclusion, our study has identified critical inflammasome markers that may help in better stratifying patients for prognosis in CRC, and could help clinicians to determine which patients may benefit from immunotherapies.

INTRODUCTION

Immunotherapy is one of the most promising approaches for the treatment of several types of cancer. Indeed, prolonged survivals were observed with immune checkpoint inhibitors that reactivate immune system antitumor functions. However, 60% to 80% of patients are resistant to these treatments, and there is a crucial need to identify new therapeutic targets to improve patients' outcome.

Colorectal cancer (CRC) is one of these refractory tumours. It is the third most common cancer worldwide but the second in term of mortality (Globocan 2018). Colorectal carcinogenesis is highly correlated to chronic harmful inflammation and to gut microbiote dysbiose (Ullman and Itzkowitz, 2011). Tumour-mediated inflammation is an emerging hallmark of cancer which is tightly controlled. Indeed, chronic and uncontrolled inflammation favours intestinal epithelial lesions among other mechanisms, which induces carcinogenesis. On the other hand, innate immune mechanisms are required

to impair early tumorigenesis by priming a robust antitumor immune response mediated by myeloid and lymphoid cells.

Colon is characterised by the presence of bacteria that closely interact with the host immune system. To preserve host homeostasis and avoid uncontrolled inflammation, these bacteria are tightly controlled through their recognition by pattern-recognition receptors (PRRs). Nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat proteins (NLRs) are one of these PRRs and are emerging players of the host homeostasis. There are 22 NLRs described in human, but only some of them are able to form an inflammasome platform (Guo et al., 2015). Inflammasomes are multi-protein macromolecular cytosolic complexes formed after recognition by NLRs of specific danger- or pathogen-associated molecular patterns (respectively DAMPs or PAMPs). Once activated, NLRs bind to the adaptor protein ASC and pro-caspase-1. This leads to the cleavage and activation of caspase-1 which in turn maturates IL-1β and IL-18 for secretion. Multiple inflammasomes are described in hematopoietic cells (such as dendritic cells, macrophages). However, it also exists in epithelial cells where it plays an important role in tissue homeostasis through the recovery after tissue damage, and the defence against external insults, limiting chronic inflammatory processes.

Inflammasomes are critically involved in maintaining the gut epithelium homeostasis, but also play a crucial role in immunosurveillance and tumorigenesis mechanisms. Indeed, in human, a transcriptomic study has found that the expressions of *NLRP1*, *NLRP3*, *NLRC4* and *AIM2* were reduced in Chinese patients with CRC (Liu et al., 2015). The antitumor functions of these NLRs seemed to be partly due to IL-18 secretion in the mucosa, and its loss was shown to be associated with carcinogenesis in different mice models (Karki and Kanneganti, 2019). However, it was recently reported that inflammasome components may deploy antitumor functions in a caspase-independent manner. Indeed, AIM2 was associated with CRC in mouse models through the decrease of AKT activation (Wilson et al., 2015). NLRP12 is also able to regulate NF-κB, MAPK and AKT, and the loss of NLRP12 in colon epithelium was associated to higher tumorigenesis in mouse models (Zaki et al., 2011). In most studies, interpretations of the role of inflammasomes in cancer have relied on transcriptome analyses of bulk tumours, and their specific tumorigenic role in various mucosal cell types is unclear. Here, we further investigated the expression of various inflammasome components in intestinal epithelium cells, at the protein level in patient tissues, and identified their prognostic impact in the development of human CRC.

METHODS

Tissue micro-array (TMA) constitution

One hundred and four patients treated for a primary CRC at the Bergonié Institute (Bordeaux, France) between May 2008 and January 2013 were enrolled. Histology samples were obtained from surgery or biopsies, and tissues were fixed in formalin and then paraffin-embedded. Clinical data were retrospectively collected from patient medical charts with special focus on age, gender, date of diagnosis and tumour-node-metastasis (TNM) stage. Histological type was determined as well as tumour grade, and mutational status (Microsatellite Instability (MSI), *KRAS* and *BRAF* mutations).

Tissue cores with a diameter of 0.6 mm were removed from fixed paraffin-embedded tissue blocks and arrayed on a recipient paraffin block using a tissue arrayer (Beecher Instruments Tissue Arrayer, Sun Prairie, WI) at the Molecular Biology Department of Bergonié Institute. Each tumour sample was punched in triplicate, along with 2 cores of matched normal mucosal tissue punched far away from the tumour.

Fluorescent tissue staining

Immunofluorescent analysis was performed on a 5-µm fixed paraffin–embedded TMA section mounted on a charged slide. Slides were dewaxed on heating plate at 58°C for 10 minutes and in series of xylene and ethanol baths. Heat-induced proteolytic epitope retrieval was done in target retrieval pH6 or pH9 buffer (Dako®, Glostrup, Denmark) according to the primary antibody for 20 minutes using a microwave oven. Slides were then blocked using 5% BSA for 10 minutes. Primary antibodies were incubated for predetermined duration at room temperature in antibody diluent (Dako®, Glostrup, Denmark), as indicated in Supplementary Table 1. Slides were then washed three times in PBS 1X. Secondary antibodies [goat anti-rabbit (Alexa Fluor 594 nm), goat anti-mouse (Alexa Fluor 488 nm) and donkey anti-goat (Alexa Fluor 594 nm), all from ThermoFisher®] were diluted (1:400) in antibody diluent and

incubated for 1 hour at room temperature in the dark. Sections were washed with PBS 1X three times and incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (2 µg/mL) for 10 minutes in the dark. Finally, slides were mounted with Fluoromount-G (Clinisciences®) and dried overnight at 4°C in the dark. For each antibody, specificity was checked by western-blot or immunofluorescence assay on overexpressing cell lines fixed in formalin and paraffin-embedded (data not shown).

Slides acquisition

Method of slides acquisition is detailed in supplementary methods and in Figure 1A.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical analysis was performed in all cases on 3 µm-thick serial sections from a representative formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) block. We used the following antibodies: CD3 (clone 2GV6, prediluted, Roche® Diagnostics), CD8 (clone C8/144B, dilution 1:25, Dako®, Glostrup, Denmark), CD68 (clone PG-M1, dilution 1:50, Dako®, Glostrup, Denmark), CD163 (clone 10D6, dilution 1/100, Leica® Novocastra Laboratories, United Kingdom), PD-1 (clone NAT105, prediluted, Roche® Diagnostics) and PD-L1 (clone SP263, prediluted, Roche® Diagnostics). In 32 cases, heterologous differentiation was suspected and additional antibodies against desmin (clone D33, dilution 1:100, Dako®, Glostrup, Denmark), h-caldesmon (clone h-CD, dilution 1:50, Dako®, Glostrup, Denmark), and myogenin (clone LO26, dilution 1:20, Novocastra®, New Castle upon Tyne, United Kingdom) were used. After microwave oven heating (20 min in 0.1 M citrate buffer at pH 6), sections were incubated with biotinylated link antibody, with peroxidase-labelled streptavidin (LSAB™ + Kit; Dako®, Glostrup, Denmark) and then with diaminobenzidine solution (DAB; Dako®, Glostrup, Denmark). Omitting the specific primary antibody was used as negative controls. The tumour PD-L1 expression was considered positive if ≥ 1%, and PD-1 status was assessed on immune cells and considered positive if ≥ 1 %. Finally, CD3, CD4, CD8, CD68 and CD163 were assessed as low, moderate and high expressions by an expert pathologist.

Statistical analysis

The samples were collected in accordance to French legislation and ethical codes and all patients gave their consents for the use of their biological samples in research. For cut-off determination for our markers, clinical and biological measurements were expressed as mean (+/- standard deviation) or median (range) for continuous variables, or as a number (percent) for categorical variables. Receiver-operating characteristics (ROC) curves and area under the curve were computed to assess the effectiveness of NLRC4 and NLRP6 to predict death. Statistical significance was set at $p<0.05$. Data analysis was performed using the STATA 13.1 software, (StataCorpLP, College Station, Texas, USA). Overall survival (OS) was analysed from the inclusion time to the death of patient. A Cox model was applied for survival analysis. Paired data were analysed with a paired t test (parametric) or a Wilcoxon test (non-parametric). Associations between quantitative and qualitative variables were analysed using t-test (parametric) or Mann Whitney (non-parametric) for 2 variables, and one way ANOVA (parametric) or Kruskall-Wallis (non-parametric) for up to 2 variables. Univariate analyses were performed with $\chi 2$ or Fischer exact test. Statistics were performed using GraphPad Prism version 7.00 for Mac, GraphPad Software. Results were considered significant if the p-value was <0.05.

RESULTS

Population characteristics

Clinical features of patients from Bergonié Institute are provided in Table 1. Patients were predominantly men (57.7%) with a median age of 71.7 [range: 38.6-88.4] years. Colorectal cancers were mainly stage II (34.6%) and III (35.6%), with predominant grade 2 (73.1%). In our cohort, we had 15.4% of tumours with a MSI status. Diagnosis was obtained by surgery (97.1%) for almost all patients. After surgery, 40.4% patients didn't received any adjuvant therapy because of local diseases, and 45.2% received an adjuvant chemotherapy. Furthermore, 13.5% received a palliative chemotherapy because of advanced diseases. After a median follow-up of 62.1 months, median overall survival was not reached, and 5-years survival was 64.4%.

Correlation of the expression of epithelial tumour inflammasome components with clinical outcomes

We first assessed the immunofluorescence intensity of selected inflammasome components (NLRP1, NLRP3, NLRP6, AIM2, ASC, Caspase-1, IL-1β and IL-18) expression in tumour cells compared to normal epithelial cells, for each patient. As showed in Figure 1A, slides were stained using a specific antibody against each component of the inflammasome together with an antibody against cytokeratin (epithelial marker) and DAPI (nuclear marker). Images analysis was then done as follows (for details, see supplementary methods). First, a nuclear (DAPI positive) and a cellular segmentation were performed. Then, a cytokeratin mask was created from the cytokeratin positive segmented cells, and superimposed to the inflammasome marker staining. Finally, expression quantification of each inflammasome marker was obtained by measuring the fluorescence intensity of DAPI positive cells in the cytokeratin mask in each spot. Using this tissue-based approach, we found a significant downregulation at the protein level of all inflammasome components in epithelial tumour cells ($p<0.001$) (Figure 1B). Conversely, cytokeratin expression in epithelial tumour cells was higher than in normal epithelial cells. We then assessed the correlation between expression of inflammasome components and overall survival. Interestingly, the expression of three biomarkers was associated with overall survival in our cohort: NLRP6, caspase-1 and IL-18 (Figure 2A). Indeed, we found that the downregulation, in epithelial tumour cells, of each biomarker was correlated to a poor prognosis, with an increased mortality of 72%, 58% and 68% respectively if markers were downregulated. All other components were not correlated to patient outcome. ***Hence, the protein downregulation by epithelial tumour cells of NLRP6, caspase-1, or IL-18 was correlated with a poorer clinical outcome for colorectal cancer patients.***

Because immune cells also express inflammasome components, we assessed the impact of NLRP6 and IL-18 stromal expression on overall survival (Figure 2B). We found a trend towards a worse outcome in stromal $NLRP6^{low}$ cohort, but it did not reached significance ($p=0.06$). Conversely, for IL-18, there was an association between low IL-18 production by stromal cells and worse outcome ($p=0.011$). However, this correlation was not as important as the prognostic impact of IL-18 expression in epithelial tumour cells. ***Hence, stromal expression of NLRP6 and IL-18 was not associated with patients' outcome to the same extent than their epithelial expression.***

Correlation between expression of inflammasome components and clinical parameters

We found higher expressions of NLRP1, NLRP3 or IL-1β in the young subgroup of patients in our cohort (respectively $p=0.03$, $p=0.001$ and $p=0.0002$) (Table 2). There was no correlation between inflammasome expression and other clinical parameters. However, there was a trend to higher IL-18 epithelial expression in tumour with a microsatellite instability ($p=0.057$), and MSI status was also correlated to lower AIM2 expression ($p=0.015$). Then, we analysed the association between epithelial inflammasome expression and TNM stage. We found that the downregulation of NLRP6 or IL-18 in epithelial tumour cells was associated with a more aggressive disease (Figure 3). The effect of IL-18 downregulation seemed to be stronger on tumour aggressiveness than NLRP6. ***Hence, the loss of NLRP6 or IL-18 in epithelial tumour cells was associated to metastatic progression.***

Correlation between epithelial expression of inflammasome components and immune infiltration

We evaluated the association between immune infiltrates and expression of inflammasome components (Figure 4), including overall immune infiltrate, $CD3^+$ T cells, $CD8^+$ T cells, $CD68^+$ macrophages, $CD163^+$ macrophages, and expression of PD-1 and PD-L1. No correlation was observed between NLRP1, NLRP3, NLRP6, AIM2, caspase-1, or IL-1β expression and immune infiltrate. However, high expression of ASC adaptor was associated with higher $CD8^+$ cytotoxic T cell infiltration ($p=0.01$), and higher PD-1 expression by immune cells ($p=0.02$). Furthermore, tumours with low IL-18 epithelial expression were associated with low $CD3^+$ T cell infiltration. There was also a trend to a lower $CD8^+$ cytotoxic T cell infiltration in this group, suggesting that there are probably different sub-types of T cells involved. Finally, tumours with high levels of IL-18 were associated with higher expression of PD-1 receptor ($p=0.018$). No association with macrophage infiltrate was observed. ***Hence, loss of IL-18 epithelial expression was associated with modification of immune cell infiltration, especially lymphoid cells.***

The role of the inflammasome signature in clinical outcome

Based on the crucial role of NLRP6 and IL-18 in colon physiology, we combined these markers into an epithelial inflammasome signature and found a strong correlation between patient outcome and epithelial coexpression of NLRP6 and IL-18 (Figure 5A). Indeed, while the 5-year survival rates were 46% and 42% for the NLRP6^{low} and IL-18^{low} tumours, respectively (Figure 2A), it only reached 26% for the NLRP6^{low}/IL-18^{low} tumours, with an 85% higher risk of death. Furthermore, patients whose tumours downregulated both biomarkers harboured a more metastatic disease ($p<0.0001$) (Figure 5B). We observed no difference in macrophage infiltration using the NLRP6/IL-18 signature (Figure 5C). However, the number of NLRP6 ^{high}/IL-18^{high} patients with mild and high CD8^{+} T cell infiltrate was more important than NLRP6^{low}/IL-18^{low} patients. ***The combined downregulation by epithelial tumour cells of NLRP6 and IL-18 is associated with a more aggressive pattern and a worse outcome in CRC disease, potentially explained by a lower cytotoxic T cell infiltration.***

DISCUSSION

Inflammasome proteins are critical mediators of the host innate immune response to cell stress and infection. Recent data emphasize their role in gut homeostasis and cancer development from the early stages of the disease all the way to advanced metastasis (for review see (Karki and Kanneganti, 2019)). Another level of complexity is that their expression and role in cancer pathophysiology vary upon organs, cell types studied in the tumour microenvironment or disease stage, leading to diverging data. Most data on inflammasomes were actually provided from mice or *in vitro* models and there is a crucial need to better understand their role in tumorigenesis. Furthermore, in human, inflammasomes expression in cancer was only reported in small cohorts of patients and at the transcriptomic level in tumour bulk. Therefore, we wanted to assess more widely the inflammasome expression in human colorectal cancer and its correlation to clinicopathological and immune infiltration parameters. To our knowledge, this is the first largest evaluation of epithelial inflammasome proteins in human colorectal cancer, and the first report of human NLRs as biomarkers of survival and cancer progression. Indeed, we found that colorectal epithelial cancer cells strongly downregulate all of the components of the inflammasome pathway at the protein level. Expression of some inflammasome components were also found decreased in the literature at the gene expression level, but the mechanism of their loss was not well identified because little is known on the regulation of inflammasome expression. Indeed, expression of ASC adaptor was found decreased due to hypermethylation in different models (glioblastoma, lung, breast…) (Salminen et al., 2014). Furthermore, through transcriptome analyses of tumour bulk from public databases, Liu et al. found three different patterns of inflammasome expression in colorectal cancer: a downregulation for *NLRP1, NLRP3, NLRC4* and *AIM2*, an upregulation for *NOD1* and *NOD2*, and no variation for *NLRC5, NLRP6* and *NLRP12* (Liu et al., 2015). The downregulation by tumour cells of inflammasome components favours immune escape, by limiting the recruitment and activation of antitumor immune cells in a caspase-dependant manner. Furthermore, it was shown that some NLRs may display antitumor function in a caspase-independent manner as shown for AIM2 and NLRP12 (Janowski et al.; Wilson et al., 2015).

Interestingly, among all the components investigated, only the downregulation of NLRP6, caspase-1 and IL-18 in epithelial cancer cells were correlated to a worse outcome with an increased risk of death. Furthermore, we identified that the loss of NLRP6 and IL-18 that were associated in a protein signature was a strong predictor of patients' outcome, with a worse outcome in the case of low signature. This survival effect was probably partly due to a more aggressive disease in NLRP6^{low} and/or IL-18^{low} tumours. Our signature did not include caspase-1 whereas it had a survival impact alone, because its association to NLRP6/IL-18 had no further effect on predictiveness.

IL-18 is an important cytokine involved in colon physiology and mucosal immunity. IL-18 is involved in homeostatic renewal of the gut epithelial barrier, to prevent colitis. Indeed, IL-18$^{-/-}$ mice show an increased incidence of polyps, colitis and colorectal cancers (Salcedo et al., 2010), therefore illustrating its role in cancer protection in normal steady state condition. IL-18 explains the anticancer effect of inflammasomes in a caspase-dependant manner, inducing the recruitment of immune cells and polarizing them towards developing cytotoxic function. Indeed, in IL-18$^{-/-}$ mice, it was observed, as in our cohort, a lower infiltration of immune cells, leading to a lower interferon-γ production (Zaki et al., 2010). However, interferon-γ is one of the main cytokine allowing the recruitment and activation of

antitumor immune cells, and which also hold direct antitumor toxicity. We found that loss of IL-18 epithelial expression was correlated with a more aggressive disease, which is consistent with data obtained from mouse models. Indeed, in NLRP3$^{-/-}$ mice models of liver metastasis from colorectal cancers, it was shown that the absence of IL-18 was associated with increased growth of liver metastasis (Dupaul-Chicoine et al., 2015). Rescue with exogenous IL-18 led to limitation of the metastatic process. This was due to decreased infiltration of Th1 and NK cells, critical cell types that mediate potent antitumor immune response (Dagenais and Saleh, 2016). These immune cells were also unable to confer tumour lysis (through downregulation of Fas pathway). This was also reported in other tumour models such as melanoma (Nishio et al., 2008). We did not assess NK cell infiltration in our cohort, but as reported in the literature, we found a less important T cell infiltration in tumours downregulating IL-18. Importantly, IL-18 production is one of the few cytokines lost rapidly during progression of lung cancer in patients as identified by deep immunophenotyping recently (Mascaux et al., 2019). We did not find any correlations for IL-1β which is abundantly expressed in tumour microenvironment in several cancers (Pantschenko et al., 2003). Mouse models have reported a protumoral role on proliferation, metastatic process (Voronov et al., 2003), angiogenesis (Jung et al., 2003) and immunosuppression (Song et al., 2005). However, it has a controversial role according to tumour type and to compartment of secretion. This could explain the absence of prognostic role of this cytokine.

Conversely to IL-18, we found no correlation between NLRP6 epithelial expression and immune infiltration. Thus, NLRP6 could have an antitumor role in a caspase-dependent manner through the secretion of IL-18, and in a caspase-independent manner too. Indeed, in NLRP6$^{-/-}$ mice models, the loss of NLRP6, which led to a decreased IL-18 secretion, induced a loss of maturation of immune cells which were dysfunctional (Chen et al., 2011). This led to a decreased immune cell recruitment, and favoured proinflammatory cytokine secretion such as TNFα and IL-6. However, NLRP6 could also regulate mucus secretion through the regulation of MUC2 (Birchenough et al., 2016). Indeed, the loss of NLRP6 favours colitis through microbiome dysregulation and the defect of mucus protective function (Elinav et al., 2011; Wlodarska et al., 2014). It was evidenced a crossed regulation between the intestinal microbiome and NLRP6, involving AMP (AntiMicrobial Peptides), and NLRP6 dysregulation that favours dysbiosis in NLRP6$^{-/-}$ mouse model (Hu et al., 2013).The correlation between NLRP6 and tumour aggressiveness could be explained by the regulation of NLRP6 on some genes involved in the epithelial to mesenchymal transition, such as Wnt and Notch (Normand et al., 2011), or the regulation of cancer cell proliferation or migration in an intrinsic manner. Finally, its role in mediating Type-I IFN signalling (as shown in virally-infected cells (Wang et al., 2015)) might trigger cell death of cancer cells in an inflammasome-independent manner

In our work, we found an impact of NLRP6 associated to IL-18 on patients' outcome, which highlight non redundant roles in protection and survival. Indeed, NLRP6 and IL-18 are strongly involved in the regulation of the microbiome, which is now recognized as a critical player in colon inflammation favouring cancer. Indeed, cohousing of mice that were unable to produce IL-18 with normal mice limited colitis in knock-out mice, underlying an important role of microbiome dysbiosis in inflammation-induced colorectal cancer (Williams et al., 2015).

We assessed expression of inflammasome components in intestinal epithelial cells with the generation of a cytokeratin mask, to avoid contamination with stromal immune cells that also express inflammasome components. We focused on the epithelium because the literature has reported a diverging effect of inflammasomes according to tissue compartments. Indeed, in NLRP1$^{-/-}$ mice in hematopoietic or non-hematopoietic cells, it was shown that epithelial NLRP1 limited tumorigenesis, in contrast to immune cells (Williams et al., 2015). Furthermore, the cellular compartment and the timing of IL-18 secretion in disease evolution seems to have a different impact on tumorigenesis (Nowarski et al., 2015). Indeed, it was shown in mice models that gut epithelial IL-18 favoured colitis and inflammation-induced cancer, whereas it was protective in established cancer. However, in our cohort, we found the same effect of IL-18 on patient survival either from epithelial or stromal cells, but the effect was less important in stromal cells thereby underlying a potential role of the cell type of origin.

About 17% of colorectal cancers are microsatellite instable in France. In our cohort, we found that IL-18 was higher in MSI tumours patients. This is probably due to higher mutational burden of these specific subset of tumours, which are called "hot tumours" and which are known to better respond to

immune checkpoint inhibitors (Llosa et al., 2015). In all colorectal tumours, we found a correlation between high IL-18 expression and high T cell infiltration, because IL-18 is one of the most important recruiting cytokine. There was also a higher expression of PD-1 on immune cells that is consistent with their activation status. In most cases, established tumours create an immunosuppressive context and induce the upregulation of PD-1 on immune cells after activation to sustain impaired immune cytotoxicity towards cancer cells.

In summary, we report here the first largest evaluation of inflammasome components' expression at the protein level, and found that NLRP6 and IL-18, alone or in combination, are strong predictor of patient outcome in colorectal disease. Their expressions were strongly correlated to tumour aggressiveness, meaning that their downregulation are associated with the metastatic process. Our study may help in better stratifying patients for prognosis in CRC. Furthermore, our signature could help clinicians in determining which patients may benefit from current immunotherapy therapeutic strategies. It would be of interest to better understand the mechanisms underlying downregulation of inflammasome components in the context of carcinogenesis, and to determine which targets are regulated by these components. Finally, finding new ways to harness the innate immunity of tumours is of particular interest currently (Demaria et al., 2019) and re-establishing normal expression of NLRP6 in tumour cells may confer therapeutic benefits by blocking progression towards aggressive CRC.

FIGURES LEGENDS

Figure 1: Epithelial protein expression of inflammasome components are downregulated in colorectal cancer patients

A: Image processing used to monitor the expression of epithelial inflammasome components.

Slides were stained with antibodies targeting inflammasome components, cytokeratin for epithelial staining and DAPI for nuclear staining (1). Slides were digitalized with the Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT scanner. A nuclear (DAPI positive) and a cellular segmentations were performed (2). A cytokeratin mask was then created and superimposed to inflammasome staining (3). Immunofluorescent expression quantification was obtained by measuring the cell intensity of DAPI positive cells in the cytokeratin mask on each spot.

B: Protein expression of cytokeratin, inflammasome components and cytokines in colorectal epithelial normal and tumour cells.

Expression levels of each marker were assessed as the mean of all median fluorescence intensity in each cell contained in the cytokeratin mask for each sample of normal and tumour tissues. The mean intensity value of the 3 tumour spots was compared to the mean intensity value of the 2 normal matched samples for each patient. Data are expressed as mean +/- SD. Paired t-test (parametric) or Wilcoxon matched-pairs (unparametric) were used to evaluate the significance of the difference between normal and tumour tissue. ****P<0.0001.

Figure 2: NLRP6 and IL-18 expressions in epithelial tumour cells are strong predictors of patients' outcome.

A: NLRP6, caspase-1 and IL-18 were correlated with patients' outcome in colorectal cancer.

Survival curves of patients based on expression of inflammasome proteins in epithelial tumour cells are shown. Patients were stratified as X^{high} or X^{low} expressions according to cut-offs predetermined with ROC curves (NLRP6, caspase-1 and IL-18) or the median of fluorescence intensity (NLRP1, NLRP3, AIM2, IL-1B). Censored data are indicated by tick marks. Data for any patients who were not known to have died at the time of the analysis were censored at the last recorded date that the patient was known to be alive. 95%CI: 95% confidence interval; HR: Hazard Ratio. A log-rank test stratified according to protein expressions was used. NC: could not be calculated.

B: Stromal protein expression of NLRP6 and IL-18 were not correlated to survival.

Survival curves of patients according to NLRP6 and IL-18 expression in stromal cells from colorectal tumors are shown. Patients were stratified according to the median of fluorescence intensity for each markers, in X^{high} or X^{low} expressions, according to cut-offs determined with ROC curves. Censored data are indicated by tick marks. Data for any patients who were not known to have died at the time of the analysis were censored at the last recorded date that the patient was known to be alive. 95%CI: 95%

confidence interval; HR: Hazard Ratio. A log-rank test stratified according to protein expressions was used. NC: could not be calculated.

Figure 3: Epithelial expression of NLRP6 and IL-18 are correlated with tumour aggressiveness.
For each protein, we assessed the correlation between fluorescence intensity and tumour stages, classified in stage I-II (locally advanced), stage III (regionally advanced) and stage IV (metastatic disease). Data are expressed as mean +/- SD. A one-way ANOVA (parametric) or Kruskal-Wallis (unparametric) tests were used to evaluate the significance of the differential expression between each disease stage. *P<0.05 and ****P<0.0001.

Figure 4: Expression of epithelial IL-18 is correlated with higher lymphocytes infiltration within colorectal tumours.
For each protein, we assessed the correlation between fluorescence intensity of inflammasome component and immune infiltration assessed by immunohistochemistry for T cell lymphocytes ($CD3^+$ and cytotoxic $CD8^+$) and macrophages ($CD68^+$ and $CD163^+$). We also evaluated PD-1 and PD-L1 expressions. Data are expressed as mean +/- SD. A one-way ANOVA (parametric) or a Kruskal-Wallis test (unparametric) were used to evaluate the correlation between expression intensity and immune infiltrate levels. *P<0.05 and **P<0.001.

Figure 5: Downregulation of epithelial NLRP6/IL-18 is associated with a more aggressive disease.
A: Overall survival of colorectal cancer patients based on NLRP6/IL-18 signature.
NLRP6 and IL-18 were combined into a protein signature, and segregated into $NLRP6^{high}/IL\text{-}18^{high}$ and $NLRP6^{low}/IL\text{-}18^{low}$ according to cut-off determined by ROC curves. Its impact on patients' outcome was assessed by comparison between $NLRP6^{high}/IL\text{-}18^{high}$ and $NLRP6^{low}/IL\text{-}18^{low}$ subgroups.
A log-rank test stratified according to protein expressions was used. 95%CI: 95% confidence interval; HR: Hazard Ratio. A log-rank test stratified according to protein expressions was used. NC: could not be calculated.
B: Tumour aggressiveness based on the coexpression of NLRP6/IL-18.
Data are expressed as absolute number of patients for each stage. We compared stage I-II (locally advanced), stage III (regionally advanced) and stage IV (metastatic disease). Black: $NLRP6^{high}/IL\text{-}18^{high}$; grey: $NLRP6^{low}/IL\text{-}18^{low}$. A χ^2 test was used for the comparison.
C: Correlation between immune cells, T lymphocytes, cytotoxic T cells, $CD68^+$ or $CD163^+$ macrophages infiltrations and coexpression of NLRP6/IL18 in the protein signature.
Data are expressed as absolute number of patients for each immune cell infiltrate. Black: $NLRP6^{high}/IL\text{-}18^{high}$; grey: $NLRP6^{low}/IL\text{-}18^{low}$. A χ^2 test was used for the comparisons.

TABLES

Table 1: Demographic and clinical features of colorectal cancer patients.

Table 2: Correlation between expression of epithelial inflammasomes and clinical characteristics of the colorectal cancer patients.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1: List of antibodies used to stain paraffin-embedded tissues.

REFERENCES

Birchenough, G.M.H., Nyström, E.E.L., Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. Science *352*, 1535–1542.
Chen, G.Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., and Núñez, G. (2011). A Functional Role for Nlrp6 in Intestinal Inflammation and Tumorigenesis. J Immunol *186*, 7187–7194.
Dagenais, M., and Saleh, M. (2016). Linking cancer-induced Nlrp3 inflammasome activation to efficient NK cell-mediated immunosurveillance. Oncoimmunology *5*, e1129484.
Demaria, O., Cornen, S., Daëron, M., Morel, Y., Medzhitov, R., and Vivier, E. (2019). Harnessing innate immunity in cancer therapy. Nature *574*, 45–56.

Dupaul-Chicoine, J., Arabzadeh, A., Dagenais, M., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A., Rodrigue-Gervais, I.G., Breton, V., Colpitts, S.L., Beauchemin, N., et al. (2015). The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. Immunity *43*, 751–763.
Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. Cell *145*, 745–757.
Globocan 2018 Cancer today.
Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P.-Y. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat. Med. *21*, 677–687.
Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Strowig, T., Hao, L., Hafemann, A., Jin, C., Wunderlich, C., Wunderlich, T., Eisenbarth, S.C., et al. (2013). Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *110*, 9862–9867.
Janowski, A.M., Colegio, O.R., Hornick, E.E., McNiff, J.M., Martin, M.D., Badovinac, V.P., Norian, L.A., Zhang, W., Cassel, S.L., and Sutterwala, F.S. NLRC4 suppresses melanoma tumor progression independently of inflammasome activation. J Clin Invest *126*, 3917–3928.
Jung, Y.-J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. FASEB J. *17*, 2115–2117.
Karki, R., and Kanneganti, T.-D. (2019). Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. Nature Reviews Cancer 1.
Liu, R., Truax, A.D., Chen, L., Hu, P., Li, Z., Chen, J., Song, C., Chen, L., and Ting, J.P.-Y. (2015). Expression profile of innate immune receptors, NLRs and AIM2, in human colorectal cancer: correlation with cancer stages and inflammasome components. Oncotarget *6*, 33456–33469.
Llosa, N.J., Cruise, M., Tam, A., Wicks, E.C., Hechenbleikner, E.M., Taube, J.M., Blosser, R.L., Fan, H., Wang, H., Luber, B.S., et al. (2015). The vigorous immune microenvironment of microsatellite instable colon cancer is balanced by multiple counter-inhibitory checkpoints. Cancer Discov *5*, 43–51.
Mascaux, C., Angelova, M., Vasaturo, A., Beane, J., Hijazi, K., Anthoine, G., Buttard, B., Rothe, F., Willard-Gallo, K., Haller, A., et al. (2019). Immune evasion before tumour invasion in early lung squamous carcinogenesis. Nature *571*, 570–575.
Nishio, S., Yamada, N., Ohyama, H., Yamanegi, K., Nakasho, K., Hata, M., Nakamura, Y., Fukunaga, S., Futani, H., Yoshiya, S., et al. (2008). Enhanced suppression of pulmonary metastasis of malignant melanoma cells by combined administration of alpha-galactosylceramide and interleukin-18. Cancer Sci. *99*, 113–120.
Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 9601–9606.
Nowarski, R., Jackson, R., Gagliani, N., de Zoete, M.R., Palm, N.W., Bailis, W., Low, J.S., Harman, C.C.D., Graham, M., Elinav, E., et al. (2015). Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. Cell *163*, 1444–1456.
Pantschenko, A.G., Pushkar, I., Anderson, K.H., Wang, Y., Miller, L.J., Kurtzman, S.H., Barrows, G., and Kreutzer, D.L. (2003). The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. Int. J. Oncol. *23*, 269–284.
Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R.-M., Wang, E., Ma, W., Haines, D., O'hUigin, C., et al. (2010). MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. J. Exp. Med. *207*, 1625–1636.
Salminen, A., Kauppinen, A., Hiltunen, M., and Kaarniranta, K. (2014). Epigenetic regulation of ASC/TMS1 expression: potential role in apoptosis and inflammasome function. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 1855–1864.
Song, X., Krelin, Y., Dvorkin, T., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E., and Apte, R.N. (2005). CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. J. Immunol. *175*, 8200–8208.
Ullman, T.A., and Itzkowitz, S.H. (2011). Intestinal inflammation and cancer. Gastroenterology *140*, 1807–1816.
Voronov, E., Shouval, D.S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. PNAS *100*, 2645–2650.
Wang, P., Zhu, S., Yang, L., Cui, S., Pan, W., Jackson, R., Zheng, Y., Rongvaux, A., Sun, Q., Yang, G., et al. (2015). Nlrp6 regulates intestinal antiviral innate immunity. Science *350*, 826–830.
Williams, T.M., Leeth, R.A., Rothschild, D.E., Coutermarsh-Ott, S.L., McDaniel, D.K., Simmons, A.E., Heid, B., Cecere, T.E., and Allen, I.C. (2015). The NLRP1 Inflammasome Attenuates Colitis and Colitis-Associated Tumorigenesis. J Immunol *194*, 3369–3380.

Wilson, J.E., Petrucelli, A.S., Chen, L., Koblansky, A.A., Truax, A.D., Oyama, Y., Rogers, A.B., Brickey, W.J., Wang, Y., Schneider, M., et al. (2015). Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. Nat. Med. *21*, 906–913.
Wlodarska, M., Thaiss, C.A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.-P., Brown, E.M., Frankel, G., Levy, M., Katz, M.N., Philbrick, W.M., et al. (2014). NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. Cell *156*, 1045–1059.
Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. J. Immunol. *185*, 4912–4920.
Zaki, M.H., Vogel, P., Malireddi, R.K.S., Body-Malapel, M., Anand, P.K., Bertin, J., Green, D.R., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2011). The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis. Cancer Cell *20*, 649–660.

SUPPLEMENTAL INFORMATION: Image acquisition from TMA (Supplementary Figure 1)

Image handling

Images of the TMA are generated using the slide scanner NanoZoomer from Hamamatsu. Images are stored in NDPI image files. Homemade software was designed to perform the processing adapted to the study.

First slide image is display on the screen at low resolution. User select the 4 cores of at the extremity of the TMA to pre-localize the core grid. The localization of cores is improved by searching high intensity cores around each node of the grid. Localization of all cores are displayed in the screen to let user refine cores that would be poorly located.

Image of high resolution (20x) is exported for each core in TIF format and is named according to their position in the grid (A01, A02, …, B01, …)

Cytokeratin detection

Slides are cut sequentially, and successive slices are stained using different fluorescent biomarkers. One of those biomarkers stains Cytokeratin to reveal epithelium structures. Epithelium is detected using a simple threshold intensity on the cytokeratin channel followed by a closing operation to fill up small holes in the segmented region. The obtained region can be used to distinguish Epithelium structure from the rest on the image. It also can be transferred to a consecutive slice to reveal the position of the Epithelium in the consecutive slides.

Cytokeratin region transfer

To be able to transfer the Epithelium region to a consecutive slide, nuclei channel of a core image is register to nuclei channel in the consecutive slide. Nuclei repartition and density contains enough information to estimate the rotation and translation need to register the first image on the second one. The estimate rotation and translation are applied the full core image and the epithelium region mask. Epithelium region mask is now precisely aligned to the consecutive slice.

Cell detection

Nuclei DAPI channel is used to drive cell segmentation. Nuclei are detection using band pass follow by thresholding above the background. Nuclei clusters are spited using watershed strategy in order to obtain well separated nuclei segmentation. Cell segmentation is obtained by defining rings around nuclei. Rings of fixed width define the cytosolic area around nuclei.

Feature measurements

For each cell, intensity features are measured from fluorescent channels using maximum or average operator. Measurements are extracted for the different subcellular compartments (cells, nuclei and cytosol). Cell statistics are stored into csv files for further analysis.

Core alignment

Consecutive TMA slices are extracted from single paraffin blocks. Different biomarkers are stained from consecutive slices. In order to perform correlative analysis between the different channel, a method based on image registration where developed and used. For each core, image registration based on DAPI

channel where applied. DAPI channel is used because it is the channel which is the most conserved from on slide to another. The image registration consists in finding the best rigid transform (translation + rotation) that allows to fit the first image into the second. This best transform is applied to all channel of the first slide. A new multiplexed image is obtained combining all channels of the first slice and all channels of the second slide. This multiplexed image is used to apply Cytokeratin mask detection to consecutive images.

Cytokeratin mask detection

The cytokeratin mask is obtained by processing cytokeratin channel using direct thresholding followed by morph math operations (opening and closing). This mask is used as a channel such as a feature express whether the cell is in or out the cytokeratin mask.

Cell positivity

Cell positivity is obtained by placing one or several thresholds on selected features. For example, we have counted the number of cells that are positive for a certain biomarker and inside the cytokeratin mask. The positive cells where displayed on the screen such as the user can control and finetune the threshold. After staining, slides were then digitalized with the Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT scanner in collaboration with the Bordeaux Imaging Center (BIC). Imaging acquisition and fluorescence quantification was made by QuantaCell Inc. (Pessac, France). After computer-assisted image calibration, immunofluorescence quantification was obtained by measuring the fluorescence of each pixel in a DAPI-positive cell, calculating the median of all pixels in each cell and then assessing the mean of median intensity of all cells for each spot. Studied cells were identified with DAPI staining and epithelial cells (in normal and tumour tissues) with a cytokeratin mask (Figure 2). Indeed, quantification of inflammasome expression was done by applying a cytokeratin mask on each spot, to measure fluorescence of inflammasome markers only in cytokeratin/epithelial positive cells. Images were reviewed with NDP.View 2 (Hamamastu photonics Inc).

Table 1: Demographic and clinical features of colorectal cancer patients.

Characteristic		N	%
Gender	Male	60	57.7
	Female	44	42.3
Median age (years [range])		71.7 [38.6 – 88.4]	
Stage	I	8	7.7
	II	36	34.6
	III	37	35.6
	IV	23	22.1
Grade	1	8	7.7
	1-2	9	8.7
	2	76	73.1
	3	8	7.7
Mutational status	KRAS	19	18.3
	BRAF	4	3.8
MMR status	MSS	88	84.6
	MSI	16	15.4
5 years overall survival		64.4%	

Table 2: Correlation between expression of epithelial inflammasomes and clinical characteristics of the colorectal cancer patients.

Inflammasome component	Age	Gender	Tumour grade	MMR status
NLRP1	Young > old (*)	NS	NS	NS
NLRP3	Young > old (***)	NS	NS	NS
NLRP6	NS	NS	NS	NS
AIM2	NS	NS	NS	MSI < MSS (*)
ASC	NS	NS	NS	NS
Caspase-1	NS	NS	NS	NS
IL-1B	Young > old (***)	NS	NS	NS
IL-18	NS	NS	NS	NS

Figure 1: Epithelial protein expression of inflammasome components are downregulated in colorectal cancer patients

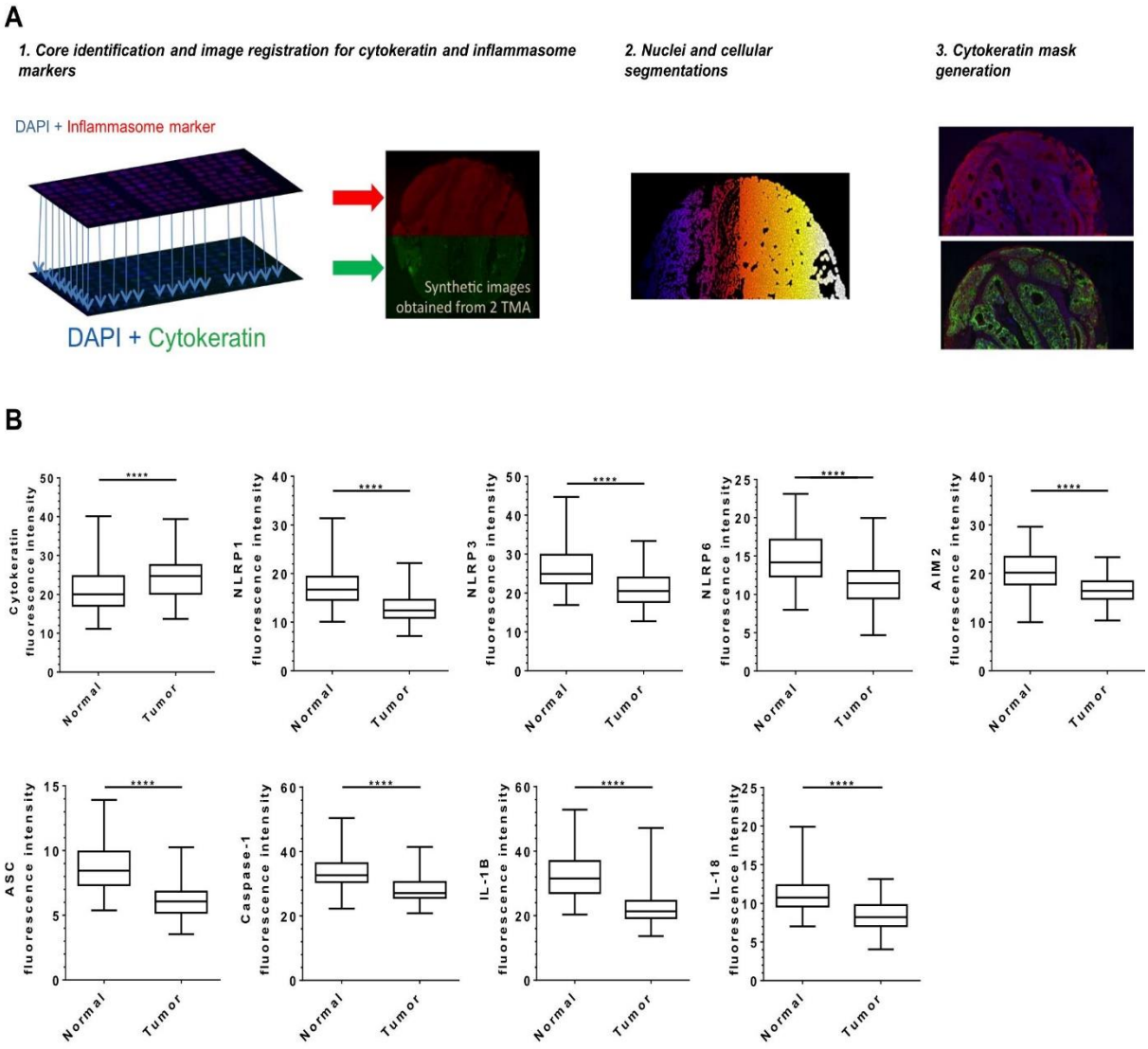
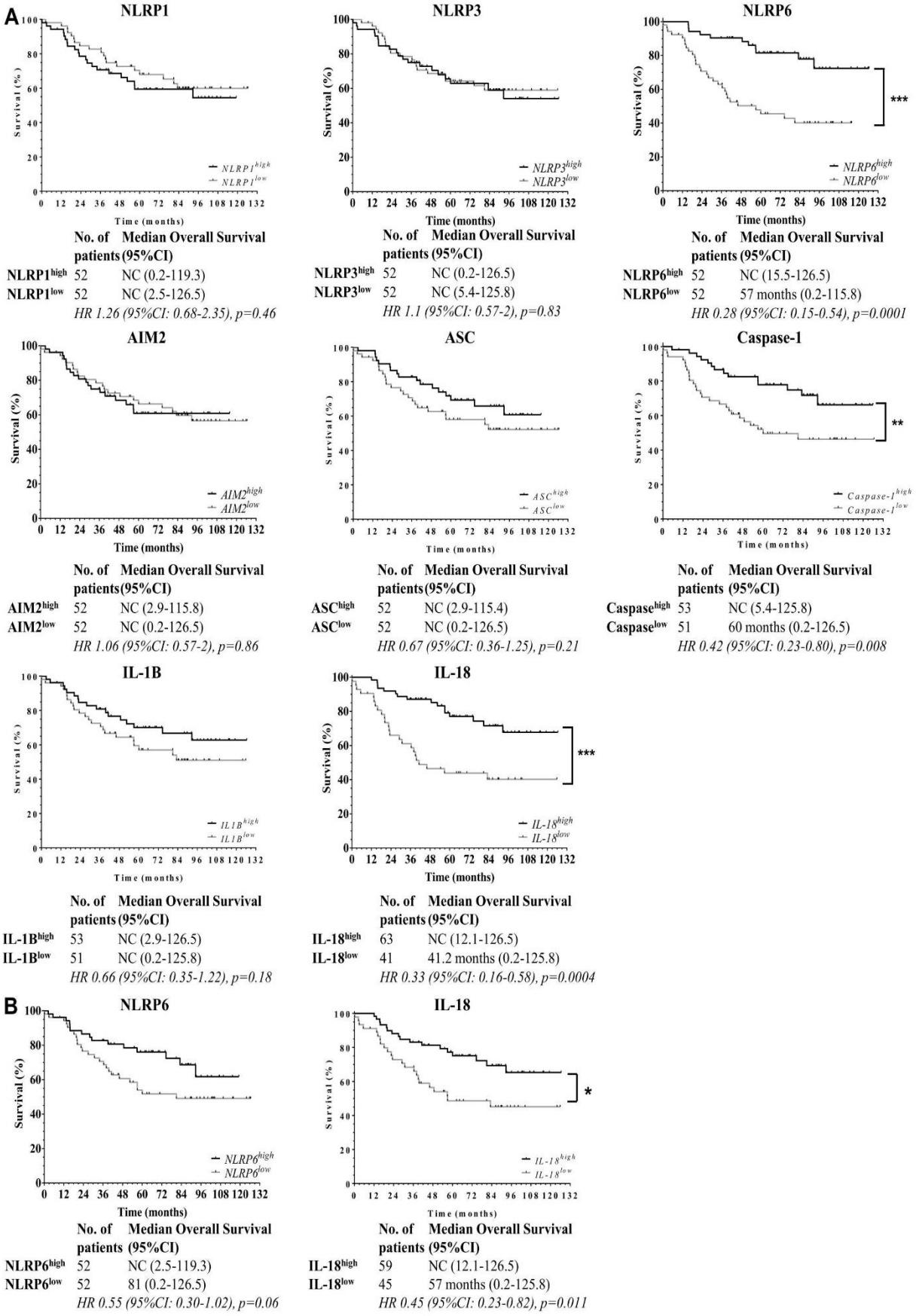


Figure 2: NLRP6 and IL-18 expressions in epithelial tumour cells are strong predictors of patients' outcome.



	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
NLRP1^{high}	52	NC (0.2-119.3)
NLRP1^{low}	52	NC (2.5-126.5)
HR 1.26 (95%CI: 0.68-2.35), p=0.46		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
NLRP3^{high}	52	NC (0.2-126.5)
NLRP3^{low}	52	NC (5.4-125.8)
HR 1.1 (95%CI: 0.57-2), p=0.83		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
NLRP6^{high}	52	NC (15.5-126.5)
NLRP6^{low}	52	57 months (0.2-115.8)
HR 0.28 (95%CI: 0.15-0.54), p=0.0001		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
AIM2^{high}	52	NC (2.9-115.8)
AIM2^{low}	52	NC (0.2-126.5)
HR 1.06 (95%CI: 0.57-2), p=0.86		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
ASC^{high}	52	NC (2.9-115.4)
ASC^{low}	52	NC (0.2-126.5)
HR 0.67 (95%CI: 0.36-1.25), p=0.21		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
Caspase^{high}	53	NC (5.4-125.8)
Caspase^{low}	51	60 months (0.2-126.5)
HR 0.42 (95%CI: 0.23-0.80), p=0.008		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
IL-1B^{high}	53	NC (2.9-126.5)
IL-1B^{low}	51	NC (0.2-125.8)
HR 0.66 (95%CI: 0.35-1.22), p=0.18		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
IL-18^{high}	63	NC (12.1-126.5)
IL-18^{low}	41	41.2 months (0.2-125.8)
HR 0.33 (95%CI: 0.16-0.58), p=0.0004		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
NLRP6^{high}	52	NC (2.5-119.3)
NLRP6^{low}	52	81 (0.2-126.5)
HR 0.55 (95%CI: 0.30-1.02), p=0.06		

	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
IL-18^{high}	59	NC (12.1-126.5)
IL-18^{low}	45	57 months (0.2-125.8)
HR 0.45 (95%CI: 0.23-0.82), p=0.011		

Figure 3: Epithelial expression of NLRP6 and IL-18 are correlated with tumour aggressiveness.

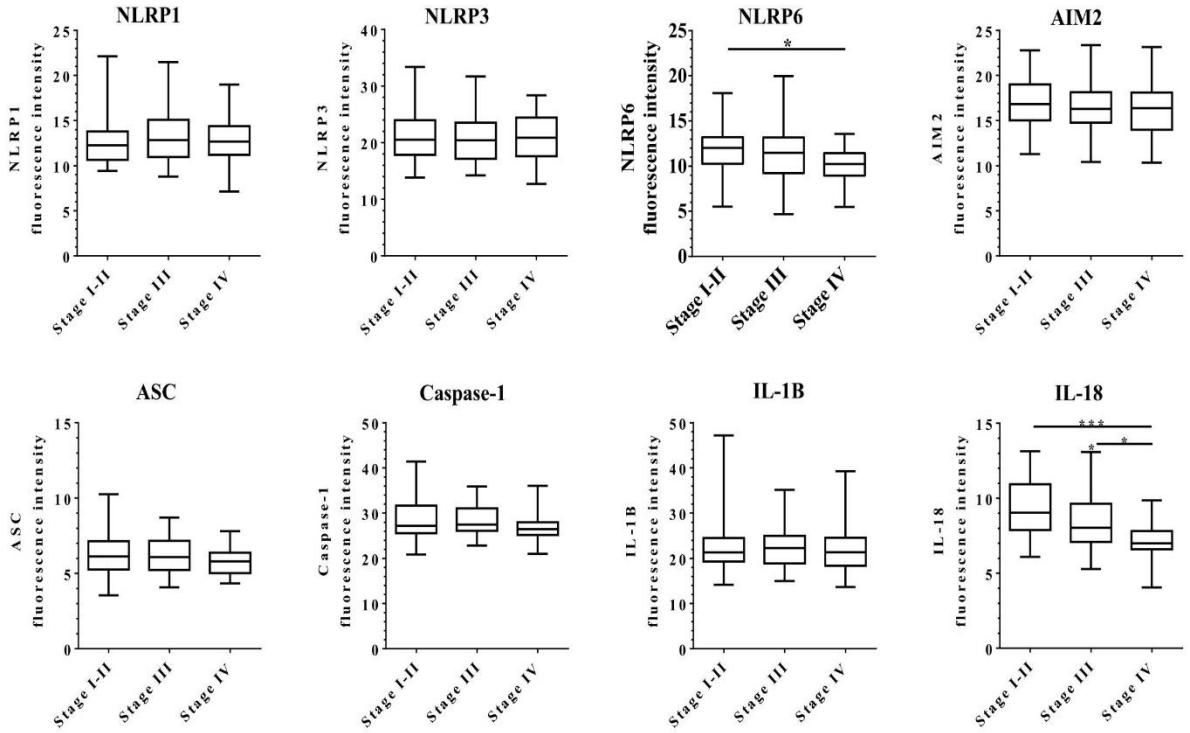


Figure 4: Expression of epithelial IL-18 is correlated with higher lymphocytes infiltration within colorectal tumours.

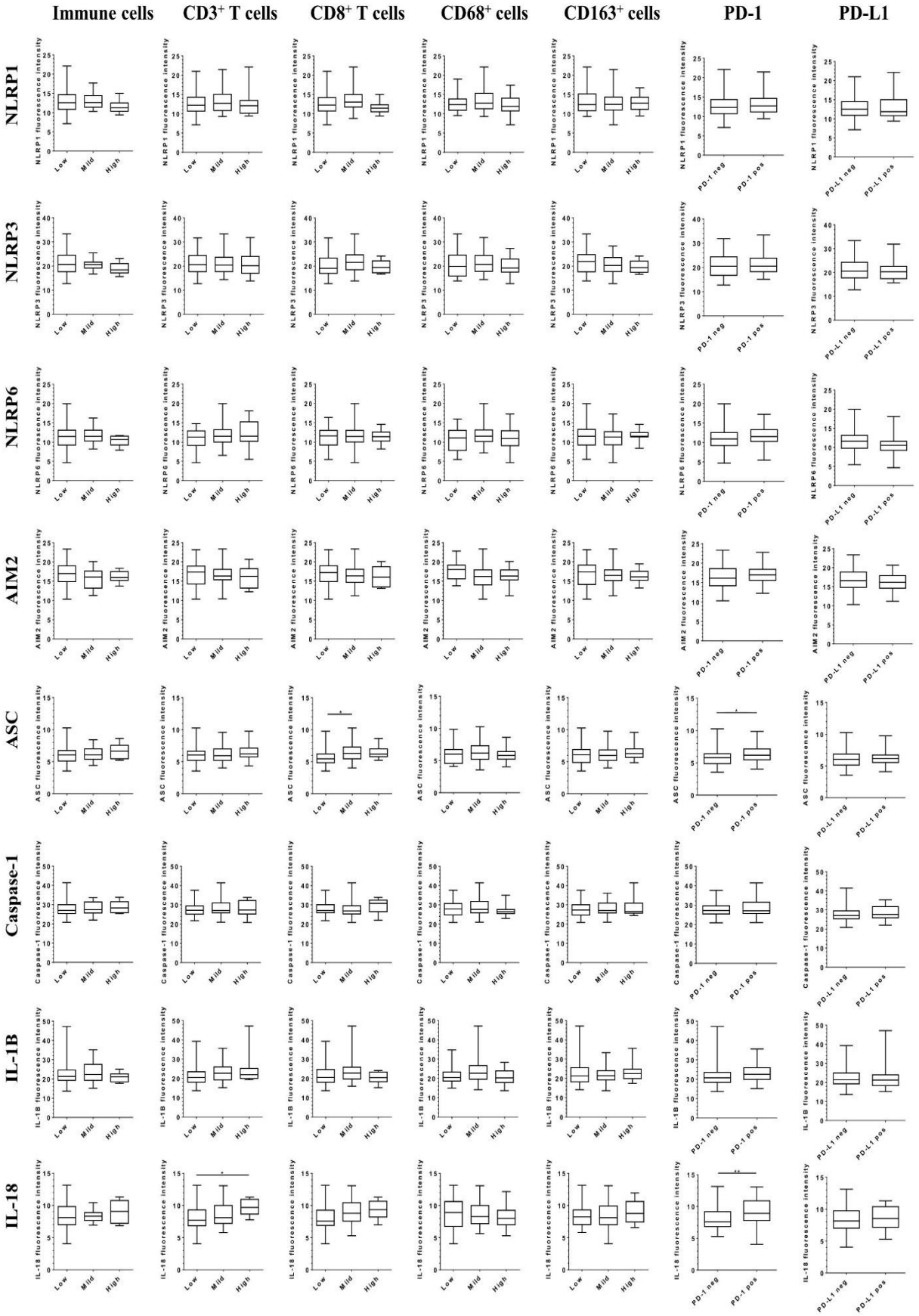
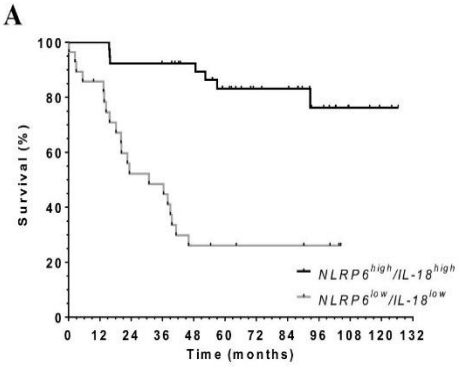
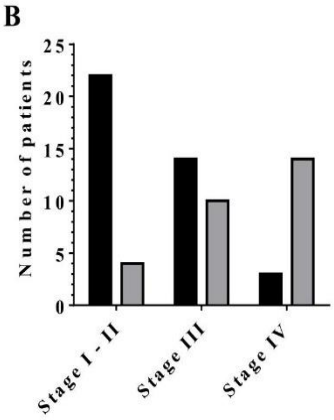
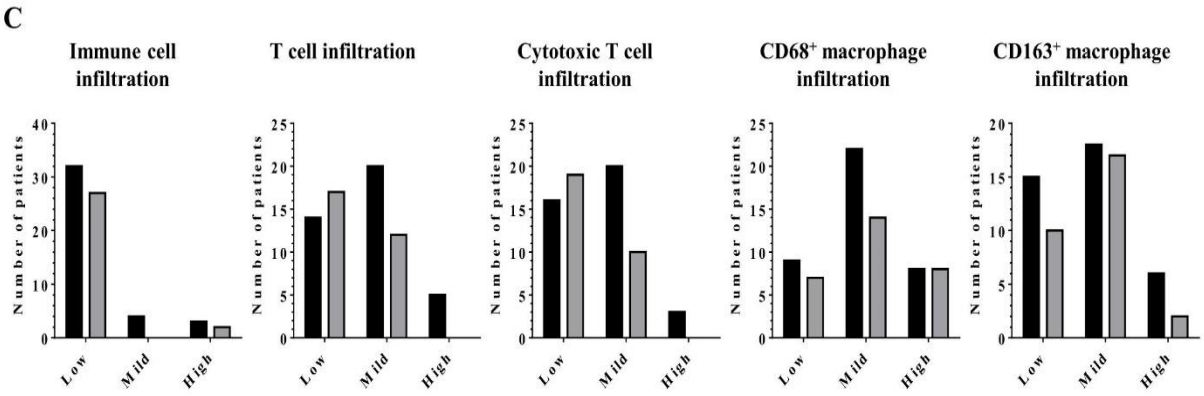


Figure 5: Downregulation of epithelial NLRP6/IL-18 is associated with a more aggressive disease.



	No. of patients	Median Overall Survival (95%CI)
NLRP6^{high}/IL-18^{high}	28	NC (15.5-126.5)
NLRP6^{low}/IL-18^{low}	39	30.8 months (0.2-104.6)
	HR 0.15 (95%CI: 0.05-0.27), p<0.0001	





Supplementary Table 1: List of antibodies used to stain paraffin-embedded tissues.

Target	Clone	pH	Dilution	Secondary
Cytokeratin	AE1-AE3	pH 6	1/50	Mouse
NLRP1	ALX-801-803	pH 6	1/300	Mouse
NLRP3	ALX-804-819	pH 6	1/250	Mouse
NLRP6	ABF29	pH 6	1/500	Rabbit
AIM2	OAEB01074	pH 9	1/50	Goat
Caspase-1 (p10)	LS-C312683	pH 9	1/500	Rabbit
ASC	HPA049074	pH 6	1/100	Rabbit
IL-1β	3A6	pH 6	1/100	Mouse
IL-18	HPA003980	pH 6	1/200	Rabbit

b. Epithelial innate immune sensor NLRC4 impairs metastatic colorectal cancer (submitted)

Charlotte Domblides[1,2,3], Lydia Lartigue[4], Isabelle Mahouche[4], Félix Lefort[2,3], Valérie Velasco[5], Victor Racine[6], Isabelle Douchet[1,2], Sonia Netzer[1,2], Vincent Pitard[1,2], Christian Roy[7], Isabelle Soubeyran[5], Hong Liu[7], Julie Déchanet-Merville[1,2], Patrick Blanco[1,2], Benjamin Faustin[1,2,8]*

1 Bordeaux University, ImmunoConcept, 33000 Bordeaux, France
2 CNRS, UMR 5164, 146 rue Léo Saignat, 33000 Bordeaux, France
3 Department of Medical Oncology, Hôpital Saint-André, Bordeaux University Hospital-CHU, Bordeaux, France
4 INSERM U1218 ACTION, Institut Bergonié, 33076 Bordeaux, France
5 Department of Biopathology, Institut Bergonié, Comprehensive Cancer Center, Bordeaux, France
6 QuantaCell, 2 Allée du Doyen Georges Brus, Pessac 33600, France
7 Immune-Oncology DDU, Takeda Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA
8 Immunology Discovery, Janssen Research and Development, 3210 Merryfield Row, San Diego, CA 92121, USA

*Current address correspondence:
Benjamin Faustin, PhD
Immunology Discovery, Janssen Research and Development
3210 Merryfield Row
San Diego, CA 92121, USA.
email: bfaustin@its.jnj.com

Running Title: Epithelial NLRC4 impairs metastatic colorectal cancer

ABSTRACT
Harnessing the immune system is at center stage of the antitumor immune response, and the use of immune checkpoint blockade strategy has led to unprecedented clinical responses in various cancer indications, albeit few responders. Hence, unleashing additional immune mechanisms, including the innate immunity to tumors, are promising to improve both the number of responders and survival of patients through impairing aggressive metastatic progression. Here, we show that low protein expression of innate immune sensor NLRC4 in intestinal epithelial cells is associated to the progression of patients with colorectal cancer (CRC) into aggressive metastatic clinical stage. Loss of NLRC4 protein expression in patient tumor cells is coupled to impaired immune infiltrates characterize by CD3+ T cells, DCs, and macrophages. To confer protection, we show that in addition to mediate IL-18 production, NLRC4 expression in cancer cells also triggers a Type-I IFN gene signature and chemokines at the transcriptional level as measured by RNA sequencing (RNA-seq), which increases tumor-infiltrating monocyte-derived DCs and T cells. Altogether, we shed light on the epithelial innate immune sensor NLRC4 to confer new therapeutic targeting opportunities for improving the antitumor immune response to aggressive stages in CRC.

INTRODUCTION
Immunotherapy has recently revolutionized cancer patient care for several indications, mostly through the use of immune checkpoint blockade of tumor infiltrating T cells to reignite an efficient immune response. However, most patients with solid tumors are still refractory to this therapeutic strategy without clearly defined causes. Higher vertebrates have developed protective mechanisms that can detect stress-induced cues triggered by infection, injury or carcinogenesis. Among those, the innate immune system is primed by these signals and responds to protect the host against cellular stress or pathogen invasion.
Such cytosolic sensors of cellular perturbations compose the nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat (NLR) family of proteins (Ting et al., 2008). After sensing cellular cues, NLRs assemble into a molecular scaffold that maturates inflammatory caspases including caspase-1 by a close-proximity mechanism. Such multi-protein complexes are called inflammasomes (Martinon et al., 2002), and upon the selective NLR engaged in the machinery, several inflammasomes can form in response to a plethora

of cellular insults (for review see (Guo et al., 2015)). Processed and active caspase-1 can then mediate numerous downstream immune signaling including cytokine maturation (IL-1β and IL-18), pyroptosis cell death, production of inflammatory lipids, and modulation of cell metabolism. Recently, various NLR inflammasomes have been shown to protect mice against tumorigenesis in various cancer types including colon, lung, and melanoma (for review see (Karki and Kanneganti, 2019); and NLRP3 mediates improved response to immune checkpoint therapy (Segovia et al., 2019). Interestingly, some NLRs have been recently shown to mediate their antitumor function independently of caspase activity (Janowski et al.; Karki et al., 2016; Wilson et al., 2015). Finally, even NLRs not forming inflammasome such as NLRX1 and NLRC3 seem to play also a role in tumorigenesis by blocking major tumor-mediated pathways including TRAF6-induced NF-κB and MAPK, or PI3K-mTOR, respectively (Karki et al., 2016; Lei and Maloy, 2016).

However, how the various biology of NLRs translate into the regulation of tumorigenesis in patients remains unclear, as well as the underlying molecular mechanisms of protection. In addition, since some NLRs are expressed in both the epithelial and myeloid compartments, their cell-type specific impact in cancer immune response within the tumor microenvironment remains to be established. NLRC4 is a crucial component of bacterial innate immune sensing in the gut by triggering diverse mechanisms involved in intestinal epithelial cell (IEC) homeostasis and innate immune responses through production of IL-18 among others (Rauch et al., 2017). Previously, we have identified that upregulation of NLRC4 at the gene expression level stratifies older individuals with IL-1β/IL-18-mediated inflammation, hypertension, and cardiovascular death (Furman et al., 2017). Strikingly, the NLRC4high population (harboring high levels of NLRC4 gene expression in blood cells) seemed to be protected against cancer mortality (Furman et al., 2017) , which is consistent with mice models. This prompted us to evaluate the translational impact of NLRC4 expression in cancer onset/progression in relevant patient tissue samples and its impact in disease prognosis. Especially, by using a new procedure of High-Throughput imaging analysis of Tissue-MicroArrays (TMAs) of patients with colorectal cancer (CRC), we monitored the level of epithelial NLRC4 protein expression specifically in tumor epithelial cells or in the stromal compartment. Our results show that specific loss of NLRC4 protein expression in cancer cells (not stromal) is associated to aggressive metastatic disease in CRC patients, decreased survival, and correlates with low immune infiltrate of T cells and dendritic cells (DCs). Normal epithelial NLRC4 protein expression improves prognosis and T cell infiltration through both IL-18 dependent and independent mechanisms that involves Type-I IFN gene signature in colon cancer cells to prime DC activation. Hence, healthy expression of epithelial NLRC4 rather than in the stromal compartment contributes to mount an efficient immune response and protects against aggressive metastatic CRC.

RESULTS

Loss of epithelial NLRC4 protein expression is associated to poor survival in CRC and metastatic stage IV

Studies so far investigating the impact of NLRs in the antitumor immune response have relied mainly on measuring gene expression levels from bulk analysis of tumor samples. To monitor protein expression levels of NLRs directly into patient tumor cells, we devised a new immunofluorescence imaging procedure using high-throughput analysis of Tissue MicroArrays (TMAs) samples from healthy controls and patients diagnosed with various clinical stages of colorectal cancer (CRC). Samples were either collected from the Bergonié Cancer Institute or commercially available as a confirmation cohort (104 and 216 patients, respectively; clinical features of cohorts described in Suppl. Table 1; see methods). This tissue-based imaging procedure consists in measuring by immunofluorescence protein levels of various NLRC4 inflammasome components (NLRC4, Caspase-1, IL-1β, IL-18) specifically in colon cancer cells versus whole tumor bulk which encompasses expression in immune cells within the tissue microenvironment (Figure 1A). Essentially, various protein expression of inflammasome components were quantified by measuring fluorescence intensity within cytokeratin-positive and DAPI-positive stained tumor cells (see methods). Figure 1B shows a robust loss of protein expression of NLRC4 as well as inflammasome-dependent cytokines IL-1β and IL-18 in tumor cells of the 104 patients from the Bergonié cohort, compared to normal tissue. Loss of NLRC4 was confirmed in another cohort of commercial colon TMAs of 208 tissue from colorectal cancer patients compared to 8 unmatched normal samples (Suppl. Figure 1). This result is consistent with downregulation of NLRC4

at the gene expression level obtained from TCGA transcriptomics analysis of bulk tumors of patients with gastrointestinal cancer including colon adenocarcinoma (COAD), cholangiocarcinoma (CHOL), and liver hepatocellular carcinoma (LIHC) (Figure 1C, to the left). Importantly, a strong downregulation of NLRC4 gene expression is also observed in the tumor of patients with lung cancers (adenocarcinoma LUAD, or squamous cell carcinoma LUSC). Indeed, 26.43% and 27.78% of tumor samples show more than two times reduction of NLRC4 gene expression for COAD and CHOL respectively, and robust 89.62% and 97.21% for LUAD and LUSC (Figure 1C, to the right).
However, it remained to determine if the observed loss of NLRC4 expression at the gene expression and protein level in tumor cells might have a clinical impact on the survival of patients. For that, patients' cohort was stratified based on protein expression levels of NLRC4, IL-1β, and IL-18, as high versus low expression in the colon epithelium either within the cytokeratin mask or in the stroma (outside the cytokeratin mask). For NLRC4 expression (Figure 1D), we showed that high tumor epithelial protein expression of NLRC4 was associated with a better survival than tumors with lower epithelial expression (HR: 0.44, 95IC: 0.22-0.79, p=0.0082). The median overall survival was 56.98 months for NLRC4- patients, and unreached for NLRC4+ individuals. In contrast, variation of stromal NLRC4 protein expression was not associated with a difference in overall survival (HR: 0.79, 95IC: 0.42-1.46, p=0.45). Unlike NLRC4, loss of IL-18 protein expression in and out of the cytokeratin tumor mask was associated to a worse outcome (tumor epithelium with HR: 0.33, 95IC: 0.17-0.58, p=0.0004; tumor stroma with HR: 0.45, 95IC: 0.23-0.83, p=0.01). Median overall survivals were 41.21 months for IL-18- and unreached for IL-18+ in epithelial cells, and 56.98 months for IL-18- and unreached for IL-18+ in stromal cells. Unlike NLRC4 and IL-18, variation of IL-1β protein expression in the cytokeratin tumor mask was not associated to a difference in survival (HR: 0.67, 95IC: 0.36-1.25, p=0.21). Consistently, significant improved survival for NLRC4+ patients (measured at the gene expression level; bulk tumor analysis) was also obtained from analysis of transcriptomics datasets for colorectal cancer (p=0.0169) (Suppl. Figure 2), as well as importantly from non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) (p=1.999e-6) (Figure 1D). Finally, a significant correlation was determined between lower NLRC4 expression in epithelial tumor cells and more advanced disease (TNM stage IV; p=0.0082) (Figure 1E). This was also the case for IL-18 (p<0.0001), but not for IL-1β. This association to stage IV was confirmed in another cohort by using the commercial colon TMAs of 216 patients (Suppl. Figure 1). Therefore, loss of NLRC4 protein expression, especially in epithelial tumor cells rather than stromal cells, is associated to poor survival of CRC patients (and potentially of lung cancer patients as well) due to progression to more advanced aggressive clinical stage.

Loss of epithelial NLRC4 expression associates to lower immune infiltrates

Based on its central role in the gut mucosal innate immune response, we hypothesized that NLRC4 may regulate the antitumor immune response in CRC patients. In patients TMAs, we observed that low infiltrate patients had a lower expression of NLRC4 (p=0.004), including lower CD3+ T cell infiltration (p=0.006) and CD8+ T cells in a lower extent (p=0.03) (Figure 2A). Interestingly, no correlation was observed for CD68+ and CD163+ macrophages infiltration (respectively p=0.23 and p=0.44). To confirm and extend this approach, we performed another analysis using TIMER to determine the abundance of additional tumor-infiltrating immune cell populations in COAD (Li et al., 2017). We first conducted an analysis that provides the comparison of tumor infiltration levels among tumors with different somatic copy number alterations (SCNA) for NLRC4 inflammasome genes. SCNAs are defined by GISTIC 2.0 (Mermel et al., 2011). Consistently with the results obtained from TMAs, arm-level deletion of nlrc4 was associated to decreased CD4+ T cell tumor infiltration, but also neutrophils and DCs (Figure 2B). This strong significance of impaired infiltration for CD4+ T cells and DCs was no longer observed for casp1 and IL18 genes. In addition, the level of NLRC4 gene expression correlated strongly with immune infiltration of DCs (partial cor=0.71; p-value=2.2e-16) and in a lesser extent to CD8+ and CD4+ T cells (Figure 2C). This correlation with DCs and T cells was substantially lower for CASP1 and IL-18.
To determine the prognostic effect of both NLRC4 and IL-18 protein expression combined, CRC patients were stratified according to the protein expression levels of NLRC4 and IL-18 as high versus low protein expression in epithelial cancer cells (Figure 2D). NLRC4-/IL-18- patients had a strong decreased survival compared to NLRC4+/IL-18+ individuals (HR: 0.26, 95IC: 0.09-0.45, p=0.0001).

Median overall survivals were 39.02 months for NLRC4-/IL-18- patients and unreached for NLRC4+/IL-18+ individuals. Interestingly, there was no difference in overall survival between NLRC4+/IL-18+ and NLRC4+/IL-18- cohorts (p=0.13). Moreover, the loss of IL-18 with preserved NLRC4 expression was associated with an intermediate prognostic in comparison with NLRC4+/IL-18+ and NLRC4-/IL-18- cohorts (5-year survival rates of 82% for NLRC4+/IL-18+, 62% for NLRC4+/IL-18- and 35% for NLRC4-/IL-18-).. These results suggested that the prognostic effect of NLRC4 could depend on both IL-18/inflammasome-dependent and IL-18/inflammasome-independent mechanisms. This prompted us to investigate the effect of these stratifications on T cell infiltration (Figure 2E). Consistent with analysis of overall survival, NLRC4-/IL-18- patients were characterized by a decreased of mild and high immune infiltrate compared to the NLRC4+/IL-18+ population, including CD3+ and CD8+ T cells. However, no difference was observed between NLRC4+/IL-18+ and NLRC4+/IL-18- populations in terms of immune infiltration, and loss of NLRC4 expression within the IL-18- population mostly impaired the mild infiltration of both CD3+ and CD8+ T cells (~20% in frequency respectively). Therefore, tumor NLRC4 expression associates to T cell immune infiltration and DCs, through mechanisms that are partially inflammasome-independent to mediate better survival.

NLRC4 expression in colon cancer cells triggers a Type-I IFN gene signature

To identify potential mechanisms underlying this inflammasome-independent process, we engineered cell lines that stably re-express NLRC4, and conducted RNA sequencing analysis (RNA-seq) to investigate the induction of transcriptional programs (Figure 3A; Suppl Figure 3; see methods). As functional control (of cell lines), NLRC4 re-expression in untreated HT29 and THP-1 cell lines did not induce inflammasome activation as measured by IL-1β cytokine secretion (data not shown); whereas IL-1β secretion was measured upon treatment with Flagellin in THP-1 cell line (Suppl. Figure 4). Moreover, NLRC4 cell lines including HT29 did not display changes in cell proliferation or migration compared to mock control (Suppl. Figure 5). For SW620 cell line, we observed a decreased proliferation by expressing NLRC4 but only at later time (J7). Volcano plots of significant dysregulated genes ($p<0.05$) illustrated that NLRC4 re-expression in colon HT29 cell line induced the transcriptional upregulation of 102 genes (2 Fold Change cut-off) and 127 downregulated genes versus mock control (102 upregulated and 144 downregulated for THP-1-NLRC4) (Figure 3A). Further Gene Ontology (GO) analysis using KEGG pathways of significant upregulated genes identified various signaling pathways including 'defense response to virus' and 'Type-I interferon signaling' among the most significant ones. Consistently, same analysis on THP-1-expressing NLRC4 cell line also identified 'Type-I interferon signaling pathway' as the most significant GO. Finally, Figure 3B shows composition of the Type-I interferon gene signature upregulated by NLRC4 expression in both colon and monocytic cell lines. As observed in Figure 3C, some genes are redundant between the two cell types including IFI44L and IFI27 as the most upregulated (>4 fold), and others specific to colon epithelial HT29 (MX2, DDX58, IFNB1). Interestingly, HT29-NLRC4 also upregulated several chemokines CXCL6 and CXCL10 essential for infiltration of tumor-specific CD8 T cells into the tumor and killing activity as well as recruitment of NK cells (Fuertes et al., 2011; Wennerberg et al., 2015). As control, the use of specific caspase-1 inhibitor VX-765 had no effect on the expression of those genes as observed in HT29-NLRC4 cell line by RNAseq analysis (data not shown). Expression of some of these Type-I IFN genes identified (CXCL10, IFIT2, DDX58, IFIT3, OAS2) correlated with NLRC4 expression in COAD ($Corr \geq 0.5$) (Figure 3D). As shown in Figure 3E and F, the expression of a Type-I IFN gene signature (encompassing 59 genes; see methods) correlated with NLRC4 expression in COAD and READ patient tumors (corr=0.46, p<2.2e-16; corr=0.53, p=5.2e-14), and higher in metastatic tumors with a GI primary site (corr=0.53, p=0.043) (data obtained from MET500 database). As control, data obtained for NLRP6 expression (another NLR-family member also expressed in intestinal epithelial cells) show much lower correlation coefficients for both primary and metastatic tumors. Importantly, high correlations for NLRC4 were also obtained in lung cancer tumors (LUSC and LUAD), as well as for metastatic tumors. Hence, NLRC4 expression in colon and monocytic cancer cells deploys a Type-I IFN signature at the transcriptional level that is caspase-1 independent, and expressions between NLRC4 and this signature are strongly correlated in patients with colorectal and lung cancers (even more in metastatic stage as consistent with the results from the Bergonié cohort).

NLRC4 associates to monocyte-derived DCs and T cell infiltration in CRC patients

Type-I IFN signaling is crucial in priming professional antigen-presenting cells (APCs) including DCs to present tumor antigens to T cells for developing subsequent tumor cell killing functions (Demaria et al., 2019). Hence, improving DC tumor infiltration and priming is an attractive strategy to improve patient response to current therapies. NLRC4-mediated Type-I IFN signaling in colon cancer cells has prompted us to evaluate its potential association to various DC subsets in patients with CRC. First, we run GO KEGG pathway analysis on the most significant genes associated to NLRC4 in COAD patients (see methods) and confirmed that pathways related to Type-I IFN signaling including 'Antigen processing and presentation' was significantly present; as well as domains involved in MHCI/II machineries using GO KEGG interdomain analysis (Figure 4A). We then aimed to better characterize DC subsets that might be associated with NLRC4 expression in CRC and lung cancer patients (Figure 4B), among COAD, READ, LUSC, and LUAD. For that we analyzed several available datasets including scRNAseq, TCIA, CIBERSORT, and TIMER and determine the coefficient correlations between various DC subsets and NLRC4 expression. Analysis of the various human DC subsets (as identified by scRNAseq in (Villani et al., 2017)) showed the strongest correlation with NLRC4 expression for DC2, DC3, and DC4 in COAD (corr=0.69, 0.71, and 0.64 respectively), as well as in READ patients. Those same three subsets were also the most correlated to NLRC4 expression for lung cancer in LUSC (corr=0.81, 0.78, and 0.81 respectively) and LUAD patients with the same magnitude. The same analysis was performed in comparison to STING expression (TMEM173 gene) because of its well-known function in triggering Type-I IFN signaling in immune cells and cancer cells to prime DC activation. Surprisingly, coefficient correlations between either NLRC4 or STING expression to DC2, DC3, and DC4 subsets were much stronger for NLRC4 in both colon and lung cancers. From TCIA datasets, activated DC (aDC) phenotype was the strongest subset correlated to NLRC4 expression in both cancer types, again those coefficients were lower for STING. Using CIBERSORT, no difference was observed between DC resting and DC activated even though high coefficients were measured for NLRC4 (corr=0.74 and 0.7 for COAD) and again much lower for STING (corr=0.23 and 0.28 for COAD). Finally, TIMER analysis of DC provided strong coefficients for NLRC4 in both colon and lung cancers, which were much lower for STING. To illustrate these results, correlation curves were plotted between DC2 or DC3 subsets (obtained from scRNAseq signatures) and NLRC4 expression in COAD patient showing both strong correlation coefficient and high significance values (corr=0.73, $p<2.2e-16$; corr=0.72, $p<2.2e-16$ for DC2 and DC3 respectively). Importantly, molecular features of DC2 and DC3 subsets by scRNAseq analysis have suggested their skewing towards mainly an inflammatory monocyte phenotype and Type-I IFN signaling/Ag presentation (Villani et al., 2017). In addition, aligned with their molecular features, only DC2 and DC3 subsets were demonstrated to mediate CD4+ and CD8+ proliferation in co-culture assays (Villani et al., 2017). By using TIMER analysis, NLRC4 expression consistently correlated to CD4 expression (corr=0.69, $p<2.2e-16$) in COAD patients, and CD8A in a lesser extent (corr=0.47, $p<2.2e-16$), independently of age (Figure 4C). As control, another NLR-family member NLRP6 was not correlated to CD4 or CD8A (Figure 4C), as well as downstream inflammasome components CASP1, and cytokines IL-1β and IL-18 (Suppl. Figure 6 and 7). Altogether, these data suggest that NLRC4 associates to antigen-presenting DC phenotype in colon and lung patient tumors.

DISCUSSION

Various innate immune signaling that include inflammasomes and NLR-family members have been described having a role in tumorigenesis, with contrasting functions depending on disease stages, tissue location of expression, and study models used. Here, we show an unprecedented role of epithelial NLRC4 as protector against aggressive stage of metastasis in patients with colorectal cancer, and potentially by extension to multiple lung cancers. Tumor epithelial expression of NLRC4, rather than stromal, seems to be critical to mediate protection by playing a role in DC and T cell immune infiltration in the tumor microenvironment. Mechanistically, epithelial NLRC4 in tumor cells engages a Type-I IFN gene signature in an inflammasome-independent manner that strongly associates to DC2 and DC3 infiltration for tumor antigen presentation.

Previously, several NLR-family members have been shown to be downregulated at the gene expression level of patient tumors with CRC, as measured by transcriptomic analysis of tumor bulk (Liu et al., 2015). This decrease seems to appear in early clinical stages of tumorigenesis. Here, we show that

NLRC4 is downregulated as well at the protein level and within the epithelial tumor compartment. Strikingly, this loss of NLRC4 protein expression particularly in cancer cells but not stromal, translates into aggressive stage IV metastatic CRC and poor survival of patients. Therefore, our results emphasize the importance of normal epithelial expression of NLRC4 to improve survival. Irrespective to epithelial NLRC4, neither loss of epithelial caspase-1 nor IL-1β have an impact in disease prognosis. Hence, downregulation of some downstream effectors of inflammasomes do not translate like NLRC4 in prognosis which shed light on its own underlying molecular mechanisms in CRC and protection. Importantly, our results in patients are consistent with those obtained from NLRC4-/- mice showing increased tumorigenesis upon AOM/DSS treatment, and tumors appeared aggressive with invasion of tumor cells below the muscular mucosae compared to treated WT mice (Hu et al., 2010). How epithelial expression of NLRC4 at the protein and gene expression is lost in patients in response to carcinogenesis in unclear. We can speculate that early signaling involved in the regulation of NLRC4 expression mediated by microbial dysbiosis (which participates to cancer progression), p53, or IRF8 might contribute to this loss (Lee et al., 2018; Sadasivam et al., 2005).

NLRC4 is normally constitutively expressed in intestinal epithelial cells (IECs), along with IL-18, to cope with extracellular insults by sensing the presence of infection and microbiome dysbiosis, thereby participating in maintaining the gut barrier integrity. However, when hyperactivated by the presence of gain-of-function mutations identified in some human diseases, NLRC4 induces a spectrum of clinical inflammasopathies characterized by severe enterocolitis and rapid death in some cases (Canna et al., 2014; Romberg et al., 2014), with associated clinical and molecular features clearly different than NLRP3 gain-of-function mutation inducing NOMID (Neonatal-Onset Multisystem Inflammatory Disease). This observation would suggest that activated NLRC4 triggers particular gut immune biology underlying by specific mechanisms not redundant to other NLRs in the intestinal mucosa. When potently activated particularly in gut IECs, epithelial NLRC4 can deploy diverse mechanisms which encompass potent cytokine secretion (IL-18), eicosanoid production, pyroptotic cell death, and expulsion of IECs in the lumen (Rauch et al., 2017). Interestingly, this last event can be independent of canonical inflammasome (with caspase-1) but may rely on caspase-8 activation to rearrange IEC actin cytosqueleton. Hence, we may hypothesize that NLRC4 mediates protection against tumorigenesis by triggering those epithelial functions in addition to the ones we have hereby identified which involve DC and T cell infiltration. This combination of epithelial functions might explain the strong prognostic role of NLRC4 in CRC, and potentially lung cancers (which also show dramatic decrease of expression in tumors and impact on survival). We show here that IL-18 has a prognostic role in CRC and is associated to stage IV metastasis. IL-18 in the gut is mostly produced by the NLRC4 inflammasome (Rauch et al., 2017), but unlike NLRC4, we show here that its protective role in overall survival is not limited to the tumor epithelium. Importantly, we show that protection in overall survival is mostly attributed to expression of NLRC4 rather than IL-18 in epithelial tumors, by maintaining mild/high immune infiltration including T cells.

As shown here, epithelial NLRC4 have distinct protective role(s) independent of IL-18 and canonical inflammasome, to confer additional robust immune response through the setting of a Type-I IFN gene signature and chemoattractants in cancer cells. To note, AIM2 also has an inflammasome-independent protective role in CRC by blocking the pAkt-mediated expression of Myc oncogene (Man et al., 2015). Consistent with this NLRC4-induced Type I-IFN signature in tumor cells shown here, NLRC4 expression strongly associates to DC infiltration particularly DC2/DC3/DC4 rather than DC1, DC5, or DC6 (pDCs). Interestingly, mainly DC2 and DC3 subsets express molecular features of antigen presentation as shown by scRNAseq analysis studies, and promote CD4+ and CD8+ T cell activation/proliferation in co-cultures (Villani et al., 2017). Since NLRC4 expression also associates to T cell infiltration and CD4/CD8A gene expression from patient CRC tumors, we may speculate a model wherein epithelial NLRC4 triggers DC2/DC3 through Type-I IFN to prime T cells and mediate a potent antitumor immune response. In line with this, NLRC4 also upregulates CXCL6 and CXCL10 chemokines essential for infiltration of tumor-specific CD8 T cells into the tumor and killing activity as well as recruitment of NK cells (Fuertes et al., 2011; Wennerberg et al., 2015). Altogether, this immune response translates into avoiding progression to more aggressive stage IV metastasis in CRC. Finally, we have noticed that NLRC4 gene expression strongly associates to CD4 gene expression more potently than CD8A in patient CRC tumors. Hence, NLRC4 might play a role in the proinflammatory CD4-

mediated immune response critical for productive antitumor immune response (Borst et al., 2018), potentially through the infiltration/priming of tumor-antigens presenting DC2 as observed in melanoma patients; the later DC subset correlating with responsiveness to anti-PD-1 therapy (Dodagatta-Marri et al., 2019).

One important remaining challenge in cancer immunotherapy is to improve immune infiltration in solid tumors in response to current therapy and increase responders. In addition to enhancing T-cell responses, improving/re-establishing a proper innate immunity of epithelial tumors to thereby educate the immune system towards mounting a robust antitumor immune response is an attractive approach to leverage and has started to be investigated in the clinic. Recently, an inflammasome-activated signature has been identified in melanoma patient tumors responding to immune checkpoint blockade (anti-CTLA-4 and anti-PD-1 therapies), in which NLRC4 was found to be upregulated at the gene expression level during treatment (Segovia et al., 2019). Epithelial innate immune NLRC4 might also have an impact in this mechanism in CRC because of its role illustrated here in priming epithelial tumor cells for immune infiltration and activation through Type-I IFN signaling and chemoattractants that are emphasized as critical mediators for mounting a robust immune response (along with STING and RIG-I) (Demaria et al., 2019), in addition to its role in intestinal mucosal IL-18 production. Altogether, this work shed light on NLRC4 as a critical epithelial innate immune protector against aggressive CRC, and re-establishing its normal expression within epithelial tumor cells may restore/maintain DC and T cell immune infiltrates to ultimately sensitize the tumor to current therapies (including immune checkpoint blockades). Hence, those results might lay the foundation for new therapeutic opportunities in CRC and potentially lung cancers by extension through various strategies.

ACKOWLEDGEMENT

This research was funded by INCa-Cancéropôle GSO, Ligue Nationale contre le Cancer, Fondation ARC pour la recherche sur le cancer, and the MD-PhD program of CHU Bordeaux.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Loss of tumor epithelial NLRC4 protein is associated to lower overall survival of colorectal cancer patients and metastatic stage IV. (A) High-throughput tissue image processing used to monitor the protein expression of NLRC4 and cytokines from patient tissue samples. Histology slides were stained with antibodies against NLRC4 or cytokines IL-1β, or IL-18, or cytokeratin for epithelial cellular staining and DAPI for nuclear staining (step 1). Slides were acquired with the Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT scanner. Nuclear staining (DAPI positive) and cellular segmentation was performed (step 2). A cytokeratin mask was then created and superposed to inflammasome staining (step 3). Quantification of immunofluorescence intensity was obtained by measuring the mean of median fluorescence intensity of DAPI positive and cytokeratin positive cells on each spot. (B) To the left, tissue imaging by immunofluorescence of cytokeratin mask and NLRC4 protein expression in 2 normal and 3 tumor patient tissues. To the right, protein expression of epithelial NLRC4, IL-18 and IL-1β in normal and tumor cells within the Tissue-Microarrays of colorectal cancer patients obtained from the Bergonié Cancer Institute (n=104 patients). Expression of markers was measured based on the average fluorescence intensity in each spot of tissue. Fluorescence intensities obtained from 3 tumor spots and 2 normal spots were averaged for each patient. Each spot in the graph represents one patient. Data are expressed as mean +/- SD. Paired t-test (parametric) or Wilcoxon matched-pairs (non-parametric) were used to evaluate the significance of the difference between normal and tumour tissue. ****P<0.0001. (C) Gene expression analysis of NLRC4 obtained from TCGA patient cohort, showing dysregulation among various cancer types and tissues of origin. To the left, comparison of NLRC4 between tumor samples vs. related normal in each tumor type. Size of the dot represents the –log (adjusted pvalues). Tumor type is indicated in the Figure if NLRC4 gene expression is down-regulated with significant adjusted pvalue (< 0.05). To the right, percentage of samples with NLRC4 having 2x down-regulation of gene expression in each tumor type. (D) Association between protein expression levels of tumor epithelial NLRC4, IL-18, or IL-1β, with patient overall survival in the Bergonié Institute cohort. When available, patients were stratified based on protein expression levels of NLRC4, IL-1β, or IL-18, as high versus low expression in the colon epithelium (inside the cytokeratin mask) or in the stroma (outside the cytokeratin mask). 95%CI: 95% confidence interval; HR: Hazard Ratio. A log-rank test stratified

according to protein expressions was used. NC: could not be calculated. Asterisks indicate pvalues between high versus low expression of markers either inside or outside the mask. *p<0.05; **p<0.01. To the right, correlation between NLRC4 gene expression in the tumor bulk with overall survival of patients with respiratory system cancer. (E) Protein expression of tumor epithelial NLRC4, IL-18, or IL-1β, in various colorectal cancer tumour stages, classified in stage I-II (locally advanced), stage III (regionally advanced) and stage IV (metastatic disease) (obtained from the Bergonié institute cohort). Data are expressed as mean +/- SD. One-way ANOVA (parametric) or Kruskal-Wallis (non-parametric) tests were used to evaluate the significance of the differential expression between each disease stage. COAD, colon adenocarcinoma; READ, Rectum Adenocarcinoma; CHOL, cholangiocarcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma. *P<0.05, **p<0.01, ****P<0.0001.

Figure 2: Loss of tumor epithelial NLRC4 protein is associated to low tumor immune infiltration including T cells and DCs. (A) Protein expression of tumor epithelial NLRC4 in various clinical levels of tumor immune infiltration, T cell infiltration, cytotoxic T cell infiltration, CD68+ macrophages, and CD163+ macrophages; as determined by immunohistochemistry as low, medium, and high levels of infiltration in tumors (from the Bergonié Institute cohort). Data are expressed as mean +/- SD. One-way ANOVA (parametric) or a Kruskal-Wallis test (non-parametric) were used to evaluate the correlation between expression intensity and levels of immune infiltrates. *p<0.05; **p<0.01. (B) Associations between NLRC4, Caspase-1 (CASP1), or IL-18 somatic copy number alterations and composition of the tumor immune infiltrate, obtained from the TCGA cohort analysis and using the TIMER software. Box plots are presented to show the distributions of each immune subset at each copy number status in COAD cancer patients. The infiltration level for each category is compared with the normal using two-sided Wilcoxon rank sum test. *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. (C) Correlation coefficient and pvalues between NLRC4, CASP1, or IL-18 transcripts and levels of immune infiltration for various immune cell subsets in COAD patients, obtained from the TCGA cohort and analysis using TIMER. (D) Association between protein expression levels of tumor epithelial NLRC4 and IL-18 with patient overall survival (from the Bergonié Institute cohort). Patients were stratified based on protein expression levels of NLRC4 and IL-18 (to the left), or CASP1 (to the right), as high versus low expression in the colon epithelium (inside the cytokeratin mask). 95%CI: 95% confidence interval; HR: Hazard Ratio. A log-rank test stratified according to protein expression was used. NC: could not be calculated. Asterisks indicate pvalues between pairs as indicated. *p<0.05; **p<0.01. (E) Frequency of patients with low, mild, or high tumor immune infiltrates (as pathologically characterized by immune infiltration, CD3+ T cells, or CD8+ T cells) among three different population of patients expressing high or low levels of tumor epithelial NLRC4 and/or IL-18 (from the Bergonié Institute cohort). COAD, colon adenocarcinoma.

Figure 3: NLRC4 expression triggers a Type-I IFN gene signature in cancer cells. (A) To the left, volcano plots of differentially expressed genes between HT29-NLRC4 or THP-1-NLRC4 versus mock control cell lines, as measured by RNAseq analysis. Differential gene expression performed with DeSeq2. X-axis shows the log2-transformed fold change of NLRC4 over expressing lines over control, y-axis is the -log10 transformation of the adjusted P.value. The 10 genes with the lowest (blue) or highest (red) log2 fold change values are included. To the right, Gene Ontology analysis using KEGG of significant upregulated genes (p<0.05; FoldChange>2) in both stable cell lines. (B) Expression level of genes upregulated in NLRC4 cell lines and involved in a Type-I IFN signature, as shown as triplicates for each HT29 and THP-1 cell lines. (C) Dot plot representing variations of gene expression fold change and associated p-values in both NLRC4-expressing cell lines versus mock control. (D) Expression correlation of NLRC4-induced Type-I IFN genes identified by RNAseq in COAD patient datasets obtained from the TCGA cohort. (E) Correlation analysis between expression of the Type-I IFN gene signature (obtained from Qiagen) and NLRC4 or NLRP6 in colorectal cancer patients (COAD and READ), or in lung cancer patients (LUSC and LUAD), or (F) in metastatic patients with either lung or GI tumor primary site. Patient datasets were obtained from the TCGA cohort. Correlation coefficients R and pvalues are indicated. COAD, colon adenocarcinoma; READ, Rectum Adenocarcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma.

Figure 4: NLRC4 is associated to monocyte-derived DC tumor infiltrate in colorectal and lung cancer patients. (A) Gene Ontology analysis using KEGG pathways or KEGG interdomain of NLRC4-associated genes in COAD patients (top 500 significant genes; with significant corr>0.5). Patient datasets were obtained from the TCGA cohort. (B) To the left, expression correlation between NLRC4 or TMEM173 (STING) and various tumor infiltrating DC subsets in colorectal (COAD, READ) and lung cancer patients (LUSC, LUAD); correlation coefficient R is represented by the size of dot, log10 (pvalue) is represented by the color of the dot. The various DC subset gene signatures used (for DC1, DC2, DC3, DC4, DC5, DC6) were obtained from scRNAseq of human blood, and those reflecting the naïve versus activation status of DCs were obtained from various datasets including TCIA, CIBERSORT, and TIMER (Tables to the right; with coefficient correlations and pvalues). Below, scatter plots showing correlation of gene expression between NLRC4 or TMEM173 and DC2 or DC3 gene signatures in COAD cancer patients. COAD datasets used were obtained from the TCGA cohort. (C) Scatter plots showing correlation of gene expression between NLRC4 or NLRP6 and CD4 or CD8A in colorectal (COAD, READ) and lung cancer patients (LUSC, LUAD). Patient datasets used were obtained from the TCGA cohort. Correlation coefficients R and pvalues are indicated. COAD, colon adenocarcinoma; READ, Rectum Adenocarcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma.

Supplemental Table 1: Clinical features of colorectal cancer patient cohorts used in the study. Above, features of the Bergonié Cancer Institute cohort composed of 104 patients. Below, features of the validation cohort commercially available composed of 216 patients.

Supplemental Figure 1: Loss of tumor epithelial NLRC4 protein is associated with metastatic disease in CRC patients (validation cohort). To the left, protein expression of epithelial NLRC4 in normal and tumor cells within the Tissue-Microarrays of colorectal cancer patients obtained from the commercial validation cohort (n=216 patients). Expression of NLRC4 was measured based on the average fluorescence intensity in each spot of tissue. Each spot in the graph represents one patient. The validation cohort was obtained from USBiomax (see methods). *indicates $p<0.05$; **** indicates $p<0.0001$. On the middle, correlation of NLRC4 expression with tumor grade, showing an association between low expression and higher grade. To the right, protein expression of tumor epithelial NLRC4 in various CRC clinical stages I-II, III and IV.

Supplemental Figure 2: Association between NLRC4 transcript levels (in tumor bulk) with overall survival of colorectal cancer patients. Data were analyzed from TCGA. Patients were stratified based on transcript levels of NLRC4 as up versus down expression in the tumor bulk. pvalue between up versus low expression is indicated.

Supplemental Figure 3: Engineered stable cell line stably expressing NLRC4. We used a lentiviral plasmidic construction to re-express NLRC4 in several cancer cell lines. In this construction (see Methods), NLRC4 is fused to a fluorescent tag cherry, and is expressed under control of a CMV promoter. We used 3 different cell lines: 2 from colorectal cancer (HT29, SW620) and one from a monocytic leukemia (THP-1). A plasmid named mock-cherry was used as a control, expressing only the fluorescent tag but not NLRC4 protein. (A) After lentiviral infection at different MOI, cells were sorted according to cherry fluorescence and purity was assessed by flow cytometry. We obtained a good purity after cell sorting, from 98.4% to 99.7% for mock-cherry, and from 87.5% to 96.7% for NLRC4-cherry. (B) NLRC4 expression was controlled by RT-qPCR in each cell, and results are expressed as 1/Cq. Expression of NLRC4 was higher in NLRC4-cherry transduced cells, and was not detected in mock-cherry cell lines. (C) NLRC4 expression was also assessed by western-blot, as cherry expression, with specific antibodies. We found an expression of NLRC4 only in NLRC4-cherry cell lines, and cherry was detected in both mock- and NLRC4-transduced cell lines.

Supplemental Figure 4: NLRC4-cherry expressed in stable cell lines can form a functional inflammasome and induce cytokine secretion upon specific activation. We found that HT29 and SW620 are not able to secrete IL-1β because they do not dispose of all the intracellular machinery to

produce IL-1β due to inhibitory process. Indeed, we used a THP-1 model reexpressing NLRC4-cherry to assess the functionality of our construction. We exposed THP-1 mock-cherry and NLRC4-cherry to intracellular flagellin to activate NLRC4. Flagellin was first associated to DOTAP in order to facilitate its introduction within cytoplasm, because only intracytosolic flagellin could activate NLRC4. We quantified NLRC4 activation through IL-1β secretion, and found that THP-1 transduced with NLRC4-cherry were able to secrete high levels of IL-1β after cytosolic flagellin exposure, but not THP-1 wild-type or transduced with control mock-cherry plasmid.

Supplemental Figure 5: Effect of NLRC4 reexpression in colorectal cancer cells on proliferation and migration. (A) Proliferation assay on NLRC4 cellular models. We used different colon cancer cells (HT29 and SW620) and assessed proliferation through CFSE assay. We didn't found any differences between mock-cherry and NLRC4-cherry cells in HT29 cell line. However, we found that the expression of NLR4 in SW620 cancer cell line induced a limited proliferation after 7 days of culture. (B) Migration and invasion assays on NLRC4 cellular models. We assessed migration (scratch test). We did not found any effect of NLRC4 reexpression on migratory abilities of cancer cell lines.

Supplemental Figure 6: Correlation between gene expression of NLRs or CASP1 and CD4 or CD8A in cancer patients. (A) Scatter plots showing correlation of gene expression between NLRC4 or NLRP6 and CD4 or CD8A in lung cancer patients (LUSC, LUAD). (B) Scatter plots showing correlation of gene expression between CASP1 and CD4 or CD8A in colorectal (COAD, READ) and lung cancer patients (LUSC, LUAD). Patient datasets used were obtained from the TCGA cohort. Correlation coefficients R and pvalues are indicated. COAD, colon adenocarcinoma; READ, Rectum Adenocarcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma.

Supplemental Figure 7: Correlation between gene expression of IL-1β or IL-18 and CD4 or CD8A in cancer patients. Scatter plots showing correlation of gene expression between (A) IL-1β or (B) IL-18 and CD4 or CD8A in colorectal (COAD, READ) and lung cancer patients (LUSC, LUAD). Patient datasets used were obtained from the TCGA cohort. Correlation coefficients R and pvalues are indicated. COAD, colon adenocarcinoma; READ, Rectum Adenocarcinoma; LUAD, lung adenocarcinoma; LUSC, lung squamous cell carcinoma.

METHODS

Tissue micro-array (TMA) from the Bergonié Cancer Institute

104 patients treated for a primary colorectal cancer at the Bergonié Institute (Bordeaux, France) between May 2008 and January 2013 were enrolled. Histology samples were obtained from surgery, and tissues were fixed in formalin and then paraffin-embedded. Clinical characteristics were collected from patient medical charts with special focus on age, gender, date of diagnosis and tumor node metastasis (TNM) stage. Histological type was determined as well as tumor grade, and mutational status. Tissue cores with a diameter of 0.6 mm were removed from fixed paraffin-embedded tissue blocks and arrayed on a recipient paraffin block using a tissue arrayer (Beecher Instruments Tissue Arrayer, Sun Prairie, WI) at the Molecular Biology Department of Bergonié Institute. Each tumor sample was punched in triplicate, along with 2 cores of matched normal mucosal tissue punched far away from the tumor. Sections of the array were cut at 5 µm and placed on glass slides.

Tissue micro-array from commercial USBiomax

Sections of formalin-fixed paraffin embedded TMA of tumors were purchase from USBiomax Inc. (Rockville, MD). In the CO2161 TMA, there were 204 colon adenocarcinoma, 4 signet-ring cell carcinoma and 8 unmatched normal colon tissue, with one core for each tumor cases. Adenocarcinoma were from pathologic stage I (n=22), stage II (n=128), stage III (n=47) and stage IV (n=11) (Suppl. Table 1). Slides were treated as Bergonié's TMA slides, and were stained only with NLRC4, cytokeratin and IFI44L (see in the corresponding section).

Immunofluorescence tissue staining

Immunofluorescent analysis was performed on a 5-µm fixed paraffin–embedded TMA section mounted on a charged slide. Tissues were deparaffinised in xylene and rehydrated in a series of ethanol baths. Heat-induced proteolytic epitope retrieval was done in target retrieval buffer from DAKO (pH 6.0 (reference S236984) or pH 9.0 (reference S236784) according to primary antibody) using a microwave oven and during 20 minutes. Slides were then blocked using 5% BSA for 10 minutes. Primary antibodies (see below) were incubated for 1 hour at room temperature in antibody diluent (DAKO, reference S202230). Slides were washed three times in PBS. Secondary antibodies [goat anti-rabbit (Alexa Fluor 594 nm), goat anti-mouse (Alexa Fluor 488 nm) and donkey anti-goat (Alexa Fluor 594 nm), all from ThermoFisher] were diluted (1/400) in antibody diluent and incubated for 1 hour at room temperature in the dark. Sections were washed with PBS three times and incubated with DAPI (2 µg/mL) for 10 minutes in the dark. Finally, slides were mounted with Fluoromount-G and stored at 4°C in the dark until analysis.

We assessed the expression of all components of the inflammasome pathway (Table). Before use on TMA slides, we assessed antibodies' specificity by western-blot or immunofluorescence assay on cell lines fixed in formalin and paraffin-embedded (data not shown).

Target	Clone/reference	pH	Dilution	Secondary
Cytokeratin	AE1-AE3	pH 6	1/50	Mouse
NLRC4	AB115537	pH 9	1/200	Rabbit
Caspase-1 (p10)	LS-C312683	pH 9	1/500	Rabbit
IL-1β	3A6	pH 6	1/100	Mouse
IL-18	HPA003980	pH 6	1/200	Rabbit

Image acquisition from TMA

Image handling

Images of the TMA are generated using the slide scanner NanoZoomer from Hamamatsu. Images are stored in NDPI image files. Homemade software was designed to perform the processing adapted to the study.

First slide image is display on the screen at low resolution. User select the 4 cores of at the extremity of the TMA to pre-localize the core grid. The localization of cores is improved by searching high intensity cores around each node of the grid. Localization of all cores are displayed in the screen to let user refine cores that would be poorly located.

Image of high resolution (20x) is exported for each core in TIF format and is named according to their position in the grid (A01, A02, …, B01, …)

Cytokeratin detection

Slides are cut sequentially, and successive slices are stained using different fluorescent biomarkers. One of those biomarkers stains Cytokeratin to reveal epithelium structures. Epithelium is detected using a simple threshold intensity on the cytokeratin channel followed by a closing operation to fill up small holes in the segmented region. The obtained region can be used to distinguish Epithelium structure from the rest on the image. It also can be transferred to a consecutive slice to reveal the position of the Epithelium in the consecutive slides.

Cytokeratin region transfer

To be able to transfer the Epithelium region to a consecutive slide, nuclei channel of a core image is register to nuclei channel in the consecutive slide. Nuclei repartition and density contains enough information to estimate the rotation and translation need to register the first image on the second one. The estimate rotation and translation are applied the full core image and the epithelium region mask. Epithelium region mask is now precisely aligned to the consecutive slice.

Cell detection

Nuclei DAPI channel is used to drive cell segmentation. Nuclei are detection using band pass follow by thresholding above the background. Nuclei clusters are spited using watershed strategy in order to obtain

well separated nuclei segmentation. Cell segmentation is obtained by defining rings around nuclei. Rings of fixed width define the cytosolic area around nuclei.

Feature measurements
For each cell, intensity features are measured from fluorescent channels using maximum or average operator. Measurements are extracted for the different subcellular compartments (cells, nuclei and cytosol). Cell statistics are stored into csv files for further analysis.
Core alignment
Consecutive TMA slices are extracted from single paraffin blocks. Different biomarkers are stained from consecutive slices. In order to perform correlative analysis between the different channel, a method based on image registration where developed and used. For each core, image registration based on DAPI channel where applied. DAPI channel is used because it is the channel which is the most conserved from on slide to another. The image registration consists in finding the best rigid transform (translation + rotation) that allows to fit the first image into the second. This best transform is applied to all channel of the first slide. A new multiplexed image is obtained combining all channels of the first slice and all channels of the second slide. This multiplexed image is used to apply Cytokeratin mask detection to consecutive images.

Cytokeratin mask detection
The cytokeratin mask is obtained by processing cytokeratin channel using direct thresholding followed by morph math operations (opening and closing). This mask is used as a channel such as a feature express whether the cell is in or out the cytokeratin mask.

Cell positivity
Cell positivity is obtained by placing one or several thresholds on selected features. For example, we have counted the number of cells that are positive for a certain biomarker and inside the cytokeratin mask. The positive cells where displayed on the screen such as the user can control and finetune the threshold. After staining, slides were then digitalized with the Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT scanner in collaboration with the Bordeaux Imaging Center (BIC). Imaging acquisition and fluorescence quantification was made by QuantaCell Inc. (Pessac, France). After computer-assisted image calibration, immunofluorescence quantification was obtained by measuring the fluorescence of each pixel in a DAPI-positive cell, calculating the median of all pixels in each cell and then assessing the mean of median intensity of all cells for each spot. Studied cells were identified with DAPI staining and epithelial cells (in normal and tumor tissues) with a cytokeratin mask (Figure 2). Indeed, quantification of inflammasome expression was done by applying a cytokeratin mask on each spot, to measure fluorescence of inflammasome markers only in cytokeratin/epithelial positive cells. Images were reviewed with NDP.View 2 (Hamamastu photonics Inc).

Immunohistochemistry
Immunohistochemical analysis was performed in all cases on 3 µm-thick serial sections from a representative formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) block. We used following antibodies: CD3 (clone 2GV6, prediluted, Roche Diagnostics), CD8 (clone C8/144B, dilution 1/25, Dako Glostrup, Denmark), CD68 (clone PG-M1, dilution 1/50, Dako Glostrup, Denmark), CD163 (clone 10D6, dilution 1/100, Leica Novocastra Laboratories, United Kingdom), PD-1 (clone NAT105, prediluted, Roche Diagnostics) and PD-L1 (clone SP263, prediluted, Roche Diagnostics). In 32 cases, heterologous differentiation was suspected and additional antibodies against desmin (clone D33, dilution 1: 100, Dako, Glostrup, Denmark), h-caldesmon (clone h-CD, dilution 1: 50, Dako), and myogenin (clone LO26, dilution 1: 20, Novocastra, New Castle upon Tyne, United Kingdom) were used. After microwave oven heating (20 min in 0.1 M citrate buffer at pH 6), sections were incubated with biotinylated link antibody, with peroxidase-labelled streptavidin (LSAB™ + Kit; Dako) and then with diaminobenzidine solution (DAB; Dako). Omitting the specific primary antibody was used as negative controls. The PD-L1 expression was considered positive if > 1%, and CD3, CD8, CD68 and CD163 were assessed as low, moderate and high expressions.

Cell lines

HT29, from a primitive colorectal adenocarcinoma, and SW620, from a lymph node metastasis of colorectal cancer, were cultured in RPMI 1640 (GIBCO-Invitrogen) supplemented with 8% of decomplemented foetal bovine serum (FBS, Gibco, Invitrogen) and with glutamine (200 mM). All cell lines were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO2.

Cloning procedure and control

cDNA encoding NLRC4 was amplified by RT-PCR and directly ligated into a lentiviral vector. The cherry vector was provided by Genecopoeia (reference pEX-T3678-Lv130) and NLRC4 was already ligated in the vector. In this vector, NLRC4 is fused in C-terminal with a red fluorescent protein cherry. Lentiviral particles were produced by transient transfection of packaging 293T HEK cells (vectorology facility of Bordeaux 2 University, Bordeaux, France) and viral titers were determined by enzyme-linked immunosorbent assay of p24. Transductions of HT29 and SW620 were performed using lentiviral particles produced by transient transfection of 293T HEK cells. Different MOI were used in RPMI 1640 medium with 8% of fetal bovine serum and glutamine. After 24 hours of infection, cells were washed twice and amplified for 5 days. Purity was assessed by FACS and cells from correct MOI were sorted by flow cytometry (BD FACSAria). A control condition was also done with empty construction (called "mock-cherry").

Control of correct expression of NLRC4 was performed using RT-qPCR and western-blot assays. For RT-qPCR, total RNA was prepared using Nucleospin RNA Plus (Macherey-Nagel) and reverse transcription was performed with a Reverse Transcription GoScript Promega® kit according to the manufacturer's instructions. RT-qPCR was then performed on CFX 384 (BioRad) and the relative expression of transcripts was determined using 18S reference gene. Expression was quantified as 1/Cq, meaning as the ratio of the number of cycle at which our sample's reaction curve intersects the threshold line.

For western-blot, cells were washed in PBS and whole cell extracts were obtained by cell pellet lysis in buffer containing 25 mM TRIS-HCL pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP40, with protease inhibitors (dilution 1/500) for 30 mn at 4°C. Cells were spin down for 10 mn at 13,000 g at 4°C and supernatants was kept for protein quantification using BCA protein assay from ThermoFisher. Lysates were electrophoresed on a 8-16% SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Bio-Rad) for immunoblotting. Unbound sites were blocked with Odyssey Blocking buffer (Li-Cor). Immunoblots were probed by overnight incubation at 4°C with purified NLRC4 primary antibody at a dilution of 1/1000°. Membrane were then rinsed and incubated with the corresponding fluorescent secondary antibody for 1 hour at a dilution of 1/4000° (IRDye®). The detection was performed using Li-Cor Odyssey imaging system at the corresponding wavelengths.

Proliferation assay

Cell division was assessed using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dye (Life Technologies®, reference V12883). Transduced cells with NLRC4-cherry or mock-cherry were trypsinized, spin down and resuspended at 106 cells/ml in PBS containing CFSE at a final concentration of 1.5 µM. Cells were stained during 10 mn at 37°C and then washed in hot sterile PBS. Cells were centrifuged and resuspended in complete medium at a concentration of 106 cells/ml during 30 mn at 37°C. Cells were then washed twice in medium and 20 000 cells/well were seeded in 24-wells. Cell division was analyzed every 24 hours detecting fluorescence by flow cytometry, until 7 days.

Scratch wound healing assay

Cells were seeded at 400 000 (HT29) or 450 000 (SW620) cells/well in a 24-well culture plate. Cells were cultured until being 80% confluent as a monolayer. After 24 hours of growth, a 200 µl pipette tip was used to form a wound. Each well was gently washed twice with medium to remove detached cells, and cells were cultured for further 24 h. A x4 microscope was used to take pictures and the scratch surface was assessed at each time point using ImageJ software.

Differential gene expression by RNAseq analysis

RNA-Seq sample analysis was performed using Array Studio software version 10.0.1.81 (QIAGEN®, Cary, NC), the OSA aligner, and the OmicsoftGene20130723 gene model (Hu et al., 2012). Aligned count matrixes were used as input into a DESeq2 workflow to measure differential gene expression (Love et al., 2014). Genes with an absolute log fold change of greater than 2 and an adjusted Pvalue of less than 0.05 between two conditions were considered as significant. Significant genes were used as input to the pathfinder R package to measure altered KEGG pathways (Kanehisa et al., 2017; Ulgen et al., 2018).

Bioinformatic analysis from public datasets: profiling of immune cell infiltrates, survival, correlation of gene expression

Immune cell type gene signatures were from CIBERSORT (Newman et al., 2015). DC subset gene signatures were from scRNA-seq study of human blood DC (Villani et al., 2017); TCIA (Charoentong et al., 2017). Type I IFN regulated genes were those reported on the QIAGEN Human Type I Interferon Response PCR Array and whose Up-regulation by type I IFN were confirmed by at least two studies in Interferome database. Pearson correlation analysis was performed for each pair of gene vs. immune cell type, gene vs. gene for their expressions in COAD (colon adenocarcinoma), READ (rectum adenocarcinoma), LUSC (lung squamous cell carcinoma) and LUAD (lung adenocarcinoma) from TCGA transcriptomic data, and/or in metastatic tumors whose tumor types are either Lung or COLO (colorectal) cancer and STAD (stomach adenocarcinoma) from MET500 transcriptomic data (Robinson et al., 2017). The expression value of cell type signature was represented by the median value of genes in the specific gene set. Timer analysis (Li et al., 2017) were conducted on the corresponding website. ggpubr and ggplot2 package in R were used for statistical calculations and visualization.

Comparisons of NLRC4 between tumor samples vs. related normal were conducted in "TCGA land" by OmicSoft. Survival analysis was performed in ClinicalOutcome dataset compiled by OmicSoft (http://www.arrayserver.com/wiki/index.php?title=Introduction_to_ClinicalOutcome_Land_Content). ClinicalOutcome contains human gene expression profiles associated with key clinical features and outcomes like "Survival", etc. from GEO.

Statistical analysis

Clinical and biological measurements were expressed as mean (standard deviation) or median (range) for continuous variables, or as a number (percent) for categorical variables. The comparison between quantitative and qualitative variables was done using a Student t-test (parametric) or the Mann-Whitney U-test (non-parametric). The comparison between qualitative variables was done using a Chi2 (parametric) or a Fisher's exact test (non-parametric). Variance analysis were done using a one-way ANOVA (parametric) or Kruskal-Wallis (non-parametric) test. A Cox model was applied for survival analysis.

To determine the cut-off of interesting markers, receiver-operating characteristics (ROC) curves and area under the curve were computed to assess the effectiveness of NLRC4 and NLRP6 to predict death. Statistical significance was set at $p<0.05$. Data analysis was performed using the STATA 13.1 software (StataCorpLP, College Station, Texas, USA) and using Graphpad Version 23.0 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA).

REFERENCES

Borst, J., Ahrends, T., Bąbała, N., Melief, C.J.M., and Kastenmüller, W. (2018). CD4+ T cell help in cancer immunology and immunotherapy. Nat. Rev. Immunol. 18, 635–647.

Canna, S.W., de Jesus, A.A., Gouni, S., Brooks, S.R., Marrero, B., Liu, Y., DiMattia, M.A., Zaal, K.J.M., Sanchez, G.A.M., Kim, H., et al. (2014). An activating NLRC4 inflammasome mutation causes autoinflammation with recurrent macrophage activation syndrome. Nat. Genet. 46, 1140–1146.

Charoentong, P., Finotello, F., Angelova, M., Mayer, C., Efremova, M., Rieder, D., Hackl, H., and Trajanoski, Z. (2017). Pan-cancer Immunogenomic Analyses Reveal Genotype-Immunophenotype Relationships and Predictors of Response to Checkpoint Blockade. Cell Rep. 18, 248–262.

Demaria, O., Cornen, S., Daëron, M., Morel, Y., Medzhitov, R., and Vivier, E. (2019). Harnessing innate immunity in cancer therapy. Nature 574, 45–56.

Dodagatta-Marri, E., Meyer, D.S., Reeves, M.Q., Paniagua, R., To, M.D., Binnewies, M., Broz, M.L., Mori, H., Wu, D., Adoumie, M., et al. (2019). α-PD-1 therapy elevates Treg/Th balance and increases tumor cell pSmad3 that are both targeted by α-TGFβ antibody to promote durable rejection and immunity in squamous cell carcinomas. J. Immunother. Cancer 7, 62.
Fuertes, M.B., Kacha, A.K., Kline, J., Woo, S.-R., Kranz, D.M., Murphy, K.M., and Gajewski, T.F. (2011). Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8{alpha}+ dendritic cells. J. Exp. Med. 208, 2005–2016.
Furman, D., Chang, J., Lartigue, L., Bolen, C.R., Haddad, F., Gaudilliere, B., Ganio, E.A., Fragiadakis, G.K., Spitzer, M.H., Douchet, I., et al. (2017). Expression of specific inflammasome gene modules stratifies older individuals into two extreme clinical and immunological states. Nat. Med. 23, 174–184.
Guo, H., Callaway, J.B., and Ting, J.P.-Y. (2015). Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. Nat. Med. 21, 677–687.
Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Booth, C.J., Strowig, T., Jin, C., Eisenbarth, S.C., and Flavell, R.A. (2010). Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107, 21635–21640.
Hu, J., Ge, H., Newman, M., and Liu, K. (2012). OSA: A Fast and Accurate Alignment Tool for RNA-Seq. Bioinformatics.
Janowski, A.M., Colegio, O.R., Hornick, E.E., McNiff, J.M., Martin, M.D., Badovinac, V.P., Norian, L.A., Zhang, W., Cassel, S.L., and Sutterwala, F.S. NLRC4 suppresses melanoma tumor progression independently of inflammasome activation. J. Clin. Invest. 126, 3917–3928.
Kanehisa, M., Furumichi, M., Tanabe, M., Sato, Y., and Morishima, K. (2017). KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. Nucleic Acids Res. 45, D353–D361.
Karki, R., and Kanneganti, T.-D. (2019). Diverging inflammasome signals in tumorigenesis and potential targeting. Nat. Rev. Cancer 1.
Karki, R., Man, S.M., Malireddi, R.K.S., Kesavardhana, S., Zhu, Q., Burton, A.R., Sharma, B.R., Qi, X., Pelletier, S., Vogel, P., et al. (2016). NLRC3 is an inhibitory sensor of PI3K–mTOR pathways in cancer. Nature 540, 583–587.
Lee, E., Karki, R., and Kanneganti, T.-D. (2018). The NLRC4 inflammasome requires IRF8-dependent production of NAIPs. Cell Stress 2, 144–146.
Lei, A., and Maloy, K.J. (2016). Colon Cancer in the Land of NOD: NLRX1 as an Intrinsic Tumor Suppressor. Trends Immunol. 37, 569–570.
Li, T., Fan, J., Wang, B., Traugh, N., Chen, Q., Liu, J.S., Li, B., and Liu, X.S. (2017). TIMER: A Web Server for Comprehensive Analysis of Tumor-Infiltrating Immune Cells. Cancer Res. 77, e108–e110.
Liu, R., Truax, A.D., Chen, L., Hu, P., Li, Z., Chen, J., Song, C., Chen, L., and Ting, J.P.-Y. (2015). Expression profile of innate immune receptors, NLRs and AIM2, in human colorectal cancer: correlation with cancer stages and inflammasome components. Oncotarget 6, 33456–33469.
Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biol. 15.
Man, S.M., Zhu, Q., Zhu, L., Liu, Z., Karki, R., Malik, A., Sharma, D., Li, L., Malireddi, R.K.S., Gurung, P., et al. (2015). Critical Role for the DNA Sensor AIM2 in Stem Cell Proliferation and Cancer. Cell 162, 45–58.
Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-β. Mol. Cell 10, 417–426.
Mermel, C.H., Schumacher, S.E., Hill, B., Meyerson, M.L., Beroukhim, R., and Getz, G. (2011). GISTIC2.0 facilitates sensitive and confident localization of the targets of focal somatic copy-number alteration in human cancers. Genome Biol. 12, R41.
Newman, A.M., Liu, C.L., Green, M.R., Gentles, A.J., Feng, W., Xu, Y., Hoang, C.D., Diehn, M., and Alizadeh, A.A. (2015). Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. Nat. Methods 12, 453–457.
Rauch, I., Deets, K.A., Ji, D.X., von Moltke, J., Tenthorey, J.L., Lee, A.Y., Philip, N.H., Ayres, J.S., Brodsky, I.E., Gronert, K., et al. (2017). NAIP-NLRC4 Inflammasomes Coordinate Intestinal Epithelial Cell Expulsion with Eicosanoid and IL-18 Release via Activation of Caspase-1 and -8. Immunity 46, 649–659.
Robinson, D.R., Wu, Y.-M., Lonigro, R.J., Vats, P., Cobain, E., Everett, J., Cao, X., Rabban, E., Kumar-Sinha, C., Raymond, V., et al. (2017). Integrative clinical genomics of metastatic cancer. Nature 548, 297–303.
Romberg, N., Al Moussawi, K., Nelson-Williams, C., Stiegler, A.L., Loring, E., Choi, M., Overton, J., Meffre, E., Khokha, M.K., Huttner, A.J., et al. (2014). Mutation of NLRC4 causes a syndrome of enterocolitis and autoinflammation. Nat. Genet. 46, 1135–1139.
Sadasivam, S., Gupta, S., Radha, V., Batta, K., Kundu, T.K., and Swarup, G. (2005). Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis. Oncogene 24, 627–636.
Segovia, M., Russo, S., Jeldres, M., Mahmoud, Y.D., Perez, V., Duhalde, M., Charnet, P., Rousset, M., Victoria, S., Veigas, F., et al. (2019). Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. Cancer Cell 35, 767-781.e6.

Ting, J.P.-Y., Lovering, R.C., Alnemri, E.S., Bertin, J., Boss, J.M., Davis, B.K., Flavell, R.A., Girardin, S.E., Godzik, A., Harton, J.A., et al. (2008). The NLR gene family: a standard nomenclature. Immunity 28, 285–287.
Ulgen, E., Ozisik, O., and Sezerman, O.U. (2018). pathfindR: An R Package for Pathway Enrichment Analysis Utilizing Active Subnetworks (Bioinformatics).
Villani, A.-C., Satija, R., Reynolds, G., Sarkizova, S., Shekhar, K., Fletcher, J., Griesbeck, M., Butler, A., Zheng, S., Lazo, S., et al. (2017). Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. Science 356.
Wennerberg, E., Kremer, V., Childs, R., and Lundqvist, A. (2015). CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo. Cancer Immunol. Immunother. CII 64, 225–235.
Wilson, J.E., Petrucelli, A.S., Chen, L., Koblansky, A.A., Truax, A.D., Oyama, Y., Rogers, A.B., Brickey, W.J., Wang, Y., Schneider, M., et al. (2015). Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. Nat. Med. 21, 906–913.

Figure 1: Loss of tumor epithelial NLRC4 protein is associated to lower overall survival of colorectal cancer patients and metastatic stage IV.

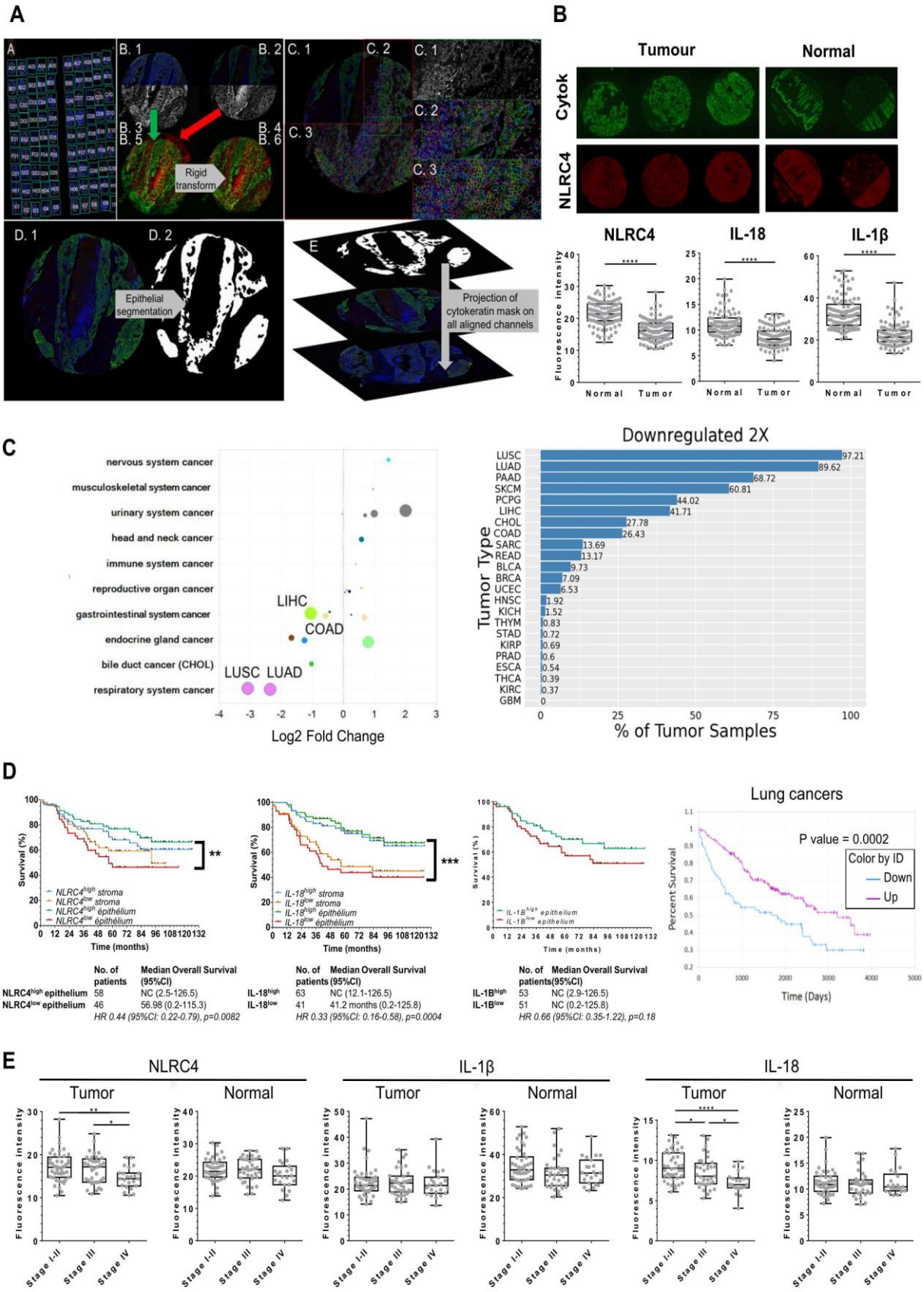


Figure 2: Loss of tumor epithelial NLRC4 protein is associated to low tumor immune infiltration including T cells and DCs.

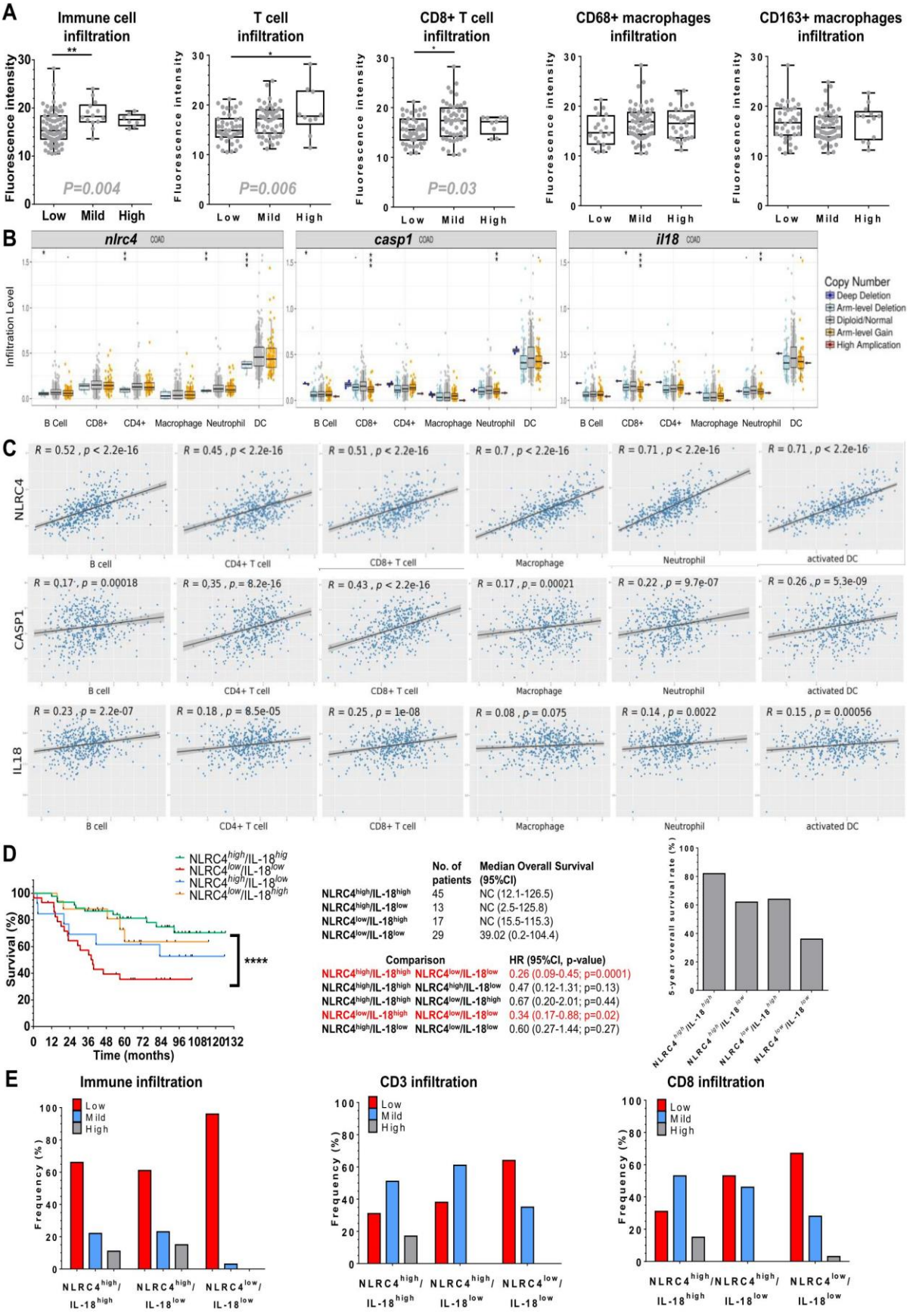


Figure 3: NLRC4 expression triggers a Type-I IFN gene signature in cancer cells.

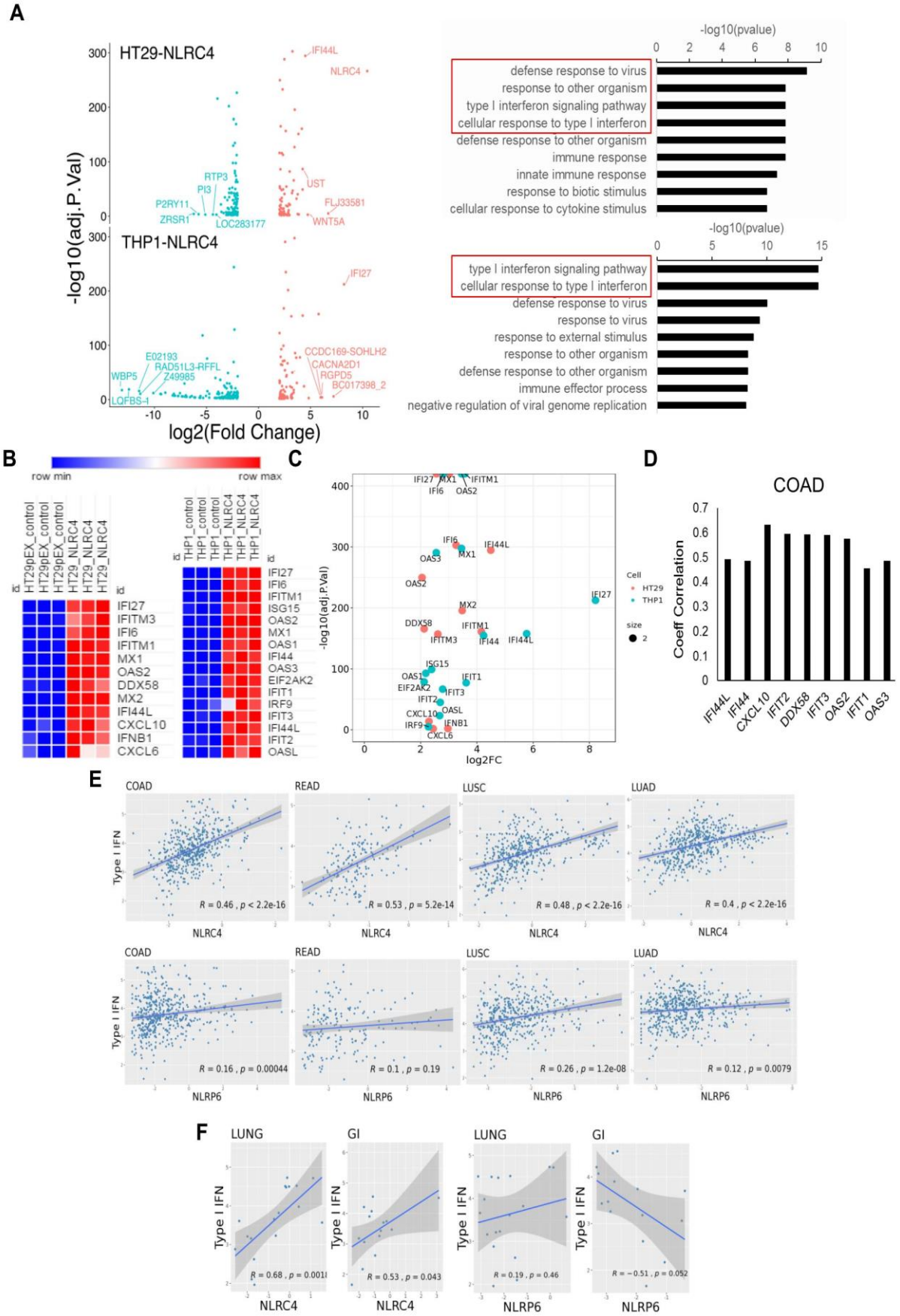
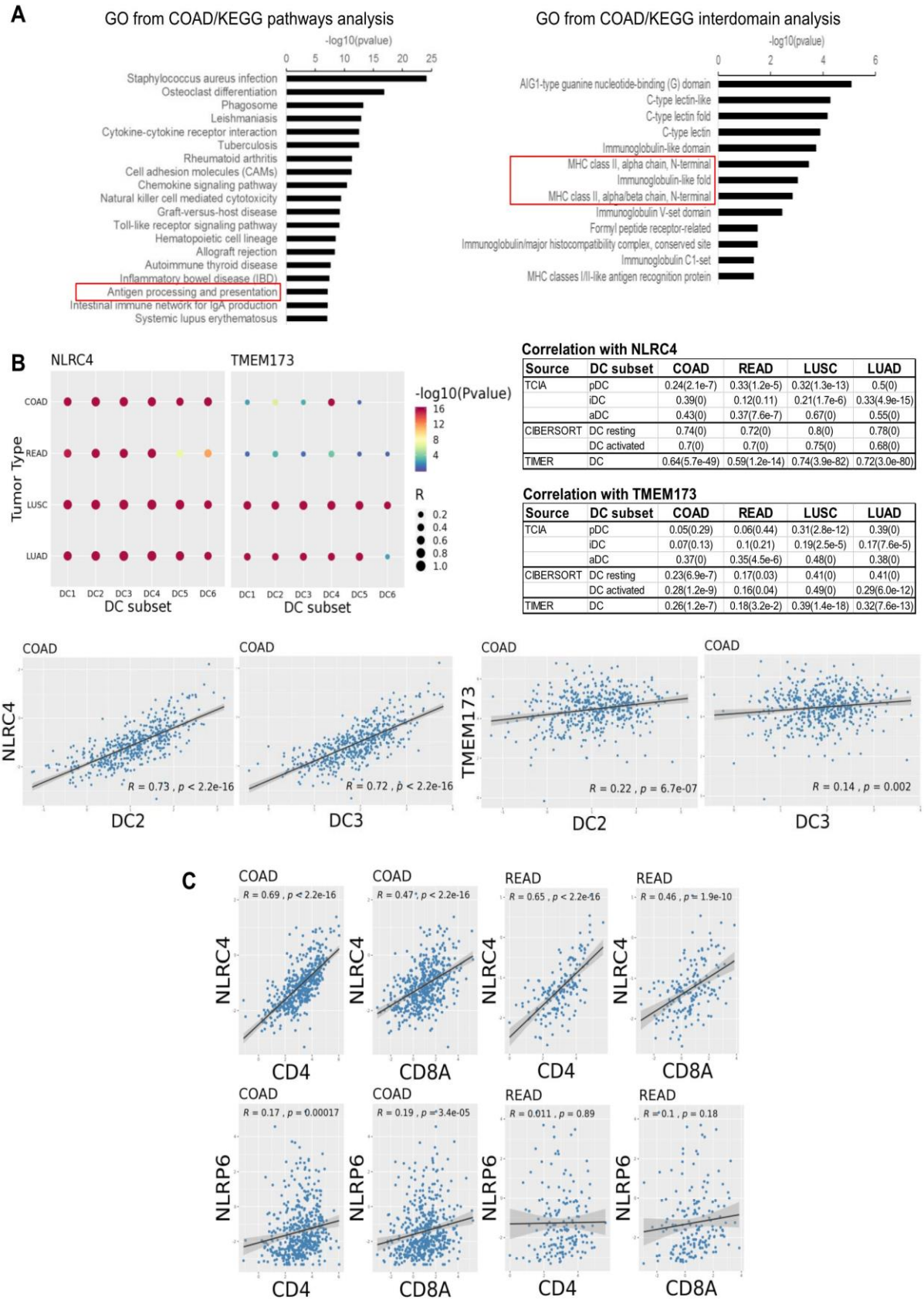


Figure 4: NLRC4 is associated to monocyte-derived DC tumor infiltrate in colorectal and lung cancer patients.



Source	DC subset	COAD	READ	LUSC	LUAD
TCIA	pDC	0.24(2.1e-7)	0.33(1.2e-5)	0.32(1.3e-13)	0.5(0)
	iDC	0.39(0)	0.12(0.11)	0.21(1.7e-6)	0.33(4.9e-15)
	aDC	0.43(0)	0.37(7.6e-7)	0.67(0)	0.55(0)
CIBERSORT	DC resting	0.74(0)	0.72(0)	0.8(0)	0.78(0)
	DC activated	0.7(0)	0.7(0)	0.75(0)	0.68(0)
TIMER	DC	0.64(5.7e-49)	0.59(1.2e-14)	0.74(3.9e-82)	0.72(3.0e-80)

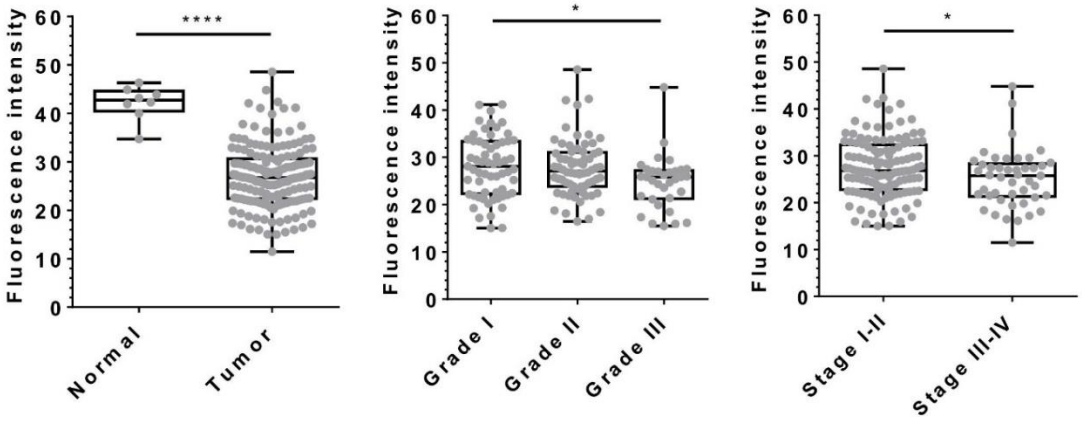
Source	DC subset	COAD	READ	LUSC	LUAD
TCIA	pDC	0.05(0.29)	0.06(0.44)	0.31(2.8e-12)	0.39(0)
	iDC	0.07(0.13)	0.1(0.21)	0.19(2.5e-5)	0.17(7.6e-5)
	aDC	0.37(0)	0.35(4.5e-6)	0.48(0)	0.38(0)
CIBERSORT	DC resting	0.23(6.9e-7)	0.17(0.03)	0.41(0)	0.41(0)
	DC activated	0.28(1.2e-9)	0.16(0.04)	0.49(0)	0.29(6.0e-12)
TIMER	DC	0.26(1.2e-7)	0.18(3.2e-2)	0.39(1.4e-18)	0.32(7.6e-13)

Supplemental Table 1: Clinical features of colorectal cancer patient cohorts used in the study.

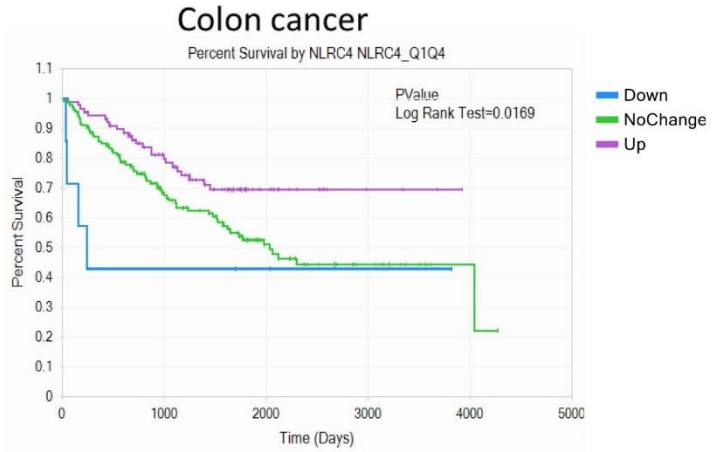
Characteristic (Bergonie cohort)		N	%
Gender	Male	60	57.7
	Female	44	42.3
Median age (years [range])		71.7 [38.6 – 88.4]	
Stage	I	8	7.7
	II	36	34.6
	III	37	35.6
	IV	23	22.1
Grade	1	8	7.7
	1-2	9	8.7
	2	76	73.1
	3	8	7.7
Mutational status	KRAS	19	18.3
	BRAF	4	3.8
MMR status	MSS	88	84.6
	MSI	16	15.4
5-years overall survival		64.4%	

Characteristic (USBiomax cohort)		N	%
Gender	Male	118	56.7
	Female	90	43.3
Median age (years [range])		55.8 [24 – 82]	
Stage	I	22	10.6
	II	128	61.5
	III	47	22.6
	IV	11	5.3
Grade	1	73	38.2
	2	77	40.3
	3	41	21.5

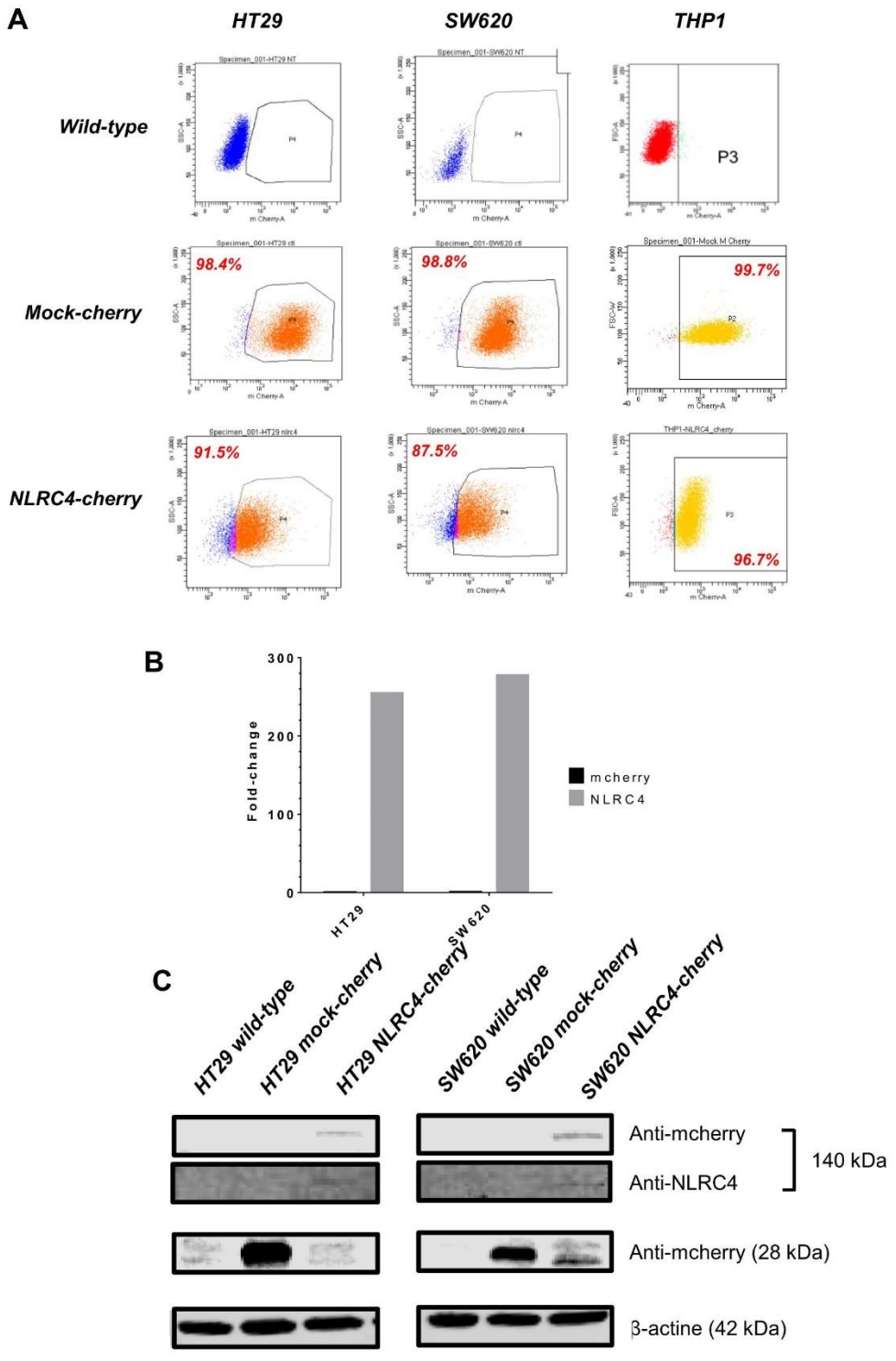
Supplemental Figure 1: Loss of tumor epithelial NLRC4 protein is associated with metastatic disease in CRC patients (validation cohort).



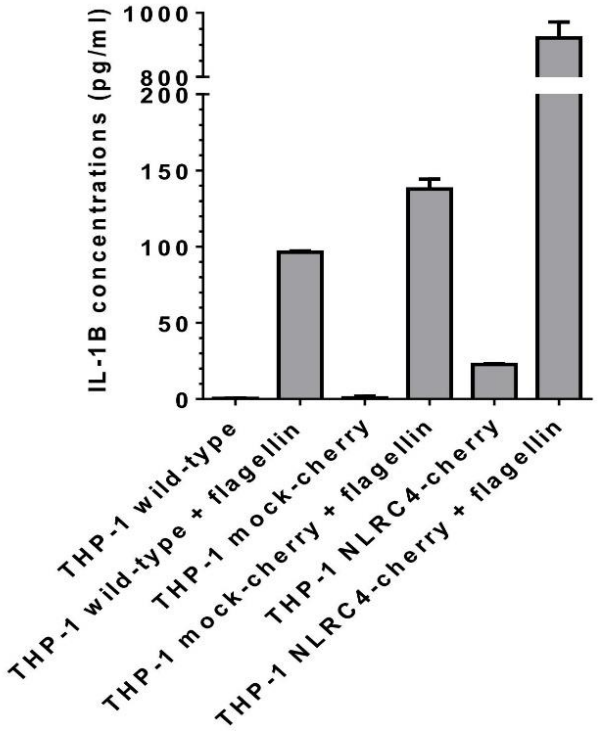
Supplemental Figure 2: Association between NLRC4 transcript levels (in tumor bulk) with overall survival of colorectal cancer patients.



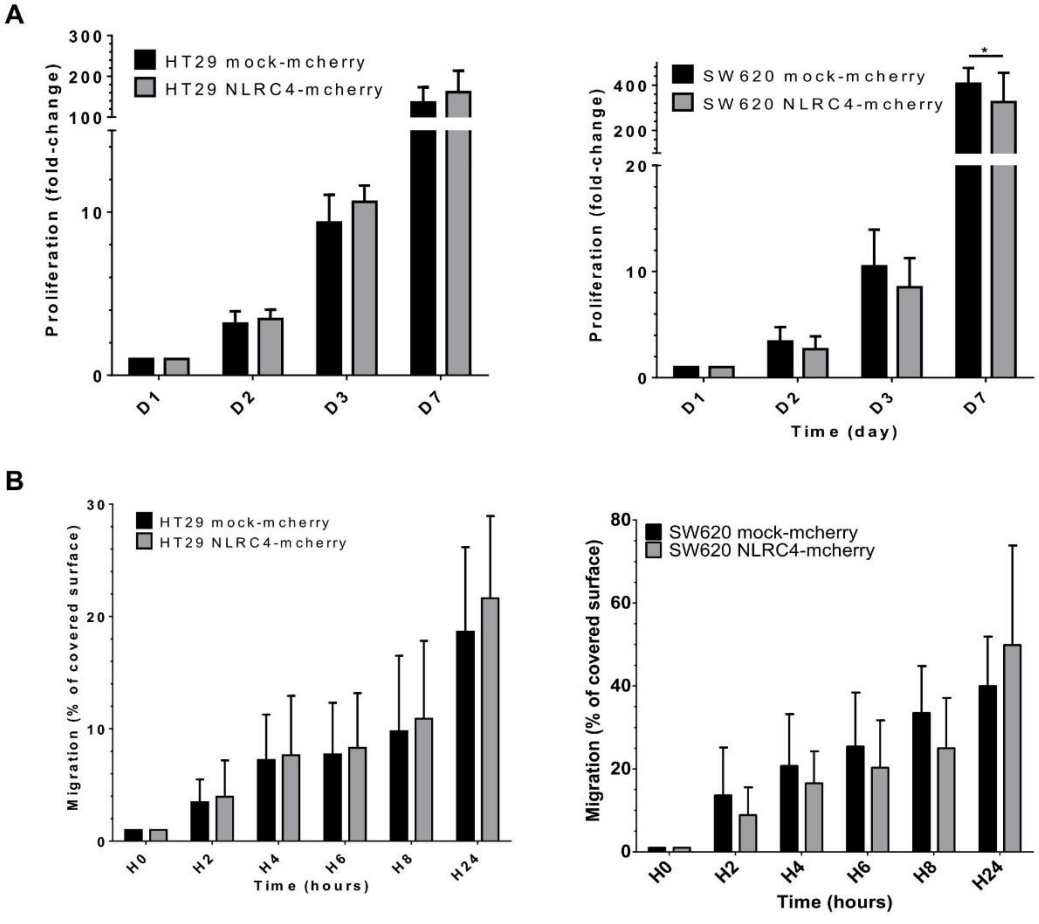
Supplemental Figure 3: Engineered stable cell line stably expressing NLRC4.



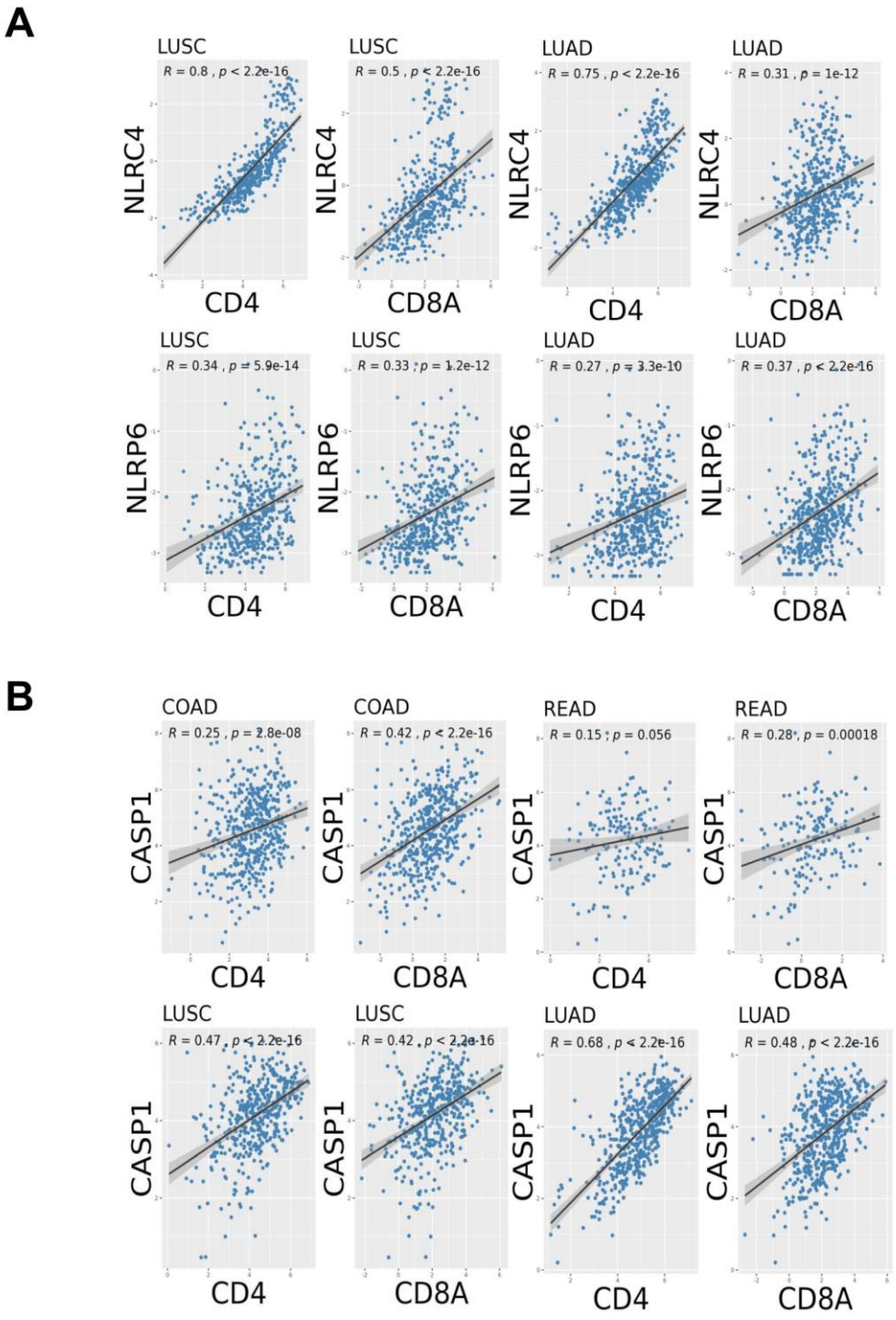
Supplemental Figure 4: NLRC4-cherry expressed in stable cell lines can form a functional inflammasome and induce cytokine secretion upon specific activation.



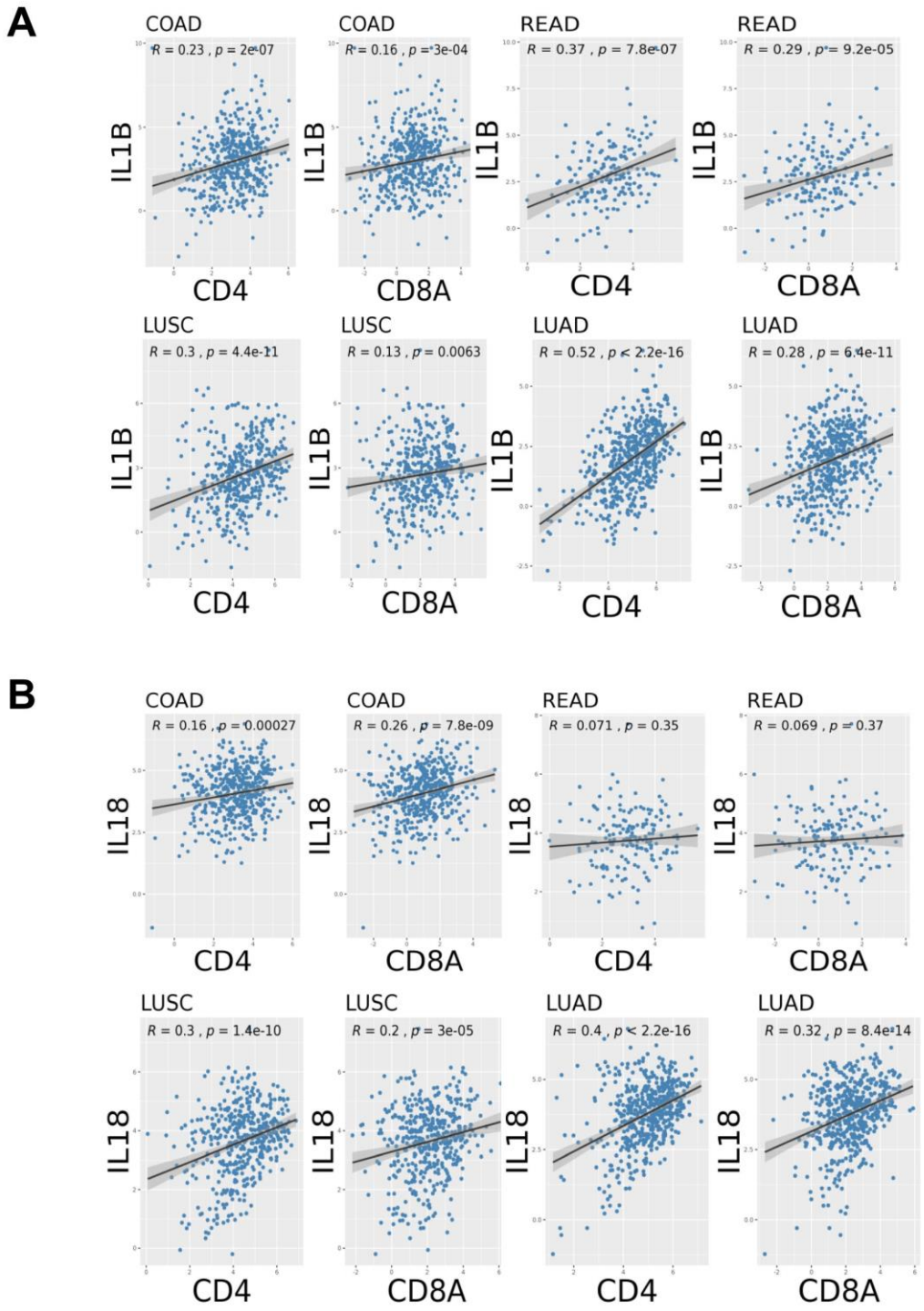
Supplemental Figure 5: Effect of NLRC4 reexpression in colorectal cancer cells on proliferation and migration.



Supplemental Figure 6: Correlation between gene expression of NLRs or CASP1 and CD4 or CD8A in cancer patients.



Supplemental Figure 7: Correlation between gene expression of IL-1β or IL-18 and CD4 or CD8A in cancer patients.



c. Procédé *in vitro* de pronostic d'un cancer associé à l'inflammation, kits et utilisations correspondantes : la signature épithéliale NLRC4/NLRP6/IL-18 dans le cancer colorectal (brevet BV2017-041)

WO 2019/076818 **PCT/EP2018/078087**

PROCÉDÉ IN VITRO DE PRONOSTIC D'UN CANCER ASSOCIÉ À L'INFLAMMATION ET UTILISATIONS CORRESPONDANTES

RESUME DE L'INVENTION

La présente invention concerne un procédé in vitro de pronostic d'un cancer chez un sujet, ainsi que les kits et utilisations correspondants. Il est mis en œuvre une méthode fiable de pronostic de cancers associés à l'inflammation, notamment le cancer colorectal, le carcinome cutané et le cancer du poumon.

ART ANTERIEUR

Pour de nombreux cancers, une corrélation avec l'inflammation a été établie. Ainsi, l'inflammation, notamment les inflammations chroniques, est un facteur de risque bien connu de la tumorigénèse. C'est le cas notamment du cancer colorectal. Le cancer colorectal est l'une des formes de cancer les plus répandues. Les différents stades de développement du cancer colorectal sont classés selon la classification TNM, laquelle recense quatre stades différents, à savoir les stades I et II qui correspondent à un envahissement de plus en plus profond de la paroi du côlon et du rectum, le stade III qui correspond en outre à une atteinte des ganglions et le stade IV qui comprend en outre l'apparition de métastases.

Pour ce type de cancers, des méthodes pronostiques basées sur la réponse immunitaire observée chez les sujets malades ont été développées. Différents modèles ont été testés sur la souris, voire chez l'humain. Certains ont consisté notamment en l'analyse de différents échantillons biologiques (cellules épithéliales, cellules immunitaires, cellules hématopoïétiques, etc.) et la mise en œuvre de techniques de biologie moléculaire, d'immunohistologie et d'immunomarquage de marqueurs biologiques. Par exemple, la technique IHC (*ImmunoHistoChimie*) ou la technique FISH (*fluorescence in situ hydridization* ou hydridation in situ en fluorescence) sont couramment utilisées.

Les méthodes pronostiques peuvent être basées notamment sur l'identification et/ou l'analyse de « signatures » biologiques. Trois types de signatures peuvent être observées, à savoir la signature génétique (par exemple identification de mutations génétiques corrélées à une susceptibilité accrue au développement d'un type de tumeur), la signature transcriptomique ou transcriptionnelle (analyse du profil des ARN transcrits) et la signature protéique dite également signature fonctionnelle *in vivo* (analyse du profil d'expression de protéines).

La tumorigénèse et l'inflammation sont intrinsèquement liées. Notamment, le rôle de l'inflammasome, et des molécules le composant, sur l'oncogenèse a été étudié. Ainsi, l'analyse de certaines molécules de l'inflammasome, impliquées dans les réactions inflammatoires aigües ou chroniques, pourrait permettre de pronostiquer une tumeur chez un sujet, ou son stade de développement.

L'inflammasome est un complexe protéique multimérique cytoplasmique. Il est composé de plusieurs protéines, y inclus les *Nod-Like receptors* (NLR ou « *nucleotide-binding domain, leucine-rich-repeat-containing proteins* »). L'activation de l'inflammasome induit l'activation de protéines caspases pro-inflammatoires, par exemple la caspase-1, qui elles-mêmes induisent l'activation de cytokines pro-inflammatoires, par exemple interleukine-1β (IL-1β) et interleukine-18 (IL-18). L'IL-18 est une cytokine contribuant à la réparation de la barrière épithéliale. L'activation de l'inflammasome induit également la pyroptose, c'est-à-dire la mort cellulaire inflammatoire. Le polymorphisme de certaines molécules de l'inflammasome peut influencer la susceptibilité de certains sujets au développement de certaines formes de cancers, par exemple les molécules NLRP1, NLRP3 et AIM2.

Diverses études ont été publiées. Plusieurs d'entre elles sont rapportées dans la revue de R. Karki *et al.*, *Cancer Immunol Res* ; 5(2) February 2017. Celles-ci ont généralement été réalisées à partir de modèles murins. Les résultats obtenus, et les conclusions tirées, sont parfois contradictoires pour une molécule donnée. Ainsi, suivant les conditions expérimentales, le modèle murin, etc., les effets observés peuvent varier pour les molécules NLRP1, NLRP3, NLRP6, NLRP12, NLRC3, NLRC4, NLRC5, NOD1, NOD2, ASC, AIM2, IL-18, IL-1β, etc.

A titre d'exemple, l'article B. Hu *et al.*, PNAS, December 14, 2014, vol. 107, no.50, 21635-21640 rapporte une étude menée sur la signature transcriptionnelle de NLRC4 et NLRP3 au niveau des cellules épithéliales et hématopoïétiques, et leur corrélation avec l'activation de la caspase-1 et la formation de cancers du côlon induits par l'inflammation. Il a été utilisé des modèles murins tels que Casp1$^{-/-}$, NLRC4$^{-/-}$ et NLRP3$^{-/-}$. Il était conclu notamment que la caspase-1 avait un rôle central dans la prévention de la formation de tumeurs du côlon induites par l'inflammation via la régulation de la réponse des cellules épithéliales aux dommages, ces effets étant médiés par l'inflammasome NLRC4. En comparaison, l'article I. C. Allen *et al.*, J. Exp. Med., May 10, 2010, vol. 207, no.5, 1045-1056 rapporte une étude selon laquelle NLRP3 régulerait la tumorigénèse via le compartiment

hématopoïétique/myéloïde. Il a été utilisé des modèles murins tels que Casp1$^{-/-}$, Pycard$^{-/-}$, NLRC4$^{-/-}$ et NLRP3$^{-/-}$. Il était conclu notamment que NLRP3 jouerait un rôle central dans l'atténuation de la colite aigüe et du cancer colorectal, alors que NLRC4 n'aurait pas de rôle significatif.

D'autres articles, dont notamment S. Normand *et al.*, PNAS, June 7, 2011, vol.108, no.23, 9601-9606 et S. S. Seregin *et al.*, Mucosal Immunol., March 2017, vol.10, no.2, rapportent des études menées sur l'expression de NLRP6 chez des sujets malades.

L'article R. Liu *et al.*, Oncotarget, September 10, 2015, vol. 6, no.32, 33456-33469 rapporte, quant à lui, une étude comparant l'expression de gènes codant pour de multiples molécules (signature transcriptionnelle), à partir des échantillons répertoriés dans différentes bases de données. Les résultats les plus concluants ont été obtenus pour NLRP3, dont le niveau d'expression était systématiquement significativement réduit tant chez les sujets malades que chez les sujets sains. De même, des résultats concordants ont été obtenus pour NOD1 et NOD2, dont les niveaux d'expression des gènes codant étaient quasiment systématiquement significativement augmentés. A contrario, la variabilité des données collectées pour NLRC4, NLRP6 et AIM2 ne permettaient pas de tirer un enseignement particulier.

Ainsi, au vu de ces nombreuses études rapportées relatives aux inflammasomes, des résultats parfois différents, voire divergents ou contradictoires pour certaines molécules, ont été obtenus. Même si une certaine convergence de résultats a été relevée pour les molécules NLRP3, NOD1 et NOD2, les enseignements vis-à-vis des autres molécules sont plus difficiles à tirer.

Tel que souligné dans Lui *et al.*, il y a un besoin d'identification de biomarqueurs fiables et de la mise à disposition de kits et méthodes pour le pronostic du cancer colorectal, ou d'autres cancers dont le développement est étroitement associé à l'inflammation, par exemple le cancer colorectal, le cancer du poumon ou le carcinome cutané, permettant d'aider le praticien à déterminer si le recours à une intervention chirurgicale est nécessaire, confirmer la nécessité de prescrire un traitement et/ou la nature du traitement, notamment un traitement adjuvant tel qu'une chimiothérapie, déterminer l'agressivité de la tumeur (pronostic), prévoir le taux de survie, stratifier les sujets à haut ou bas taux de rechute après chirurgie curative. De tels kits et méthodes sont une aide à la mise en œuvre des traitements et interventions au moment opportun, ni trop tôt ni trop tard, et permettent d'éviter

notamment le recours à une chimiothérapie à un stade où elle ne serait pas nécessaire. En effet, la chimiothérapie est un traitement lourd, qui, outre le coût souvent élevé, et bien qu'indispensable au traitement des sujets malades et à l'évitement de la rechute des sujets en rémission, n'est pas exempte d'effets secondaires et nocifs pour les sujets traités. Or, de tels kits et méthodes ne sont utiles que s'ils sont fiables, c'est-à-dire s'ils reposent sur l'analyse de marqueurs biologiques, dont l'activité (par exemple l'expression protéique) est directement corrélée à un certain type de cancer et/ou à l'un de ses stades de développement. Or, pour ce qui est de l'inflammasome, vis-à-vis du cancer colorectal, mais également vis-à-vis du carcinome cutané et du cancer du poumon, les différences de résultats constatées dans les études référencées ci-avant ne permettent pas à l'homme du métier d'identifier les biomarqueurs biologiques qui permettraient la mise au point de tels kits et méthodes.

Ainsi, la mise à disposition de nouveaux outils d'analyse permettrait au praticien d'améliorer le pronostic du cancer de cancers associés à l'inflammation, notamment le cancer colorectal. De tels outils permettraient en outre d'améliorer la prise en charge du sujet malade et d'éviter la rechute de sujets en rémission. En effet, la pose d'un pronostic précis sera utile tant pour déterminer si le recours à une intervention chirurgicale est nécessaire et/ou si un traitement adjuvant tel une chimiothérapie devrait être prescrit, avant ou après une intervention chirurgicale. Enfin, un tel outil sera utile pour ménager les coûts associés au traitement du sujet malade ou au suivi du sujet en rémission.

OBJECTIFS DE L'INVENTION

La présente invention a pour objectif la mise en œuvre d'une méthode fiable de pronostic des cancers associés à l'inflammation, notamment le cancer colorectal, le carcinome cutané et le cancer du poumon ; en particulier le cancer colorectal.

Un autre objectif est la mise en œuvre d'une méthode fiable de pronostic du stade de développement du cancer colorectal, en particulier du stade TNM II du cancer colorectal.

Un autre objectif est la mise en œuvre d'une méthode fiable de pronostic du risque de rechute de sujets en rémission et/ou de sujets ayant subi une intervention chirurgicale après diagnostic d'un cancer colorectal.

Un autre objectif est la mise en œuvre d'une méthode fiable comme aide à la décision quant à la prescription d'un traitement adjuvant tel qu'une chimiothérapie à un sujet malade chez lequel un cancer colorectal au stade TNM II a été diagnostiqué.

WO 2019/076818 PCT/EP2018/078087

DESCRIPTION DE L'INVENTION

Selon un premier aspect, la présente invention concerne un procédé de pronostic – ou procédé de stratification – d'un cancer associé à l'inflammation, notamment le cancer colorectal, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- Mise à disposition d'un échantillon comprenant du tissu cancéreux épithélial,
- Sélection de la zone tumorale épithéliale de l'échantillon,
- Analyse quantitative des produits d'expression des gènes choisis parmi le groupe consistant en le gène NLRC4, le gène NLRP6, le gène IL-18 ou une de leurs combinaisons pour obtenir une valeur caractéristique desdits produits d'expression;
- Comparaison de chacune des valeurs caractéristiques avec une valeur seuil prédéterminée,
- Détermination du groupe de sujets auquel appartient le sujet.

Par « pronostic d'un cancer », on entend au moins une action parmi la détermination de la nécessité d'un recours à une intervention chirurgicale, la confirmation de la nécessité de prescrire un traitement, la détermination de l'agressivité de la tumeur, la prévision du taux de survie, la stratification des sujets à haut ou bas taux de rechute après chirurgie curative chez un sujet atteint dudit cancer ou sans chirurgie curative chez des patients atteint d'un cancer de stade IV.

Les inventeurs ont développé une méthode pronostique des cancers associés à l'inflammation, notamment le cancer colorectal, par la sélection de multiples facteurs nécessaires à l'obtention de résultats fiables et reproductibles. Ainsi, les inventeurs ont démontré qu'une telle méthode pouvait être développée par la prise en compte des facteurs suivants : la signature biologique à sélectionner en raison de son impact pronostic fort et de sa relevance clinique, les échantillons biologiques à prélever, les cellules et compartiments à analyser. La sélection attentive de ces facteurs est une condition nécessaire à l'obtention d'une méthode qui soit fiable et reproductible.

De façon inattendue, il a été démontré par les inventeurs que l'expression des biomarqueurs selon l'invention est prédictive au niveau des cellules épithéliales du tissu cancéreux. A contrario, l'expression desdits biomarqueurs au niveau des cellules stromales n'est pas prédictive, même si elle peut être modifiée dans les tissus cancéreux. Ainsi, tel que explicité ci-contre, les inventeurs ont démontré qu'une méthode pronostique fiable pouvait être développée en prélevant des échantillons des tissus cancéreux épithéliaux, par exemple des pièces chirurgicales, du sujet malade ou en rémission, en analysant dans la zone tumorale épithéliale, c'est-à-dire au niveau des cellules épithéliales tumorales, la signature protéique de deux marqueurs biologiques spécifiques des inflammasomes NLRC4 et NLRP6 seul ou en combinaison, ainsi que la signature protéique de l'IL-18 seul ou en combinaison avec NLRC4 et/ou NLRP6.

En outre, les analyses de la signature protéique de NLRC4, de NLRP6, et d'IL-18 menées par les inventeurs ont permis d'établir leur intérêt comme biomarqueurs du cancer colorectal, et d'autres formes de cancers associés à l'inflammation également, pour un pronostic fiable et reproductible. Cela est surprenant au vu des différents résultats, parfois divergents, rapportés dans de précédentes études. En effet, les études réalisées par les inventeurs ont mis en avant que l'expression de NLRC4 et de NLRP6 – protéines impliquées dans l'homéostasie tissulaire – était corrélée à la survie des sujets. De la même manière, l'expression d'IL-18 est également corrélée à la survie des sujets. Cette corrélation a été observée pour NLRC4, NLRP6 et IL-18 pris individuellement et, de manière d'autant plus significative, pour n'importe laquelle de leurs combinaisons (NLRC4/NLRP6, NLRC4/IL18, NLRP6/IL18 ou NLRC4/NLRP6/IL18). Les analyses quantitatives des produits d'expression de NLRC4, NLRP6 et d'IL-18 sont donc complémentaires. Leur combinaison permet d'affiner le pronostic du cancer, et de mieux stratifier notamment les sujets sur le pronostic. A contrario, aucune corrélation statistiquement significative avec la survie des sujets n'a été démontrée pour d'autres protéines des inflammasomes, notamment les protéines NLRP1, NLRP3, AIM2 et ASC.

Ainsi, les résultats collectés par l'analyse quantitative des produits d'expression des gènes NLRC4, NLRP6 et IL-18 au niveau de la zone tumorale épithéliale d'un échantillon ont un facteur pronostic fort, contrairement aux analyses quantitatives de produits d'expression d'autres gènes NLR et/ou au niveau des cellules immunitaires.

Enfin, les inventeurs ont confirmé que la signature protéique de NLRC4 et NLRP6 permettait un pronostic fiable du cancer colorectal seulement si celle-ci était analysée dans la zone tumorale épithéliale, et non dans les zones épithéliales saines ou au niveau d'autres types de cellules telles que les cellules stromales, les cellules immunitaires ou les cellules hématopoïétiques. La sélection spécifique des produits d'expression analysés et de leur compartimentalisation permet présentement la mise en œuvre d'un procédé *in vitro* de diagnostic présentant une grande fiabilité en termes de survie des sujets.

L'étape de mise à disposition d'un échantillon comprenant du tissu cancéreux épithélial peut consister en la mise à disposition d'une pièce opératoire, collectée lors d'une opération chirurgicale, ou le résultat d'une biopsie, pratiquée sur un sujet. La mise à disposition comprend en outre la préservation et la préparation dudit échantillon. La préservation peut comprendre une étape de fixation au formol, suivie d'une étape d'inclusion dans de la paraffine, avant conservation préférentiellement à température ambiante. La préparation de l'échantillon peut comprendre une étape de découpe au microtome et dépose sur lame. Les sections découpées au microtome ont généralement une épaisseur moyenne comprise entre 2µm et 5µm, préférentiellement d'environ 3µm. Ledit échantillon est généralement préparé peu avant l'analyse des produits d'expression des gènes.

Lesdits produits d'expression des gènes sont les ARNm, produits de la transcription des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18 ; ou les protéines NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18, produits de la traduction desdits ARNm. Lorsque les produits d'expression des gènes sont les ARNm, produits de la transcription des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18, on parle alors de signature transcriptionnelle. Alternativement, lorsque les produits d'expression des gènes sont les protéines NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18, produits de la traduction desdits ARNm, on parle de signature protéique.

Les protéines NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18 peuvent être analysées par une technique d'immunomarquage, préférentiellement d'immunofluorescence. La technique d'immunomarquage peut être mise en œuvre par utilisation d'un anticorps anti-NLRC4, d'un anticorps anti-NLRP6, d'un anticorps anti-IL-18 ou leur combinaison. Ces anticorps vont se fixer de manière spécifique à la protéine cible. Par exemple, des anticorps spécifiques anti-NLRC4 sont disponibles sous la dénomination commerciale ab115537 (ABCAM). Des anticorps spécifiques anti-NLRP6 sont disponibles sous la dénomination commerciale ABF29

(Merck). Des anticorps spécifiques anti-IL-18 sont disponibles sous la dénomination commerciale PACO0010763 (OZYME). En outre, outre l'utilisation d'un anticorps primaire (anticorps spécifique anti-NLRC4, d'un anticorps spécifique anti-NLRP6, d'un anticorps spécifique anti-IL-18 ou leur combinaison), la technique d'immunomarquage peut être mise en œuvre par utilisation d'un anticorps secondaire. Cet anticorps secondaire va se fixer de manière spécifique aux anticorps primaires. Lorsqu'il est mis en œuvre une technique d'immunofluorescence, l'anticorps secondaire peut comprendre un groupement fluorescent.

Les ARNm, produits de la transcription des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18, peuvent être analysés par une technique de PCR quantitative avec une phase de sélection des cellules épithéliales dans le lysat total ou d'hybridation *in situ* en fluorescence (technique de FISH ARN). L'hybridation *in situ* en fluorescence est une technique de biologie moléculaire d'hybridation *in situ* utilisant des sondes marquées à l'aide d'un marqueur fluorescent et utilisées sur des coupes de microscopie. Les ARNm, produits de la transcription des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18, peuvent être analysés par des sondes ARN spécifiques.

La sélection de la zone tumorale épithéliale peut être mise en œuvre par marquage de l'échantillon à la cytokératine. La cytokératine est un marqueur biologique des cellules épithéliales saines ou tumorales sans discrimination. Après marquage à la cytokératine, il peut être utilisé un masque permettant de sélectionner les zones marquées avec la cytokératine. Il peut s'agir notamment d'un masque appliqué en termes de traitement d'images.

La sélection de la zone tumorale épithéliale peut en outre être mise en œuvre par un second marquage nucléaire de l'échantillon. Le marquage nucléaire peut être un marquage de l'échantillon au 4',6-diamino-2-phénylindole, communément dénommé DAPI. Le marquage nucléaire permet d'éliminer un éventuel bruit de fond dû par exemple à la présence de globules rouges. La sélection de la zone tumorale épithéliale peut donc être optimisée par la mise en œuvre d'un double marquage à la cytokératine et au 4',6-diamino-2-phénylindole permettant d'analyser uniquement le niveau d'expression des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18 dans les cellules nucléées (grâce au marquage au 4',6-diamino-2-phénylindole) de la zone épithéliale tumorale (grâce au marquage à la cytokératine).

L'analyse des produits d'expression des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18 permet d'obtenir une valeur caractéristique pour chacun de ces produits d'expression. Lorsqu'il est mis en œuvre notamment une méthode d'immunofluorescence, lesdites valeurs caractéristiques obtenues sont des intensités de fluorescence. Ces valeurs sont exprimées en unité relative de fluorescence (RFU).

Après détermination de la valeur caractéristique des produits d'expression des gènes analysés, ladite valeur caractéristique est comparée à une valeur prédéterminée. Dans un mode préférentiel de l'invention, le produit d'expression du gène choisi est la protéine NLRC4 et la valeur seuil prédéterminée est 15,67565 RFU. Dans un autre mode préférentiel de l'invention, le produit d'expression du gène choisi est la protéine NLRP6 et la valeur seuil prédéterminée est 11.466567 RFU. Dans un autre mode préférentiel de l'invention, le produit d'expression du gène choisi est la protéine IL-18 et la valeur seuil prédéterminée est 7.70055 RFU. Dans un mode très préférentiel, lorsque les produits d'expression des gènes choisis sont la protéine NLRC4 et la protéine NLRP6 sont tous deux analysés, les valeurs seuils prédéterminées sont respectivement 15,67565 RFU et 11.466567 RFU. Dans un autre mode préférentiel de l'invention, les produits d'expression des gènes choisis sont la protéine NLRC4 et la protéine IL-18 et les valeurs seuils prédéterminées sont respectivement 15,67565 RFU et 7.70055 RFU. Dans un autre mode préférentiel de l'invention, le produits d'expression des gènes choisis sont la protéine IL-18 et la protéine NLRP6 et les valeurs seuils prédéterminées sont respectivement 7.70055 RFU et 11.466567 RFU. Dans un mode très préférentiel, les produits d'expression des gènes choisis sont la protéine NLRC4, la protéine NLRP6 et la protéines IL-18 valeurs seuils prédéterminées sont respectivement 15,67565 RFU, 11.466567 RFU et 7.70055 RFU. En effet, sans vouloir être lié par aucune théorie, il semblerait que la position par rapport à la valeur seuil soit corrélée au pronostic de survie (ou autre). Les mesures cliniques et biologiques sont exprimées en moyennes (déviation standard) ou médianes (range) pour les variables continues, ou en nombres (pourcentages) pour les variables catégorielles. Les courbes ROC obtenues (pour « *receiver-operating characteristics* ») et les aires sous la courbe permettent d'évaluer l'efficacité de NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18 à prédire le décès des sujets. Présentement, la significativité statistique a été définie par une p-value inférieure à 0.04, et les analyses ont été analysées grâce au logiciel STATA 13.1 (StatCorpLP, College Station, Texas, USA).

La comparaison des valeurs caractéristiques des produits d'expression avec les valeurs seuil prédéterminées permet de déterminer le groupe auquel le sujet appartient. Lorsque la valeur caractéristique obtenue est supérieure à la valeur seuil de référence, le sujet est

considéré comme positif. A contrario, lorsque la valeur caractéristique obtenue est inférieure à la valeur seuil de référence, le sujet est considéré comme négatif. Si au moins deux produits des gènes sont analysés – à savoir NLRC4/NLRP6, NLRC4/IL-18 ou NLRP6/IL-18 – lorsque chacune des deux valeurs caractéristiques obtenues est supérieure à la valeur seuil de référence, le sujet est considéré comme double positif. En revanche, lorsque chacune des deux valeurs caractéristiques obtenues est inférieure à la valeur seuil de référence, le sujet est considéré comme double négatif. La détermination du groupe auquel appartient le sujet permet de poser le pronostic. En effet, les sujets double positifs ont un pronostic qui est meilleur que les double négatifs mais aussi meilleur que les sujets lorsqu'ils ne sont pas stratifiés sur ces marqueurs. A l'inverse, les sujets double négatifs ont un pronostic inférieur aux double positifs mais aussi inférieur au pronostic des sujets non stratifiés sur ces marqueurs. Cette stratification a permis de distinguer un troisième groupe de sujets dont l'une des deux valeurs caractéristiques obtenues est inférieure et l'autre supérieure à la valeur seuil de référence. Ces sujets ont un pronostic intermédiaire, c'est-à-dire avec un pronostic meilleur que les double négatifs mais moins bon que les double positifs. De la même manière, si trois produits des gènes sont analysés, à savoir NLRC4, NLRP6 et IL-18, les sujets triples positifs ont un pronostic qui est meilleur que les triples négatifs.

Selon un second aspect, la présente invention concerne un kit de pronostic – ou kit de stratification – d'un cancer chez un sujet, ledit kit comprenant :

- au moins un premier anticorps spécifique de la zone tumorale épithéliale à analyser;
- au moins un second anticorps spécifique des protéines NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18.

Ledit kit de pronostic est utile pour l'analyse de la signature protéique d'un échantillon de tissu cancéreux épithélial.

Selon un troisième aspect, la présente invention concerne un kit de pronostic – ou kit de stratification – d'un cancer chez un sujet, ledit kit comprenant :

- un réactif adapté à la détermination du niveau d'expression des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18dans un échantillon de tissu cancéreux du compartiment épithélial.

Ledit kit de pronostic est utile pour l'analyse de la signature transcriptionnelle d'un échantillon de tissu cancéreux épithélial. Ledit réactif peut être des amorces de qPCR pour amplifier de façon quantitative les ARNm NLCR4, NLRP6 et/ou IL-18 ou des sondes de FISH ARN.

Selon un quatrième aspect, la présente invention concerne l'utilisation des produits d'expression des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18 dans un échantillon de tissus cancéreux épithéliaux comme biomarqueurs du pronostic du cancer.

Selon un cinquième aspect, la présente invention concerne l'utilisation des produits d'expression des gènes NLRC4, NLRP6 et/ou IL-18 dans une zone tumorale épithéliale d'un échantillon comprenant un tissu cancéreux épithélial pour le pronostic du cancer.

DESCRIPTIF DES FIGURES

La figure 1 est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal de stade I-II, de stade III et de stade IV (trois groupes) en fonction du temps (mois), sans stratification sur l'un des biomarqueurs précédents (NLRC4 ou NLRP6).

La figure 2a est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales saines et dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal (tous stades).

La figure 2b est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRP6 dans les cellules épithéliales saines et dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal (tous stades).

La figure 3a est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (tous stades) en fonction du temps simples négatifs $NLRC4^-$ et simples positifs $NLRC4^+$ (deux groupes) en fonction du temps (mois).

La figure 3b est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (tous stades) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en deux groupes : simples négatifs $NLRP6^-$ et simples positifs $NLRP6^+$.

La figure 3c est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (tous stades) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en deux groupes : simples négatifs $IL\text{-}18^-$ et simples positifs $IL\text{-}18^+$.

La figure 4a est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (tous stades) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en quatre groupes : doubles positifs $NLRC4^+/NLRP6^+$, simples positifs $NLRC4^-/NLRP6^+$, simples positifs $NLRC4^+/NLRP6^-$ et doubles négatifs $NLRC4^-/NLRP6^-$.

La figure 4b est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (tous stades) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en quatre groupes : doubles positifs NLRC4$^+$/IL-18$^+$, simples positifs NLRC4$^-$/ IL-18$^+$, simples positifs NLRC4$^+$/ IL-18$^-$ et doubles négatifs NLRC4$^-$/ IL-18$^-$.

La figure 4c est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (tous stades) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en quatre groupes : doubles positifs NLP6$^+$/IL-18$^+$, simples positifs NLP6$^-$/ IL-18$^+$, simples positifs NLP6$^+$/ IL-18$^-$ et doubles négatifs NLP6$^-$/ IL-18$^-$.

La figure 4d est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (tous stades) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en deux groupes : triples positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^+$/IL-18$^+$, et triples négatifs NLRC4$^-$/NLRP6$^-$/IL-18$^-$.

La figure 5 est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal de stade II (envahissement colique) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en cinq groupes : doubles positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^-$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^-$, doubles négatifs NLRC4$^-$/NLRP6$^-$, les quatre groupes ensemble.

La figure 6 est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (stade III – envahissement ganglionnaire) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en quatre groupes : doubles positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^-$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^-$, doubles négatifs NLRC4$^-$/NLRP6$^-$, les quatre groupes ensemble.

La figure 7 est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal (stade IV – envahissement à distance) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en cinq groupes : doubles positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^-$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^-$, doubles négatifs NLRC4$^-$/NLRP6$^-$, les quatre groupes ensemble.

La figure 8 est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal de stade I ou de stade II (envahissement isolé de la paroi colique) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en cinq groupes : doubles positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^-$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^-$, doubles négatifs NLRC4$^-$/NLRP6$^-$, les quatre groupes ensemble

La figure 9 est une représentation graphique du pourcentage de survie de sujets malades ayant un cancer colorectal de stade III ou de stade IV (envahissement extra-colique) en fonction du temps (mois), lesdits sujets étant répartis en cinq groupes : doubles positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^-$/NLRP6$^+$, simples positifs NLRC4$^+$/NLRP6$^-$, doubles négatifs NLRC4$^-$/NLRP6$^-$, les quatre groupes ensemble.

La figure 10 est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales saines et dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal (tous stades) dans un TMA commercial (CO2161, USBiomax).

La figure 11 est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal en fonction du stade TNM dans un TMA commercial (CO2161, USBiomax).

La figure 12 est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal en fonction de l'histologie dans un TMA commercial (LC1923, USBiomax).

La figure 13 est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal en fonction du grade tumoral (USBiomax).

Analyse statistique de la survie des sujets en fonction du stade TNM de développement du cancer colorectal (cf. figure 1)

La figure 1 montre une analyse de survie sur 105 sujets, stratifiés sur le stade TNM (stades localisés I et II (n=32) versus stades localement avancés III (n=33) versus stades métastatiques IV (n=20)). Les sujets atteints de maladies localisées ont un meilleur pronostic (survie médiane non atteinte) que les sujets avec une maladie localement avancée (survie médiane non atteinte) et que les sujets avec une maladie métastatique (survie médiane de 38.03 mois) ($p<0.0001$). Ceci est cohérent avec les données de la littérature.

Mesure du niveau d'expression de NLRC4 par immunoflorescence des échantillons marqués et comparaison entre les zones épithéliales tumorales et saines (cf. figure 2a)

La figure 2a montre une analyse sur 105 échantillons tumoraux et sains matchés (un tissu tumoral et un tissu sain correspondant pour chaque sujet). Il existe une diminution de l'expression de NLRC4 dans les cellules épithéliales tumorales par rapport aux cellules épithéliales saines ($p<0.0001$; valeur significativement différente / $p<0.005$).

Mesure du niveau d'expression de NLPR6 par immunoflorescence des échantillons marqués et comparaison entre les zones épithéliales tumorales et saines (cf. figure 2b)

La figure 2b montre une analyse sur 105 échantillons tumoraux et sains matchés (un tissu tumoral et un tissu sain correspondant pour chaque sujet). Il existe une diminution de l'expression de NLRP6 dans les cellules épithéliales tumorales par rapport aux cellules épithéliales saines ($p<0.0001$).

Mesure du niveau d'expression épithéliale de NLRC4 dans le tissu tumoral et le tissu sain (cf. figure 10)

La figure 10 est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales saines et dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal (tous stades) dans un TMA commercial (CO2161, USBiomax, $p<0.0001$; valeur significativement différente / $p<0.005$).

Mesure du niveau d'expression de NLRC4 en fonction du stade TNM (cf. figure 11)

La figure 11 est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal en fonction du stade TNM dans un TMA commercial (CO2161, USBiomax, $p=0,0214$, valeur significativement différente / $p<0.005$).

Mesure du niveau d'expression de NLRC4 en fonction de l'histologie (cf. figure 12)

La figure 12 est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal en fonction de l'histologie dans un TMA commercial (LC1923, USBiomax, $p<0,0001$, valeur significativement différente / $p<0.005$).

Mesure du niveau d'expression de NLRC4 en fonction du grade tumoral (cf. figure 13)

La figure 13 est une représentation graphique de l'intensité de fluorescence (RFU) de la protéine NLRC4 dans les cellules épithéliales tumorales d'échantillons prélevés chez des sujets atteints d'un cancer colorectal en fonction du stade TNM dans un TMA commercial (CO2161, USBiomax, $p=0,025$, valeur significativement différente / $p<0.005$).

Analyse statistique du taux de survie des sujets malades (tous stades) en fonction du niveau d'expression de NLRC4 ($NLRC4^-$ ou $NLRC4^+$) et/ou NLRP6 ($NLRP6^-$ ou $NLRP6^+$) et/ou IL-18 ($IL\text{-}18^-$ ou $IL\text{-}18^+$) (cf. figures 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4c, 4d, 5, 6, 7, 8, 9)

Les données cliniques sont récupérées à partir du dossier du sujet, par recueil notamment de différents éléments cliniques et histologiques. Pour chaque sujet, la survie est calculée comme étant le délai entre la date du diagnostic de cancer colorectal (souvent la date du résultat de l'analyse pathologique qui pose le diagnostic précis) et la date du décès ou la date des dernières nouvelles du sujet vivant.

De plus, des analyses avec courbes de ROC ont été réalisées sur notre cohorte, pour déterminer le seuil d'expression de NLRC4 et NLRP6 qui modifiait le pronostic des sujets (sur la survie globale). Ce seuil est très proche de la médiane des intensités de fluorescence pour la cohorte.

Les données sont analysées grâce au logiciel Graphpad version 6.07 (Graphpad Inc., San Diego, CA, USA). Les comparaisons de survie en fonction de l'expression du marqueur sont effectuées par la méthode du logrank, et les résultats sont considérés comme positifs si la p-value était strictement inférieure à 0.05.

Figure 3a : $Chi^2 = 8,726$, df = 1, p = 0,0031, survie médiane de $NLRC4^-$ = 60,03 mois

Figure 3b : $Chi^2 = 9,417$, df = 1, p = 0,0021, survie médiane de $NLRP6^-$= 60,03 mois.

Figure 3c : Chi^2= 15,11, df= 1, p= 0.0001, survie médiane de $IL\text{-}18^-$= 39,02 mois.

Figure 4a : $Chi^2 = 14,97$, df = 1, p = 0,0001, survie médiane $NLRC4^-/NLRP6^-$ = 39 mois.

Figure 4b : Chi^2= 21,35, df=3, $p<0.0001$, survie médiane de $NLRC4^-/IL\text{-}18^-$=38,03 mois, $NLRC4^+/IL\text{-}18^-$ = 93,195 mois.

Figure 4c : Chi^2= 28,89, df=3, p<0.0001, survie médiane de $NLRP6^-/IL\text{-}18^-$=30,79 mois, $NLRP6^+/IL\text{-}18^-$ = 83,18 mois.

Figure 4d : Chi^2= 27,89, df=4, p<0.0001, survie médiane de $NLRC4^-/NLRP6^-/IL\text{-}18^-$=30,79 mois, $NLRC4^+/NLRP6^+/IL\text{-}18^-$= 93,195 mois, $NLRC4^+/NLRP6^-/IL\text{-}18^-$ = 63,26 mois.

Figure 5 : Chi^2 = 5,787, df = 2, p = 0,0554, survie médiane $NLRC4^-/NLRP6^-$ = 60,03 mois.

Figure 6 : Chi^2 = 7,029, df = 4, p = 0,1343, survie médiane $NLRC4^-/NLRP6^-$ = 39,39 mois.

Figure 7 : Chi^2 = 2,420, df = 4, p = 0,6591, survie médiane « tous » = 38,08 mois ; $NLRC4^+/NLRP6^+$ = 15,74 mois ; $NLRC4^+/NLRP6^-$ = 38,905 mois ; $NLRC4^-/NLRP6^+$ = 35,675 mois ; $NLRC4^-/NLRP6^-$ = 39,02 mois

Figure 8 : Chi^2 = 5,293, df = 4, p = 0,2586, survie médiane $NLRC4^-/NLRP6^-$ = 60,03 mois

Figure 9 : Chi^2 = 8,514, df = 4, p = 0,0745, survie médiane « tous » = 74,56 mois ; $NLRC4^+/NLRP6^-$ = 80,95 mois ; $NLRC4^-/NLRP6^-$ = 38,03 mois.

Conclusion quant à la performance du double marquage (test de double positivité)

Il a été réalisé un test de double positivité. Présentement, le test est « double positif » lorsque niveau d'expression des deux protéines NLRC4 et NLRP6 dans la zone épithéliale tumorale est significativement moindre que celui dans la zone épithéliale saine.

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 1 ci-dessous.

	Décès	Pas de décès
NLRC4+ (NLRC4-)	22 (14)	25 (44)
NLRP6+ (NLRP6-)	26 (10)	25 (44)
NLRC4+ ou NLRP6+ (autres)	31 (5)	38 (31)
NRLC4+/NLRP6+ (autres)	17 (19)	12 (57)
Total	36	69

Tableau 1

A partir de ces résultats, la spécificité et la sensibilité peuvent être calculées. La spécificité est la probabilité que le test soit négatif (donc que les protéines soient toujours exprimées) si le sujet a moins de risques de décéder. Ceci signifie que, par exemple, le comarquage selon la présente invention va permettre de mieux distinguer les sujets à bon pronostic qui n'auront pas besoin de chimiothérapie supplémentaire pour survivre. La sensibilité correspond à la probabilité que le test soit positif (donc que les protéines soient moins exprimées) si le sujet a plus de risques de décéder. La moins bonne sensibilité signifie

que lorsque les deux marqueurs seront diminués, il sera difficile de dire si les sujets ont plus de risque de décéder et donc nécessitent une chimiothérapie ou pas (1 risque sur 2 de se tromper). Ceci permettrait quand même de mieux séparer les sujets et d'éviter probablement l'administration d'une chimiothérapie à des sujets qui n'en ont pas besoin.

Avec des valeurs seuil de 15,67565 pour NLRC4 et/ou 11,466567 pour NLRP6 et/ou 7.70055 pour IL-18, les valeurs de sensibilité et de spécificité suivantes ont été obtenues:

	Sensibilité	Spécificité
Test NLRC4+	61,1% [43,5% - 76,9%] $_{95\%}$	63,8% [51,3% - 75,0%] $_{95\%}$
Test NLRP6+	72,2% [54,8% - 85,8%] $_{95\%}$	63,8% [51,3% - 75%] $_{95\%}$
Test IL-18+	60% [42.1% - 76.1%]$_{95\%}$	73.5% [61.4% - 83.5%]$_{95\%}$
Test NLRC4+ ou NLRP6+	86,1% [70,5% - 95,3%] $_{95\%}$	44,9% [32,9% - 57,4%] $_{95\%}$
Test NLRC4+ et NLRP6+ (test de double positivité)	47,2% [30,4% - 64,5%] $_{95\%}$	82,6% [71,6% - 90,7%] $_{95\%}$

Tableau 2

Le test (double marquage NLRC4 et NLRP6 dans la zone épithéliale tumorale) présente une bonne performance, avec une bonne spécificité (82.6%) mais une sensibilité modérée (47.2%).

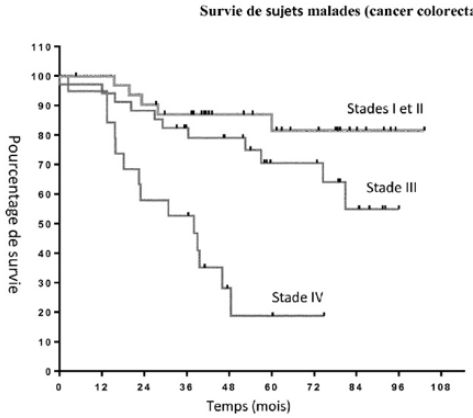


Figure 1

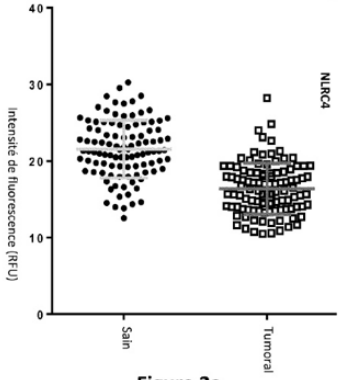


Figure 2a

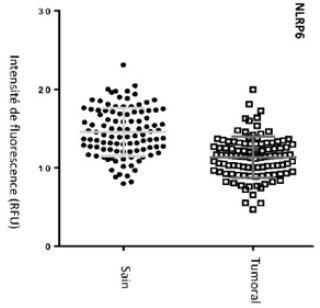


Figure 2b

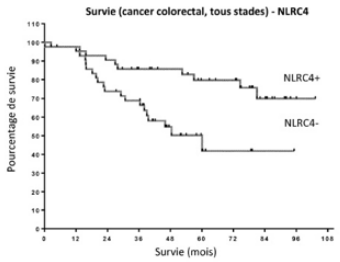


Figure 3a

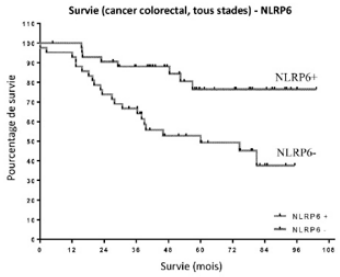


Figure 3b

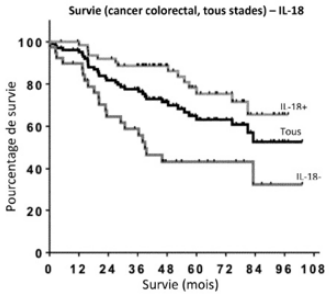


Figure 3c

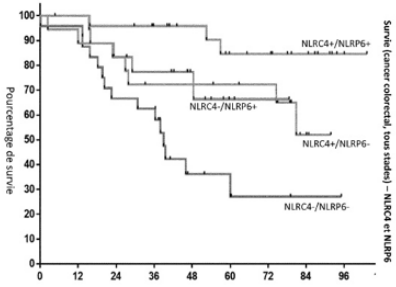


Figure 4a

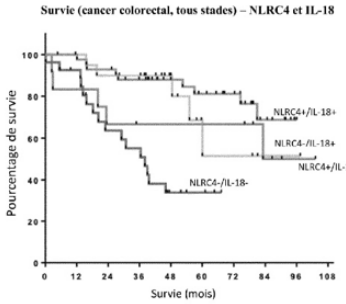


Figure 4b

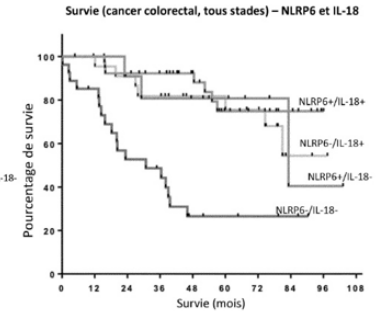


Figure 4c

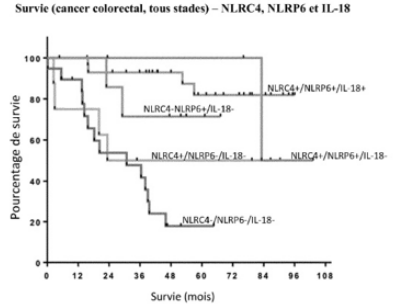


Figure 4d

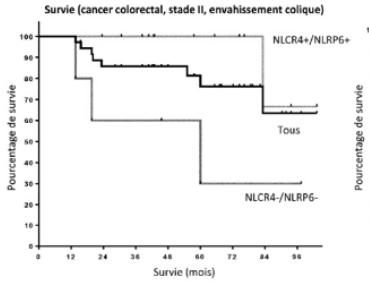


Figure 5

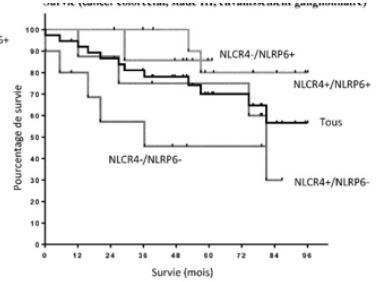


Figure 6

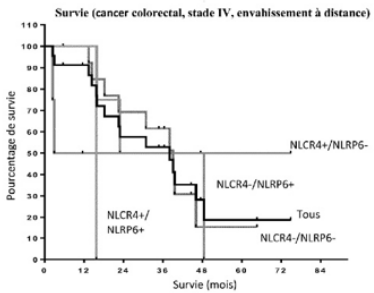


Figure 7

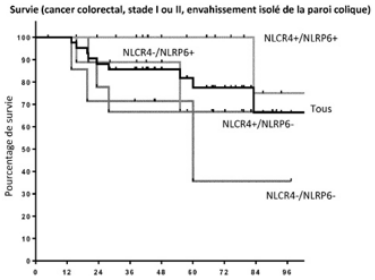


Figure 8

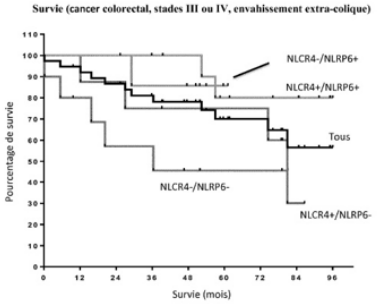


Figure 9

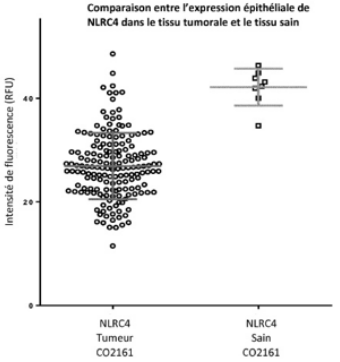


Figure 10

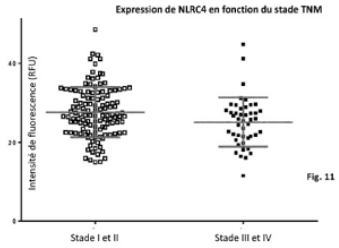


Figure 11

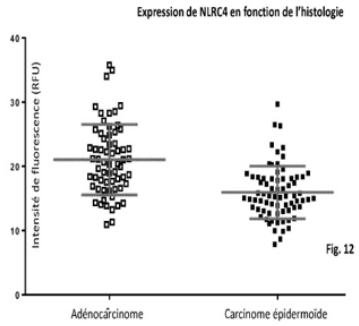


Figure 12

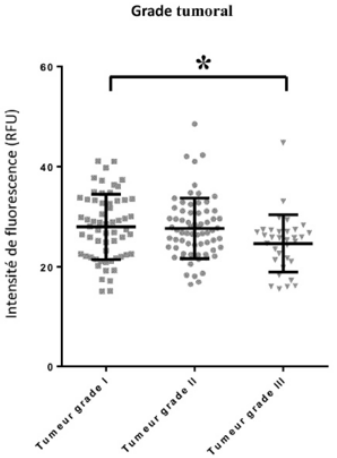


Figure 13

VII. Projet 2 : Rôle du métabolisme tumoral dans l'activation des cellules immunitaires

a. Human γδ TCR sensing of AMPK-dependent metabolic tumour reprogramming through recognition of EphA2 (submitted)

Le métabolisme tumoral joue un rôle important dans la régulation des fonctions des cellules immunitaires. Ainsi, il a été montré que le métabolisme tumoral pouvait induire l'expression, à la surface des cellules tumorales, d'antigènes de stress qui vont être reconnus par les LT γδ. C'est le cas par exemple de la voie du mévalonate. Le métabolisme tumoral peut être modulé *in vitro* par la déplétion du glucose dans le milieu de culture, ou par l'ajout de modulateurs pharmacologiques ciblant AMPK ou mTOR, 2 senseurs cytosoliques énergétiques majeurs.

Dans ce deuxième travail, nous avons montré que les modifications du métabolisme tumoral pouvaient induire l'expression d'antigènes de stress *in vitro*, qui permettront l'activation des LT γδ et de leurs fonctions antitumorales. Ainsi, nous avons identifié un nouvel antigène de stress, EphA2, exprimé à la surface de certaines cellules tumorales. Nous avons également trouvé que son expression était induite par l'activation d'AMPK et indépendante de la voie mTOR. Ainsi, nous avons identifié une nouvelle voie de régulation de l'activation des LT γδ via l'expression d'antigènes de stress, qui sera inhibée dans certaines tumeurs afin de favoriser l'échappement à l'immunité antitumorale. L'objectif serait donc d'induire la réexpression de cet antigène afin de réactiver la reconnaissance des cellules tumorales par les LT γδ.

Christelle Harly[1,2★], Stephen Paul Joyce[3★], Charlotte Domblides[1,2], Charlotte Mannat[1,2], Thomas Bachelet[1,2], Vincent Pitard[1,2,4], Angela Pappalardo[1,2], Lionel Couzi[1,2,5], Sonia Netzer[1,2], Emilie Obre[6], Omar Hawchar[1,2], Lydia Lartigue[7], Stéphane Claverol[8], Jean-François Moreau[1,2,9], Rodrigue Rossignol[10], Benoit Viollet[11,12,13], Carrie R. Willcox[3], Fiyaz Mohammed[3], Benjamin E. Willcox[3¶], Benjamin Faustin[1,2¶], Julie Déchanet-Merville[1,2,4¶]

[1] *Bordeaux University, ImmunoConcept, 33000 Bordeaux, France*
[2] *CNRS, UMR 5164, 33000 Bordeaux, France*
[3] *Cancer Immunology and Immunotherapy Centre, Cancer Research UK Birmingham Centre, Institute of Immunology and Immunotherapy University of Birmingham, Birmingham, B15 2TT, UK*
[4] *Flow cytometry facility, TransBioMed Core, CNRS UMS3427, INSERM US05, Bordeaux University, 33000 Bordeaux, France*
[5] *Renal transplantation department, Bordeaux Unversity Hospital, 33076 Bordeaux, France*
[6] *Cellomet, Centre de Génomique Fonctionnelle Bordeaux, University of Bordeaux, 33076 Bordeaux, France*
[7] *INSERM U916 VINCO, Institut Bergonié, 229 cours de l'Argonne, 33076 Bordeaux cedex, France*
[8] *Centre de Génomique Fonctionnelle Bordeaux, University of Bordeaux, 33000 Bordeaux, France*
[9] *Immunology and Immunogenetics Laboratory, Bordeaux University Hospital, F-33000 Bordeaux*
[10] *INSERM U1211, Rare diseases, Genetics and Metabolism, University of Bordeaux, Bordeaux, France*
[11] *Institut Cochin, INSERM U1016, Paris France*
[12] *CNRS UMR 8104, Paris, France*
[13] *Université Paris Descartes, Sorbonne Paris cité, Paris, France*

Address correspondence: bfaustin@immuconcept.org; jdechanet@immuconcept.org; b.willcox@bham.ac.uk

KEYWORDS: immunology, cancer, γδ T cells, T-Cell Receptor, metabolism, AMPK

Running Title: γδ TCR sensing of metabolic tumor reprogramming through recognition of EphA2

SUMMARY
Human γδ T cells contribute to tissue homeostasis and participate in epithelial stress surveillance through as yet unclear underlying mechanisms. Here we identified Ephrin Type-A Receptor 2 (EphA2) as a new stress antigen recognized by a human γδ TCR. EphA2 interacted with both ephrinA1 and a Vγ9Vδ1 γδ TCR at two distinct binding sites required for TCR triggering, and we identified a putative TCR binding site on the ligand-binding domain of EphA2. Moreover, expression of EphA2 is upregulated by the AMP-activated protein kinase (AMPK)-dependent metabolic reprogramming of cancer cells. These results highlight the potential of the human γδ TCR to recognise non-MHC-encoded proteins as signals of cellular dysregulation, potentially allowing γδ T cells to sense metabolic energy crisis associated with either viral infection or cancer.

INTRODUCTION
Higher vertebrate adaptive immunity is reliant on three types of lymphocytes: γδ T cells, αβ T cells, and B cells, each with both specific and redundant functions. As regards to human γδ T cells, they circulate in peripheral blood (where the Vγ9Vδ2 population is dominant), and are located in epithelial tissues wherein they are substantially enriched in other □□ T cell subsets collectively termed Vδ2^{neg} γδ T cells. Tissue Vδ2^{neg} γδ T cells are thought to contribute to tissue homeostasis by mediating first line host response to a wide variety of cellular insults [1]. Human γδ T cells are found in tumors and infected tissues, and their expansion in blood correlates with better clinical outcome in some studies [23]. As a striking example, a meta-analysis of 18,000 tumour transcriptomic signatures among 39 human malignancies recently highlighted □□ T cells as the tumour-infiltrating immune subset with the strongest association to overall patient survival [4].

CMV-infection is also a well-described clinical scenario where γδ T cells are implicated in immuosurveillance [5]. We and others have shown that human Vδ2^{neg} γδ T cells expand in the periphery of individuals suffering from CMV-infection [6,7,8]. They develop cytotoxic function and produce proinflammatory cytokines [9] making them able to participate in the immune response against CMV, especially in immune compromised patients. This expansion correlates with a decreased susceptibility to post-transplant cancers, suggesting a role in tumor immunosurveillance *in vivo* [10]. In line with this, such cells display a TCR-dependent cross reactivity against several solid tumor cell lines and CMV-infected cells. This can be explained by the recognition of common specific stress-induced γδ TCR ligands expressed by cellular targets in both conditions which are likely to be part of a molecular stress signature required for full γδ T cell activation, that comprises membrane and soluble co-stimulators [11,12]. We recently identified EPCR and Annexin A2 as two of these antigens recognized by □□ TCRs [11,13]. Although human γδ T cells have been shown to recognize stress-associated proteins, metabolites, and lipids in an MHC-unrestricted manner [1], so far, only a few molecules have been proposed as stress antigens recognized by human Vδ2^{neg} γδ TCRs (for review see [1], and the stress-induced molecular mechanisms underlying their expression and immunogenicity are mostly unknown.

One main cellular function that could potentially represent a common axis of dysregulation in HCMV and cancer is metabolic rewiring. Both carcinogenesis and CMV infection induce epithelial stress involving metabolic reprogramming of the host cell to accommodate both catabolism and anabolism to changing environmental tissue constraints and cell proliferation [1415]. In most solid tumors, a typical metabolic reprogramming is the so-called Warburg effect, commonly defined by an upregulation of glycolytic and anabolic pathways and a downregulation of mitochondrial oxidative catabolic functions [14]. Such a metabolic switch with increased glycolysis also occurs in human fibroblasts in response to HCMV infection [15], and is thought to be critical for viral replication [16]. However, to date it has remained unclear whether such metabolic changes translate into a cell surface molecular stress signature that γδ T cells can detect and respond to. Here we report a new stress ligand Ephrin Type-A Receptor 2 (EphA2) recognized by human γδ T cells in a Vγ9Vδ1 TCR-dependent manner, expression of which is regulated by the metabolic reprogramming of cancer cells through AMPK downstream signaling.

RESULTS
Vγ9Vδ1 TCR-dependent recognition of target cells and generation of a blocking antibody. Only a few endogenous stress antigens recognized by human Vδ2^{neg} γδ TCRs have been identified to date.

To expand this knowledge, we decided to identify the antigen recognized by the TCR of a γδ T cell clone (the MAU clone, referred to as clone 5-4 Vγ9Vδ1 in [9] isolated from a CMV-infected kidney transplant patient. $V\delta2^{neg}$ γδ T cells in this patient's blood expanded up to 8% of $CD3^+$ T cells. The MAU clone was representative of the TCR-dependent dual reactivity against tumor cells and CMV-infected cells typically found in CMV-induced $V\delta2^{neg}$ γδ T cells ([9] and as shown in **Figure 1A** for an extended set of targets). We generated cDNA encoding the Vγ9 and Vδ1 TCR chains from the clone MAU and expressed those cDNAs in the TCR-deficient human JRT3 T cell line to generate a γδ TCR reporter cell line **(Figure S1A)**. Expression of the MAU γδ TCR on JRT3 cells conferred reactivity against a considerably large array of tumor cell lines (as measured by CD69 expression) among which those recognized by the MAU clone **(Figure 1B and Figure S1B)**. Transduced JRT3-LES expressing a Vγ4Vδ5 TCR chains (described in [11] did not react to the same panel of tumor cells, suggesting a TCR-dependent reactivity **(Figure 1B)**. Interestingly, JRT3-MAU cells also reacted to murine cell line 3T3 and to mouse embryonic fibroblasts (MEFs) **(Figure 1B)** indicating that the antigen recognized by MAU-TCR has a close homolog in mice and monkeys. These results confirmed the importance of the γδ TCR in the T cell specific recognition of cancer cells.

To identify the membrane ligand recognized by MAU-TCR on target cells, we generated a specific blocking monoclonal antibody (mAb) by immunizing mice with the human glioblastoma cell line U373. Cell culture supernatants of B cell hybridomas generated from mice immunized with U373 cells were screened for their capacity to block JRT3-MAU reactivity **(Figure S2A)**. The most efficient hybridoma able to block activity was selected, cloned, and the subsequent blocking antibody produced was called 6G8 mAb. All target cells recognized by JRT3-MAU were stained by 6G8 mAb, while those not able to confer reactivity were either stained or not by 6G8 **(Figure 1C),** which substantially blocked their recognition by JRT3-MAU cells, consistent with the idea that 6G8 specifically recognized the ligand of MAU-TCR, 6G8 mAb substantially blocked reactivity of JRT3-MAU cells against all recognized tumor target cell lines **(Figure 1D)**. Interestingly, some cell lines not recognized by JRT3-MAU were stained by 6G8 mAb (HUH-7 and HUTU-80; **Figure 1C**), suggesting that 6G8 ligand (6G8L) is necessary but not sufficient to transduce T-cell recognition and further activation, as previously noticed for the EPCR ligand of the LES Vγ4Vδ5 clone [11]. Moreover, 6G8 mAb exhibited clonotype-specific blocking, as it had no effect on the reactivity of JRT3-LES against HT29 colon cancer cells stably expressing the stress antigen EPCR (recognized by the LES Vγ4Vδ5 TCR). This was analogous to the 2E9 mAb specific for EPCR, which reciprocally blocked JRT3-LES recognition of EPCR, but had no effect on MAU recognition [11] (**Figure 1E**). Together these data indicated that 6G8-ligand (6G8L) is a potential γδ TCR ligand necessary for the efficient recognition of tumor cells by the MAU clone.

Identification of EphA2 as the ligand for 6G8. To identify 6G8L, we biotinylated the surface of $6G8L^+$ target cells (Hela and U373) and immunoprecipitated proteins from the cells with 6G8 or control mAb, as carried out previously for EPCR [11]. We found that 6G8 mAb specifically immunoprecipitated a ~130 kilodalton (kDa) protein from 6G8L-expressing target cells (Hela and U373 cells), but not from 6G8L-negative cells (K562 and Daudi cell lines; **Figure 2A**). Proteins immunoprecipitated from HeLa cells with 6G8 mAb were separated by SDS-PAGE, then the ~130-kDa band was excised and analysed by mass spectrometry for peptide identification (see methods for details). Based on peptide coverage, we identified Ephrin-Type A Receptor 2 (EphA2) as the single compelling candidate for 6G8L **(Figure 2B)**. We confirmed the equivalence of EphA2 and 6G8L through the use of commercially available EphA2 antibodies. First, staining of $6G8L^+$ target cells by mAb 6G8 was completely abrogated by preincubation of cells with polyclonal antibody to EphA2 (α-EphA2; **Figure 2C**). Second, the recognition of HT29 human colon cell line by JRT3-MAU cells (conversely to that by JRT3-LES) was blocked by both 6G8 and anti-EphA2 antibodies but not by anti-EPCR **(Figure 2D)**. Third, 6G8 mAb immunoprecipitates from HUTU80 cells were recognized by anti-EphA2 mAb in immunoblots **(Figure 2E)**. In addition, EphA2 transduction into cancer cells not initially recognized by JRT3-MAU cells (such as non-adherent cell lines, or Jar and HUH7) conferred both staining with 6G8 mAb (**Figure 2SB** and data not shown) and ability to activate JRT3-MAU **(Figure 2F)**. Collectively these findings confirmed that EphA2 was the antigen recognised by the 6G8 mAb. We then addressed the specificity for EphA2 relative to other Ephrin receptors using purified recombinant EphA-Fc chimeric proteins.

We observed that immobilized recombinant EphA2-Fc but not EphA4-Fc could induce activation of JRT3-MAU cells **(Figure 2G)**. As a negative control, recombinant EphA2-Fc had no effect on JRT3-LES Vγ4Vδ5 **(Figure 2G)** nor JRT3-Vγ9Vδ2 **(Figure S2B)**. We confirmed also the specific recognition of EphA2 among other EphA-family members since only recombinant EphA2-Fc enabled JRT3-MAU reactivity **(Figure 2H)**.

EphA2 is recognized in a Vγ9Vδ1 TCR-dependent manner. We then developed approaches to explore the molecular characteristics of TCR mediated recognition. First, transduced EphA2-mediated reactivity was TCR-dependent since it was blocked by anti-Vγ9 and anti-Vδ1 antibodies (**Figure 3A**). Second, EphA2-Fc-mediated increase of CD69 in JRT3-MAU cells correlated with CD3ζ and ZAP70 phosphorylation as observed by western-blots (**Figure 3B**), suggesting *bona fide* induction of TCR signaling. Finally, we addressed the TCR chain-dependence, by testing if EphA2 could be recognized by various combinations of Vγ and Vδ TCR chains. By using GFP or EphA2-transduced 721.221 cells (displaying both 6G8 and EphA2 staining; **Figure S2C**), we tested its recognition by various γδ TCRs isolated from CMV-infected patients (Vγ9Vδ1 MAU-TCR, Vγ8Vδ1 PIN-TCR, Vγ4Vδ5 LES-TCR) or by chimeric combinations of Vγ and Vδ chains **(Figure 3C)**. We first observed that EphA2 is recognized by neither PIN-TCR (Vγ8Vδ1) nor LES-TCR (Vγ4Vδ5). However, it was possible to compose three new hybrid TCRs with reactivity against EphA2 by associating PIN V□1 chain with MAU V□9 chain, or MAU V□1 chain with PIN V□8 or LES V□4 chains. It is noteworthy that all EphA2-reactive TCRs expressed a V□1 chain. Hence, recognition of EphA2 was likely to involve both Vγ9 and Vδ1 chains, and was influenced by the CDR3 of MAU Vδ1, as the native Vδ1 PIN TCR was not reactive to EphA2, however substitution of the MAU Vδ1 chain did induce EphA2 reactivity. Therefore, recognition of EphA2 by γδ TCR may have the potential to extend beyond the MAU Vγ9Vδ1 TCR.

Ephrins and Vγ9Vδ1 TCR are both required for EphA2-mediated activation of JRT3-MAU. EphA2 is a receptor for ephrinA1 to A5 [17]; and ephrinA1, A3 and A4 transcripts were reported in T cells [18]. To address the expression of ephrins on JRT3-MAU, we generated specific anti-ephrinA1 and anti-ephrinA4 mAbs suitable for flow cytometry (see Supplemental Experimental Procedures and **Figure S3A**). Using these custom mAbs, membrane expression of ephrinA4 but not ephrinA1 was observed on JRT3 cells including JRT3-MAU **(Figure 3D)**, consistent with the staining of JRT3 cells by EphA2-Fc and EphA4-Fc **(Figure S3B)**. The role of ephrins in the EphA2-mediated activation of JRT3-MAU was then investigated. Ephrins are GPI-linked molecules, and JRT3-MAU cells were treated with phosphoinositide phospholipase C (PI-PLC) that cleaves GPI anchors to remove ephrins from the cell surface. This treatment efficiently removed CD59 from the cell surface (used as a GPI-linked positive control) along with ephrins as revealed by the blocking of EphA2-Fc staining **(Figure S3B)**. Deletion of ephrin cell surface was associated with a significant decrease of EphA2-Fc-induced JRT3-MAU activation **(Figure 3E)**.

To further explore the role of ephrins in JRT3-MAU activation, we generated an EphA2 mutant that was unable to bind to ephrin ligands. During ligand binding, the EphA2 binding pocket residue R103 forms a salt bridge with E119 of the G-H loop of ephrinA1, which is described as a 'latch' to stabilise the binding facilitated by the hydrophobic interactions **(Figure S3C)**. Interestingly, ephrinA1 residue E119 is conserved in all A-ephrins. As exploited in previous studies, a mutant incorporating charge reversal of R103 to glutamic acid (R103E) was generated (in EphA2-Fc) in order to prevent binding to ephrins *via* electrostatic repulsion effects [19]. Expression levels, yield, SDS-PAGE migration and purity for EphA2^{R103E}-Fc were equivalent to the WT construct, and anti-EphA2 pAb bound to both WT and EphA2^{R103E}-Fc confirming that the R103E mutation had not compromised the natural conformation of EphA2 **(Figure S4A, S4B, and S4C)**. Next, the surface of JRT3-MAU and JRT3-LES were stained with the mutant to test the ability of EphA2^{R103E}-Fc to bind ephrins. In contrast to WT protein, EphA2^{R103E}-Fc failed to stain the surface of the JRT3 cells **(Figure 3F)**, suggesting that ephrin binding had been completely ablated. Consistent with this, EphA2^{R103E}-Fc failed to activate JRT3-MAU **(Figure 3G)**. This strongly implicates the presence of ephrins on the T cell surface as being essential for EphA2-induced, TCR-dependent activation of MAU, as a single specific amino acid substitution deep in the ephrin binding pocket completely abolished activation of JRT3-MAU by EphA2-Fc.

Having established the dependence of EphA2 recognition on both the MAU TCR and T cell-expressed ephrins, we determined whether these interactions took place on the same EphA2 molecule, or if they could be provided separately. To address this, we carried out plate-bound activation assays with either wild type EphA2 (hypothesised to bind both MAU TCR and ephrins), or with a combination of EphA4-Fc (able to bind the same ephrins as EphA2 but not MAU TCR), and EphA2^{R103E}-Fc (able to interact with the MAU TCR but not ephrins). This approach assumed that the MAU TCR does not bind in the ephrin binding pocket in a way that is dependent on R103. Whereas EphA2 activated JRT3-MAU as expected, the combination of EphA4-Fc and EphA2^{R103E}-Fc did not, despite a variety of ratios being used **(Figure 3H)**. This suggests that both ephrin and TCR interactions are required to take place on the same EphA2-Fc molecule for the initiation of signalling **(Figure S3D)**.

Selective mutagenesis of EphA2 ligand-binding domain (LBD) reveals a putative TCR binding site. Data described above suggested a binding site on the EphA2 molecule for the MAU TCR that was distinct from the site of Ephrin interaction. We used mutagenesis approaches to define a candidate binding site. Consistent with the premise that ephrin binding was essential for activation of JRT3-MAU by EphA2, deletion of the EphA2 LBD domain, the known site of ephrin interaction, abrogated activation of JRT3-MAU **(Figure 4A and B)** whereas yield and conformation of generated proteins remained the same **(Figure S4D, S4E, and S4F)**. However to determine if this domain was also critical for TCR interaction, we generated LBD domains swaps between EphA4 and EphA2 **(Figure 4C)**. Domain-swapped EphA2/A4 proteins bound cell surface ephrins similarly to the wild type protein matching their LBD domain **(Figure 4D)**. Whereas EphA4-Fc failed to activate JRT3-MAU, replacement of the EphA4 LBD with that of EphA2 conferred the ability to do so, and conversely EphA2 bearing the LBD of EphA4 failed to mediate JRT3-MAU activation **(Figure 4E)**. These results demonstrated that the most membrane-distal portion of EphA2, the LBD, was sufficient to confer TCR-dependent activation of JRT3-MAU, suggesting it was a site for direct TCR interaction.

To identify which region of the EphA2 LBD was involved in TCR binding, we selected multiple amino acids on EphA2 for mutation, based on several eligibility criteria related to preservation of EphA2 structural integrity, and avoiding interference with ephrin binding as well as EphA2 clustering effects (detailed in Supplemental Material). Combining these different criteria led to the selection of 18 candidate residues, which were grouped according to location into five distinct patches **(Figure 4F and Figure S5A, S5B, and S5C)**. However, based on inspection of these on the EphA2 structure, only patches 1, 2, 4 and 5 were confirmed as suitable for mutation (a total of 14 residues, **Figure 4F**), whereas patch 3 was excluded due to its close proximity to the Sushi domain **(Figure 4F, right)**. As expected, all mutants bound ephrins equivalently to WT EphA2-Fc **(Figure 4G)**, indicating correct folding. Importantly, patch mutants 1, 2 and 4 activated JRT3-MAU equivalently to WT EphA2, whereas EphA2^{PATCH5}-Fc failed to do so, with activation levels comparable to EphA4-Fc (**Figure 4H**). Hence, the area of EphA2 covered by the patch 5 mutant, which is distinct from that required for ephrin binding **(Figure 4I)**, is vital for the TCR-mediated activation of JRT3-MAU by EphA2. This therefore represents a putative ligand binding site for the MAU TCR.

Metabolic reprogramming of cancer cells upregulates expression of EphA2, and improves γδ TCR activation. Although EphA2 is a ubiquitous self protein, it is upregulated in both cancer and after HCMV infection, and therefore represented a plausible stress antigen for γδ T cells dually reactive to tumour cells and HCMV-infected targets. However the mechanism of EphA2 upregulation in these scenarios was unclear. We noted that both cancer cells and CMV-infected cells undergo metabolic rewiring upon cellular transformation [14,15]; furthermore, HCMV infection is thought to trigger a rapid overexpression of EphA2 during the first 24hrs post-infection [20]. We therefore hypothesized that metabolic rewiring in target cells may represent a stress signal sensed by the MAU Vδ2^{neg} γδ T cell specificity through the upregulation of EphA2. To test this, we investigated if reprogramming the metabolism of tumor cells may regulate the expression of EphA2. To switch cancer metabolism from aerobic glycolysis towards mitochondrial oxidative metabolism, we used different cellular models including glucose deprivation (Glucose is replaced by Galactose in cell culture media; Glu/Gal switch) [21], the pharmacological modulation of energy and nutrient sensor activities including AMP-activated protein kinase (AMPK) and Mammalian Target Of Rapamycin (mTOR) [22], and the upregulation of

ketone bodies by supplementing cell culture media with Li-Acetoacetate (mimetic of caloric restriction) [23]. To begin with, we confirmed that colonic HT29 and lung SKMES-1 cancer cell lines treated with Gal or AICAR (known AMPK activator) improved mitochondrial respiratory capacity as measured by polarography **(Figure S6)**. We observed that both Gal and AICAR treatments of HT29 and SKMES-1 cell lines increased basal and uncoupled respiratory rates, as well as maximal respiratory chain capacities (induced by uncoupler CCCP). We also performed unbiased quantitative proteomics analysis on whole cell lysates and observed that Gene Ontology (GO)-annotated "Metabolic pathways" is the most significant for both upregulated or down-regulated proteins (**Figure S7A and S7B**, respectively) in Gal and AICAR-treated HT29 cells, as well as in SKMES-1 cells. We further obtained insights on specific enriched metabolic pathways comprising this GO using the KEGG PATHWAY gene enrichment analysis **(Figure S7, right)**, and verified a significant increase in proteins involved in mitochondrial oxidative phosphorylation and a decrease in Glycolysis/Gluconeogenesis upon treatments (except for AICAR-treated HT29 cells showing both an increase of oxidative phosphorylation and Glycolysis). Therefore, both cell types underwent a broad metabolic reprogramming in response to Glu/Gal switch and AICAR treatments.

By applying the Glu/Gal switch to colon HT29 cell lines, we observed an increased membrane expression of stress antigen EphA2, in contrast to other tested γδ TCR antigens EPCR and CD1d **(Figure 5A)**. Of note, this effect is stable over time as still observed at day 6 post-reprogramming **(Figure 5B)**. Consistently, we observed a dose response increase of reactivity of transduced JRT3-MAU cells (as measured by CD69 expression) while increasing the number of target cells HT29 and SKMES-1 **(Figure 5C)**. Expression of EphA2 in HT29 cells is upregulated in response to Glu/Gal switch in contrast to SKMES-1 cells **(Figure S8A)**, and therefore, we noticed a two fold increased activation of JRT3-MAU cells when co-cultured with Gal-reprogrammed HT29 cells in contrast to SKMES-1 cells which did not upregulate EphA2 upon this treatment. The increase of JRT3-MAU activation mediated by Gal-treated HT29 cells was completely blocked by anti-EphA2 but not by anti-EPCR antibodies **(Figure 5D)**. Therefore, the upregulation of stress antigen EphA2 triggered by the metabolic reprogramming of cancer cells can translate to the magnitude of the JRT3-MAU immune response.

Energy sensor AMPK upregulates membrane expression of stress antigens and co-stimulators in cancer cells. This increase of EphA2 expression was mostly observed for colon cancer cell lines (HT29 and Caco2), in addition to hepatocarcinoma HUH-7 cells **(Figure S8A)**, but was not observed for lung SKMES-1 and glioblastoma U373 cells irrespective of metabolic reprogramming triggers they were exposed to. Besides the Glu/Gal switch, Metformin and AICAR also induced an increase of EphA2 expression **(Figure 5E and Figure 6A)**. Activation of AMPK is known to negatively regulate the activity of the nutrient sensor mTOR, but the mTOR pharmacologic inhibitor Rapamycin had no effect on membrane expression of ligands tested (**Figure 5F**). Finally, we observed that increasing ketone metabolism by supplementing HT29 cells with Li-Acetoacetate had no effect on expression of γδ TCR stress antigens EPCR and EphA2 (**Figure 5G**). AICAR-mediated reprogramming of HT29 cells recapitulated the increase of EphA2 using Glu/Gal switch **(Figure 6A)**, and max increase of EphA2 expression was reached at AICAR 500 μM **(Figure 6B)**.

The cancer metabolic reprogramming conditions found to upregulate expression of EphA2 (Glu/Gal switch and AMPK activators) shared the common feature of AMPK activation [24]. Together, these results suggested that energy sensor AMPK, independently of nutrient sensor mTOR, plays a crucial role in controlling expression of membrane EphA2. The direct role of AMPK was further confirmed using a highly specific and direct pharmacological activator 991 [25] that recapitulated a strong increase of EphA2 **(Figure 6C)**. Conversely, treatment of Gal-reprogrammed HT29 cells with AMPK inhibitor Compound C partially inhibited EphA2 **(Figure 6D)**. These results were reproduced for AICAR-reprogrammed HT29 cells **(Figure 6E)**. Finally, in addition to transformed cells, Gal and AICAR-treated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) displayed increased membrane expression of EphA2 which was completely abolished in AMPK α1/α2-double deficient MEFs **(Figure 6F)**. Furthermore, treatment of HT29 cells with AICAR and 991 (indirect and direct AMPK activators, respectively) increased by roughly two times total EphA2 protein expression as evidenced by immunostaining **(Figure 6G and Figure S8B)** and quantitative label free proteomics analysis in Gal and AICAR-treated HT29 cells **(Figure 6H)**. As control**,** this increase was not observed for SKMES-1

cells. Finally, an increased *EPHA2* gene expression was measured by qRT-PCR in Gal-and AICAR-treated HT29 cells **(Figure 6I)**, along with *GLUT1* used as positive control. Therefore, AMPK signaling controls the expression of EphA2 at the transcriptional level to further increase protein expression at the cell surface, and promotes MAU γδ TCR signaling.

DISCUSSION

Human Vδ2^{neg} γδ T cells exploit both innate and adaptive features, a duality that has been compellingly demonstrated in the response to CMV [5,26,27]. Through this ability to carry out lymphoid stress surveillance, they contribute to immune responses against tumors and infections [11,28]. The mechanisms underpinning these functions are poorly defined, but hold promise for defining novel immunotherapeutic approaches targeted at malignancy and viral infection. We have previously reported that human Vδ2^{neg} γδ T cells display a dual reactivity against tumor and CMV-infected cells, through the recognition of a complex array of stress signals including TCR-recognized molecules, co-stimulatory/inhibitory and adhesion molecules, and soluble innate inflammatory molecules including IL-18 [12,11]. The magnitude of these signals collectively fine-tunes the γδ T cell-mediated immune outcome towards tissue repair, viral clearance or tumor control [29]. However, the role of the γδ TCR in the process, while important, is poorly defined.

Few molecules have been proposed as direct ligands for Vδ2^{neg} γδ TCRs, including CD1d, EPCR, Annexin A2, PE and MICA/B. Here we identify EphA2 as a new antigen for the γδ TCR, one that is expressed on solid tumour cells and CMV-infected cells. EphA2, which belongs to the largest family of receptor tyrosine kinases in humans, regulates a broad range of cellular functions including mobility, adhesion, and reorganization of actin filaments, and is also instrumental in maintaining epithelial integrity [30]. Although it is constitutively expressed at low levels on various tissues including normal epithelial and endothelial cells, it is overexpressed in a wide range of tumor cells, associated with altered signal transduction and epithelial to mesenchymal transition, and is believed to be involved in different stages of carcinogenesis [31]. Although EphA2 is a cancer therapeutic target in its own right [32], these properties also distinguish it as a plausible target of Vδ2^{neg} γδ T cell-mediated stress surveillance. Unlike all endogenously encoded ligands for Vδ2^{neg} TCRs identified to date, EphA2 is non-MHC-like and structurally very different from MHC molecules, highlighting the potential of Vδ2^{neg} γδ T cells to recognise diverse ligands.

The specific molecular requirements for EphA2-mediated activation that we identify define a distinct recognition mode relative to other γδ TCR ligands. Although non-MHC-like, EphA2 stimulation of γδ T cell activation was dependent on the MAU TCR, with TCR hybrid experiments strongly implicating the MAU TCR γ chain and TCR δ CDR3 loop as important determinants of EphA2 recognition. However, TCR/EphA2 interaction was not sufficient for EphA2-mediated activation, because the presence of ephrins on the T cell surface, and their cognate interaction with EphA2 on the target cell, was also essential. Notably, αβ T cells typically express either CD4 or CD8 proteins on the surface, which stimulate the sensitivity of antigen recognition by acting as co-receptors that engage the same MHC molecule as the TCR. While γδ T cells often lack expression of CD4/8 at the cell surface, consistent with recognition of non-MHC ligands such as EphA2, the requirement for co-receptors in γδ TCR-mediated recognition has not previously been shown. However, our finding that MAU activation depended upon single EphA2 molecules bearing both a putative TCR binding site and a viable ephrin interaction site suggests that ephrins are likely to act as true co-receptors for the MAU TCR, in a tripartite interaction. For αβ T cell recognition, the TCR/MHC interaction is generally in the 1-50μM range, while the coreceptor/MHC interactions, particularly CD4/class II MHC, are thought to be considerably weaker (100μM-mM range). Conversely, we failed to observe direct binding between MAU TCR and EphA2, suggestive of a weak TCR/ligand interaction, however the nanomolar affinity of the coreceptor Ephrin/EphA2 interaction is likely to provide compensation. Nevertheless, despite the unconventional nature of the MAU TCR/Ephrin/EphA2 complex, our results on ZAP70 and CD3ζ phosphorylation suggest it is capable of triggering well established T cell signalling pathways activated by TCR/MHC and CD4/8/MHC interactions. In keeping with a co-receptor role, Ephrins have been shown to associate with the Src family kinases Lck (analogous to CD4 and CD8) and Fyn [18], which are key to the initiation of the TCR signalling cascade [33]. Consequently, the MAU specificity senses dysregulated self by expressing the cognate ligand of a tumour-associated, high-affinity counter-receptor, with the TCR

playing the role of a low affinity but critical adapter in a tripartite complex that is essential for the initiation of TCR triggering.

While the list of stress antigens is expanding, it remains crucial to understand the stress signaling pathways associated with disturbed epithelial target cells that control protein expression or recognition modalities of these antigens. Because EphA2 is upregulated on tumors and HCMV-infected cells [20], and because metabolic rewiring is a common feature of cancer cells and HCMV-infected cells, we decided to investigate whether cell metabolism may influence EphA2 expression. Once activated by energy depletion via a mechanism that detects increases in AMP/ATP and ADP/ATP ratios, AMPK can restore energy homeostasis by switching on catabolic pathways that generate ATP, while switching off energy demanding processes including anabolic pathways required for proliferation [34]. We demonstrate here that increased AMPK activity in both non-transformed fibroblasts and cancer cells upregulates expression of EphA2 (but not EPCR or CD1d) at the plasma membrane which in turn enhanced γδ TCR immune signaling and cytotoxicity against these cells. AMPK-induced expression of EphA2 does not seem to depend on mTOR signaling, and it is persistent over time suggesting it might foster conditions for a potent and long lasting immune response *in vivo*, useful in cancer immunotherapy protocols. As for now, recent research focusing on cancer metabolism has led to meaningful insights into how cancer cells particularly adapt to strong environmental constraints to sustain survival and rapid proliferation. In the light of our results, it is tempting to speculate that metabolic reprogramming which occurs in most cancer cells upon cellular transformation might lead in some extent and cell-types to escape immune surveillance, since remodelling of Warburg-like cancer metabolism we report here improves the γδ T cell response. This concept might have implications for conventional αβ T cells as well. Besides, HCMV-infected cells (also recognized by $V\delta2^{neg}$ γδ T cells) overexpress EphA2 and the AMPK-α2 catalytic subunit is consistently increased in these cells [20]. Therefore, beyond its role in maintaining energy homeostasis, this work extends the role of AMPK to immunomodulation of the γδ T cell response and potentially others; such effects may help explain (among other mechanisms) why well-known AMPK-stimulating drugs (Salicylate and Metformin) provide protection against cancer in mice models and Metformin-treated patients with Type 2 Diabetes [35].

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Generation of cells transfected to express EphA2, TCRs, and CD69 assay. First, cDNA encoding EphA2 or the Vγ and Vδ TCR chains of the MAU (Vγ9Vδ1) T cell clones, or other clones was amplified by RT-PCR and subcloned into pCR2.1 (TA Cloning Kit, Invitrogen). Then, the cDNA was ligated into the lentiviral vector TEEW in which cDNA was under the control of the promoter EF1α and lentiviral particles were produced by transient transfection of packaging 293T cells as described. Viral titers were determined by enzyme-linked immunosorbent assay of p24. All this was done in the lentiviral vector production facility of SFR TransBioMed. Tumor cell lines were transduced with lentiviral particles expressing EphA2, and JRT3 cells (American Type Culture Collection) were cotransduced with lentiviral particles expressing one Vγ TCR chain and particles expressing one Vδ TCR chain. This was done at a multiplicity of infection of 2, 4 or 8 in RPMI medium with 8% FCS and 8 μg/ml protamine sulfate (Sigma). After 24 h of infection, cells were washed twice and, if necessary, $EphA2^+$ or TCR^+ cells were sorted by flow cytometry (FACSAria and FACSDiva 6.1.2 software; BD Biosciences). Activation of JRT3 cells transduced to express TCRs was assessed by expression of CD69, done as for T cell clones but for 4 h at 37 °C, and by staining with fluorescein isothiocyanate–conjugated mAb to CD2 (39C1.5; Beckman Coulter) and phycoerythrin-indodicarbocyanine–conjugated anti-CD69 (TP1.55.3; Beckman Coulter) with analysis on a FACSCanto (BD Biosciences).

Metabolic reprogramming of cancer cells. Human cancer cell lines, specifically colonic carcinoma lines (HT29, CaCO2), a hepatocarcinoma line (HuH-7), and a lung carcinoma (SKMES) were cultured in DMEM medium (Gibco) supplemented with 8 % fetal bovin serum (FBS). For metabolic reprogramming, tumor cells were cultured for 72 hrs in galactose medium (DMEM no glucose, 8% FBS, Galactose 10 mM, HEPES 10 mM, Na-Pyruvate and Glutamine); or RPMI medium supplemented with AICAR (Sigma), Metformine (R&D systems), Rapamycin (Cell Signaling), or Li-Acetoacetate (Sigma). Expression of membrane ligands were measured in healthy DAPI positive cells. For co-culture experiments, reprogrammed target cells were stained with CFSE (Invitrogen) and mixed with

5×10^5 cells per well during 4 hrs at 37°C. Then, JRT3 activation was measured using membrane CD69 staining in CFSE negative populations.

Statistical Analysis. Most data were presented as the mean ± SD from at least three independent experiments. Statistical comparisons between different treatments were performed by unpaired t test, where $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CH, SPJ, CD, CM, TB, VP, AP, LC, SN, EO, OH, CW performed experiments and analysed data; SC, RR, JFM, helped design the study; BV, provided biological materials; LL, edited the manuscript; FM, BW, BF, JDM, designed the study, analysed data and wrote the manuscript.

AKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the support of Agence Nationale de la Recherche (GDSTRESS), Fondation pour la Recherche Médicale (DEQ20110421287), INCa-Cancéropôle GSO, Ligue contre le Cancer de la Dordogne et Landes, the Conseil Régional d'Aquitaine, and SIRIC BRIO. We thank the FR TransBioMed vectorology facility, and Plateforme de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux; the Birmingham FT-ICR Mass Spectrometry facility, with equipment obtained through the "Birmingham Science City Translational Medicine: Experimental Medicine Network of Excellence" project, with support from Advantage West Midlands, the University of Birmingham Protein Expression Facility. BW, CW, SJ and FM were supported by a Wellcome Trust Investigator award to BW (Grant reference number: 099266/Z/12/Z), and SJ was additionally supported by a Medical Research Council PhD studentship.

REFERENCES

1. Chien, Y., Meyer, C. & Bonneville, M. γδ T cells: first line of defense and beyond. *Annu. Rev. Immunol.* **32,** 121–155 (2014).
2. Wilhelm, M. *et al.* Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. *Blood* **102,** 200–206 (2003).
3. Lafarge, X. *et al.* Cytomegalovirus infection in transplant recipients resolves when circulating gammadelta T lymphocytes expand, suggesting a protective antiviral role. *J. Infect. Dis.* **184,** 533–541 (2001).
4. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat. Med.* **21,** 938–945 (2015).
5. Khairallah, C., Déchanet-Merville, J. & Capone, M. γδ T Cell-Mediated Immunity to Cytomegalovirus Infection. *Front. Immunol.* **8,** 105 (2017).
6. Pitard, V. *et al.* Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* **112,** 1317–1324 (2008).
7. Ehl, S. *et al.* A variant of SCID with specific immune responses and predominance of gamma delta T cells. *J. Clin. Invest.* **115,** 3140–3148 (2005).
8. Vermijlen, D. *et al.* Human cytomegalovirus elicits fetal gammadelta T cell responses in utero. *J. Exp. Med.* **207,** 807–821 (2010).
9. Halary, F. *et al.* Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **201,** 1567–1578 (2005).
10. Couzi, L. *et al.* Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* **21,** 181–188 (2010).
11. Willcox, C. R. *et al.* Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human γδ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. *Nat. Immunol.* **13,** 872–879 (2012).
12. Guerville, F. *et al.* TCR-dependent sensitization of human γδ T cells to non-myeloid IL-18 in cytomegalovirus and tumor stress surveillance. *Oncoimmunology* **4,** e1003011 (2015).
13. Marlin, R. *et al.* Sensing of cell stress by human γδ TCR-dependent recognition of annexin A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2017). doi:10.1073/pnas.1621052114
14. Schulze, A. & Harris, A. L. How cancer metabolism is tuned for proliferation and vulnerable to disruption. *Nature* **491,** 364–373 (2012).
15. Munger, J. *et al.* Systems-level metabolic flux profiling identifies fatty acid synthesis as a target for antiviral therapy. *Nat. Biotechnol.* **26,** 1179–1186 (2008).

16. Terry, L. J., Vastag, L., Rabinowitz, J. D. & Shenk, T. Human kinome profiling identifies a requirement for AMP-activated protein kinase during human cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 3071–3076 (2012).
17. Coulthard, M. G. *et al.* Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. *Am. J. Pathol.* **181,** 1493–1503 (2012).
18. Holen, H. L. *et al.* Signaling through ephrin-A ligand leads to activation of Src-family kinases, Akt phosphorylation, and inhibition of antigen receptor-induced apoptosis. *J. Leukoc. Biol.* **84,** 1183–1191 (2008).
19. Himanen, J. P. *et al.* Ligand recognition by A-class Eph receptors: crystal structures of the EphA2 ligand-binding domain and the EphA2/ephrin-A1 complex. *EMBO Rep.* **10,** 722–728 (2009).
20. Weekes, M. P. *et al.* Quantitative temporal viromics: an approach to investigate host-pathogen interaction. *Cell* **157,** 1460–1472 (2014).
21. Rossignol, R. *et al.* Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* **64,** 985–993 (2004).
22. Hardie, D. G. AMP-activated protein kinase: maintaining energy homeostasis at the cellular and whole-body levels. *Annu. Rev. Nutr.* **34,** 31–55 (2014).
23. Shukla, S. K. *et al.* Metabolic reprogramming induced by ketone bodies diminishes pancreatic cancer cachexia. *Cancer Metab.* **2,** 18 (2014).
24. Jose, C., Melser, S., Benard, G. & Rossignol, R. Mitoplasticity: adaptation biology of the mitochondrion to the cellular redox state in physiology and carcinogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **18,** 808–849 (2013).
25. Xiao, B. *et al.* Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat. Commun.* **4,** 3017 (2013).
26. Davey, M. S. *et al.* Clonal selection in the human Vδ1 T cell repertoire indicates γδ TCR-dependent adaptive immune surveillance. *Nat. Commun.* **8,** 14760 (2017).
27. Ravens, S. *et al.* Human γδ T cells are quickly reconstituted after stem-cell transplantation and show adaptive clonal expansion in response to viral infection. *Nat. Immunol.* **18,** 393–401 (2017).
28. Scheper, W. *et al.* γδT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT cross-recognize CMV and leukemia. *Leukemia* **27,** 1328–1338 (2013).
29. Vantourout, P. & Hayday, A. Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* **13,** 88–100 (2013).
30. Pasquale, E. B. Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **10,** 165–180 (2010).
31. Tandon, M., Vemula, S. V. & Mittal, S. K. Emerging strategies for EphA2 receptor targeting for cancer therapeutics. *Expert Opin. Ther. Targets* **15,** 31–51 (2011).
32. Mercurio, F. A. *et al.* Targeting EphA2-Sam and Its Interactome: Design and Evaluation of Helical Peptides Enriched in Charged Residues. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* (2016). doi:10.1002/cbic.201600413
33.Salmond, R. J., Filby, A., Qureshi, I., Caserta, S. & Zamoyska, R. T-cell receptor proximal signaling via the Src-family kinases, Lck and Fyn, influences T-cell activation, differentiation, and tolerance. *Immunol. Rev.* **228,** 9–22 (2009).
34. Hardie, D. G., Ross, F. A. & Hawley, S. A. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13,** 251–262 (2012).
35. Franciosi, M. *et al.* Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. *PloS One* **8,** e71583 (2013).

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Vγ9Vδ1 TCR MAU recognizes a wide spectrum of cancer cells, this is blocked by the generation of 6G8 mAb. (A) Co-culture of MAU clone expressing Vγ9Vδ1 TCR with cancer cells for 24 hrs, and then TNFα secretion was measured by ELISA. (B) JRT3-expressing MAU or LES γδ TCRs (Vγ9Vδ1 or Vγ4Vδ5) were co-cultured for 4 hrs with various cancer cell lines, and membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (C) Indicated cancer cells were stained with generated 6G8 or control mAbs, and membrane expression was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (D) JRT3-MAU were co-cultured with cancer cells in the presence or not of 6G8 or control mAbs for 4 hrs and membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (E) JRT3-LES were incubated with anti-CD3 antibody as control, or co-cultured with either HT29 cells or HT29-transduced EPCR for 4 hrs in the presence or not of 6G8 or 2E9 mAbs, and membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). For flow

cytometry experiments, data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells).

Figure 2: EphA2 is a ligand of MAU TCR. (A) 6G8- cells K562 and Daudi, or 6G8+ cells Hela and U373 were surface biotinylated, lysed, and incubated with IgG or 6G8-streptavidin conjugated mAbs. Immunoprecipitates were washed and eluted before separation by SDS-PAGE and detection with streptavidin-HRP. (B) Large-scale 6G8 immunoprecipitates were digested with Trypsin, and analysed by Fourier Transform-ion-cyclotron resonance (FT-ICR) mass spectrometry. Ten peptides were identified from the protein EphA2. (C) U373 cells were stained with anti-EphA2, or with 6G8 in the presence or not of anti-EphA2 (NT; not treated with anti-EphA2 mAb). (D) JRT3-MAU or JRT3-LES were co-cultured with HT29 for 4 hrs in the presence or not of 6G8, anti-EphA2 or anti-EPCR antibodies. Membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (E) 6G8 immunoprecipitates from HUTU80 and Daudi cells were immunoblotted using commercial EphA2 mAb. (F) Non adherent or adherent cancer cells were transduced with either GFP or EphA2, and co-cultured with JRT3-MAU for 4 hrs. Membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (G) JRT3-MAU (Vγ9Vδ1) or JRT3-LES (Vγ4Vδ5) were incubated with plate-bound anti-αCD3 antibody, or EphA2-Fc, or EphA4-Fc recombinant proteins; or (H) JRT3-MAU cells were incubated with other plate-bound Ephrin-Fc recombinant proteins (10 μg/ml) as indicated for 4 hrs at 37°C, or co-cultured with GFP or EphA2-transduced 721.221 cancer cells. Membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). For flow cytometry experiments, data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells).

Figure 3: Interaction between EphA2 and ephrinA1 is necessary for Vγ9Vδ1 TCR activation. (A) GFP or EphA2-transduced 721.221 cells were co-cultured with JRT3-MAU for 4 hrs in the presence or not of anti-Vγ9 or anti-Vδ1 mAbs. Membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (B) JRT3-MAU cells were incubated with plate-bound anti-CD3 antibody or EphA2-Fc recombinant proteins (10 μg/ml) for up to 30 min at 37°C, lysed after indicated timing and analysed by western-blots using anti-phospho CD3ζ, or anti-phospho ZAP70, or anti-Actin antibodies. (C) Chimeric JRT3 transduced with various Vγ or Vδ chains from MAU (Vγ9Vδ1), or PIN (Vγ8Vδ1), or LES (Vγ4Vδ5) TCRs were co-cultured with GFP or EphA2-transduced 721.221 cancer cells for 4 hrs. Membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). For flow cytometry experiments, data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells). (D) JRT3-WT (wild type), or JRT3-MAU, or JRT3-LES cells were immunostained with primary anti-ephrins or isotype control (grey); and then with secondary antibody IgG-PE. Expression of ephrins was measured by flow cytometry. (E) JRT3-MAU cells were treated or not with PIPLC at indicated concentrations for 5 hrs at 37°C, and then incubated or not with either anti-CD3, or Fc-tagged ephrin receptors (10 μg/ml), and membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry after 4 hrs using Mean Fluorescence Intensity (MFI) +/- SD (*n*=3). (F) Fc-tagged wild-type EphA2 or R103E mutant EphA2 were used to stain either JRT3-MAU or JRT3-LES cells, and cellular binding was detected using an AF488 conjugated goat anti-human Fc secondary antibody (Representative, *n*=3). (G) Fc-tagged ephrin receptors were immobilised on a 96-well plate and incubated with JRT3-MAU cells for 4 hrs, and membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry and Mean Fluorescence Intensity (MFI) quantified. (H) Wild type EphA2-Fc, EphA4-Fc, or various ratios of mutant EphA2R103E-Fc:EphA4-Fc were coated onto a 96 well plate and incubated with JRT3-MAU cells for 4 hrs, and activation was measured by CD69 upregulation with Mean Fluorescence Intensity (MFI) +/- SD (*n*=3).

Figure 4: Putative MAU-TCR binding site in the LBD domain of EphA2. (A) Schematic representation of EphA2WT and EphA2ΔLBD constructs with construct boundaries. (B) Fc-tagged ephrin receptors were bound to a 96-well plate and incubated with JRT3-MAU cells for 4 hrs. Activation was measured by CD69 upregulation as mean +/- SD (n=3). (C) Schematic representation of the EphA2 domain-swap mutants; residue numbers represent construct boundaries. Domains are coloured based on their source protein; blue = EphA2 and red = EphA4. (D) JRT3-MAU cells were stained with Fc-

tagged ephrin receptors, which were detected using an AF488 conjugated goat anti-human Fc secondary antibody. Equivalent staining was demonstrated between each domain-swap mutant and the WT equivalent (Representative, *n*=3). (E) Fc-tagged ephrin receptors were immobilised on a 96-well plate and incubated with JRT3-MAU cells for 4 hrs. Activation was measured by CD69 upregulation as mean +/- SD (n=3). (F) Ribbon representation of the EphA2-LBD structure. Potential EphA2 residues selected for mutation have been mapped (highlighted in stick format), and grouped into patches. Molecular surface representation of the EphA2/ephrinA5 complex (PDB code 2X11). Surface patches to be mutated are highlighted in green, and residues involved in stabilising the Epha2-ephrin5 interface or in the formation of EphA2 clustering complexes shown in yellow (right). (G) Fc-tagged ephrin receptors were used to stain JRT3-MAU cells, which were detected using an AF488 conjugated goat anti-human Fc secondary antibody. All patch mutants stain JRT3-cells equivalently to the WT construct. (H) Fc-tagged ephrin receptors were immobilised on a 96-well plate and incubated with JRT3-MAU cells for 4 hrs. Activation was measured by CD69 upregulation as mean +/- SD (n=3). (I) Zoomed view shows EphA2^{PATCH5} mutant residues in stick format. Despite their proximity to the EphA2/ephrin binding pocket, these residues are not involved in binding to ephrins.

Figure 5: Glu/Gal-induced metabolic reprogramming of cancer cells upregulates membrane expression of EphA2, and promotes γδ T cell response. (A) Human HT29 colon cancer cells were cultured for 72 hrs or 6 days (B) either in glucose (Glu) or galactose (Gal) media, then immunostained with primary specific antibodies that recognize stress antigens as indicated or with control isotypes (Iso1 for EPCR and EphA2; Iso2 for CD1d). Flow cytometry histograms are depicted for EphA2 expression in Glu vs Gal media, and appropriate isotype. (C) Various amounts of colon HT29 or lung SKMES-1 cancer cells were cultured in either glucose media (Glu) or galactose media (Gal) for 72 hrs, and then co-cultured with JRT3-MAU for 4 hrs. Membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (D) Glu- or Gal-cultured HT29 cancer cells were then co-cultured for 4 hrs with JRT3-MAU in the presence or not of anti-CD3 or blocking antibodies specific to ligands (10 μg/ml) as indicated. Membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (E) HT29 cancer cells were cultured for 72 hrs either in glucose (Glu), or Glu+Metformine (Met, 50 mM), or (F) Glu+Rapamycin (Rapa, 20 nM), or (G) in Glu+Li-Acetoacetate (LiA, 10 mM) media. Cells were immunostained with primary specific antibodies that recognize stress antigens as indicated, or with IgG control. Membrane expression of ligands was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). Flow cytometry data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells). MFI as mean +/- SD (n=3) $^{\star}p<0.05$.

Figure 6: AMPK activity in cancer cells upregulates membrane expression of stress antigen EphA2. (A) HT29 cancer cells were cultured for 72 hrs either in glucose (Glu), or Glu+AICAR (500 μM) media, and membrane ligands were immunostained with specific primary antibodies. Flow cytometry histograms are depicted to the right. Membrane expression of ligands was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (B) HT29 colon cancer cells were cultured for 72 hrs either in glucose (Glu) or Glu in the presence of various concentrations of AICAR (mM) as indicated, then immunostained with anti-EphA2 antibody. Membrane expression of EphA2 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI), and fold increase of Glu+AICAR vs Glu was reported. (C) 991-cultured, or (D) Glu/Gal-cultured, or (E) AICAR-cultured HT29 cancer cells for 72 hrs in the presence or not of Compound C (20 nM). Then, cells were immunostained with specific primary antibodies and membrane expression of ligands was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (F) WT or AMPK $\alpha1^{-/-}/\alpha2^{-/-}$ MEFs were cultured for 72 hrs either in glucose (Glu), or Gal, or Glu+AICAR (500 μM) media. Cells were then immunostained with either anti-EphA2 or Isotype control (Iso) antibodies, and membrane expression was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). Data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells). (G) HT29 cancer cells were cultured for 72 hrs either in glucose (Glu) or Glu+AICAR and then permeabilized or not to measure membrane or total expression of EphA2 by immunostaining, or with control isotype in both conditions (Iso1 and Iso2). Expression was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI).

(H) HT29 or SKMES-1 cancer cells were cultured for 72 hrs either in glucose (Glu) or Glu+AICAR, and then cell lysates were submitted to label free proteomics. Fold increase of total EphA2 protein expression was determined (vs Glucose), and mean of 3 independent experiments is reported with p-values. NV; no variation. (I) HT29 cancer cells were cultured for 72 hrs either in glucose (Glu), or Gal, or Glu+AICAR media, and submitted to qRT-PCR to measure *GLUT1* and *EPHA2* gene expression. MFI or fold change of normalized mRNA levels are reported as mean +/- SD (n=3) $^{\star}p<0.05$.

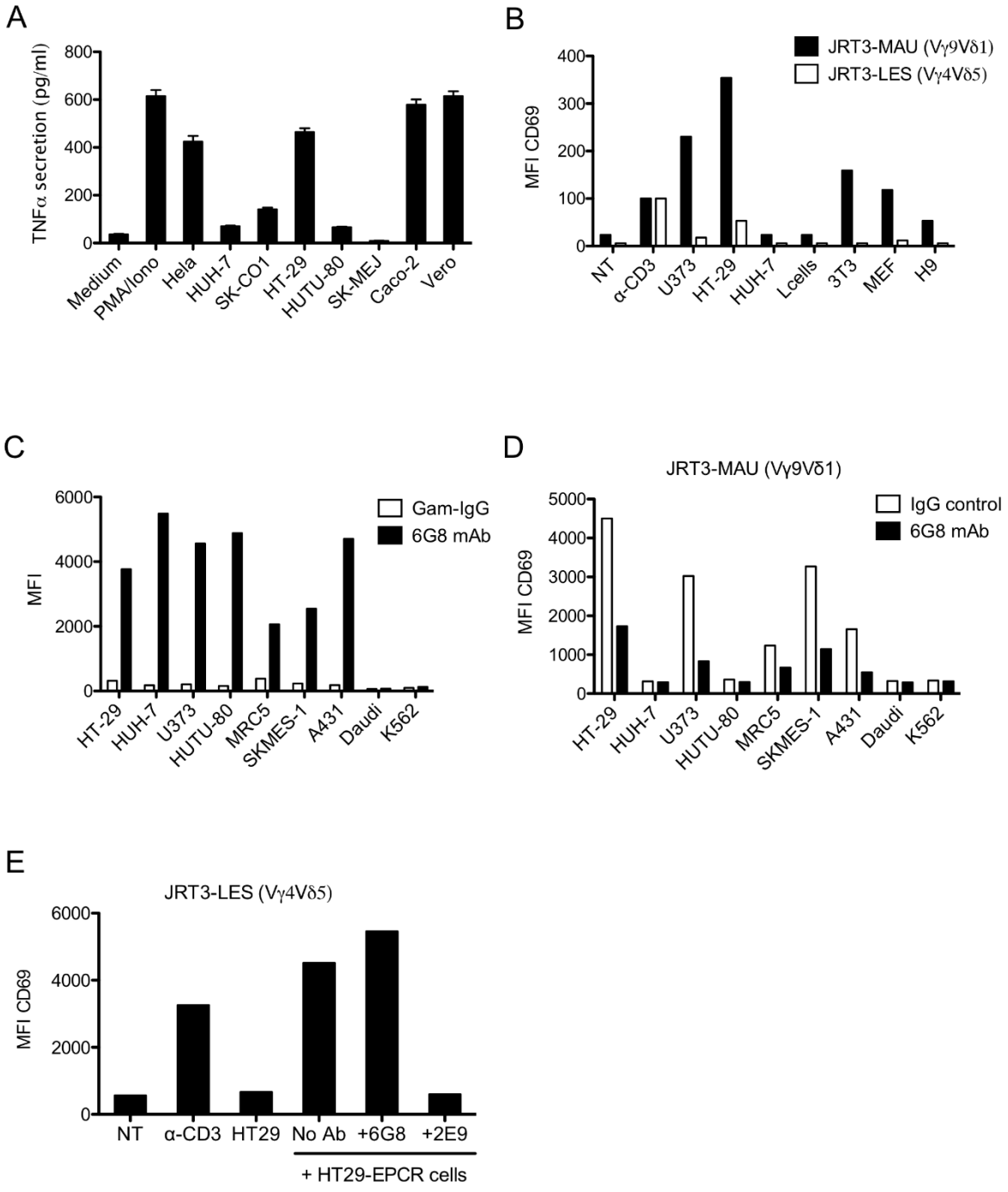

A
TNFα secretion (pg/ml)
800
600
400
200
0
Medium
PMA/Iono
Hela
HUH-7
SK-CO1
HT-29
HUTU-80
SK-MEJ
Caco-2
Vero
B
JRT3-MAU (Vγ9Vδ1)
JRT3-LES (Vγ4Vδ5)
MFI CD69
400
300
200
100
0
NT
α-CD3
U373
HT-29
HUH-7
Lcells
3T3
MEF
H9
C
MFI
6000
4000
2000
0
Gam-IgG
6G8 mAb
HT-29
HUH-7
U373
HUTU-80
MRC5
SKMES-1
A431
Daudi
K562
D
JRT3-MAU (Vγ9Vδ1)
MFI CD69
5000
4000
3000
2000
1000
0
IgG control
6G8 mAb
HT-29
HUH-7
U373
HUTU-80
MRC5
SKMES-1
A431
Daudi
K562
E
JRT3-LES (Vγ4Vδ5)
MFI CD69
6000
4000
2000
0
NT
α-CD3
HT29
No Ab
+6G8
+2E9
+ HT29-EPCR cells

Figure 1

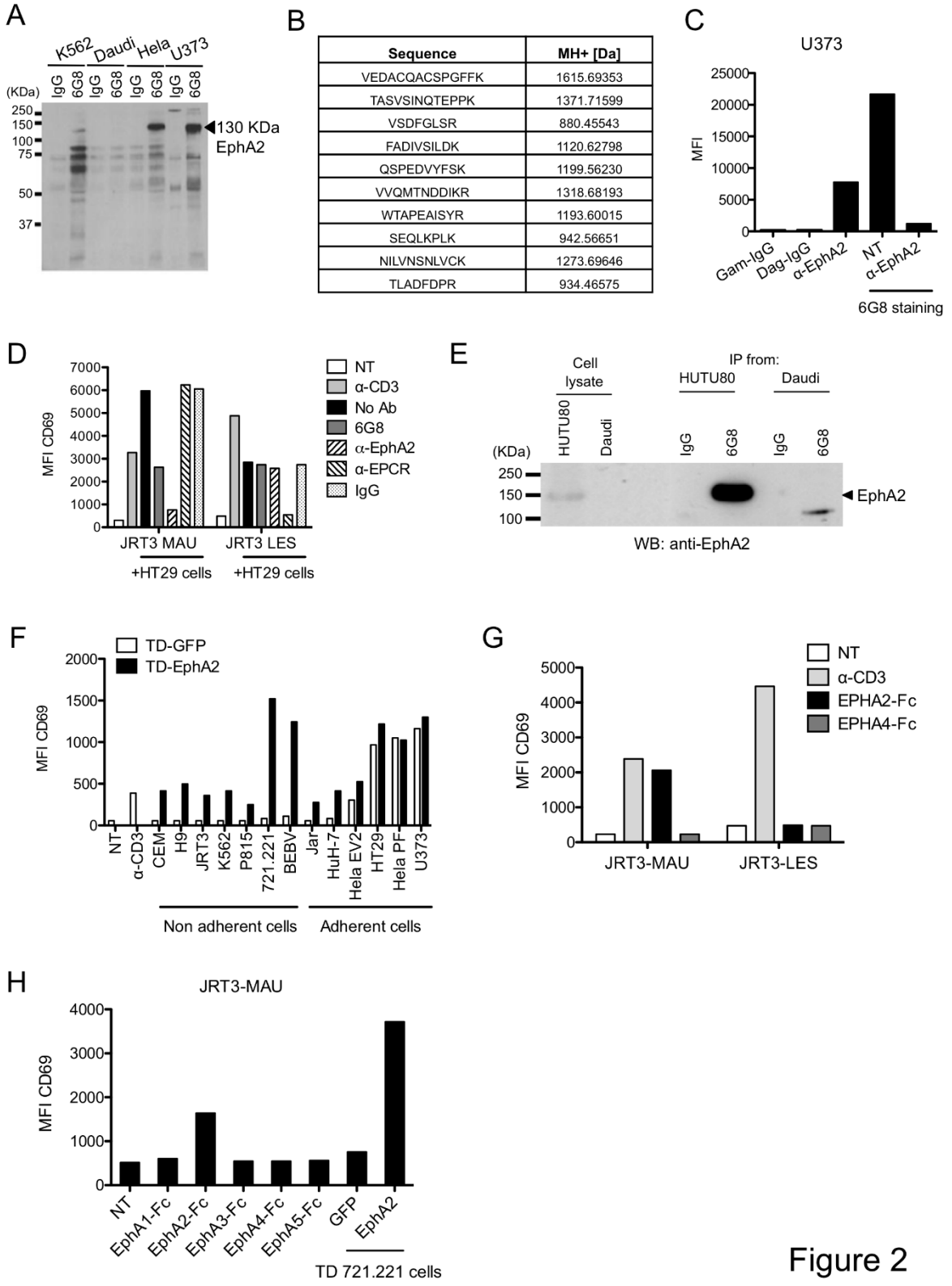

A
K562
Daudi
Hela
U373
IgG
6G8
(KDa)
250
150
100
75
50
37
130 KDa
EphA2
B
Sequence
MH+ [Da]
VEDACQACSPGFFK 1615.69353
TASVSINQTEPPK 1371.71599
VSDFGLSR 880.45543
FADIVSILDK 1120.62798
QSPEDVYFSK 1199.56230
VVQMTNDDIKR 1318.68193
WTAPEAISYR 1193.60015
SEQLKPLK 942.56651
NILVNSNLVCK 1273.69646
TLADFDPR 934.46575
C
U373
MFI
25000
20000
15000
10000
5000
0
Gam-IgG
Dag-IgG
α-EphA2
NT
α-EphA2
6G8 staining
D
MFI CD69
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
NT
α-CD3
No Ab
6G8
α-EphA2
α-EPCR
IgG
JRT3 MAU
JRT3 LES
+HT29 cells
+HT29 cells
E
Cell lysate
IP from:
HUTU80
Daudi
HUTU80
Daudi
IgG
6G8
IgG
6G8
(KDa)
250
150
100
EphA2
WB: anti-EphA2
F
TD-GFP
TD-EphA2
MFI CD69
2000
1500
1000
500
0
NT
α-CD3
CEM
H9
JRT3
K562
P815
721.221
BEBV
Jar
HuH-7
Hela EV2
HT29
Hela PF
U373
Non adherent cells
Adherent cells
G
NT
α-CD3
EPHA2-Fc
EPHA4-Fc
MFI CD69
5000
4000
3000
2000
1000
0
JRT3-MAU
JRT3-LES
H
JRT3-MAU
MFI CD69
4000
3000
2000
1000
0
NT
EphA1-Fc
EphA2-Fc
EphA3-Fc
EphA4-Fc
EphA5-Fc
GFP
EphA2
TD 721.221 cells

Figure 2

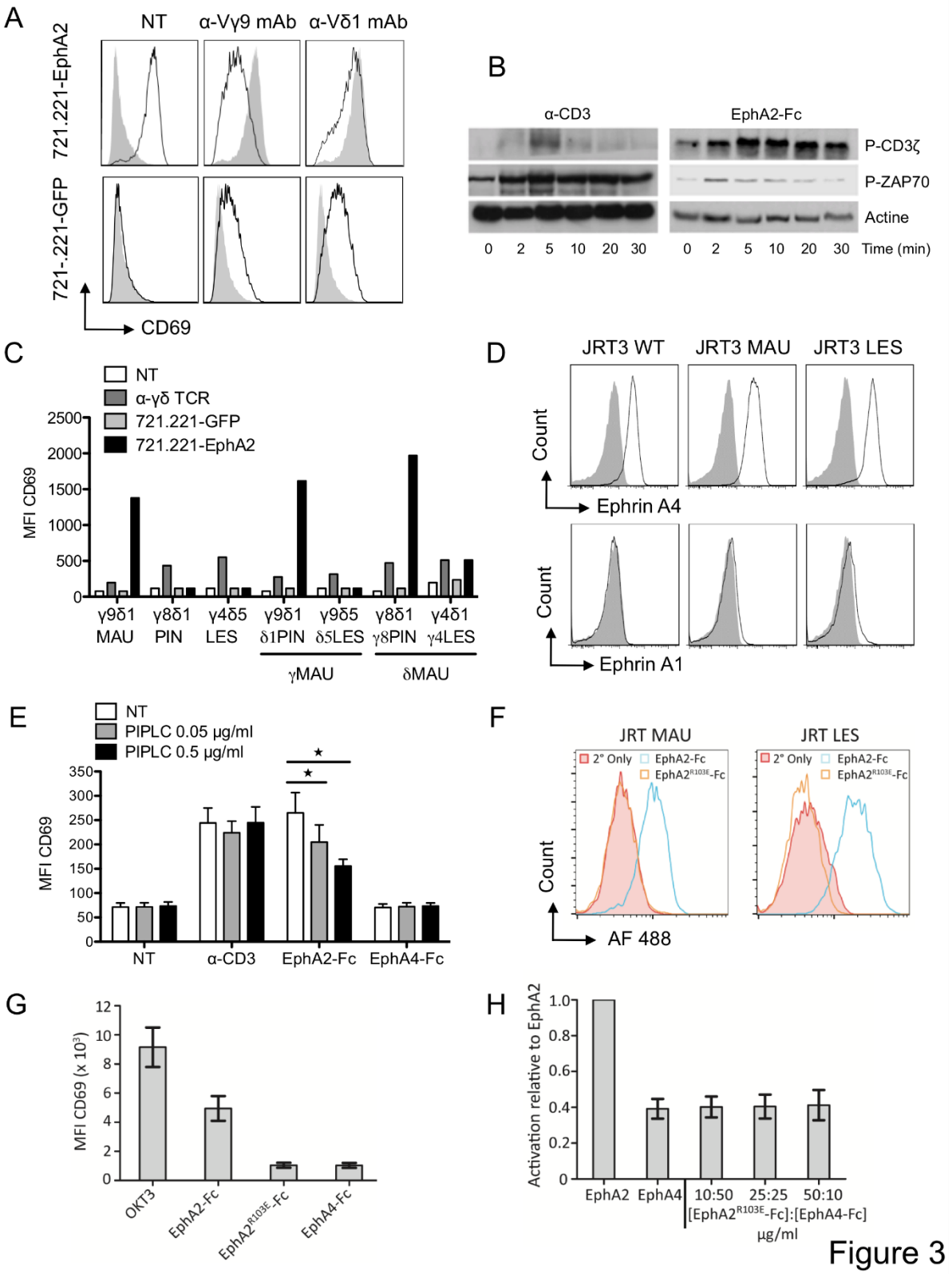

A
NT
α-Vγ9 mAb
α-Vδ1 mAb
721.221-EphA2
721-.221-GFP
CD69
B
α-CD3
EphA2-Fc
P-CD3ζ
P-ZAP70
Actine
0 2 5 10 20 30
0 2 5 10 20 30 Time (min)
C
NT
α-γδ TCR
721.221-GFP
721.221-EphA2
MFI CD69
2500
2000
1500
1000
500
0
γ9δ1 MAU
γ8δ1 PIN
γ4δ5 LES
γ9δ1 δ1PIN
γ9δ5 δ5LES
γ8δ1 γ8PIN
γ4δ1 γ4LES
γMAU
δMAU
D
JRT3 WT
JRT3 MAU
JRT3 LES
Count
Ephrin A4
Count
Ephrin A1
E
NT
PIPLC 0.05 µg/ml
PIPLC 0.5 µg/ml
MFI CD69
350
300
250
200
150
100
50
0
NT
α-CD3
EphA2-Fc
EphA4-Fc
F
JRT MAU
JRT LES
2° Only
EphA2-Fc
EphA2R103E-Fc
Count
AF 488
G
MFI CD69 (x 10³)
12
10
8
6
4
2
0
OKT3
EphA2-Fc
EphA2R103E-Fc
EphA4-Fc
H
Activation relative to EphA2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
EphA2
EphA4
10:50
25:25
50:10
[EphA2R103E-Fc]:[EphA4-Fc]
µg/ml

Figure 3

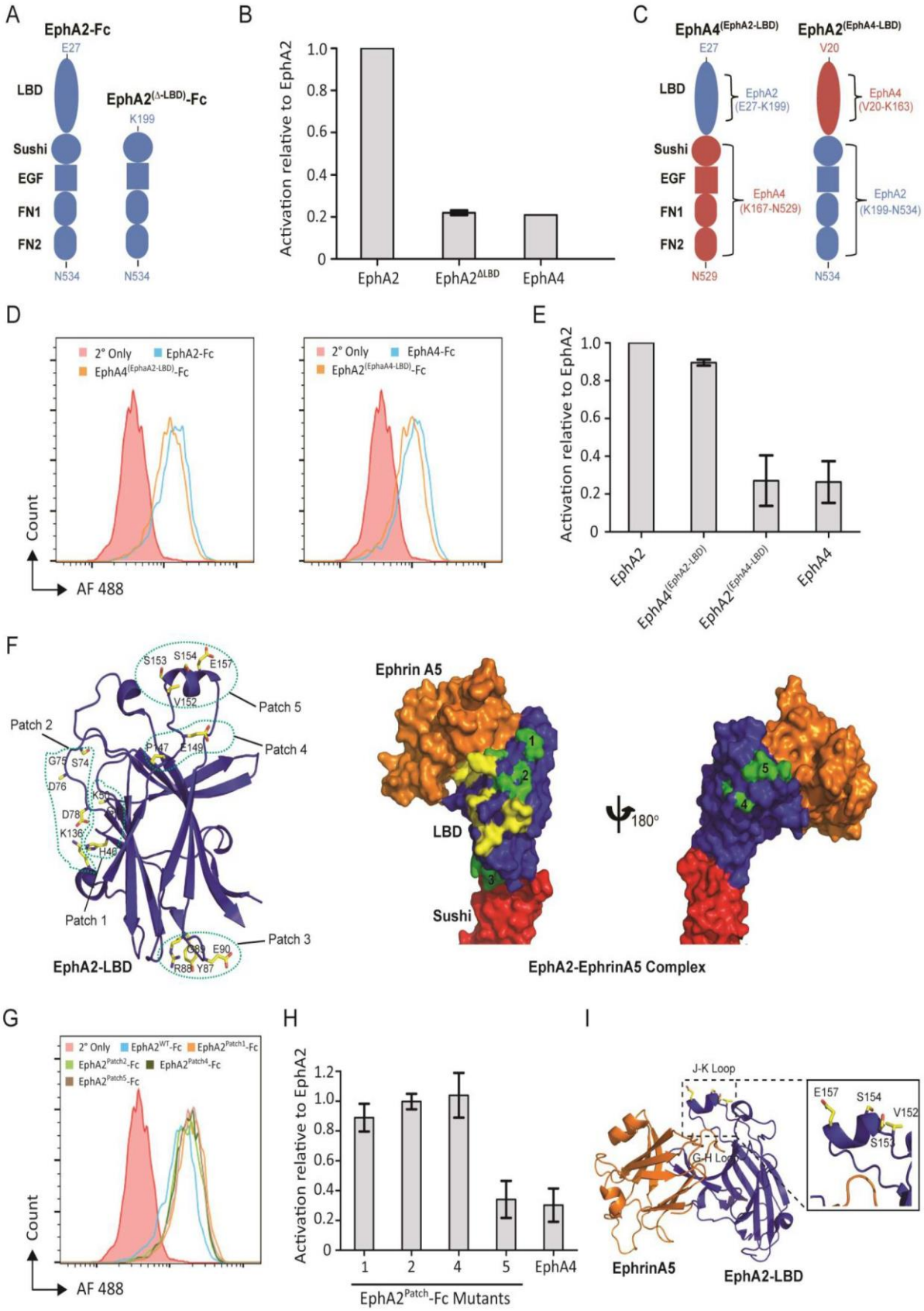

A
EphA2-Fc
E27
LBD
Sushi
EGF
FN1
FN2
N534
EphA2(Δ-LBD)-Fc
K199
N534
B
Activation relative to EphA2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
EphA2
EphA2ΔLBD
EphA4
C
EphA4(EphA2-LBD)
EphA2(EphA4-LBD)
E27
V20
LBD
EphA2 (E27-K199)
EphA4 (V20-K163)
Sushi
EGF
FN1
FN2
EphA4 (K167-N529)
EphA2 (K199-N534)
N529
N534
D
2° Only
EphA2-Fc
EphA4(EphA2-LBD)-Fc
2° Only
EphA4-Fc
EphA2(EphA4-LBD)-Fc
Count
AF 488
E
Activation relative to EphA2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
EphA2
EphA4(EphA2-LBD)
EphA2(EphA4-LBD)
EphA4
F
S153
S154
E157
V152
Patch 5
Patch 2
P147
E149
Patch 4
G75
S74
D76
K59
D78
K136
H46
Patch 1
Patch 3
E90
R88
Y87
EphA2-LBD
Ephrin A5
1
2
LBD
3
Sushi
180°
5
4
EphA2-EphrinA5 Complex
G
2° Only
EphA2WT-Fc
EphA2Patch1-Fc
EphA2Patch2-Fc
EphA2Patch4-Fc
EphA2Patch5-Fc
Count
AF 488
H
Activation relative to EphA2
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0
1
2
4
5
EphA4
EphA2Patch-Fc Mutants
I
J-K Loop
E157
S154
V152
S153
G-H Loop
EphrinA5
EphA2-LBD

Figure 4

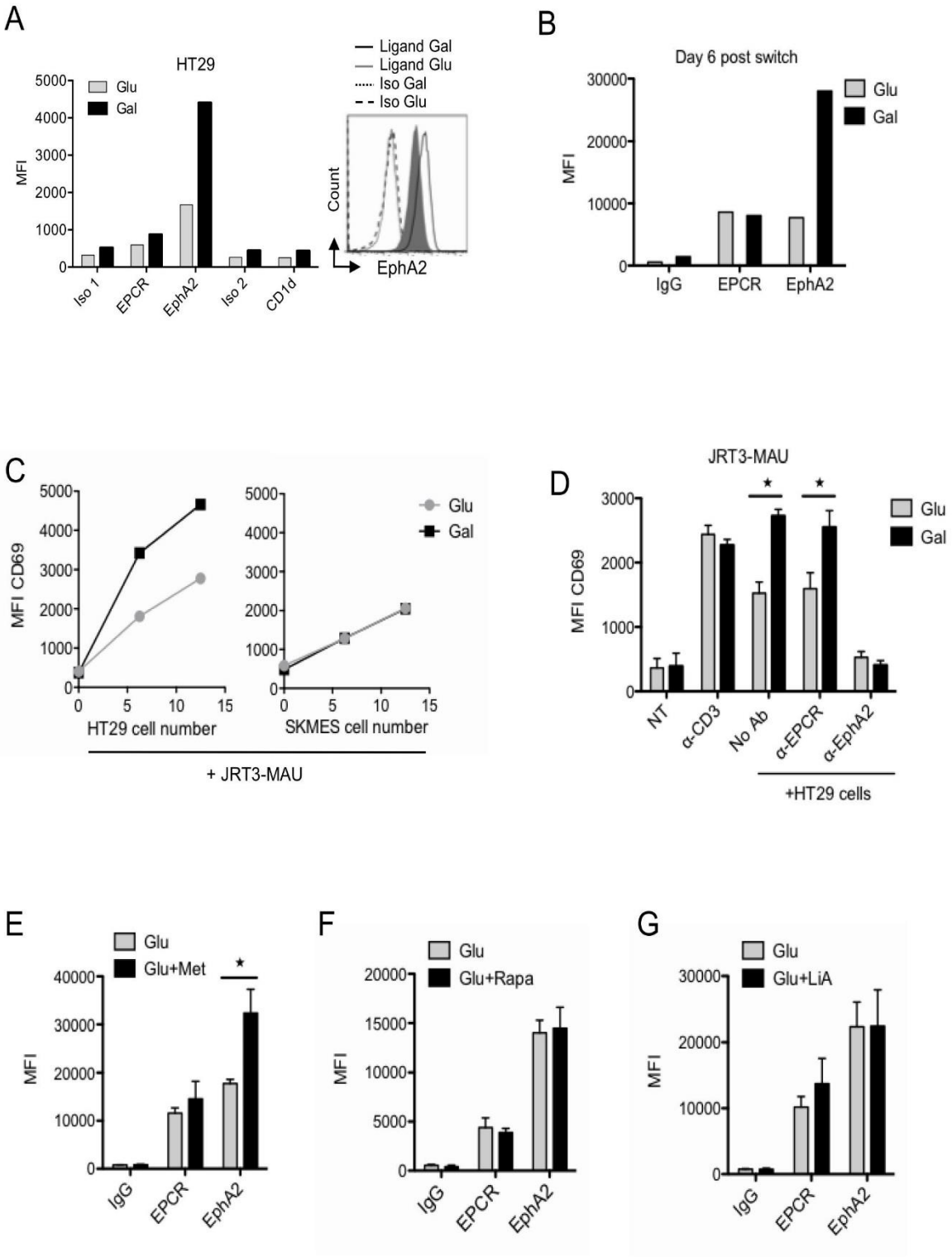

A
HT29
Glu
Gal
MFI
Iso 1
EPCR
EphA2
Iso 2
CD1d
Ligand Gal
Ligand Glu
Iso Gal
Iso Glu
Count
EphA2
B
Day 6 post switch
Glu
Gal
MFI
IgG
EPCR
EphA2
C
MFI CD69
HT29 cell number
SKMES cell number
Glu
Gal
+ JRT3-MAU
D
JRT3-MAU
MFI CD69
Glu
Gal
NT
α-CD3
No Ab
α-EPCR
α-EphA2
+HT29 cells
E
Glu
Glu+Met
MFI
IgG
EPCR
EphA2
F
Glu
Glu+Rapa
MFI
IgG
EPCR
EphA2
G
Glu
Glu+LiA
MFI
IgG
EPCR
EphA2

Figure 5

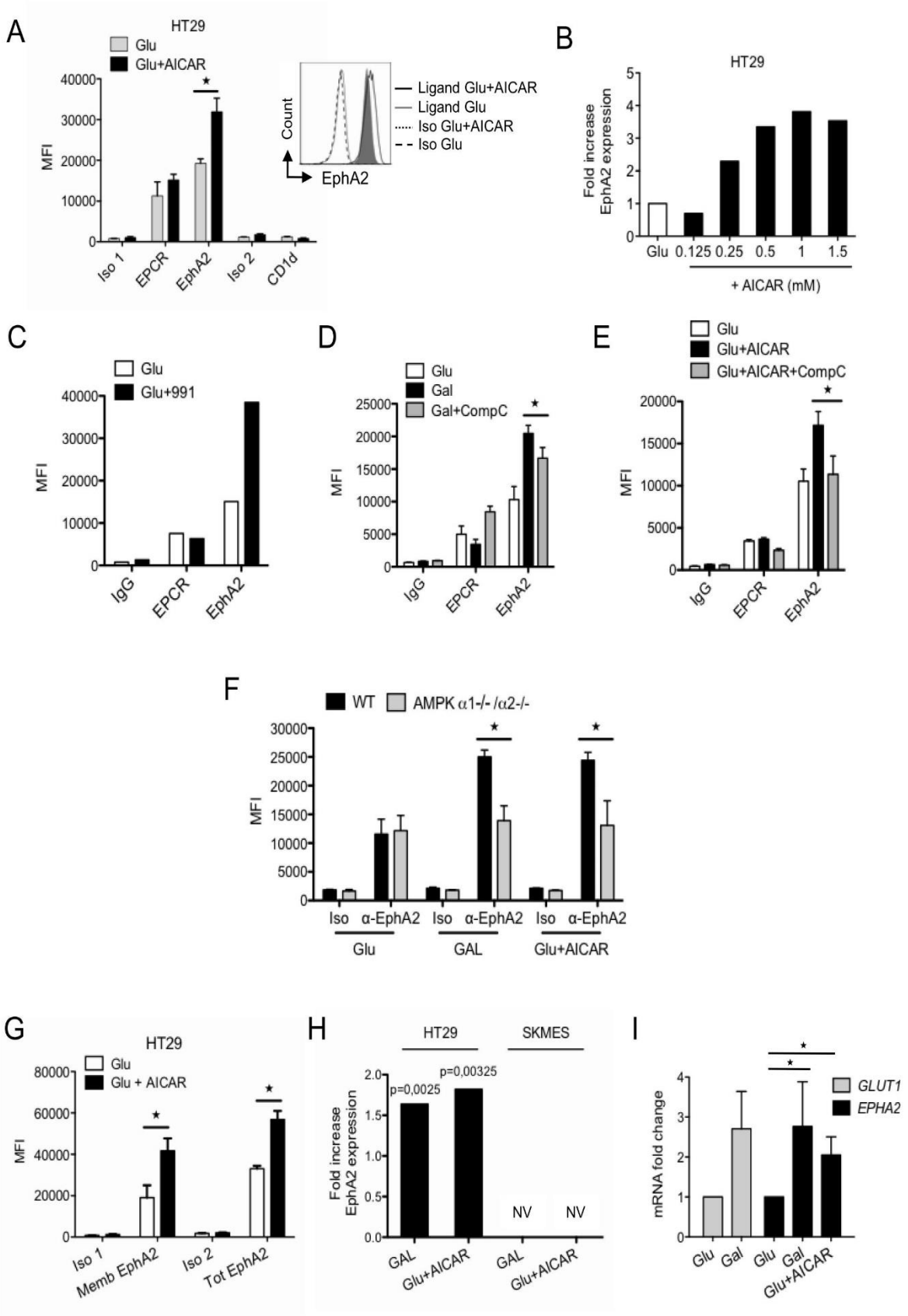
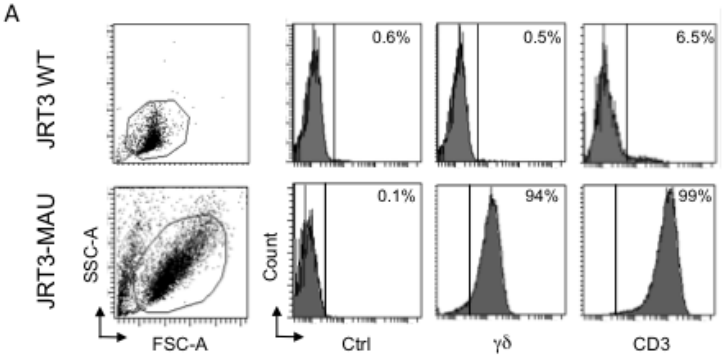

A
HT29
Glu
Glu+AICAR
MFI
Iso 1
EPCR
EphA2
Iso 2
CD1d
Count
EphA2
Ligand Glu+AICAR
Ligand Glu
Iso Glu+AICAR
Iso Glu
B
HT29
Fold increase EphA2 expression
Glu
0.125
0.25
0.5
1
1.5
+ AICAR (mM)
C
Glu
Glu+991
IgG
EPCR
EphA2
D
Glu
Gal
Gal+CompC
E
Glu
Glu+AICAR
Glu+AICAR+CompC
F
WT
AMPK α1-/- /α2-/-
Iso
α-EphA2
Glu
GAL
Glu+AICAR
G
HT29
Glu
Glu + AICAR
Iso 1
Memb EphA2
Iso 2
Tot EphA2
H
HT29
SKMES
p=0,0025
p=0,00325
NV
GAL
Glu+AICAR
I
GLUT1
EPHA2
mRNA fold change
Glu
Gal
Glu
Gal
Glu+AICAR

Figure 6

SUPPLEMENTAL FIGURES



B

Cell types	Name	Reactivity JRT3-MAU
Mouse fibroblasts	3T3	++
	MEF	++
Human fibroblasts	FSF	++
	MRC5	++
Human endothelial cells	HUVEC	++
Adherent human tumor cells	A431	++
	HELA	++
	HT29	++
	SK-MES	++
	HEK	+
	JAR	+
	KERT	+
	SK-CO1	+
	U251	+
	U343	+
	U373	+
	HEP B3	0
	HEP G2	0
	HUH7	0
	HUTU 80	0
	T84	0
Non adherent human tumor cells	H9	0
	DAUDI	0
	JY	0
	K562	0
	RAJI	0
	THP-1	0
	U937	0
Non human tumor cells	WR19L	0
	COS	+
	VERO	++
	CHO	0

Figure S1

Figure S1 (refers to main-text Figure 1): Membrane expression of γδ TCR in transduced JRT3-MAU cells. (A) wild type JRT3 (WT) or JRT3-MAU were transduced as described in materials and methods, and membrane expression of γδ TCR chains and CD3 were measured by flow cytometry after immunostaining (with anti-panδ and anti-CD3 antibodies) using Mean Fluorescence Intensity (MFI). Flow cytometry histograms are depicted with % of stained cells. (B) JRT3-MAU cells (expressing Vγ9Vδ1 TCR) were co-cultured for 4 hrs with various cancer cell lines as indicated, and membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). Data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells).

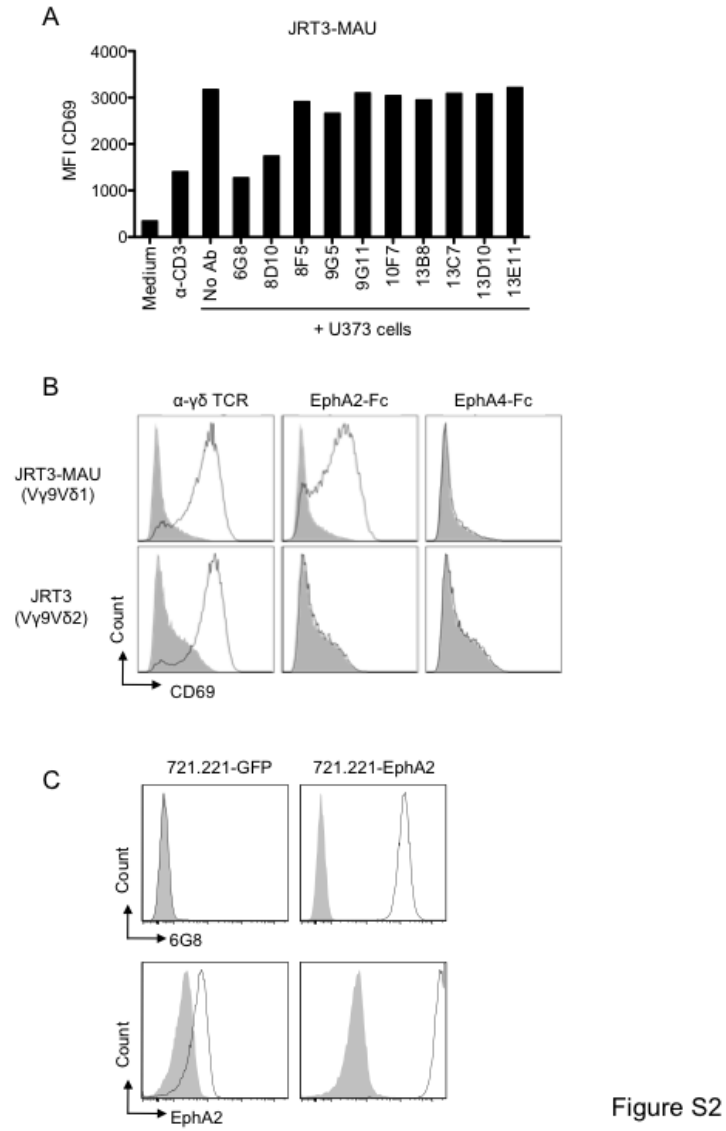


Figure S2 (refers to main-text Figure 2): Screening of antibody-producing hybridomas to block JRT3-MAU reactivity, and expression of γδ TCR chains in transduced MAU and LES JRT3 cells. (A) JRT3-MAU cells were incubated with plate-bound anti-CD3 antibody or co-cultured with U373 cells for 4 hrs in the presence or not of various hybridomas cell culture supernatants as indicated, and membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). Data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells). (B) JRT3-MAU or JRT3-Vγ9Vδ2 were incubated as described in Experimental Procedures with plate-bound anti-γδ TCR antibody, or EphA2-Fc, or EphA4-Fc recombinant proteins (10 μg/ml) for 4 hrs at 37°C. Membrane expression of CD69 was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). (C) GFP- or EphA2-transduced 721.221 cell lines were immunostained with 6G8 or EphA2 Abs and membrane expression was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). Data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells).

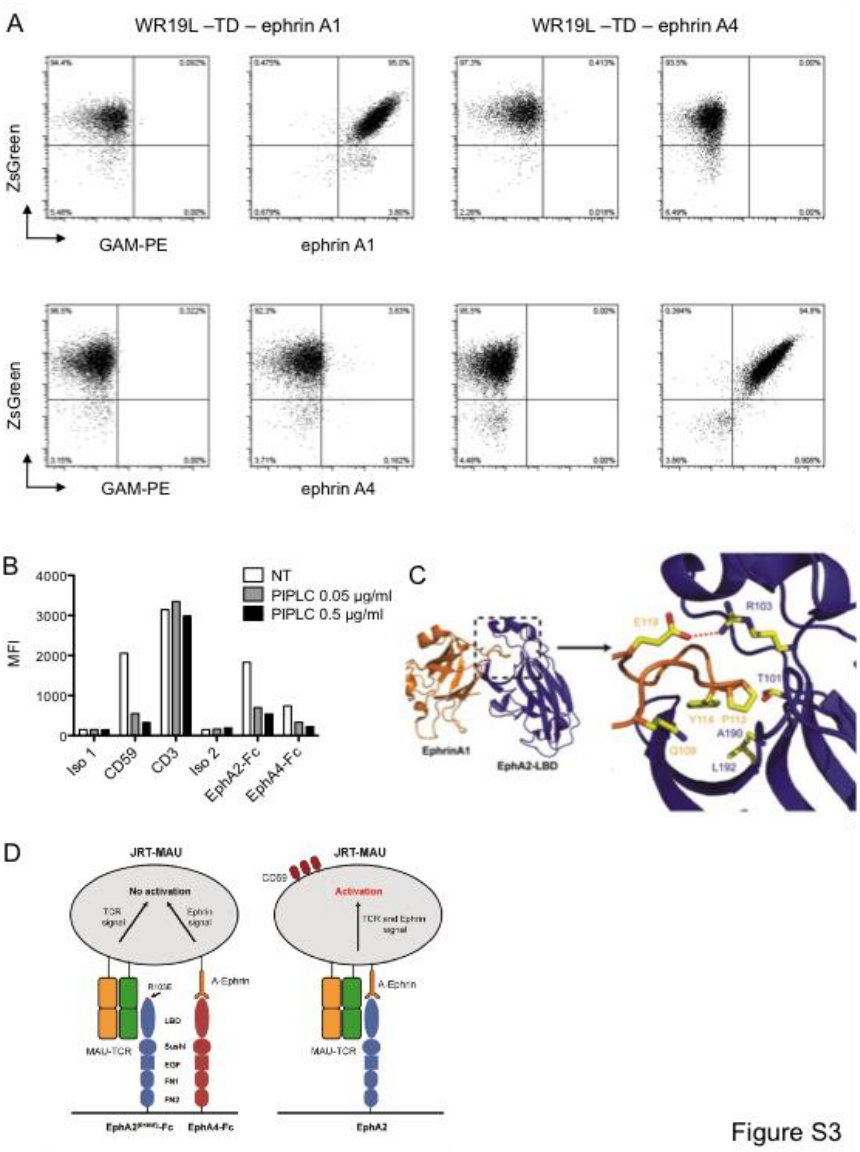


Figure S3

Figure S3 (refers to main-text Figure 3): Generation of ephrinA1 or ephrinA4 mAbs, and ribbon representation of the interaction between EphA2 and ephrinA1. (A) WR19L cells stably expressing the ZsGreen tag as control of lentiviral transduction are shown as measured by flow cytometry. ephrinA1-transduced WR19L cells or ephrinA4-transduced WR19L cells were incubated with generated anti-ephrinA1 (3E5) or anti-ephrinA4 (1D9) (10 µg/ml). Cells were then washed and incubated with secondary antibody goat anti-mouse IgG-PE. The binding of anti-ephrin A1 or ephrinA4 antibodies was measured by flow cytometry. (B) JRT3-MAU cells were treated or not with PIPLC at indicated concentrations for 5 hrs at 37°C, and then incubated with either Isotype (Iso), or anti-CD59-FITC, or anti-CD3-FITC, or Fc-tagged ephrin receptors (10 µg/ml) and detected using an AF488-conjugated goat anti-human Fc (Representative, *n*=3). (C) Ribbon representation of EphA2 (blue)-in complex with ephrinA1 (orange) (pdb code 3HEI). The interface is stabilized predominantly by non-polar interactions between residues protruding from the hydrophobic pocket of EphA2 LBD and the G-H loop of ephrinA1 (ball and stick). The interface is further stabilized by a salt bridge interaction (R103 (EphA2-LBD)-E119 (EphrinA1); red dashed line). (D) Schematic model of the EphA2 mediated activation of JRT3-MAU. EphA2R103E-Fc (E103 designated by red cross) fails to activate JRT3-MAU in the presence of EphA4-Fc (left). MAU TCR is able to bind EphA2R103E-Fc and EphA4-Fc is able to bind surface ephrins. JRT3-MAU can only be activated when the TCR and ephrin signal originate from the same EphA2-Fc molecule (right).

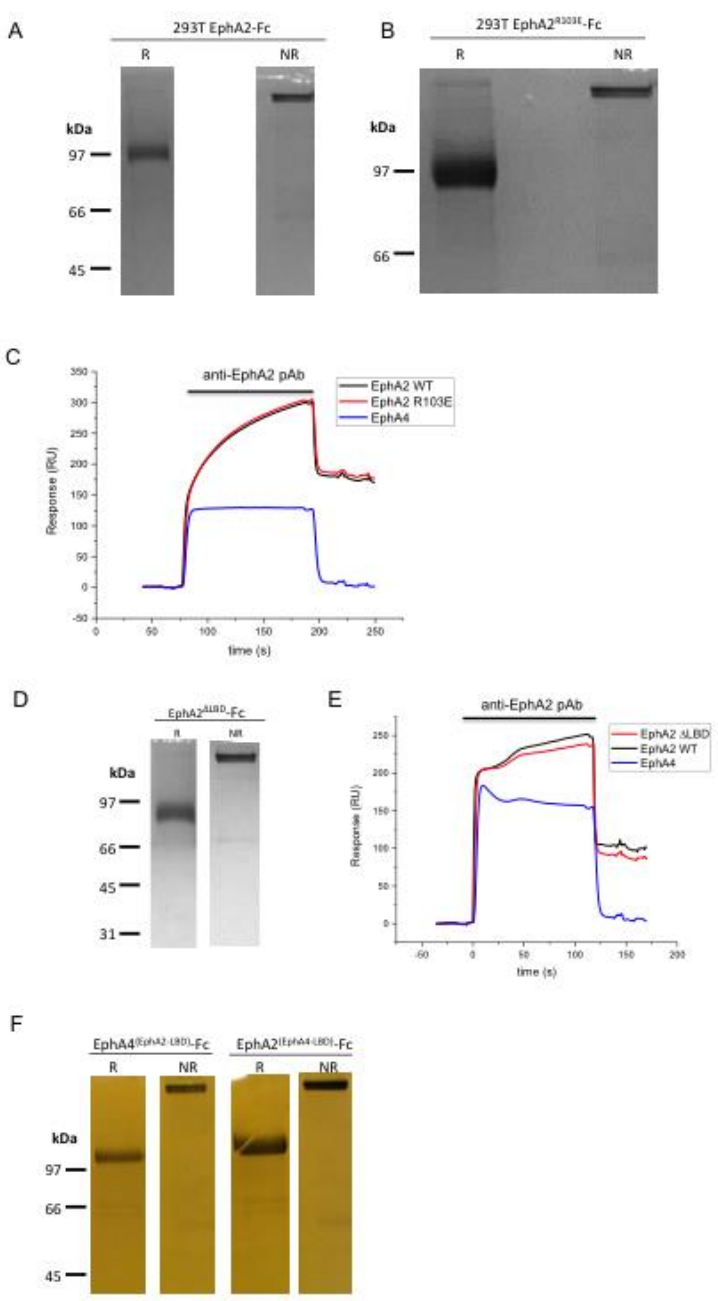


Figure S4 (refers to main-text Figure 3 and 4): Validation of EphA2, EphA2^{R103E}-Fc, EphA2$^{\Delta LBD}$-Fc, and LBD domain-swap constructs. (A) EphA2-Fc and (B) EphA2R103E-Fc were purified using Ni-NTA chromatography. Reduced (R) samples migrate at approximately 100kDa, while The non-reduced (NR) samples migrate at approximately twice this size. Proteins visualised with Instant Blue. (C) Fc-tagged EphA2 WT (66.3 RU), EphA2 R103E (61.9 RU) and EphA4 (194.2 RU) were immobilised on a R10Z8E9 coated CM5 BIAcore chip. Anti-EphA2 pAb was then injected over the chip. Equivalent binding to the WT and R103E EphA2-Fc was observed. (D) SDS-PAGE analysis of the Ni-NTA purified EphA2ΔLBD-Fc construct under reducing (R) and non-reducing (NR) conditions. Yield and purity were equivalent to WT EphA2-Fc. (E) BIAcore analysis of anti-EphA2 pAb binding to EphA2ΔLBD-Fc (48.3 RU), EphA2 WT-Fc (43.3 RU) and EphA4-Fc (141.1 RU), which were immobilised on a R10Z8E9 coated CM5 chip. (F) SDS-PAGE analysis of Ni-NTA purified LBD swap EphA2-Fc mutants under reducing (R) and non-reducing (NR) conditions. Migration pattern and yields are equivalent to the WT EphA2-Fc construct.

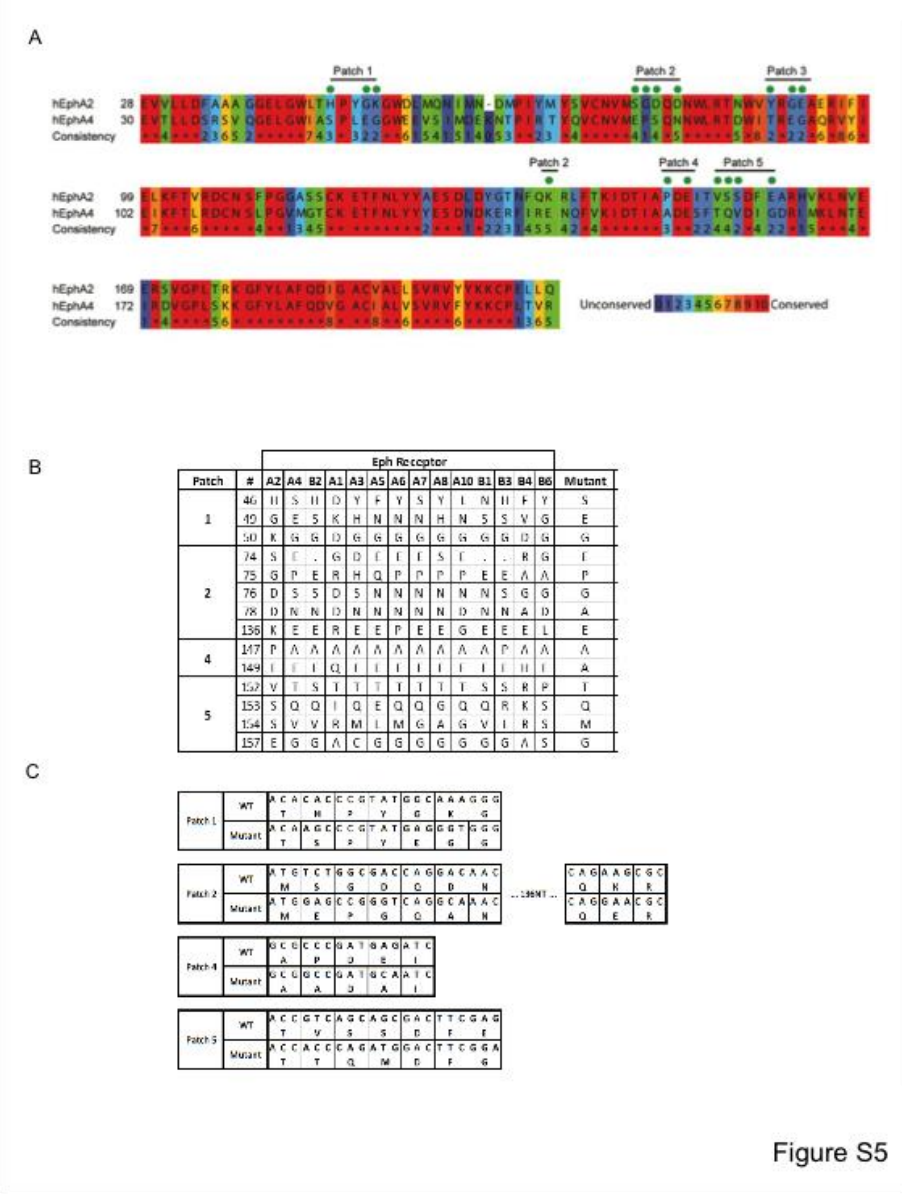


Figure S5

Figure S5 (refers to main-text Figure 4): EphA2 surface patch mutagenesis strategy. (A) Sequence alignment of the LBDs of EphA2 and EphA4 using PRALINE. UniProt accession numbers for EphA2 and EphA4 are P2931 and P5476 respectively. The colour scheme of the alignment is for amino acid conservation, 0= unconserved and 10 = conserved. (B) Mutagenesis strategy for the EphA2 patch mutants, with residue characteristics and mutational justifications. Residue numbers correspond to EphA2. (C) EphA2 surface patch mutant construct design. Codon changes used for the generation of gBlocks for the EphA2 surface patch mutants.

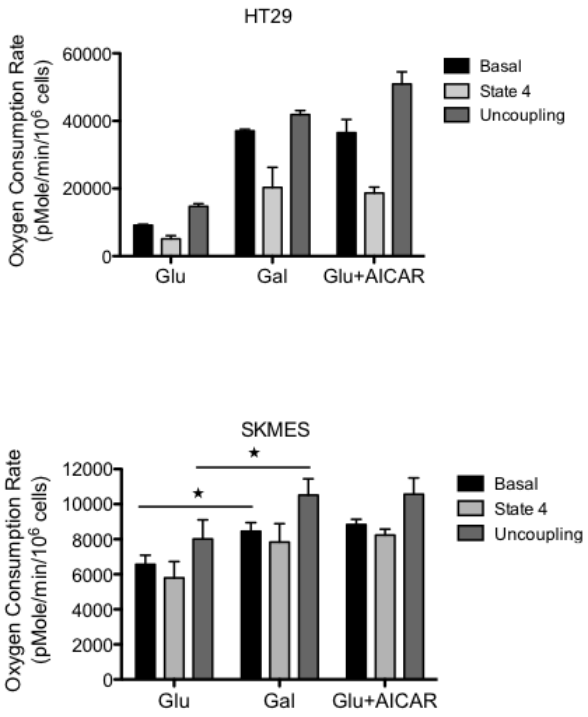


Figure S6

Figure S6 (refers to main-text Figure S6: Galactose and AICAR-mediated upregulation of mitochondrial respiration. HT29 (above) or SKMES-1 (below) cell lines were cultured for 72 hrs in Galactose or AICAR culture media. Then, oxygen consumption rates were measured in basal routine, or in the presence of the ATP synthase inhibitor Oligomycin (4 μg/μl) (State 4), or in the presence of uncoupler CCCP (10 μM) (Uncoupling state). Data as mean of three independent experiments +/- SD; ⋆ $p<0.05$.

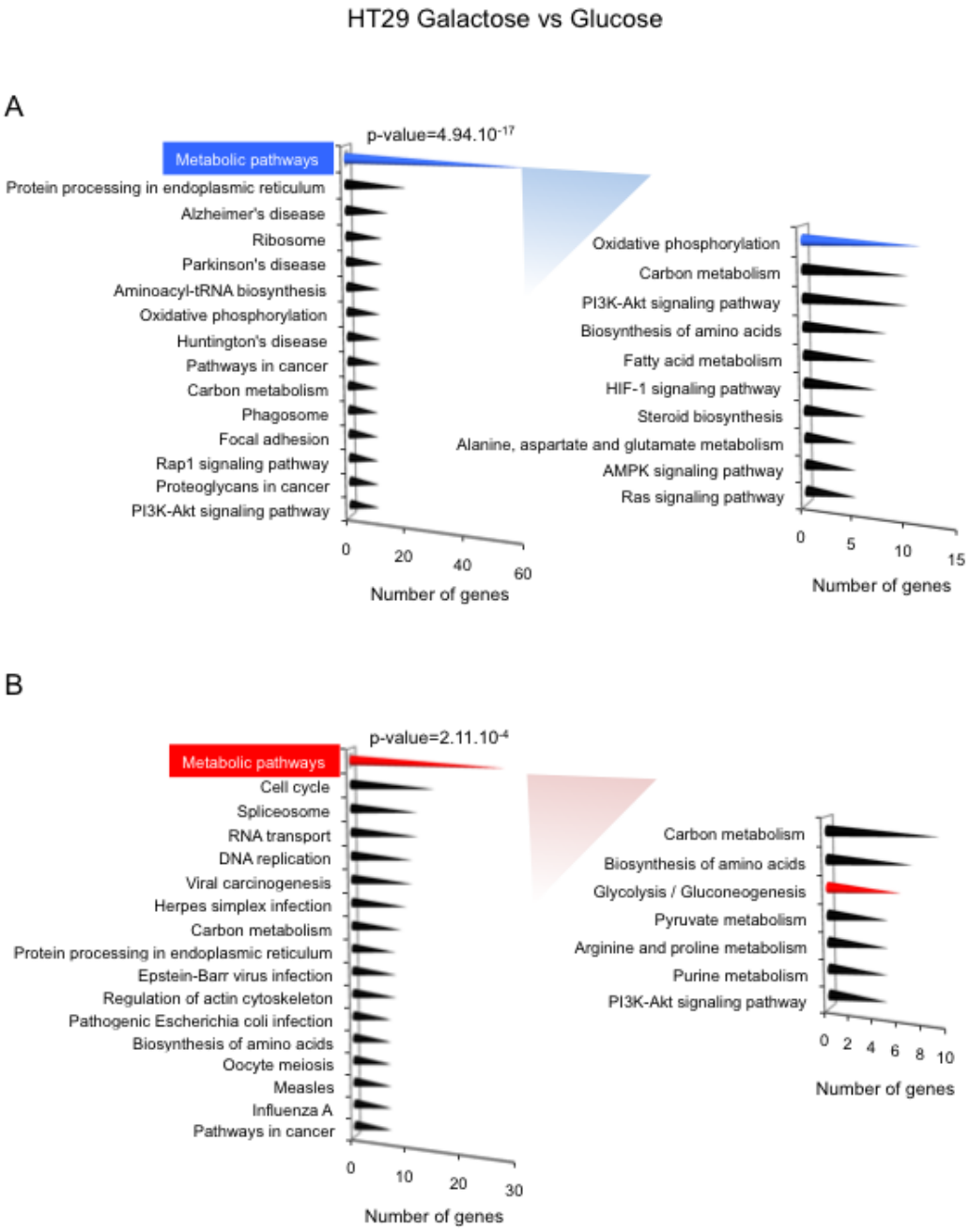
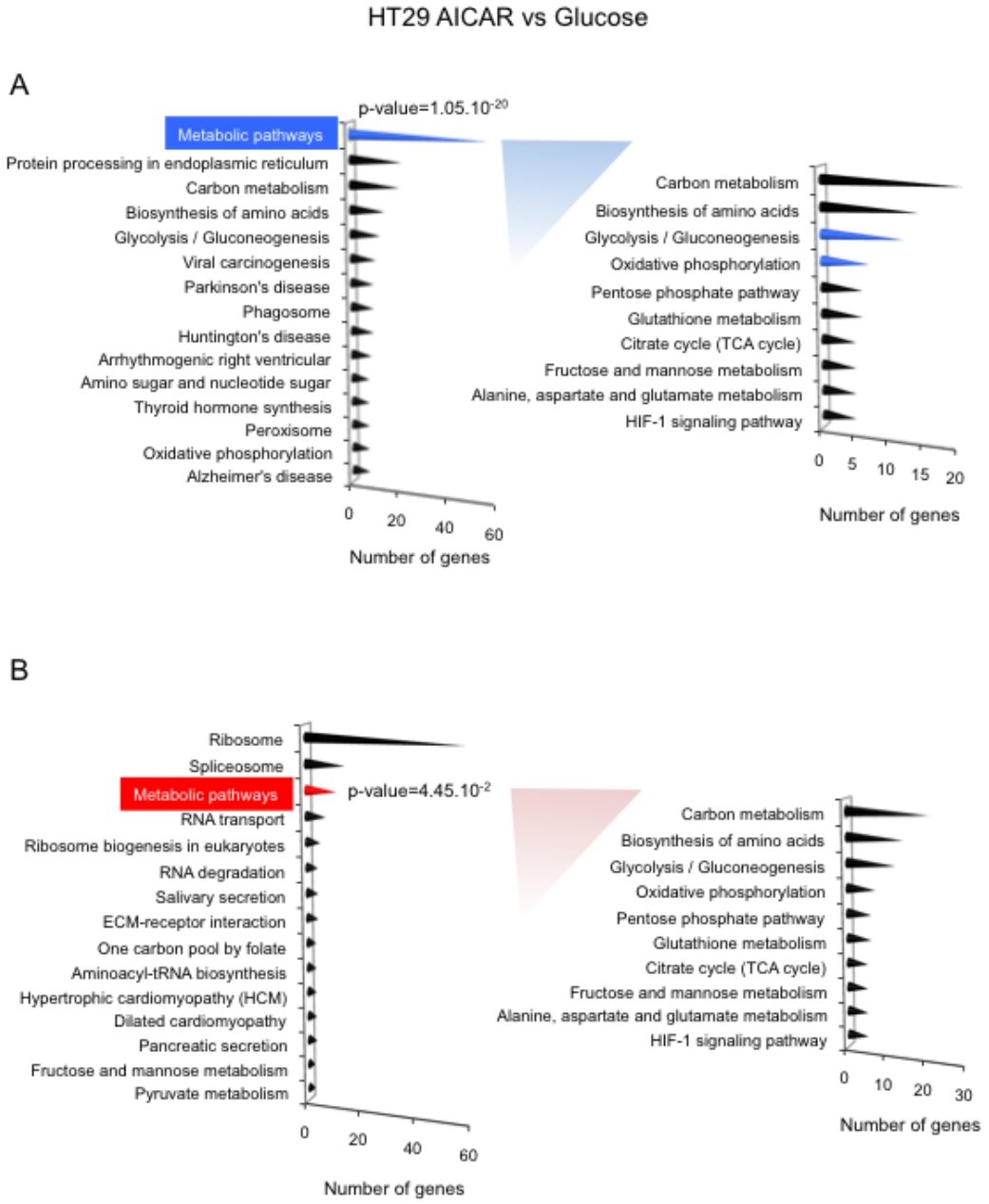
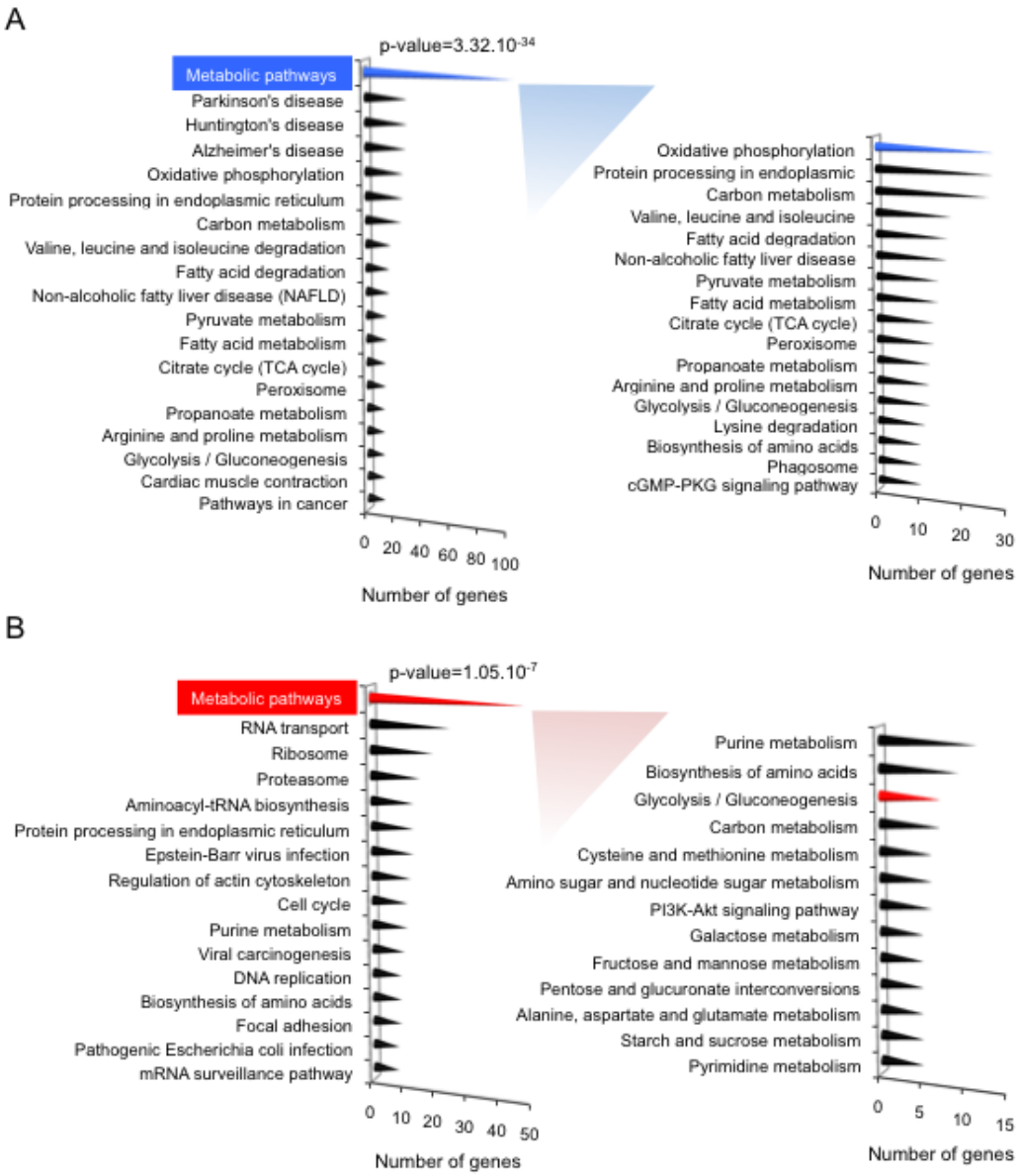

HT29 Galactose vs Glucose
A
p-value=4.94.10-17
Metabolic pathways
Protein processing in endoplasmic reticulum
Alzheimer's disease
Ribosome
Parkinson's disease
Aminoacyl-tRNA biosynthesis
Oxidative phosphorylation
Huntington's disease
Pathways in cancer
Carbon metabolism
Phagosome
Focal adhesion
Rap1 signaling pathway
Proteoglycans in cancer
PI3K-Akt signaling pathway
0
20
40
60
Number of genes
Oxidative phosphorylation
Carbon metabolism
PI3K-Akt signaling pathway
Biosynthesis of amino acids
Fatty acid metabolism
HIF-1 signaling pathway
Steroid biosynthesis
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
AMPK signaling pathway
Ras signaling pathway
0
5
10
15
Number of genes
B
p-value=2.11.10-4
Metabolic pathways
Cell cycle
Spliceosome
RNA transport
DNA replication
Viral carcinogenesis
Herpes simplex infection
Carbon metabolism
Protein processing in endoplasmic reticulum
Epstein-Barr virus infection
Regulation of actin cytoskeleton
Pathogenic Escherichia coli infection
Biosynthesis of amino acids
Oocyte meiosis
Measles
Influenza A
Pathways in cancer
0
10
20
30
Number of genes
Carbon metabolism
Biosynthesis of amino acids
Glycolysis / Gluconeogenesis
Pyruvate metabolism
Arginine and proline metabolism
Purine metabolism
PI3K-Akt signaling pathway
0
2
4
6
8
10
Number of genes

Figure S7


HT29 AICAR vs Glucose
A
p-value=1.05.10-20
Metabolic pathways
Protein processing in endoplasmic reticulum
Carbon metabolism
Biosynthesis of amino acids
Glycolysis / Gluconeogenesis
Viral carcinogenesis
Parkinson's disease
Phagosome
Huntington's disease
Arrhythmogenic right ventricular
Amino sugar and nucleotide sugar
Thyroid hormone synthesis
Peroxisome
Oxidative phosphorylation
Alzheimer's disease
0 20 40 60
Number of genes
Carbon metabolism
Biosynthesis of amino acids
Glycolysis / Gluconeogenesis
Oxidative phosphorylation
Pentose phosphate pathway
Glutathione metabolism
Citrate cycle (TCA cycle)
Fructose and mannose metabolism
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
HIF-1 signaling pathway
0 5 10 15 20
Number of genes
B
Ribosome
Spliceosome
Metabolic pathways
p-value=4.45.10-2
RNA transport
Ribosome biogenesis in eukaryotes
RNA degradation
Salivary secretion
ECM-receptor interaction
One carbon pool by folate
Aminoacyl-tRNA biosynthesis
Hypertrophic cardiomyopathy (HCM)
Dilated cardiomyopathy
Pancreatic secretion
Fructose and mannose metabolism
Pyruvate metabolism
0 20 40 60
Number of genes
Carbon metabolism
Biosynthesis of amino acids
Glycolysis / Gluconeogenesis
Oxidative phosphorylation
Pentose phosphate pathway
Glutathione metabolism
Citrate cycle (TCA cycle)
Fructose and mannose metabolism
Alanine, aspartate and glutamate metabolism
HIF-1 signaling pathway
0 10 20 30
Number of genes

SKMES Galactose vs Glucose



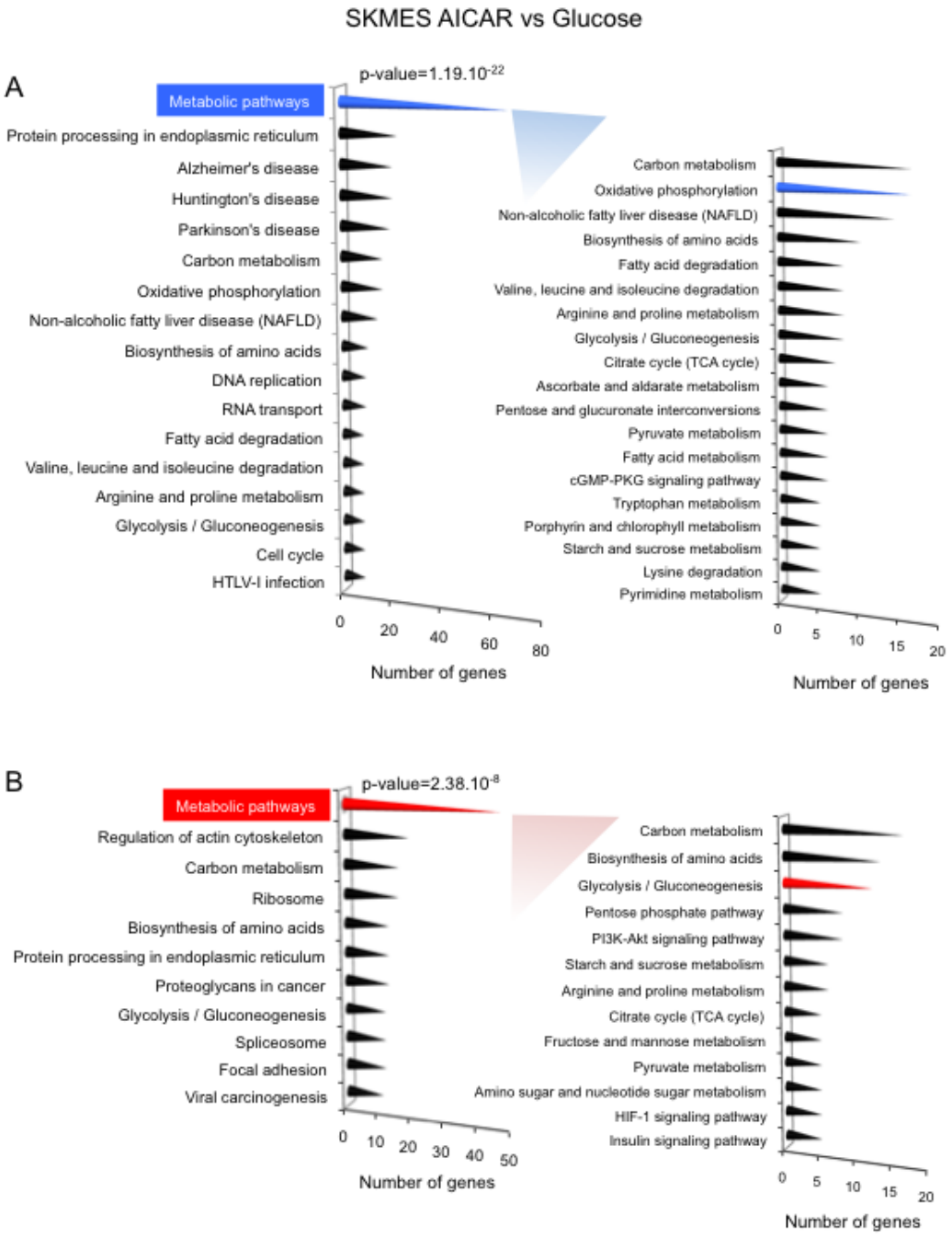


Figure S7 (refers to main-text Figure 5): Galactose and AICAR-mediated modulation of metabolic networks at the protein level in cancer cells. HT29 or SKMES-1 cell lines were cultured for 72 hrs in Galactose or AICAR cell culture media. Cells were lysed and submitted to quantitative label free proteomics analysis. Proteins identified by mass spectrometry showing significant variations of expression either (A) upregulation or (B) down-regulation upon metabolic reprogrammers were analysed for Gene Ontology (GO) using the KEGG PATHWAY database. Various GOs are reported with p-value<0.05 and the number of genes comprising each GO is indicated (to the left). The GO-annotated "Metabolic pathways" was further analysed for gene enrichment of specific metabolic pathways as indicated (to the right).

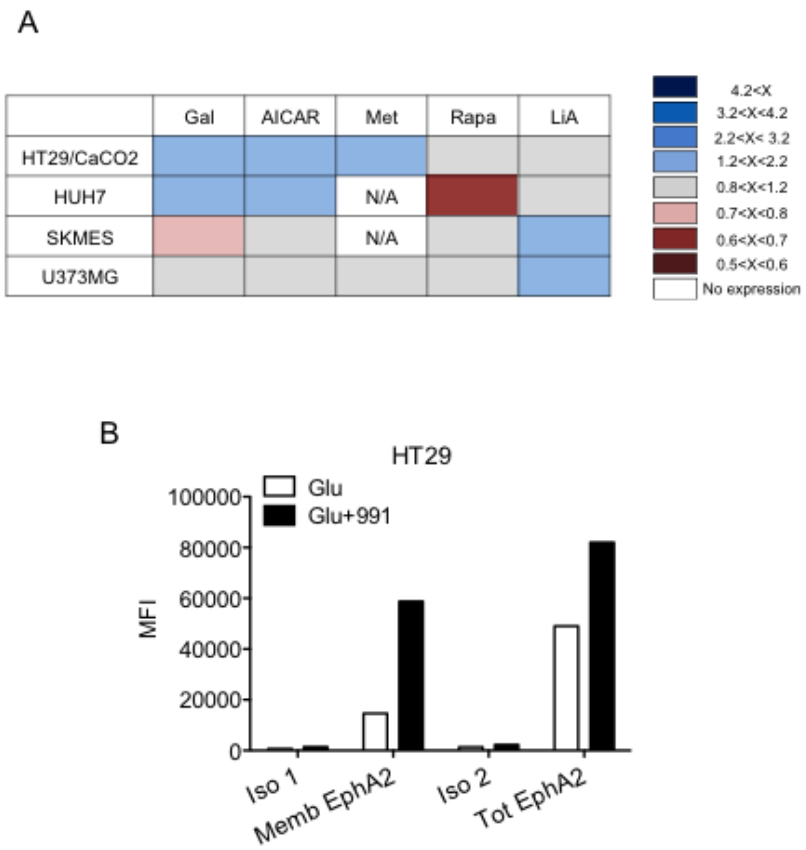


Figure S8 (refers to main-text Figure 5 and 6): Differential membrane expression of EphA2 in cancer cell types upon various methods of metabolic reprogramming; and effect of 991 compound on EphA2 total protein expression. (A) Summary of results regarding membrane expression of EphA2 as a function as various methods of metabolic reprogramming during 72 hrs (Glu/Gal switch, AICAR, Metformine, Rapamycin, Li-Acetoacetate treatments) for different human cancer cell lines as indicated (colon HT29 and Caco2, liver HuH-7, lung SKMES-1, glioblastoma U373MG). Data are represented as a color scheme indicating fold increase of membrane expression (vs Glucose) measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). N/A: not applicable due to low amount of living cells. Flow cytometry data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells). (B) HT29 cancer cells were cultured for 72 hrs either in glucose (Glu) or Glu+991 (100 µM). Cells were then permeabilized or not to measure membrane or total expression of EphA2 by immunostaining, or with control isotype in both conditions (Iso1 and Iso2). Expression was measured by flow cytometry using Mean Fluorescence Intensity (MFI). Data are representative of at least three independent experiments with similar results (mean of at least 5.10^3 cells).

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Reagents and antibodies. Anti-human CD3 antibody was purchased from Biolegend (clone OKT3, 317302); anti-human EPCR and anti-human EphA2 (R&D Systems); anti-human CD1d (BD Pharmingen); anti-MICA, anti-MICB, anti-ULBP-1, anti-ULBP-2, anti-ULBP3, anti-ULBP-4 (R&D Systems), anti-CD54 (Immunotech), Ephrin recombinant proteins (R&D systems). JRT3 activation was monitored with CD69 membrane expression (anti-human CD69-PE, Beckman Coulter). Primary antibodies were revealed with donkey anti-goat IgG-PE antibody or goat anti-mouse-IgG-PE antibody (Beckman Coulter). Compound 991 (5-[[6-chloro-5-(1-methylindol-5-yl)-1H-benzimidazol-2-yl]oxy]-2-methyl-benzoic acid; [1] was synthesized by Spirochem AG, Zürich, Switzerland. Wild type and AMPK $\alpha1^{-/-}/\alpha2^{-/-}$ mouse embryo fibroblasts (AMPK $\alpha1^{-/-}/\alpha2^{-/-}$ MEFs) were generated and maintained as previously described [2].

Human γδ T cell clone and line generation and functional assays. PBMCs were generated from blood samples collected for medical care with approval of the local medical ethics committee. Primary

γδ T cell line Vδ1 and MAU T cell clone were generated and cultured following the same methods as described previously [34]. For co-culture functional assays, γδ T cells were incubated with monolayers of tumor cell lines [3]. The degranulation potential of primary γδ T cell lines and clones (5×10^4 cells per well) cells was analyzed by measuring expression of CD107a. Cells were co-cultured for 6hr, or incubated with immobilized anti-CD3 (OKT3 clone) in 96-well plates, in the presence of PE-conjugated mAb to CD107a (H4A3; BD Biosciences) and brefeldin A (10 μg/ml) and were then were collected and stained with phycoerythrin-indodicarbocyanine–conjugated mAb to γδ TCR (IMMU510; Beckman Coulter), then the expression of CD107a on γδ TCR^+ cells was analyzed by flow cytometry.

Generation of mAb 6G8. For the generation of mAb 6G8, U373 cells (1×10^6 cells in 50 μl PBS) were injected without adjuvant into each footpad of the back legs of BALB/c mice ($n = 2$). Then, 12 days later, mice were boosted under the same conditions, and at day 15, popliteal lymph nodes were collected and B cells were extracted and fused with the myeloma partner P3U1. Hybridomas were grown until confluent and assessed for neutralization of MAU clone reactivity. Hybridoma supernatants (50 μl) were added to 96-well flat-bottomed plates containing subconfluent U373 cells. After 30 min of incubation at 22 °C, cells from the MAU clone were added (5×10^4 cells per well) and plates were incubated for 4 h at 37 °C. Supernatants (50 μl) were removed from the wells and TNF was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (Bender MedSystems). Hybridomas that secreted antibody that neutralized the reactivity of the MAU clone were cloned by limiting dilution, and mAb 6G8 (which is of the IgG2 isotype) was selected because of its strong neutralizing activity. Screening of hybridomas relied on their ability to specifically block target cell-induced activation of JRT3-MAU cells but not JRT3 cells expressing a $V_\gamma4V_\delta5$ TCR (JRT3-LES).

Generation of anti-ephrinA1 and anti-ephrinA4 mAbs: Murine cells expressing human ephrinA1 or ephrinA4 were first generated to be used in flow cytometry screening. The ephrinA1 or ephrinA4 cDNAs were obtained by RT-PCR and subcloned into the lentiviral vector 197. The WR19L mouse lymphoma cell line was transduced at a multiplicity of infection of 4, and cells stably expressing the ZsGreen tag under the control of IRES2 were sorted by flow cytometry. For the generation of mAbs, 5μg of recombinant human ephrin-A1-Fc or ephrin-A4-Fc chimeras (R&D systems, #6417-A1 or #369-EA) were injected into each foot pad of the back legs of BALB/c mice ($n = 2$). Twelve days later, mice were boosted under the same conditions, and at day 15, popliteal lymph nodes were collected and B cells were extracted and fused with the myeloma partner P3U1 with PEG15000. Hybridomas were grown in HAT selective medium until confluency and assessed by flow cytometry for their ability to produce antibody able to stain WR19L cell-expressing surface human ephrinA1 or human ephrinA4. Positive hybridomas were subcloned by limiting dilution and monoclonal antibodies were purified from culture supernatants by using protein-A column chromatography (ProSep vA ultra, Merck Millipore).

Expression of soluble EphA2-Fc constructs. Fc-fused EphA2 and EphA4 human recombinant proteins were obtained from R&D Systems. Alternatively, wild type, mutant, or chimeric EphA2-Fc and EphA4-Fc proteins were generated by transient transfection of 293T cells. cDNA was cloned into the pHL-Fc vector [5] which encodes the Fc portion of human IgG1. 293T cells were transfected using PEI as described [5] and recombinant proteins were purified from the cell supernatant by Nickel-affinity chromatography using Ni-NTA agarose (Qiagen).

Immunoprecipitation and mass spectrometry. Cancer cells were washed twice with PBS before surface biotinylation for 30 min at 4°C with sulfo-*N*-hydroxysuccinimide–LC–biotin (0.5 mg/ml in PBS; Thermo Fisher). Reactions were quenched by the addition of Tris, pH 7.4, to a final concentration of 20 mM. Cells were then washed and lysed for 30 min on ice in lysis buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Brij 96 and Complete protease inhibitor cocktail (Roche)). Insoluble materials were removed by centrifugation at 17,000*g* for 15 min. Soluble lysates were precleared for 1 h at 4°C with agarose beads coated with goat anti–mouse IgG agarose (Sigma), then supernatants were immunoprecipitated overnight with mAb 6G8 coupled to antibody to mouse IgG agarose. Immunoprecipitates were washed three times in Brij96 lysis buffer and were eluted for 30 min at 37°C in 1% SDS before separation by SDS-PAGE and detection with streptavidin–horseradish peroxidase

(Thermo Fisher). For large scale immunoprecipitation studies, confluent HeLa cells were lysed in Brij96 lysis buffer as described above, then were precleared and immunoprecipitated with mAb 6G8. The immunoprecipitated proteins were eluted in 1% SDS and separated by electrophoresis through a 4–12% Bis-Tris gradient gel (Invitrogen) under reducing conditions and silver stained. The 130-kDa band of interest was excised, destained and digested with trypsin, and tryptic peptides were analyzed by Fourier transform–ion-cyclotron resonance mass spectrometry with a Finnigan LTQ FT mass spectrometer. Tandem mass spectrometry data were used to search the nonredundant database of the National Center for Biotechnology Information with the Sequest algorithm of Bioworks 3.3. 1 (Thermo Fisher). Results obtained with TurboSEQUEST protein-identification software were filtered with a peptide cutoff score of 10, a precursor mass tolerance of 10 p.p.m. and a fragment mass tolerance 0.5 D. For confirmation that EphA2 was the ligand for 6G8, proteins immunoprecipitated with mAb 6G8 were also analyzed by immunoblot with mAb to EphA2 (R&D Systems).

Selection of "patch mutants" in LBD domain of EphA2 to identify the MAU TCR binding site. To identify the potential MAU TCR binding site, non-conservative amino acids changes between the activating EphA2-LBD and the non-activating EphA4-LBD were noted based on sequence alignment with PRALINE **(Suppl Figure 7A)**. Candidate residues for mutation were selected based on the following criteria**.** Firstly, non-conservative residues that were inward-facing and likely to play a critical role in stabilizing the overall LBD fold were excluded. Secondly, residues involved either in the binding of ephrins or in the formation of EphA2-ligand multimeric signaling complexes were also omitted. Finally, the LBDs of EphA2 (PDB code 2X10[6] and EphA4 (PDB code 4BK41, [7] were superimposed to investigate whether localised conformational changes existed between these ephrin receptor molecules which may account for differences in binding to MAU TCR. Combining these different filtering processes led to the selection of 18 residues eligible for mutation which were grouped according to location into five distinct patches **(Figure 4F and Suppl Figure 7A)**. For this study, patch 3 was excluded due to its close proximity to the Sushi domain, implying that MAU-TCR is unlikely to interact with this region **(Figure 4F)**. The strategy underlying the introduction of mutations was such that any change would not affect EphA2 folding but should be drastic enough to impede TCR binding. With this in mind, alanine scanning mutagenesis was deemed inappropriate, as changes may not significantly impact TCR binding. Sequence alignments of the LBDs of the ephrin receptor family were used **(Suppl Figure 7B)** in order to assess which residues could be tolerated at each position with minimal impact on the overall fold of the LBD **(Suppl Figure 7C).**

Surface Plasmon Resonance

Surface plasmon resonance binding studies were carried out essentially as described (Willcox, Immunity, 1999) on a BIAcore 3000 at 25°C in HBS-EP solution (10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA and 0.005% surfactant P20; BIAcore). For capture of Fc-tagged proteins, anti-human IgG-Fc antibody R10Z8E9 [8](25 µg/ml in 10 mM Sodium Acetate pH 4.5) was immobilised to a CM5 chip. The conformation of wild-type, mutant and chimeric EphA2-Fc constructs was confirmed by specific binding of anti-EphA2 polyclonal Ab (R&D Systems; 25 µg/ml) to immobilised EphA2-Fc variants.

Measurements of mitochondrial respiratory rates. Mitochondrial oxygen consumption assays were performed using an XF instrument from SeaHorse Biosciences. Cell lines were plated in 96-well plate (3.10^4 cells/well) and cultured in Glucose, or Galactose, or Glucose+AICAR media for 48 hrs. Live cells respiratory measurements included the following states: (i) basal coupled respiration (Basal state), (ii) uncoupled resting respiration upon inhibition of ATP synthase by using Oligomycin at 4 µg/µl (State 4), and (iii) maximal uncoupled respiration or maximal respiratory capacity upon supply of CCCP at 10 µM (Uncoupling state). Respiratory rates were normalized for 10^6 cells.

Proteomics and metabolic network analysis. Proteomic data were conducted at the Centre de Genomique Fonctionnelle de Bordeaux, and analysed in partnership with the CRO CELLOMET (http://www.cellomet.com/) in addition to mitochondrial bioenergetics as described below. *Sample preparation and protein digestion:* 10 µg of each protein sample were solubilized in Laemlli buffer and

were analysed by SDS-PAGE. After colloidal blue staining, protein bands were excised and cut into 8 equal bands, and each was subsequently cut again into 1 mm x 1 mm gel pieces. Gel pieces were destained in 25 mM ammonium bicarbonate 50% ACN, washed twice in ultrapure water and incubated in ACN for 10 min. After ACN removal, gel pieces were dried at room temperature, incubated in trypsin buffer (10 ng/µl in 40 mM NH_4HCO_3 and 10% ACN), rehydrated at 4°C for 10 min, and finally incubated overnight at 37°C. Spots were then incubated for 15 min in 40 mM NH_4HCO_3 and 10% ACN at room temperature with rotary shaking. The supernatant was collected and an extraction solution (H_2O/ACN/HCOOH (47.5:47.5:5)) was added to gel slices for 15 min. The extraction step was repeated twice. Supernatants were dried in a vacuum centrifuge and suspended in 100 µL H_2O/HCOOH (100:0.1). *nLC-MS/MS analysis*: Peptide mixture were analyzed on an Ultimate 3000 nanoLC system (Dionex) coupled to a nanospray LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer (ThermoFinnigan, San Jose, CA). 10 µl of peptide digests were loaded onto a 300-µm-inner diameter x 5-mm C_{18} PepMap™ trap column (LC Packings) at a flow rate of 20 µl/min. The peptides were eluted from the trap column onto an analytical 75-mm id x 15-cm C18 Pep-Map column (LC Packings) with a 5–40% linear gradient of solvent B in 105 min (solvent A was 0.1% formic acid in 5% ACN, and solvent B was 0.1% formic acid in 80% ACN). The separation flow rate was set at 200 nl/min. The mass spectrometer operated in positive ion mode at a 1.8-kV needle voltage and a 47-V capillary voltage. Data were acquired in a data-dependent mode. MS scans (*m/z* 300-1700) were recorded at a resolution of R = 60 000 (@ m/z 400) and and an AGC target of 5×10^5 ions collected within 500 ms. Dynamic exclusion was set to 30 s and top 6 ions were selected from fragmentation in CID mode. MS/MS scans with a target value of 1×10^4 ions were collected with a maximum fill time of 200 ms. *Database search and results processing:* Data were searched by SEQUEST through Proteome Discoverer 1.4 (Thermo Fisher Scientific Inc.) against a subset of the 2012.09 version of the UniProt database restricted to Human Reference Proteome Set (67,949 entries). Spectra from peptides higher than 5 kDa or lower than 350 Da were rejected. The search parameters were as follows: mass accuracy of the monoisotopic peptide precursor and peptide fragments was set to 10 ppm and 0.6 Da respectively. Only b- and y-ions were considered for mass calculation. Oxidation of methionines (+16 Da) and carbamidomethylation of cysteines (+57 Da) were considered as variable modifications. Two missed trypsin cleavages were allowed. Peptide validation was performed using Percolator algorithm [9] and only "high confidence" peptides were retained corresponding to a 1% False Positive Rate at peptide level. *Label-Free Quantitative Data Analysis:* Raw LC-MS/MS data were imported into Progenesis LC-MS 4.0 (Nonlinear Dynamics Ltd, Newcastle, U.K). Data processing includes the following steps: (i) Features detection, (ii) Features alignment across the 12 sample, (iii) Volume integration for 2-6 charge-state ions, (iv) Normalization on total protein abundance, (v) Import of sequence information, (vi) ANOVA test at peptide level and filtering for features $p < 0.05$, (vii) Calculation of protein abundance (sum of the volume of corresponding peptides), (viii) ANOVA test at protein level and filtering for features $p < 0.05$. Noticeably, only non-conflicting features and unique peptides were considered for calculation at protein level. Quantitative data were considered for proteins quantified by a minimum of 2 peptides.

Protein database for recovery of metabolic pathways: Accession numbers of identified genes showing a significant protein upregulation (>1.5) or down-regulation (0.67>) upon metabolic reprogrammers were analysed by the KEGG PATHWAY using the STRING 10 database [10]. These included ≈ 420 genes on average depending on cell lines and treatments. A first global unbiaised approach was conducted to identify Gene Ontology (GO) among large biological functions. GO was considered significant with p-value<0.05 and were reported with the associated number of genes in Supplemental Figures. A further analysis within the GO-annotated "Metabolic pathways" was conducted to identify gene enrichment of particular metabolic pathways, thereby depicting rewiring of metabolic networks.

REFERENCES

1. Xiao, B. *et al.* Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat. Commun.* **4,** 3017 (2013).

2. Laderoute, K. R. *et al.* 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) is induced by low-oxygen and glucose deprivation conditions found in solid-tumor microenvironments. *Mol. Cell. Biol.* **26,** 5336–5347 (2006).

3. Halary, F. *et al.* Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. *J. Exp. Med.* **201,** 1567–1578 (2005).
4. Pitard, V. *et al.* Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. *Blood* **112,** 1317–1324 (2008).
5. Aricescu, A. R., Lu, W. & Jones, E. Y. A time- and cost-efficient system for high-level protein production in mammalian cells. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62,** 1243–1250 (2006).
6. Seiradake, E., Harlos, K., Sutton, G., Aricescu, A. R. & Jones, E. Y. An extracellular steric seeding mechanism for Eph-ephrin signaling platform assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17,** 398–402 (2010).
7. Seiradake, E. *et al.* Structurally encoded intraclass differences in EphA clusters drive distinct cell responses. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20,** 958–964 (2013).
8. Lund, J., Takahashi, N., Pound, J. D., Goodall, M. & Jefferis, R. Multiple interactions of IgG with its core oligosaccharide can modulate recognition by complement and human Fc gamma receptor I and influence the synthesis of its oligosaccharide chains. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **157,** 4963–4969 (1996).
9. Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S. & MacCoss, M. J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* **4,** 923–925 (2007).
10. Kanehisa, M. *et al.* Data, information, knowledge and principle: back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **42,** D199–205 (2014).

b. Identification de cibles immunométaboliques et caractérisation de leur effet en pathologie cancéreuse

Contexte

Comme décrit précédemment, le métabolisme tumoral est complétement modifié par rapport à celui des cellules normales. Cela permet au cancer de subvenir aux besoins énergétiques induits par la prolifération rapide et la migration des cellules, malgré un environnement pauvre en oxygène et en nutriments. Ces modifications, nommées reprogrammation métabolique, sont l'une des caractéristiques majeures du cancer, nouvellement introduite par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011). Par cette suractivation métabolique, la tumeur va modifier le microenvironnement tumoral qu'elle va rendre plus immunosuppresseur, et ainsi agir sur la composition et l'activation des cellules du système immunitaire (Domblides et al., 2019). Son action peut être directe par la déplétion en nutriments nécessaires à la différenciation et à la fonction des cellules immunitaires, ou indirecte par le relargage de molécules solubles qui exercent un effet immunosuppresseur.

Des travaux préalables réalisés dans le laboratoire ont montré que la reprogrammation *in vitro* du métabolisme tumoral pouvait moduler l'activation de certaines populations immunitaires. Dans cette expérience, des cellules tumorales de cancer bronchique (SKMES) ont été cultivées dans différentes conditions : en milieu glucose (standard) et en milieu galactose. Le milieu galactose est un milieu pauvre en glucose, permettant la reprogrammation métabolique puisqu'il favorise le métabolisme oxydatif au détriment de la glycolyse aérobie. Le surnageant de culture des cellules tumorales cultivées dans ces 2 conditions a ensuite été mis en présence, pendant 48 heures, de lignées polyclonales humaines LT γδ Vδ2 négatives et leur activation a été évaluée par la quantification de la sécrétion d'IFNγ. Il a été observé une activation plus importante des LT γδ par le surnageant de cellules tumorales cultivées en milieu galactose, par rapport au surnageant de culture standard, ou même au milieu galactose lui-même (Figure 30). Cet effet dépendait de l'activation du TCR, puisque les LT γδ étaient également activés par un anti-CD3, de manière dose-dépendante. Cela signifie que les cellules tumorales sont capables de sécréter dans le microenvironnement tumoral des molécules immunomodulatrices dont la production dépend de leur métabolisme.

L'effet observé dans cette expérience dépend de l'activation de l'AMPK qui est un senseur cytosolique majeur des besoins énergétiques de la cellule. L'AMPK est une enzyme qui joue un rôle dans la transition métabolique de l'anabolisme vers le catabolisme, à l'inverse de la voie mTOR qu'elle inhibe en contrepartie. Elle est activée par la diminution des concentrations intracellulaires en ATP et l'augmentation des concentrations en AMP, signe d'un défaut d'énergie disponible au sein de la cellule pour alimenter les différentes voies cellulaires. Elle est retrouvée diminuée dans plusieurs types de tumeurs (Hardie et al., 2012). Son activation peut être induite *in vitro* par la diminution du glucose dans le milieu (ce qui induit une diminution de l'ATP) ou par des reprogrammateurs pharmacologiques, tels que la metformine, largement utilisée dans le diabète de type 2. Ainsi, dans des modèles murins, la metformine a un rôle protecteur limitant l'apparition de cancers. De même, il existe dans les méta-analyses d'essais chez l'homme un risque diminué de cancers chez les patients traités avec cette molécule (Franciosi et al., 2013; Hardie, 2015).

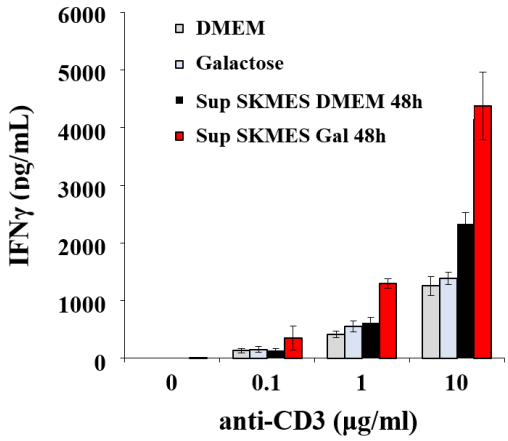


Figure 30 : La reprogrammation métabolique des cellules de cancer du poumon favorise le relargage de molécules solubles immunomodulatrices sur les LT γδ.
Les cellules SKMES sont cultivées en milieu glucose (DMEM) ou galactose (reprogrammation). Les LT γδ, activés par un anti-CD3 à concentrations croissantes, ont été cultivés dans le surnageant de culture des SKMES, ou dans du milieu frais, pendant 48 heures. L'activation des LT γδ a été évaluée par ELISA IFNγ. Sécrétions exprimées en moyenne +/- SD.

Objectif du projet

En raison des observations faites lors d'expériences réalisées préalablement à mon arrivée dans le laboratoire, nous avons conduit une analyse exploratoire pour identifier les molécules solubles dépendantes du métabolisme tumoral qui ont un effet immunomodulateur sur les LT γδ. En effet, ces molécules pourraient constituer des cibles thérapeutiques dans le cancer et leur petite taille rend plus facile leur modulation pharmacologique. Nous décrivons ici la méthodologie employée ainsi que les premiers résultats obtenus.

Méthodes

Lignées cellulaires et conditions de culture

Nous avons utilisé des SKMES, issues d'un adénocarcinome bronchique, et des HT29 issues d'un adénocarcinome colique. Les lignées ont été obtenues auprès de l'American Type Culture Collection (ATCC®) et ont été testées négatives pour le mycoplasme. Elles ont été cultivées dans un milieu comprenant du RPMI-1640 (Gibco ThermoFisher Scientific®) supplémenté avec 8% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 100 µg /mL de pénicilline, 100 mg/mL de streptomycine, et 2 mM de glutamine, mises à 37°C dans un incubateur humidifié avec 5% de CO_2.

Purification et expansion de LTγδ

Nous avons utilisé des LT γδ polyclonaux pour mieux représenter ce qu'il se passe dans la tumeur. Ainsi, nous avons utilisé des cellules immunitaires de sang périphérique de donneurs sains. Les cellules immunitaires ont été isolées grâce à la réalisation d'un Ficoll. Les LT γδ ont été triés pour ne retenir que les LT γδ Vδ2 négatifs, qui représentent la population principale retrouvée dans les tissus humains. Nous avons pour cela utilisé un kit spécifique de tri négatif des cellules exprimant le TCR γδ à l'aide de billes magnétiques anti-biotine (Pan T Cell Isolation kit, human, Miltenyi Biotec®, référence 130-096-535). Nous y avons ajouté un anticorps anti-Vδ2-FITC avec des billes magnétiques anti-FITC

pour ne garder que les LT γδ Vδ2 négatifs. Parmi les LT γδ récupérés, 3.10^6 cellules ont été expandus en coculture avec $7{,}5.10^6$ de cellules allogéniques mononucléées irradiées (35 Gys) issus de 2 donneurs sains différents, et 3.10^6 de B-EBV (lignées de lymphome de Burkitt) également irradiées afin d'obtenir une expansion polyclonale des LT γδ Vδ2 négatifs. Le milieu de culture des LT γδ contenait du RPMI-1640 (Gibco ThermoFisher Scientific®), 8% de sérum humain, 2 mM de L-glutamine, de la leuco-agglutinine (1 mg/mL, Sigma-Aldrich®) et de l'IL-2 recombinante exogène (1000 UI/mL, Chiron®).

Après 3 semaines d'expansion, pendant lesquelles le milieu est régulièrement changé, la pureté des LT γδ a été évaluée par cytométrie afin de s'assurer qu'il ne s'agissait, en fin de culture, que de LT γδ Vδ2 négatifs, en utilisant le cocktail d'anticorps suivant : anti-CD3 APC, anti-γδ PerCP et anti-Vδ2-FITC. De même, nous avons évalué par ELISA (Mabtech®, référence 3420-1H-6) leur capacité à s'activer, en dosant l'IFNγ après stimulation dans des plaques NUNCLON DELTA SURFACE (ThermoFisher Scientific®, référence 161093) coatées la veille par un anti-CD3 (OKT3, BioLegend®, référence 317302) à concentrations croissantes (1 µg/mL ou 5 µg/mL ou 10 µg/mL) pour évaluer l'activabilité des LT γδ.

Purification des peptides (Figure 31)

Chacune des lignées cellulaires a été cultivée dans 3 conditions différentes pendant 72 heures (pour obtenir une confluence de 80%) : en condition standard glucose, reprogrammées dans du milieu galactose filtré ou dans un milieu RPMI-1640 enrichi en AICAR. Le galactose est un milieu constitué de DMEM sans glucose, supplémenté avec 10 mM de galactose (Sigma Aldrich®), 2 mM de glutamine, 10 mM d'HEPES (Sigma Aldrich®), 1 mM de sodium pyruvate (Sigma Aldrich®) et 8% de sérum de veau fœtal. AICAR est un reprogrammateur métabolique agoniste de l'AMPK (C_f 500 µmol/L, Sigma Aldrich®, référence A9978). Il est dilué dans un milieu comprenant du RPMI-1640, 8% de sérum de veau fœtal et 2 mM de glutamine.

Nous avons ainsi développé une méthode de purification de molécules de petites tailles. Lors du premier essai, nous avons utilisé les surnageants de culture d'une seule flasque T75, correspondant à un volume de 15 mL pour chaque condition. Néanmoins, cette première tentative n'a pas permis d'identifier de molécules en spectrométrie de masse, probablement du fait de concentrations insuffisantes en petites molécules. Nous avons donc réitéré l'opération avec des volumes plus importants, de 150 mL pour chaque condition. La méthodologie était identique entre les 2 expérimentations, seuls diffèrent les volumes de resuspension, la taille des colonnes utilisées et le volume des fractions. Nous ne décrivons ici que la seconde, qui a permis d'identifier des peptides d'intérêt.

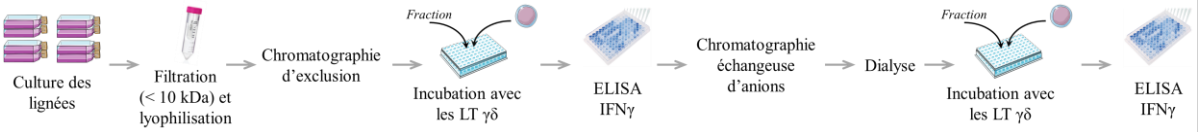


Figure 31 : Méthodologie d'isolement des peptides.
Après filtration et lyophilisation, les échantillons ont été soumis à une série de chromatographies, d'exclusion puis échangeuse d'anions. Seules ont été conservées les fractions qui avaient un effet immunomodulateur sur les LT γδ Vδ2 négatifs.

Ainsi, après culture des cellules dans les différentes conditions, les surnageants ont été filtrés pour ne récupérer que les molécules de moins de 10 kDa (AMICON Ultra-0.5, Merck Millipore®, référence ACS501024) par centrifugation à 4 000 RPM pendant 20 mn à 4°C. Après congélation des filtrats, ceux-ci ont été lyophilisés et resuspendus dans 5 mL de TBS 1X stérile (Tris 50 mM (pH 7.5), NaCl 150 mM), afin de concentrer les molécules des surnageants.

Nous avons ensuite réalisé 2 séries de fractionnements selon 2 types de chromatographies. La première chromatographie correspondait à une chromatographie d'exclusion, qui sépare les molécules selon leurs tailles respectives. Les colonnes de chromatographie (HiLoad Superdex 30 PG size, GE Healthcare®) ont été calibrées au préalable en utilisant le lysozyme (14 400 Da), l'aprotinine (6 500 Da), la glutamine (146 Da) et le pyruvate (88 Da). Les profils de chromatographie ont été analysés dans les 2 longueurs d'onde suivantes : 215 nm (liaisons peptidiques) et 280 nm (acides aminés aromatiques comprenant des noyaux phénols, notamment Phe, Tyr et Trp). Pour chaque fraction, nous avons obtenu 1 mL de solution. Chaque fraction, obtenue dans un tampon comprenant du Tris 50 mM (pH 7.5) et 150 mM de NaCl, a été testée sur des LT γδ Vδ2 négatifs. Ainsi, des plaques ont été préalablement coatées avec un anti-CD3 (concentrations de 1 µg/mL ou 5 µg/mL ou 10 µg/mL selon les tests d'activabilité préalables en fin d'expansion des LT γδ). Pour chaque puits, 50 000 LT γδ Vδ2 négatifs (volume de 50 µL de RPMI-1640 et 2 mM de L-glutamine sans sérum ni antibiotiques) ont ensuite été mis en présence pendant 24 heures de 100 µL de chaque fraction dans des puits séparés. Les plaques ont été ensuite centrifugées à 2 500 RPM pendant 2 mn afin de récupérer les surnageants de culture. Un ELISA IFNγ a été réalisé afin d'évaluer l'activation des LT γδ Vδ2 négatifs. Seules les fractions ayant un effet immunomodulateur ont été sélectionnées pour la suite. Les résultats de sécrétion cytokinique sont normalisés sur la sécrétion des LT γδ Vδ2 négatifs exposés aux fractions de l'échantillon qui sont négatives en chromatographie et sont exprimés en ratios. Les groupes de fractions d'intérêt ont été mutualisés pour la seconde chromatographie.

Les fractions immunomodulatrices ont ensuite bénéficié d'une chromatographie échangeuse d'anion (Resource Q colonne 1 mL, GE Healthcare®, référence 10479944). Ces fractions, conservées dans un tampon contenant du Tris 50 mM (pH 7.5) et du NaCl 150 mM, ont été préalablement diluées au 1/5° dans du Tris 50 mM (pH 7.5) afin de diluer le sel pour permettre l'échange sur la membrane. Le tampon d'élution utilisé correspondait à du Tris 50 mM (pH 7.5) et du NaCl à la concentration de 1 M, pour permettre de libérer correctement les molécules de la membrane du fait de leur petite taille. Afin de pouvoir les tester sur les LT γδ Vδ2 négatifs sans induire de lyse osmotique du fait de concentrations fortes en NaCl, les fractions obtenues ont été dessalées à l'aide de membranes de dialyse (Biotech CE Tubing MW 100-500 Da, Spectra/Por® dialysis membrane, référence 131054), dans un tampon contenant du Tris 50 mM (pH 7.5) et du NaCl 150 mM pendant 18h. Les fractions ont ensuite été testées séparément sur les LT γδ Vδ2 négatifs selon la même procédure que préalablement décrite.

Les fractions ayant un effet immunomodulateur ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse. Ainsi, 5 µL ont été injectés dans un système LC-MS d'analyse en spectrométrie de masse. Une colonne de C18 a été utilisée et 2 solvants ont été préparés : solvant A avec 0.1% d'acide formique dilué dans de l'eau, solvant B composé de 0.1% d'acide formique dilué dans l'acétonitrile. Les échantillons

ont ensuite été analysés en utilisant le mode de fragmentation DDA (Data Dependent Acquisition) et les données ont été traitées à l'aide de 2 logiciels différents qui utilisent des algorithmes complémentaires. L'un de ces logiciels permet d'identifier les peptides à partir d'une liste de protéines humaines issues de la base de données uniprot.org. Des analyses de voies moléculaires ont été réalisées pour déterminer la fonction moléculaire des protéines dont sont issus les peptides les plus représentés. Les peptides d'intérêt sont ceux qui ont été identifiés grâce aux 2 méthodes. Nous avons retenu les peptides qui sont différents entre les conditions de culture.

Résultats et discussion

Purification et expansion des LT γδ Vδ2 négatifs

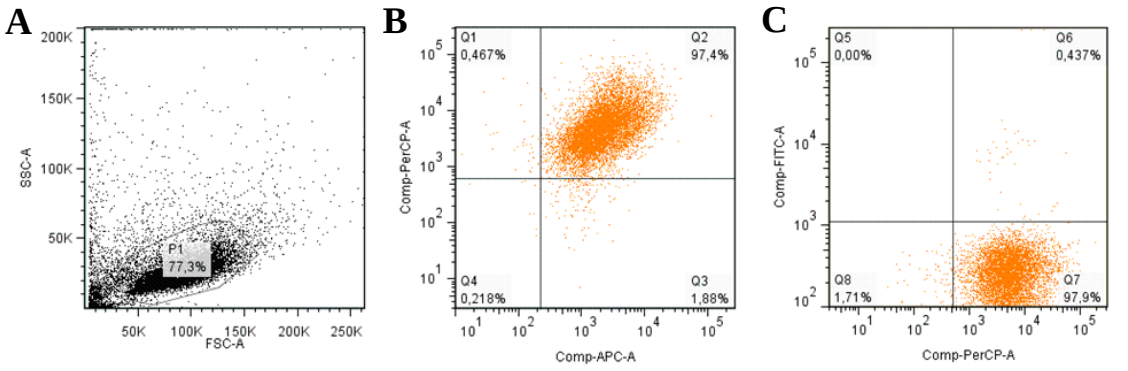


Figure 32 : Pureté des LT γδ obtenus après tri négatif à partir de PBMC d'un donneur sain.
A : Les cellules sont tout d'abord ciblées selon leur taille (FSC) et leur granulosité (SSC). Les LT γδ sont des cellules de petite taille et peu granuleuses (faibles FSC et SSC). Elles sont comprises dans P1. Le reste des cellules correspond à des débris ou des cellules mortes.
B et C : les LT γδ Vδ2 négatifs sont des cellules qui vont exprimer le CD3 (APC), le TCR γδ (PerCP), et n'exprimeront pas le sous-type Vδ2 (FITC).

Suite à la procédure de purification et d'expansion des LT γδ Vδ2 négatifs décrite précédemment, nous avons obtenu une bonne pureté cellulaire, avec 97.4% de LT γδ et seulement 0.4% de Vδ2 positifs (Figure 32). Par ailleurs, nous avons une contamination de 1.88% par les LT αβ. Les LT γδ peuvent être expandus selon le protocole précédemment décrit 2 à 3 fois maximum afin d'éviter qu'ils ne deviennent sénescents et qu'ils ne meurent. Une partie des cellules a donc été utilisée après une seule expansion, et une autre partie a été congelée pour réaliser l'ensemble des expériences suivantes. Lors des décongélations, les LT γδ étaient systématiquement expandus à nouveau pendant 3 semaines et leur pureté réévaluée en cytométrie avec le même panel.

Modulation de la réponse immunitaire des LT γδ par les lignées de cancer du colon

Les profils obtenus après chromatographie d'exclusion pour la lignée HT29 retrouvent des profils globalement superposables dans les longueurs d'ondes de 215 nm et 280 nm pour les 3 conditions (Figure 33). Le profil obtenu comprend un pic majoritaire du fait de quantités importantes de molécules différentes dans l'éluat. En effet, les surnageants ont été concentrés grâce au processus de lyophilisation et grâce à une resuspension dans un plus petit volume. Néanmoins, il existe un pic très tardif dans la longueur d'onde 215 nm, plus important pour le milieu galactose que pour les milieux AICAR ou glucose. Il s'agit probablement de l'élution d'un des composants du milieu et non d'un effet spécifique de la reprogrammation métabolique.

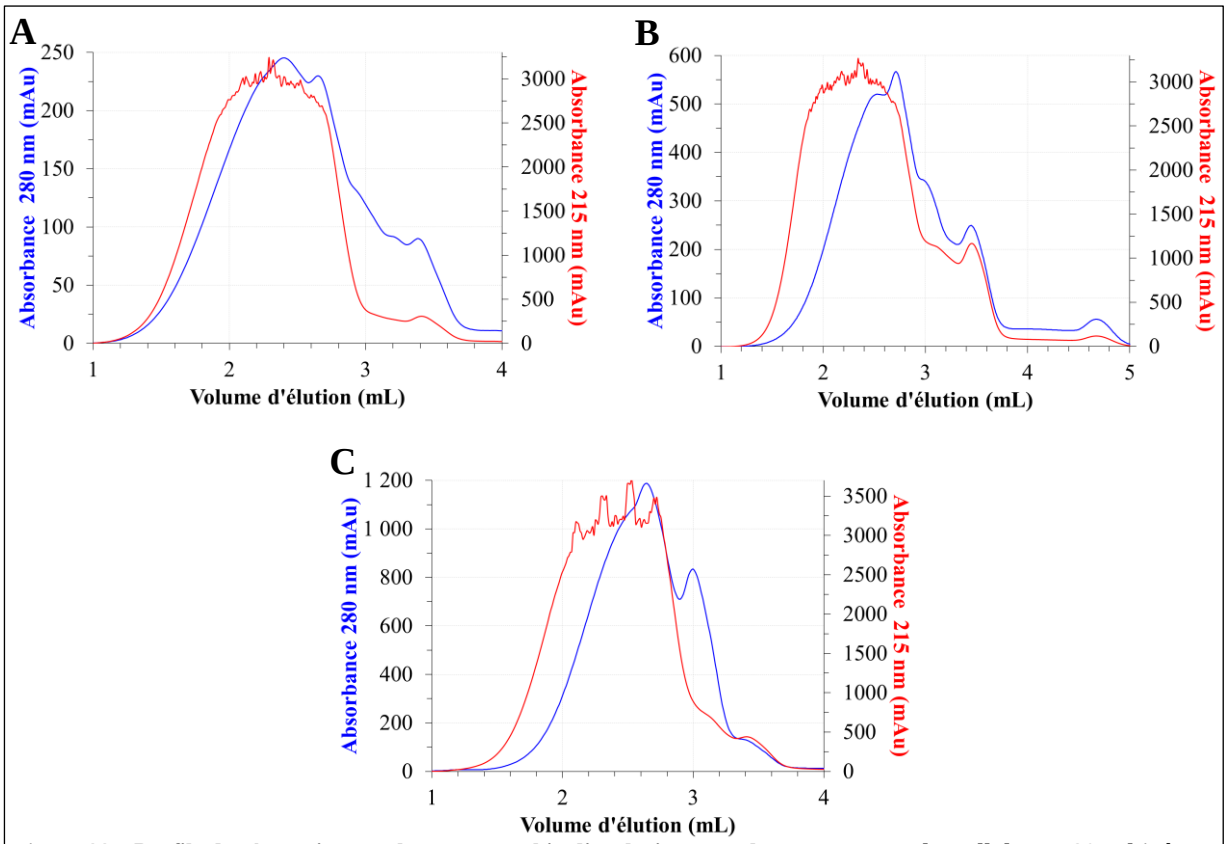


Figure 33 : Profils de séparation en chromatographie d'exclusion pour les surnageants des cellules HT29 cultivées en milieu glucose (A), galactose (B) et AICAR (C).
Les profils obtenus dans les longueurs d'onde 215 nm (rouge) et 280 nm (bleu) sont montrés ici.

L'évaluation de l'effet des fractions obtenues sur les LT γδ Vδ2 négatifs ne retrouvait pas de différences d'activation induite par la reprogrammation métabolique (Figure 34). Il existait par ailleurs de grandes variations dans la réplicats de stimulation. C'est pourquoi les analyses n'ont par la suite été poursuivies qu'avec les SKMES.

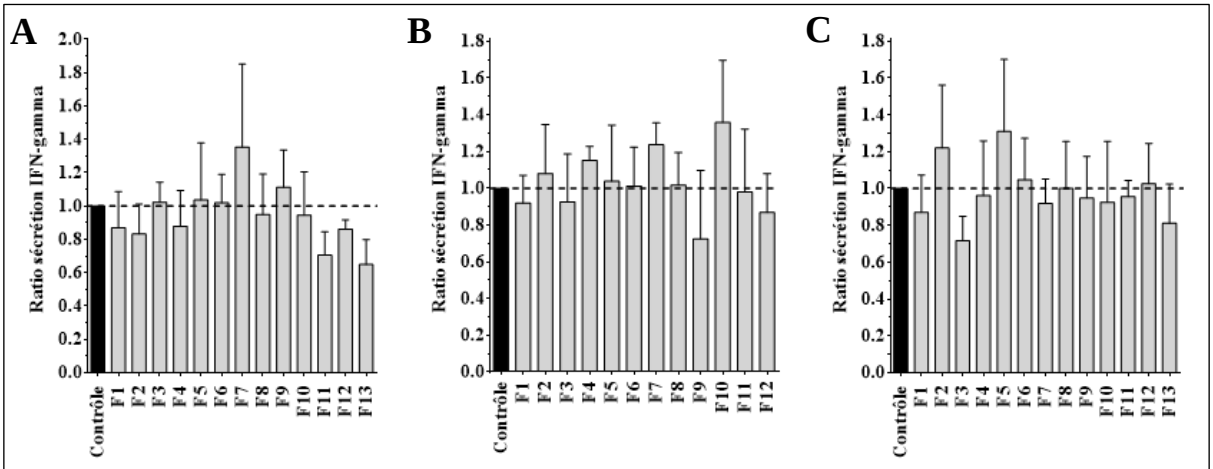


Figure 34 : Profils d'activation obtenus sur les LT γδ Vδ2 négatifs après culture avec les différentes fractions issues de la chromatographie d'exclusion pour les surnageants glucose (A), galactose (B) et AICAR (C).
Sécrétions d'IFNγ normalisées sur la sécrétion d'IFNγ obtenue avec les fractions négatives en chromatographies dans les 2 longueurs d'onde. La ligne noire en pointillés matérialise la sécrétion basale des LT γδ Vδ2 négatifs. Sécrétions exprimées en moyenne +/- SD.

Modulation de la réponse immunitaire des LT γδ par les lignées de cancer du poumon

Une première série d'analyses a été réalisée, à partir de 15 mL de surnageant pour chacune des conditions de culture. Contrairement aux HT29, après chromatographie d'exclusion, nous avons pu observer un effet inhibiteur de certaines fractions issues des surnageants glucose et un effet activateur pour d'autres fractions provenant des surnageants galactose et AICAR. Les fractions d'intérêt, après chromatographie échangeuse d'anions, ont ensuite été analysées par spectrométrie de masse après clivage par la trypsine, mais aucune molécule n'a pu être identifiée. Plusieurs points peuvent expliquer ces résultats négatifs. Tout d'abord, les fractions issues de la chromatographie échangeuse d'ions ont subi un dessalage avant d'être testées sur les LT γδ Vδ2 négatifs. Ce processus de dialyse peut avoir induit la perte des peptides, ou leur dilution induisant une perte de leur effet. Ensuite, il est possible que les concentrations des petites molécules d'intérêt soient trop faibles pour permettre une identification fiable. En effet, les concentrations de nos échantillons sont inconnues puisqu'en raison d'un faible volume d'échantillon, nous n'avons pas pu procéder à des dosages. Nous n'avons donc aucune idée de la quantité de peptides au début et à la fin de l'expérience. De plus, l'analyse en spectrométrie a été réalisée après clivage par la trypsine. Les molécules contenues dans nos échantillons sont de petites tailles et ne contiennent pas obligatoirement de sites de clivage par cette enzyme. Une analyse avec d'autres enzymes de clivage aurait peut-être permis d'identifier les peptides. De même, nous étudions des peptides potentiellement mutés et/ou pouvant correspondre à une partie d'une protéine. C'est pourquoi la comparaison de la séquence avec les bases de données peut ne pas permettre d'identifier la molécule. Nous avons donc réalisé à nouveau l'intégralité de l'expérience en augmentant le volume initial de surnageant, afin de s'affranchir d'un problème de concentrations en substances actives.

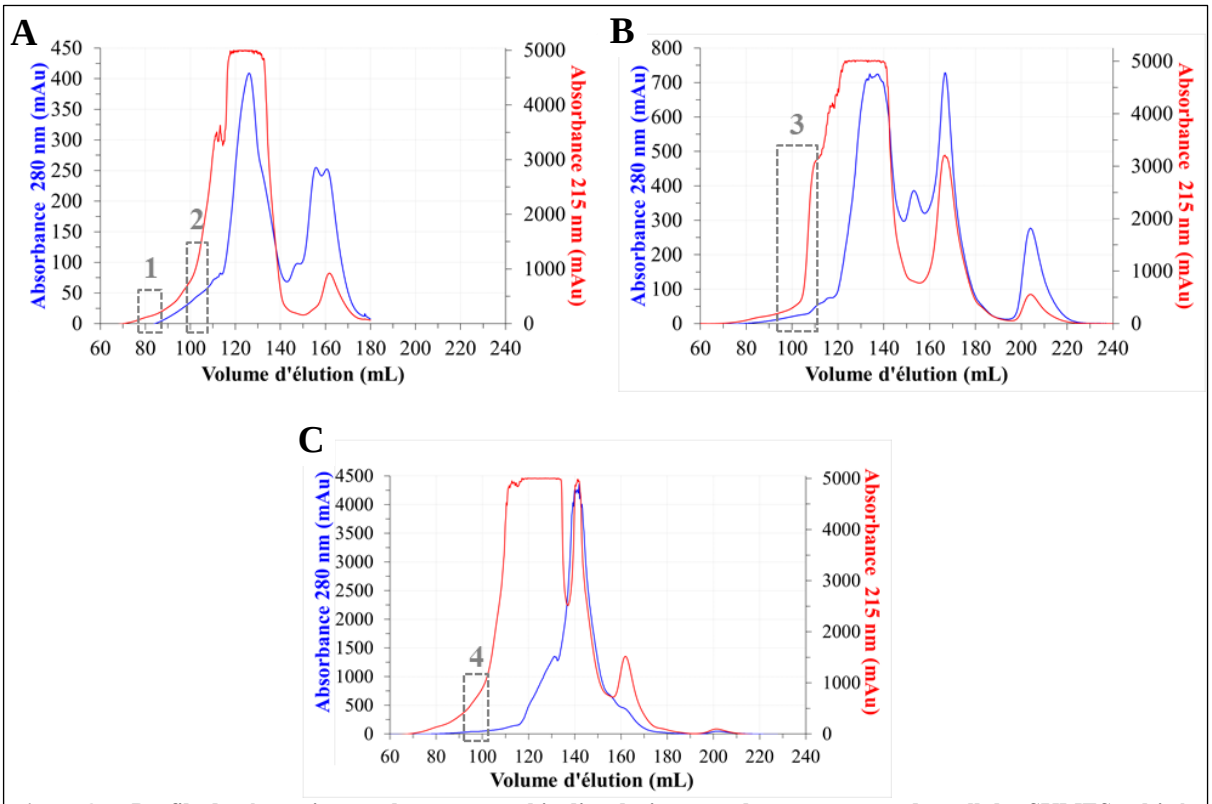


Figure 35 : Profils de séparation en chromatographie d'exclusion pour les surnageants des cellules SKMES cultivées en milieu glucose (A), galactose (B) et AICAR (C).
Les profils obtenus dans la longueur d'onde 215 nm (rouge) et 280 nm (bleu) sont montrés. Les fractions immunomodulatrices retrouvées après analyse de l'effet sur les LT γδ sont indiquées en gris.

Les profils obtenus lors de la seconde chromatographie d'exclusion montrent des pics similaires, correspondant probablement à des éléments du milieu dans lequel les cellules sont cultivées ou à des molécules relarguées de manière indépendante du métabolisme (Figure 35). Néanmoins, il existe des éléments qui les distinguent, tant sur l'intensité de l'absorbance dans les 2 longueurs d'onde que sur leur répartition et les volumes d'élution, signifiant un effet propre de la reprogrammation. Ainsi, on peut observer des profils plus complexes dans les conditions de reprogrammation métabolique galactose et AICAR, avec des molécules plus riches en acides aminés aromatiques pour le galactose et AICAR. L'analyse de ces chromatographies reste compliquée du fait de la quantité et la variété importantes en molécules contenues dans les échantillons.

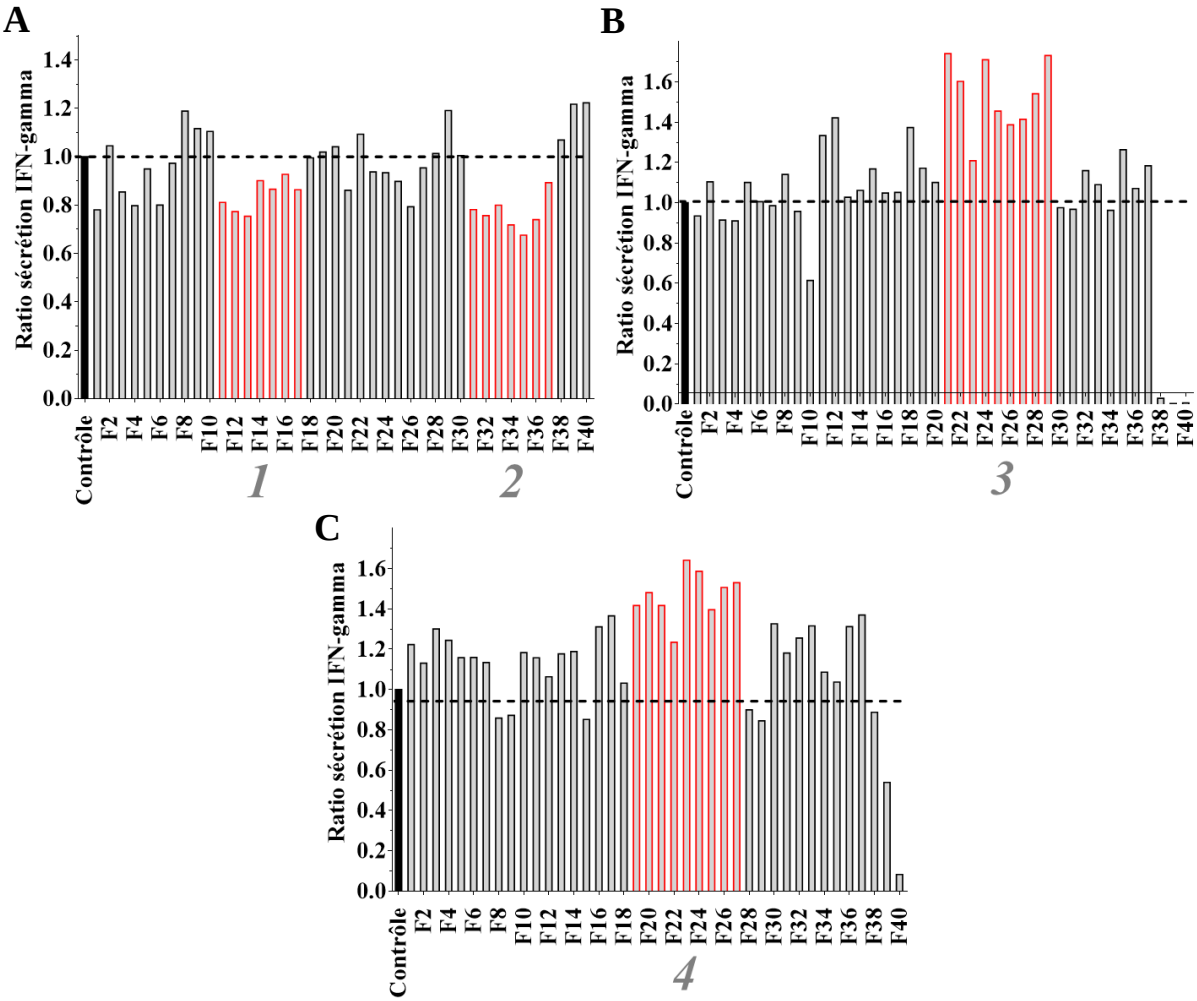


Figure 36 : Profils d'activation obtenus sur les LT γδ Vδ2 négatifs après culture avec les différentes fractions issues de la chromatographie d'exclusion pour les conditions glucose (A), galactose (B) et AICAR (C).
Sécrétions d'IFNγ normalisées sur la sécrétion d'IFNγ obtenue avec les fractions négatives en chromatographie. La ligne noire en pointillés matérialise la sécrétion basale des LT γδ Vδ2 négatifs. Les fractions rouges correspondent aux fractions sélectionnées pour la suite de l'expérience. Les groupes de fractions en gris correspondent à celles indiquées dans la Figure 34. Sécrétions exprimées en moyenne +/- SD.

L'effet des fractions issues de la chromatographie d'exclusion sur les LT γδ Vδ2 négatifs retrouve le même profil fonctionnel que lors de la première tentative, à savoir une tendance à la diminution de la sécrétion d'IFNγ en condition standard et une tendance à l'augmentation en condition

de reprogrammation (Figure 36). En particulier, nous avons retrouvé 2 groupes de fractions avec un profil inhibiteur provenant de la condition glucose, et un groupe de fraction pour chaque condition de reprogrammation, plutôt activateurs, provenant des conditions galactose et AICAR.

Les échantillons ont été fractionnés par chromatographie échangeuse d'anions (Figure 37).

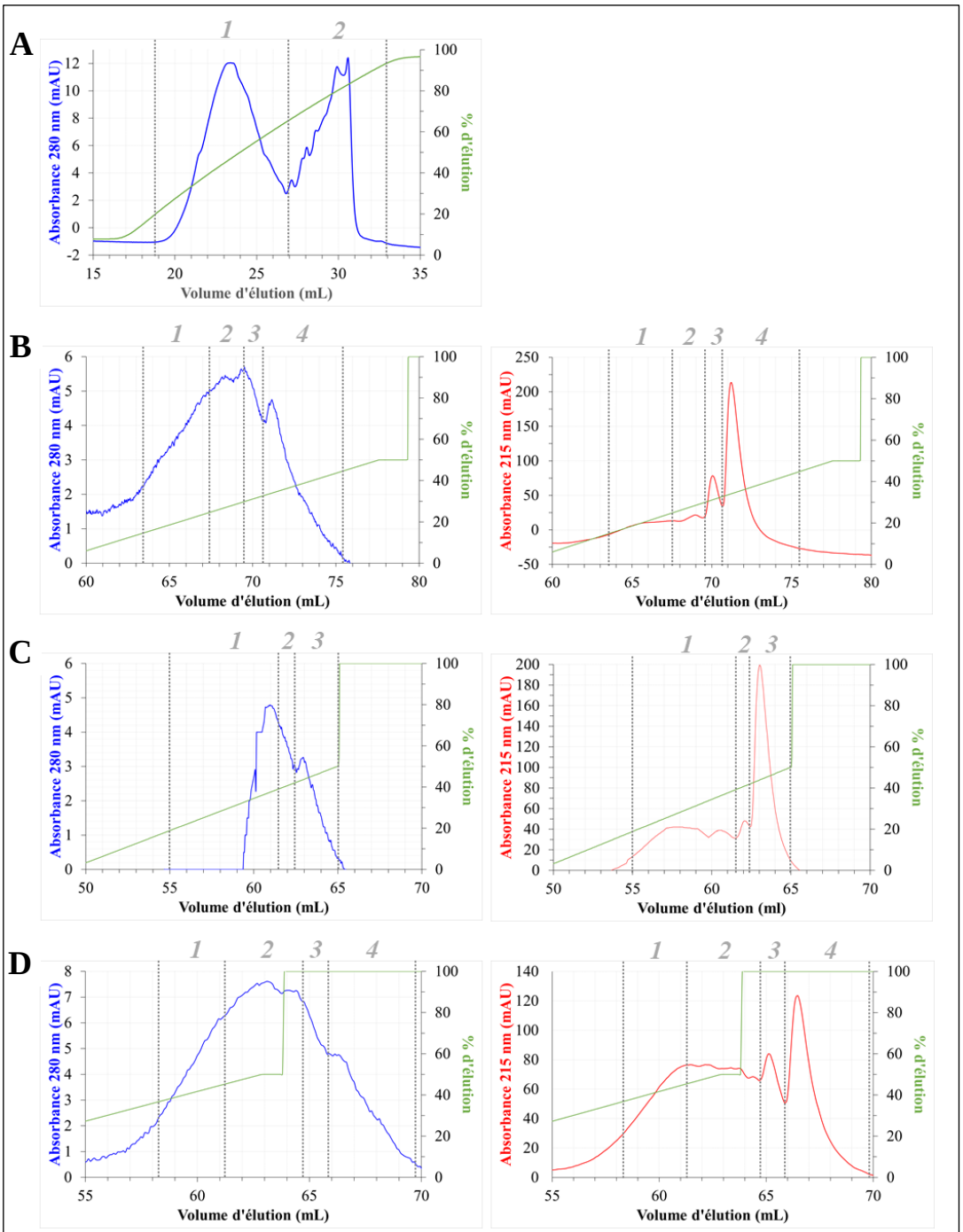


Figure 37 : Profils de séparation en chromatographie d'exclusion pour les échantillons de fractions issus des surnageants RPMI 1 (A) et RPMI 2 (B), galactose 3 (B) et AICAR 4 (C).
Les profils obtenus dans la longueur d'onde 215 nm (rouge) et 280 nm (bleu) sont montrés. Les fractions immunomodulatrices retrouvées après analyse de l'effet sur les LT γδ sont indiquées en gris.

Encore une fois, les profils observés dans les 2 longueurs d'onde présentent des similarités et des différences. En particulier, les profils de chromatographie des conditions galactose et AICAR sont très

proches, avec des intensités plus importantes pour AICAR, probablement du fait de son effet reprogrammateur plus important. Les volumes d'élution ainsi que les intensités sont variables selon les fractions. Les concentrations salines nécessaires à l'élution des peptides sont également variables : de 39% à 100% pour l'échantillon 1 et de 16% à 46% pour l'échantillon 2 issu du surnageant glucose, de 19% à 50% pour l'échantillon galactose, et de 37% à 100% pour l'échantillon AICAR.

Les fractions constituant chaque pic ont été associées et testées sur les LT γδ Vδ2 négatifs (Figure 38).

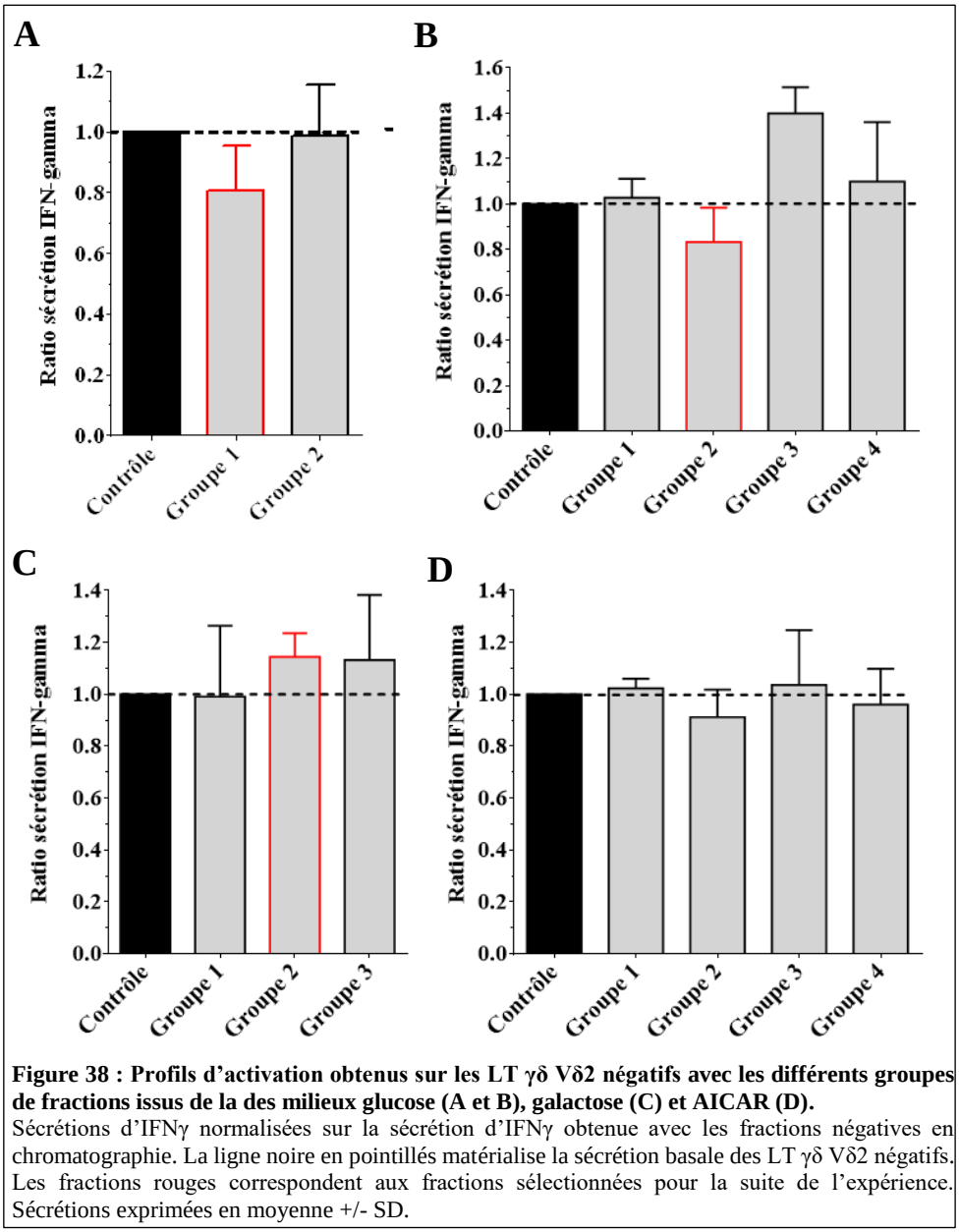


Figure 38 : Profils d'activation obtenus sur les LT γδ Vδ2 négatifs avec les différents groupes de fractions issus de la des milieux glucose (A et B), galactose (C) et AICAR (D).
Sécrétions d'IFNγ normalisées sur la sécrétion d'IFNγ obtenue avec les fractions négatives en chromatographie. La ligne noire en pointillés matérialise la sécrétion basale des LT γδ Vδ2 négatifs. Les fractions rouges correspondent aux fractions sélectionnées pour la suite de l'expérience. Sécrétions exprimées en moyenne +/- SD.

Nous retrouvons le même profil fonctionnel sur les LT γδ, à savoir une inhibition par certains groupes de fractions du milieu glucose, et plutôt activateur pour certains groupes de fractions du milieu galactose. En revanche, nous n'avons pas pu confirmer l'effet activateur des molécules solubles issues de la reprogrammation AICAR. Cela peut s'expliquer soit par une perte des molécules lors de la dialyse, soit par un problème lors de l'élution. En effet, les pourcentages nécessaires pour éluer les molécules issues

du milieu enrichi en AICAR atteignent rapidement 100%, soit parce que les molécules ont des liaisons fortes à la colonne, soit parce qu'il y a eu un problème lors de l'élution.

Les échantillons d'intérêt ont donc été analysés en spectrométrie de masse. Ces échantillons ne sont pas purs, malgré les différentes séries de chromatographies et de séparation. Il s'agit donc de mélanges de plusieurs molécules parmi lesquelles se trouvent une ou plusieurs molécules solubles immunomodulatrices. C'est pourquoi à l'issue de la spectrométrie de masse, 28 peptides ont été identifiés, avec des séquences comprenant entre 4 et 35 acides aminés. Certains sont communs aux 2 échantillons issus du milieu glucose, d'autres sont spécifiques à l'un ou à l'autre. Par ailleurs, nous avons sélectionné dans le milieu galactose les peptides ne se retrouvant pas dans les autres échantillons. Ces molécules représentent tout ou partie d'une protéine et n'ont pas, à l'heure actuelle, de rôle connu pour certaines. Parmi ces molécules, 26 proviennent des fractions inhibitrices, et 2 ont été identifiées dans la fraction activatrice. Les molécules les plus représentées ont été synthétisées pour être testées, pures, en présence de différents types de cellules immunitaires. Ils correspondent aux peptides 1, 2 et 3 issus du glucose, et 25 et 26 issus du galactose.

Effet des peptides purs sur les LT γδ Vδ2 négatifs

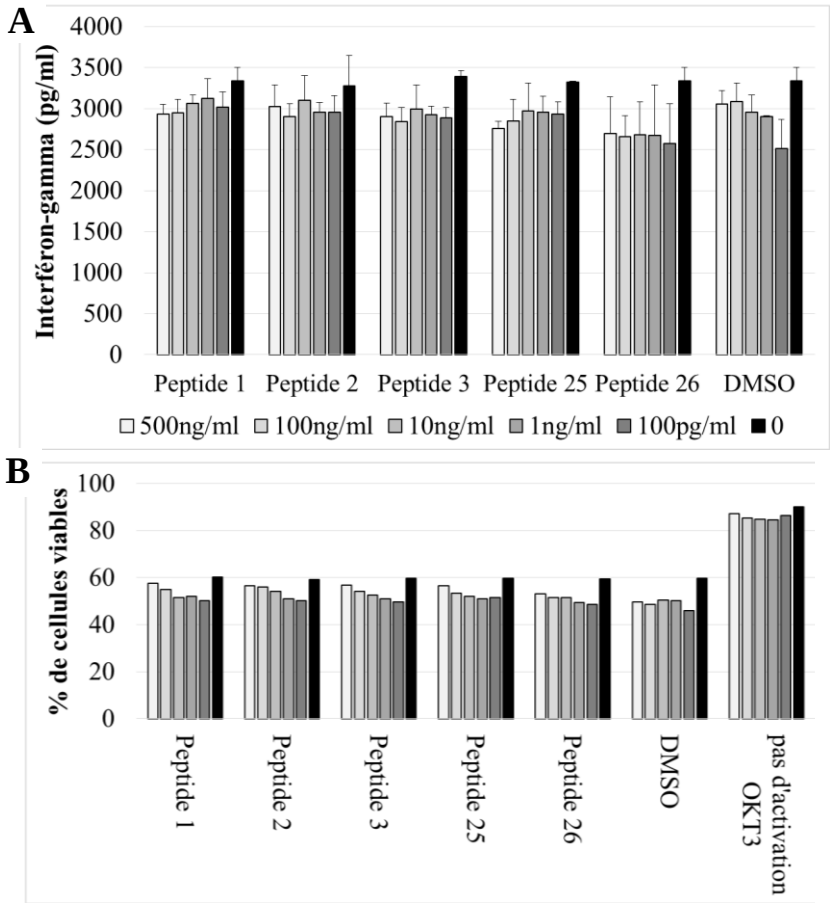


Figure 39 : Profils d'activation des LT γδ Vδ2 négatifs non expandus exposés à des doses croissantes des 5 peptides identifiés.
A : Sécrétions d'IFNγ exprimées en valeur absolue, comparées au contrôle sans peptide (noir). Sécrétions exprimées en moyenne +/- SD.
B : Viabilité des LT γδ évaluée en DAPI, exprimée en pourcentage de cellules vivantes, et comparée à l'absence d'activation CD3.

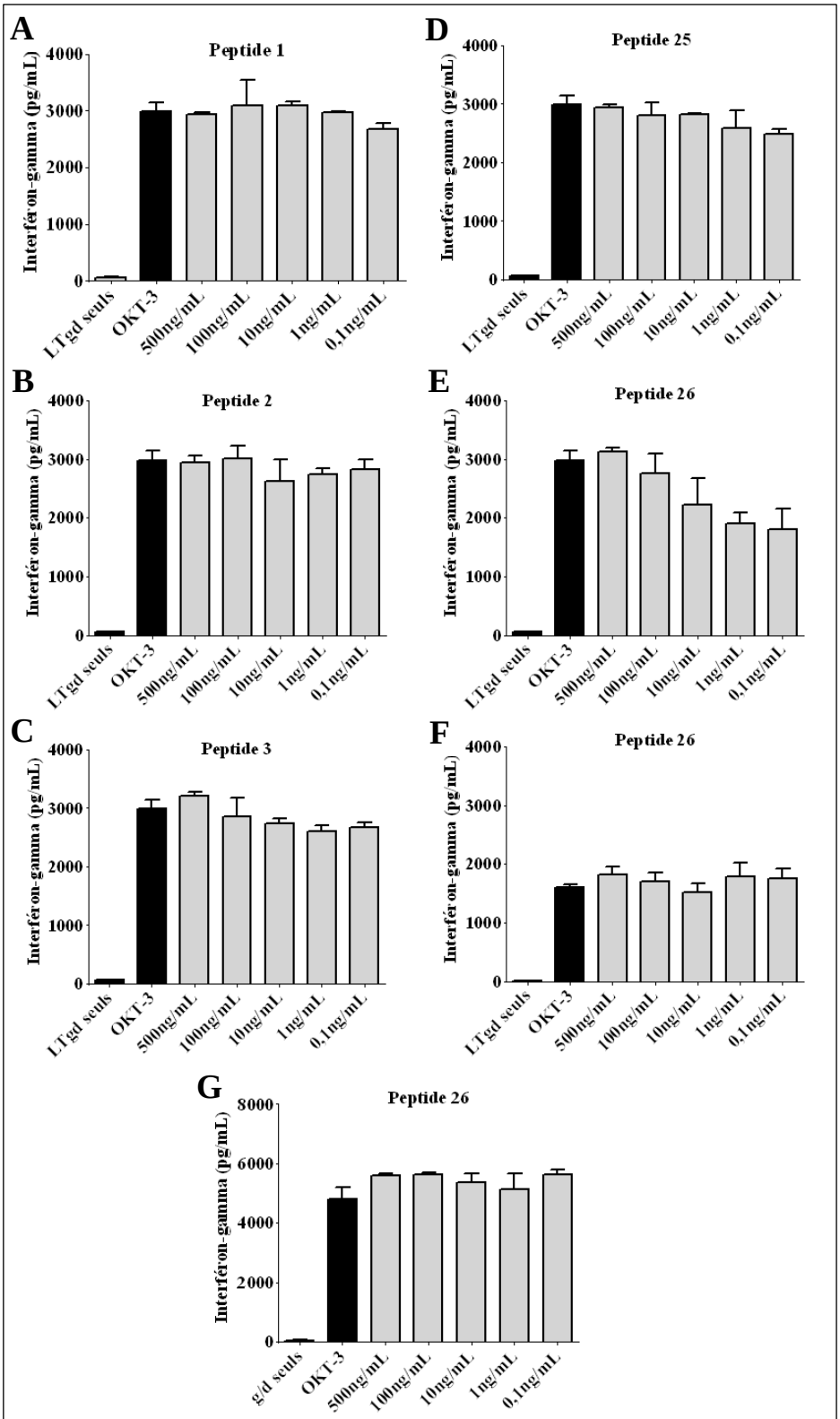


Figure 40 : Profils d'activation des LT γδ expandus en milieu IL-15 provenant d'un donneur sain, exposés à des doses croissantes des 5 peptides identifiés.
A à E : Sécrétions d'IFNγ exprimées en valeur absolue, comparées au contrôle sans peptide stimulé avec l'anti-CD3 (noir).
F et G : Sécrétions d'IFNγ après stimulation par le peptide 26 des LT γδ, sur 2 donneurs sains supplémentaires.
Sécrétions exprimées en moyenne +/- SD.

Nous avons d'abord testé les peptides purs sur les LT γδ Vδ2 négatifs utilisés pour isoler les peptides (V. Pitard). Ces LT γδ n'ont pas été au préalable réexpandus. Il n'a pas été retrouvé d'effet activateur ou inhibiteur des 5 peptides testés sur la sécrétion d'IFNγ des LT γδ Vδ2 négatifs (Figure 39A). Néanmoins, la mortalité importante à la décongélation de ces cellules (50% quelles que soient les conditions) peut expliquer ces résultats négatifs (Figure 39B). Par ailleurs, nous avons également testé les différentes fractions sur des LT γδ issus d'un donneur sain, activés par un anti-CD3 et expandus en IL-15 (G. Marsères). La culture en IL-15 dans le milieu induit un phénotype en fin de culture plutôt de type LT effecteurs mémoires terminaux (T_{EM}). Ces cellules ont une forte polarisation Th1 permettant la sécrétion de cytokines telles que l'IFNγ et le TNFα. Nous n'avons pas observé d'effet des peptides sélectionnés sur la fonction des LT γδ polyclonaux (Figure 40 A à D). Concernant le peptide 26, les premiers résultats retrouvaient un effet dose-dépendant avec une inhibition de la sécrétion d'IFNγ inversement proportionnelle à la dose (Figure 40E), effet qui n'a pas été confirmé sur 2 autres donneurs (Figure 40 F et G).

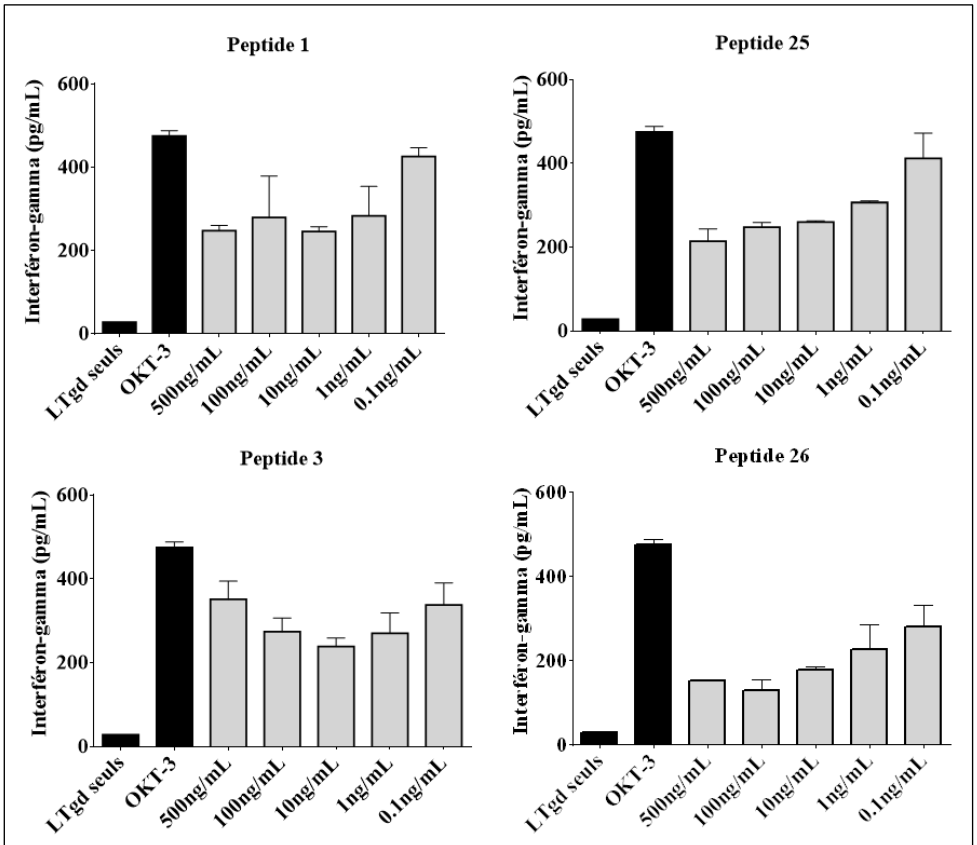


Figure 41 : Profils d'activation des LT γδ expandus en milieu IL-2/IL-15 provenant de patients greffés rénaux infectés par le CMV, exposés à des doses croissantes de 4 peptides identifiés.
Sécrétions d'IFNγ exprimées en valeur absolue, comparées au contrôle sans peptide stimulé avec l'anti-CD3 (noir). Sécrétions exprimées en moyenne +/- SD.

Enfin, nous avons testé les différentes fractions sur des LT γδ activés par un anti-CD3 et issus de patients greffés rénaux et infectés par le CMV. Ces LT γδ ont été expandus en IL-2 et en IL-15 (H. Kaminski). Ce modèle est intéressant car les LT γδ sont capables de réagir contre 2 types de cellules stressées, de manière dépendante du TCR : les cellules infectées par le CMV et les cellules tumorales. Ainsi, il a été montré que les patients greffés présentant une expansion des LT γδ induites par le CMV développaient moins de tumeurs solides. Les mécanismes de régulation sont donc potentiellement

identiques. Nous avons évalué l'effet sur des LT γδ provenant de 2 donneurs différents (Figures 41 et 42). Sur le premier donneur, nous avons pu observer un effet inhibiteur dose dépendante pour les peptides 1, 25 et 26. Cet effet n'a pas été reproduit sur le second donneur avec les 5 peptides (Figure 42). Il n'est pas impossible qu'il y ait un effet du donneur source, ce qui peut expliquer cette discordance entre les 2 patients. Néanmoins, l'inhibition est retrouvée pour l'ensemble des peptides testés chez ce donneur, avec un effet-dose similaire quel que soit le peptide étudié, ce qui est peut-être lié à un effet non spécifique. Ceci explique pourquoi aucun effet n'a pu être obtenu sur les LT γδ du second donneur.

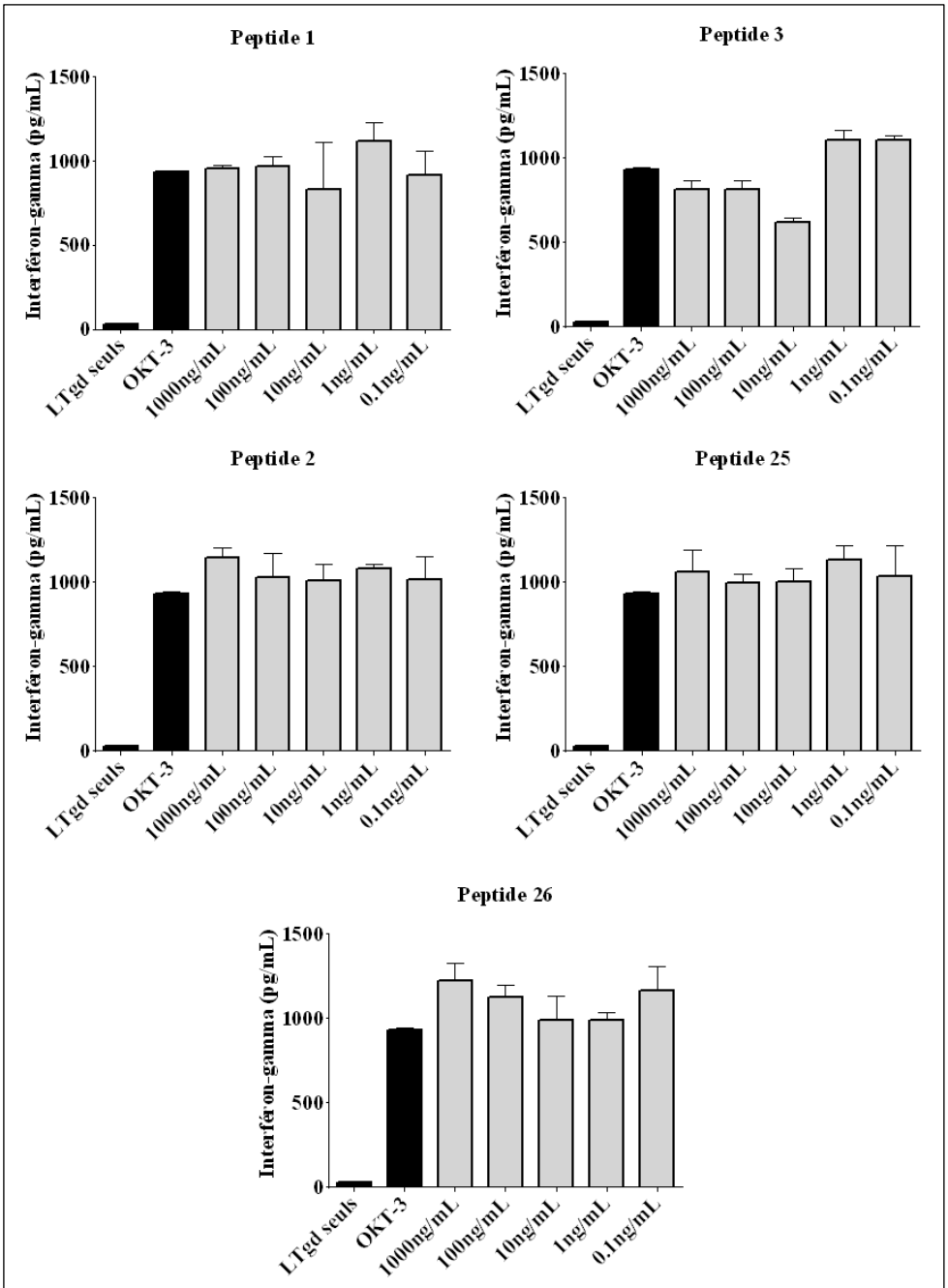


Figure 42 : Profils d'activation des LT γδ provenant de patients infectés par le CMV expandus en milieu IL-2/IL-15, exposés à des doses croissantes des 5 peptides identifiés.
Sécrétions d'IFNγ exprimées en valeur absolue, comparées au contrôle sans peptide stimulé avec l'anti-CD3 (noir). Sécrétions exprimées en moyenne +/- SD.

Nous n'avons donc pas réussi à reproduire les résultats obtenus sur nos lignées initiales de LT γδ, ce qui peut s'expliquer de différentes manières. Tout d'abord, nous avons produit un échantillon contenant probablement plusieurs dizaines de peptides, parmi lesquels nous avons sélectionné les plus représentés et/ou les plus pertinents. Cette sélection peut induire un biais, et l'effet constaté sur les LT γδ peut être lié à une autre molécule présente dans les fractions mais non testée. De plus, la spectrométrie de masse permet le clivage et l'identification de peptides qui ont une taille suffisante pour être clivées. En effet, les enzymes nécessitent la reconnaissance d'un site de restriction pour pouvoir cliver le peptide. La taille de nos molécules, qui pour certaines ne font que quelques daltons, n'ont peut-être pas ces sites de restriction et ne peuvent donc pas être clivées. De plus, les fragments sont comparés à une banque peptidique non exhaustive. Ainsi, certains peptides peuvent être méconnus, et certains peuvent être issus du clivage d'une protéine et donc être non référencés. La technique peut donc manquer de sensibilité, et il n'est pas impossible que la molécule ayant eu un effet robuste (puisque constaté sur plusieurs réplicats) n'ait pas été identifiée par la technique. Enfin, la spectrométrie de masse identifie des protéines ou des peptides, mais il est maintenant de plus en plus rapporté que d'autres types de molécules peuvent être induits par le métabolisme et avoir un effet immunomodulateur. La spectrométrie de masse ne permet pas d'identifier ces molécules, ce qui peut expliquer ces résultats négatifs sur cette sous-population.

Effet des peptides purs sur les lymphocytes B

Nous avons poursuivi les investigations et testé les peptides sur d'autres lignées immunitaires. Nous avons ainsi pu constater des effets intéressants de l'un d'entre-eux, le peptide 26, sur les lymphocytes B (I. Douchet, P. Blanco). Ainsi, lorsque les LT follicular helper (Tfh) ($CD3^+$ $CD4^+$ $CXCR5^+$ $CD45RA^-$) sont cultivés avec des LB mémoires ($CD19^+$ $CD27^+$) purifiés à partir de sang périphérique pendant 6 jours en présence des différents peptides identifiés, il existe une diminution de la différenciation en plasmablastes des LB mémoires ($CD19^+$ $CD38^+$ $CD27^+$) ainsi que de la production d'immunoglobulines (IgG) dans le surnageant (dosées en ELISA) (Figure 43).

Ce peptide semble agir de manière dose-dépendante directement sur les LB et non sur les LT Tfh. En effet, il n'a pas été retrouvé d'effet du peptide sur les Tfh circulants purifiés, en termes de prolifération, phénotype et sécrétion de cytokines. De plus, le peptide est capable de bloquer la génération de plasmablastes à partir de LB mémoires cultivés soit en coculture avec les Tfh, soit lorsque le milieu de culture est enrichi d'IL-21 recombinante et de CD40L soluble, et bloque la sécrétion d'immunoglobulines sans induction d'apoptose, suggérant que le peptide agit directement sur les LB.

Ce peptide, issu de la reprogrammation galactose, a un effet inverse de ce qui a été retrouvé sur les LT γδ Vδ2 négatifs. Ce résultat n'est pas complètement surprenant. En effet, l'effet peut être variable en fonction des lignées cellulaires et des modèles tumoraux, d'autant que les sous-types de cellules immunitaires interviennent à des stades différents de l'immunosurveillance et de la tumorigénèse.

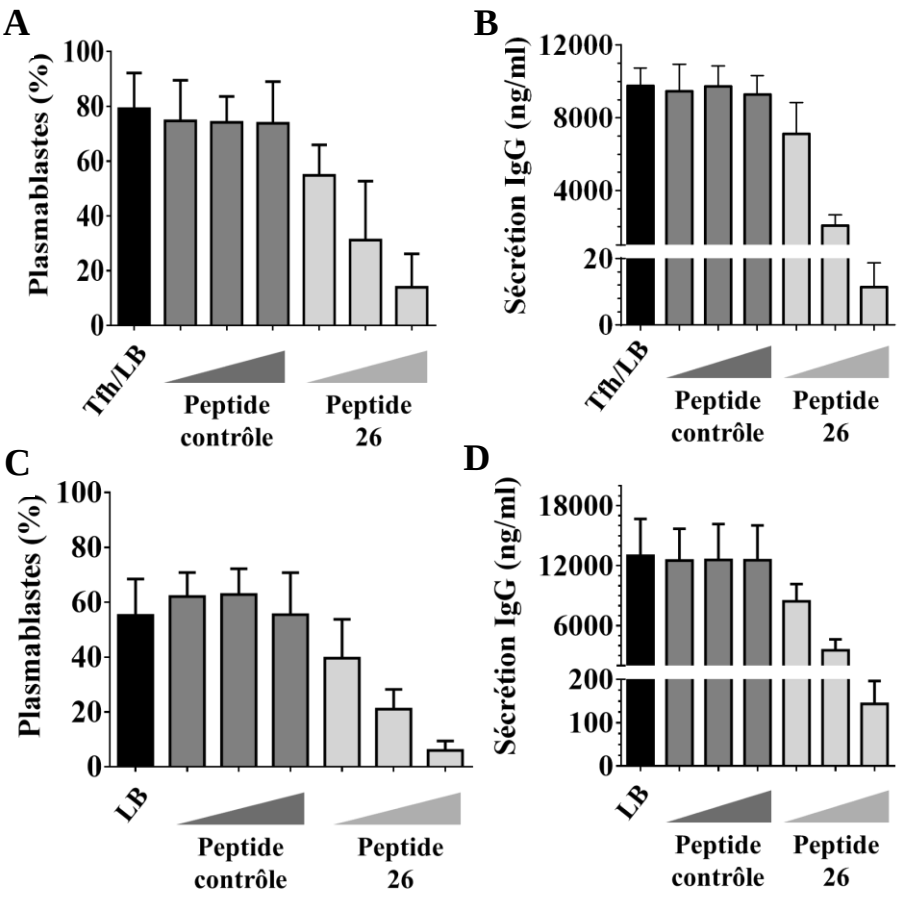


Figure 43 : Effet du peptide 26 sur la fonction des lymphocytes B et des Tfh.
A : Effet du peptide 26 sur la différenciation et la maturation des LB dépendante des Tfh en coculture.
B : Dosage ELISA des immunoglobulines (IgG) dans les surnageants de culture A.
C : Effet du peptide 26 sur la différenciation et la maturation des LB en présence d'IL-21 et de CD40L.
D : Dosage ELISA des immunoglobulines (IgG) dans les surnageants de culture C.
Pour chaque expérience, le peptide contrôle utilisé est un peptide n'ayant pas d'effet connu sur les Tfh et les LB.

Conclusion

Nous avons donc pu identifier un peptide de 10 acides aminés dont la sécrétion est induite par les modifications du métabolisme des cellules tumorales de cancer du poumon. Nous n'avons pas réussi à reproduire l'effet inhibiteur sur les LT γδ et il reste encore à tester les différents peptides sur d'autres cellules immunitaires. Néanmoins, nous avons pu identifier un effet immunomodulateur inhibiteur direct sur les LB. Il s'agit maintenant de déterminer les cibles de ce peptide expliquant son effet inhibiteur afin d'évaluer leur potentielle utilisation en thérapeutique anticancéreuse. Ainsi, en identifiant les tumeurs qui sécrètent ce métabolite inhibiteur (par dosage dans la tumeur ou dans le sérum des patients), nous pourrions envisager de développer une stratégie d'inhibition afin de restaurer l'immunité antitumorale. De plus, son effet est intéressant puisqu'il pourrait également être utilisé dans les maladies auto-immunes, mais également dans les toxicités immuno-induites.

Les LB sont des cellules qui sont peu étudiées en pathologie tumorale solide, mais plutôt ciblées dans les hémopathies. Il est donc intéressant d'avoir trouvé une molécule qui a un effet propre sur ce sous-type immunitaire qui fait l'objet de peu de développements. En effet, les thérapeutiques actuelles ciblent les LT mais ont des efficacités qui restent limitées dans beaucoup de modèles tumoraux.

Pourtant, il a été récemment montré que les LB infiltraient massivement les tumeurs, et leur présence joue un rôle pronostic positif important (Gentles et al., 2015). De plus, les LB sont des cellules qui ont des fonctions de présentation d'antigènes et de sécrétion de cytokines proinflammatoires qui permettent le recrutement et l'activation des cellules immunitaires au site tumoral. Enfin, ils jouent un rôle dans la formation, dans les tumeurs, de follicules lymphoïdes tertiaires, qui permettent de favoriser l'interaction entre LT et LB et d'induire la réponse antitumorale des LT (Lin et al., 2019). Ces follicules lymphoïdes tertiaires œuvrent indépendamment des organes lymphoïdes secondaires que sont la rate, les ganglions. Ils sont induits par l'inflammation chronique et correspondent à des structures très organisées. Ainsi, la présence de ces follicules tertiaires dans différents types de tumeurs (côlon , poumon, sein, mélanome…) a été montrée comme associée à la survie des patients (Dieu-Nosjean et al., 2008). Au total, cibler les follicules lymphoïdes tertiaires pourrait permettre d'augmenter l'efficacité des immunothérapies actuelles en favorisant le recrutement et l'activation des LT au site de la tumeur. Comprendre les mécanismes d'action de notre peptide pourrait donc permettre de réactiver la formation de ces structures tertiaires.

VIII. Discussion générale

Les immunothérapies actuellement utilisées en routine en oncologie ont représenté une révolution dans la prise en charge de certains cancers dont le pronostic était jusqu'alors mauvais. Néanmoins, ces traitements permettent d'obtenir des taux de réponse de seulement 10% à 40% en fonction des localisations tumorales. En effet, il n'existe pas de biomarqueur prédictif fiable de réponse à ces traitements. Le seul test compagnon actuellement validé, l'évaluation du statut PD-L1 en immunohistochimie, reste très controversé. De plus, les toxicités observées sont rares mais parfois sévères, pouvant mettre en jeu la vie du patient. Il est donc nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs et de nouvelles cibles thérapeutiques afin d'élargir le spectre d'utilisation de ces thérapeutiques. Parmi les nouvelles cibles identifiées, les LT γδ, en particulier les Vδ2 négatifs, semblent être les plus intéressants, de par leurs fonctions d'immunosurveillance et leur localisation dans les tissus mais leur utilisation en thérapeutique nécessite d'acquérir une meilleure connaissance des mécanismes de régulation de leur activation. Dans ce travail, nous avons exploré différentes voies impliquées dans la régulation de l'activation des cellules lymphoïdes, afin d'évaluer leur potentielle utilisation en thérapeutique anticancéreuse.

L'EphA2, un nouvel antigène activateur des LT γδ, dépendant du métabolisme tumoral.

L'activation des LT γδ nécessite la reconnaissance d'antigènes de stress, dont l'expression peut être induite par l'un des hallmarks récents du cancer : le métabolisme tumoral. Cette caractéristique du cancer est connue comme pouvant modifier le microenvironnement tumoral et induire des modifications des fonctions des cellules immunitaires, telles que nous les avons discutées dans nos 2 revues (Domblides et al., 2018 ; Domblides et al., 2019). Mais des données plus récentes rapportent un impact du métabolisme sur l'expression de molécules de surface. C'est le cas pour EphA2, un antigène de stress récemment identifié par le laboratoire ImmunoConcept, reconnu par le TCR Vγ9Vδ1 et retrouvé surexprimé dans certains cancers. Dans ce projet de thèse, nous avons montré qu'EphA2 était induit, dans les cellules de cancer du poumon, par la reprogrammation métabolique qui consiste à favoriser le métabolisme oxydatif mitochondrial aux dépens du métabolisme glycolytique. En effet, nous avons retrouvé *in vitro* une corrélation entre l'activation de l'AMPK, senseur cytosolique induisant le catabolisme, et l'expression d'EphA2, favorisant ainsi la reconnaissance et l'activation des fonctions cytotoxiques des LT γδ. Ainsi, AMPK, au-delà de son rôle de régulateur énergétique, semble jouer un rôle plus complexe via la modulation de la réponse immunitaire antitumorale. Cette kinase, qui peut être ciblée par des molécules déjà disponibles dans d'autres indications, telles que la metformine ou l'acide acétylsalicylique, pourrait donc être une cible thérapeutique pour restaurer la réponse immunitaire via la réactivation des LT γδ.

Néanmoins, ces résultats sont basés sur des observations *in vitro*. C'est pourquoi le projet est toujours en cours. Nous évaluons actuellement l'expression d'EphA2, de l'AMPK phosphorylée, et leur corrélation avec l'infiltrat en LT γδ dans le TMA de cancer du côlon utilisé pour le projet inflammasome. Pour cela, nous avons optimisé des anticorps pour réaliser des marquages sur le TMA utilisé pour le projet inflammasome, et nous étudierons la corrélation avec l'infiltrat immunitaire et les paramètres cliniques. Si les observations *in vitro* sont confirmées *ex vivo,* nous devrions retrouver une corrélation entre l'infiltrat immunitaire, l'expression d'EphA2 et l'expression d'AMPK activée. Ceci pourrait faire d'EphA2 une nouvelle cible thérapeutique permettant d'augmenter l'infiltration et l'activation immunitaire au sein de la tumeur, par l'utilisation de molécules simples déjà utilisées en routine.

L'IL-18, un régulateur fin de l'activation des LT γδ

Une fois activé suite à la reconnaissance de l'antigène par le TCR, la fonction des LT γδ est finement régulée par des médiateurs solubles, au premier rang desquels on trouve les cytokines. Parmi elles, l'IL-18 est une puissante cytokine proinflammatoire largement impliquée dans la régulation de l'activation d'un certain nombre de cellules immunitaires dont les cellules NK, les LT αβ et les LT γδ. En physiologie, elle est également impliquée dans le maintien de l'intégrité des barrières épithéliales en particulier au niveau de l'épithélium colique, en régulant le renouvellement cellulaire. *In vitro*, elle est retrouvée dans le surnageant de culture de plusieurs types de lignées cellulaires cancéreuses, mais pas dans celui des lignées coliques. Ceci doit correspondre à un mécanisme d'échappement à l'immunité mis en place par la cellule tumorale, conduisant à une tumeur dite « froide », c'est-à-dire non infiltrée par les cellules immunitaires. L'IL-18 et l'inflammasome, permettant sa production, pourraient constituer une cible thérapeutique intéressante en oncologie, afin de favoriser la réponse immunitaire antitumorale des LT γδ.

L'ensemble des données concernant le rôle de l'inflammasome dans la tumorigénèse et la régulation de l'immunité provient principalement de modèles *in vitro*, ou des modèles murins, dans lesquels les analyses tissulaires sont faites en transcriptomique, dans le tissu de manière globale sans séparer le compartiment épithélial cancéreux des cellules stromales. Dans la première partie de mon projet de thèse, nous avons donc conduit une analyse de l'expression protéique *in vivo* des constituants des différents inflammasomes connus dans les tumeurs humaines du côlon, et leur impact pronostique en clinique. Nous avons ainsi pu nous affranchir de l'expression dans les cellules stromales, qui sont pour partie des cellules immunitaires connues comme exprimant l'inflammasome. Nous avons retrouvé dans ce modèle une diminution de l'expression épithéliale de l'ensemble des constituants de l'inflammasome, en comparaison du tissu sain apparié. Néanmoins, seules les pertes d'expression de NLRC4, de NLRP6 ou de l'IL-18 étaient associées à une maladie plus avancée (stade TNM) ainsi qu'à une mortalité plus importante des patients. De plus, nous avons constaté que la perte combinée de ces 3 marqueurs était associée à un pronostic encore plus mauvais. Dans nos analyses, nous avons également retrouvé une corrélation entre la perte d'expression de NLRC4 et l'IL-18 et un infiltrat moindre en cellules immunitaires. Ces cellules étaient principalement constituées de cellules lymphoïdes $CD3^+$. Néanmoins, la population semble correspondre en partie seulement à des LT cytotoxiques $CD8^+$. Nous suggérons que cette population de LT $CD3^+$ soit également constituée d'autres cellules telles que les $CD4^+$ et/ou les LT γδ. C'est pourquoi nous poursuivons actuellement le projet en réalisant des marquages des CD3, CD4 et TCR γδ afin d'étudier la proportion de chacune des populations. Ces observations sont intéressantes, puisque ces 3 protéines sont fortement impliquées dans la physiologie intestinale. Ainsi, NLRC4 est impliquée dans la régulation du microbiote, NLRP6 dans la régulation de la sécrétion du mucus qui protège l'épithélium des agressions extérieures, et l'IL-18 joue un rôle majeur dans l'intégrité de la barrière et le contrôle du renouvellement épithélial. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la perte d'expression protéique de NLRC4, NLRP6 et IL-18 par la tumeur pourrait constituer un mécanisme d'échappement et semblerait être un facteur pronostic majeur. C'est pourquoi cette signature immunologique pronostique fait l'objet d'un dépôt de brevet auprès de la SATT Aquitaine (BV2017-041) et de 2 publications soumises. Nous souhaitons maintenant valider ces résultats en utilisant une cohorte de validation externe, rétrospective, grâce à la collaboration avec l'Institut du Cancer de Montpellier. En cas de résultats favorables, nous proposerons une évaluation prospective de notre signature en termes de faisabilité en routine, rendue complexe par la technique d'immunofluorescence, mais également d'impact sur les décisions thérapeutiques dans le cancer du côlon. Nous émettons

l'hypothèse que notre signature pourrait constituer un biomarqueur permettant de guider la stratégie thérapeutique des patients atteints de cancers colorectaux, en particulier chez les patients opérés pour lesquels la décision de traitement adjuvant ne fait pas l'objet de critères standardisés. De plus, comprendre les mécanismes expliquant la perte d'expression de ces marqueurs pourrait permettre d'identifier des cibles thérapeutiques afin de réactiver l'expression tumorale de ces constituants chez l'Homme, et peut-être d'améliorer la sensibilité aux immunothérapies.

La littérature commence à rapporter des effets des composants de l'inflammasome indépendants de la constitution de la plateforme. Ainsi, il semble exister une régulation de voies impliquées dans la tumorigénèse dans d'autres modèles tumoraux. C'est pourquoi nous avons souhaité étudier les effets *in vitro* de la perte de ces constituants sur les caractéristiques de la cellule tumorale. Nous avons donc généré un modèle *in vitro* de réexpression de NLRC4 dans un premier temps. NLRP6 sera étudié dans un second temps. Nous avons ainsi retrouvé une diminution de la prolifération des cellules métastatiques coliques en cas de réexpression de NLRC4, sans effet sur le processus de métastase, suggérant un effet indépendant de l'inflammasome et des cytokines. Cette régulation de la prolifération tumorale par NLRC4 pourrait expliquer l'effet observé sur l'agressivité tumorale chez l'Homme. Elle corrobore des données retrouvées dans des modèles murins de mélanome, mais n'avait jamais été encore rapportée dans le cancer du côlon chez l'Homme. De plus, en analyses transcriptomiques, nous avons retrouvé une induction de l'expression des gènes impliqués dans la signalisation interféron de type I dans les cellules réexprimant NLRC4, en particulier IFI44L. Ceci pourrait signifier que NLRC4 induit également dans les cellules tumorales une signalisation essentielle pour l'activation des fonctions de présentation d'antigènes des cellules dendritiques dont l'infiltrat immunitaire corrèle avec l'expression de NLRC4 dans les tumeurs de patients (analyse de bases de données), permettant *in fine* l'activation des cellules immunitaires lymphoïdes et de leurs fonctions cytotoxiques. Néanmoins, ces résultats proviennent de données *in vitro* que nous souhaitons confirmer chez nos patients. Nous étudions donc actuellement son expression à l'échelle protéique dans le TMA afin d'analyser la corrélation avec l'expression de NLRC4 et l'infiltrat immunitaire. L'objectif est maintenant d'évaluer les fonctions antitumorales de NLRC4 dans différents modèles murins, afin d'évaluer *in vivo* l'effet de la réexpression de NLRC4.

Nous nous interrogeons quant à la causalité de la perte d'expression des constituants de l'inflammasome dans l'histoire naturelle du cancer. En effet, il est possible que la perte d'expression survienne de manière très précoce, favorisant les phénomènes de dysbiose et d'inflammation chronique au niveau de l'épithélium, qui induisent à terme le cancer. Mais il ne s'agit peut-être que d'un mécanisme de résistance à l'immunité antitumorale, permettant à la cellule tumorale d'échapper à l'immunosurveillance une fois la tumeur en place, afin de limiter le recrutement et l'activation des cellules immunitaires au site tumoral. Pour cela, nous avons prévu de réaliser les mêmes analyses dans des tissus d'adénomes coliques (collaboration en cours avec le Dr G. Belleannée du service de Pathologie du CHU de Bordeaux). Nous étudierons l'expression dans des tissus sains prélevés au décours de coloscopies de surveillance, ainsi que dans des adénomes provenant de patients ayant eu ou non un antécédent de cancer colique.

Enfin, nous nous interrogeons concernant l'effet de ces constituants, et d'autres, dans différents modèles tumoraux. Tout d'abord, nous souhaitons analyser l'expression des constituants de l'inflammasome dans le cancer du poumon, modèle dont l'immunogénécité est totalement différente de celle du cancer du côlon, puisque ces tumeurs font partie des tumeurs dites « chaudes ». De plus, des

modulateurs pharmacologiques sont actuellement en essai dans cette indication, suggérant un rôle important de l'inflammasome dans cet organe, qui correspond, comme le côlon, à une barrière avec l'extérieur. Nous collaborons pour cela avec l'hôpital Tenon (Paris). Par ailleurs, nous allons étudier leur expression dans un modèle de tumeurs vésicales afin d'étudier la corrélation avec la réponse aux immunothérapies locales et avec le risque de rechute, et dans un modèle de cancers cutanés de l'immunodéprimé. L'objectif sera d'étudier l'inflammasome comme biomarqueur prédictif de réponse et/ou de rechute, mais aussi d'évaluer son potentiel ciblage en thérapie anticancéreuse.

Les métabolites solubles, des régulateurs de l'activation des LT γδ

Au décours des expériences pour le projet EphA2, nous avons constaté que, après reprogrammation, les surnageants avaient un effet immunomodulateur sur les LT γδ. Nous avons donc reprogrammé différentes lignées cancéreuses afin d'essayer d'isoler les composants solubles responsables de cette régulation. Par un processus de filtration, lyophilisation et chromatographies des surnageants de culture, nous avons pu isoler plusieurs fractions ayant un effet immunomodulateur sur les LT γδ. L'analyse en spectrométrie de ces fractions a retrouvé plusieurs dizaines de peptides, dont certains n'ont pas de fonction connue en pathologie tumorale, parmi lesquels nous avons sélectionné les 5 plus intéressants. L'évaluation de ces peptides, purs, sur les LT γδ provenant de différents modèles n'a pas permis de retrouver le même effet immunomodulateur. Ceci peut s'expliquer par le fait que les échantillons envoyés pour analyse en spectrométrie de masse n'étaient pas purs, et que les peptides sélectionnés ne sont probablement pas ceux qui ont un effet sur ces cellules. Afin de les identifier, nous pourrions réaliser un screening de l'ensemble des molécules en évaluant leur effet sur les LT γδ. Cette procédure coûteuse en temps et en cellules, semble compliquée à mettre en œuvre au laboratoire. En revanche, nous avons pu identifier un effet intéressant de l'un des peptides sur d'autres lignées immunitaires, les lymphocytes B. Les LB sont des cellules peu étudiées en pathologie tumorale solide, mais plus largement ciblées dans les hémopathies malignes. Pourtant, elles semblent jouer un rôle important dans la formation de follicules lymphoïdes tertiaires, qui permettent de favoriser l'interaction entre LT et LB et d'induire la réponse antitumorale des LT. Des analyses sont actuellement en cours afin d'identifier les mécanismes expliquant les effets observés sur ces cellules. De plus, nous étudierons par la suite l'effet des différents peptides isolés sur d'autres cellules immunitaires, en particulier les LT cytotoxiques. L'identification de ce peptide peut ainsi permettre de développer de nouvelles thérapeutiques anticancéreuses. Ainsi, nous pourrions, chez les patients présentant des tumeurs sécrétant ce peptide (mesuré dans le sérum et/ou la tumeur), développer un inhibiteur spécifique afin de favoriser la formation des follicules lymphoïdes tertiaires, qui serait utilisé seul ou en association avec les autres thérapies conventionnelles (chimiothérapie ou immunothérapie). Par ailleurs, l'identification des cibles et des mécanismes moléculaires expliquant l'effet inhibiteur pourrait constituer une autre cible thérapeutique potentielle.

IX. Conclusion générale

En conclusion, mon travail de thèse a permis de mettre en évidence deux voies de modulation de la réponse immunitaire antitumorale, qui pourraient représenter des cibles thérapeutiques potentielles. Tout d'abord, nous avons identifié, dans des tumeurs de patients, une signature pronostique dans le cancer du côlon impliquant des acteurs importants de l'immunité innée. Cette signature, combinant l'expression intra-épithéliale de NLRC4, NLRP6 et l'IL-18, joue un rôle pronostic majeur puisque la perte combinée de ces 3 marqueurs est associée à une moins bonne survie des patients, et fait l'objet d'un brevet. De manière intéressante, ces 3 protéines sont impliquées dans l'homéostasie tissulaire du côlon, puisque NLRC4 régule le microbiote et le turnover de la cellule épithéliale intestinale, NLRP6 joue un rôle dans la sécrétion de mucus et comme senseur des métabolites du microbiote, et l'IL-18 est impliquée dans la régulation des processus inflammatoires épithéliaux ainsi que les fonctions cytotoxiques des cellules immunitaires adaptatives NKT et LT. De plus, leur perte est associée à une maladie plus agressive avec une évolution plutôt métastatique, et à un infiltrat immunitaire en cellules lymphoïdes T moins important. Ceci peut expliquer en partie les faibles taux de réponse obtenus dans le cancer du côlon avec les immunothérapies actuelles qui ciblent les LT, qui infiltrent probablement moins la tumeur. Par ailleurs, nous avons retrouvé un rôle double de NLRC4. Ainsi, cette protéine est impliquée, au niveau transcriptomique, dans la régulation de la signature interféron de type I de manière indépendante de l'inflammasome et dans le recrutement des cellules dendritiques et des LT. De plus, NLRC4 semblerait avoir également en partie un effet antitumoral indépendant de l'inflammasome, par la régulation *in vitro* de la prolifération des cellules métastatiques, ce qui peut expliquer l'impact sur le stade TNM.

Ensuite, en analysant le sécrétome des cellules cancéreuses, nous avons pu identifier un peptide inhibiteur d'une sous-population immunitaire peu étudiée jusqu'à présent en pathologie tumorale solide, les LB. La sécrétion de ce peptide est induite par les modifications du métabolisme cellulaire des cellules tumorales. Nous n'avons pas réussi à déterminer la molécule responsable de l'effet robuste que nous avions observé sur les LT γδ. L'identification des mécanismes d'action de ce peptide pourraient permettre de réactiver la réponse immunitaire des LT et potentialiser l'effet des immunothérapies actuelles qui ciblent cette population. Ces études sont actuellement en cours.

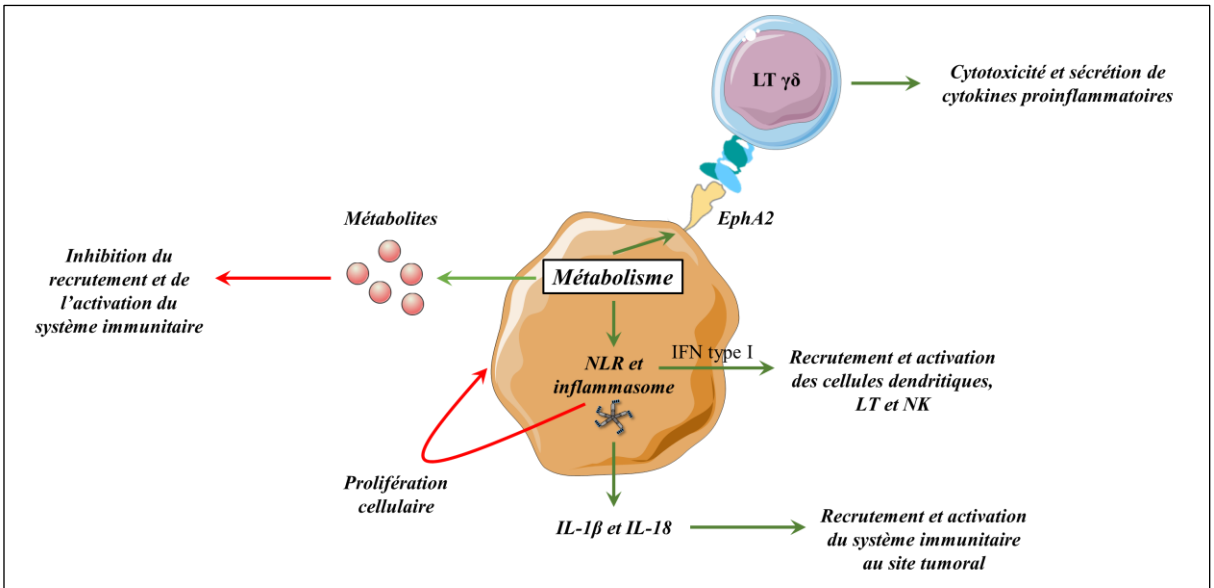


Figure 44 : Le métabolisme, un acteur central de l'immunité antitumorale.

Ces 2 axes, l'inflammasome et le métabolisme cellulaire, sont interconnectés. En effet, les modifications du métabolisme cellulaire ont un rôle central dans le phénotype tumoral, les modifications du microenvironnement tumoral et l'activation des cellules immunitaires (Figure 44). Ainsi, la modulation du métabolisme tumoral peut induire, dans un contexte de stress cellulaire, l'expression d'antigènes qui peuvent être reconnus par les LT γδ intratumoraux, comme c'est le cas de l'EphA2 ou de l'annexin A2, ou lors de la dérégulation de la voie du mévalonate. En plus de la modulation de ces ligands membranaires, les modifications du métabolisme cellulaire peuvent également favoriser la sécrétion de molécules solubles immunomodulatrices. Enfin, le métabolisme tumoral peut aussi induire la production et l'accumulation de molécules qui sont capables d'activer l'inflammasome et la sécrétion des cytokines proinflammatoires. Ces cytokines proinflammatoires, et en particulier l'IL-18, sont connues comme étant des activateurs importants des LT γδ et des NK.

Tous ces éléments constituent autant de cibles potentielles en thérapeutiques anticancéreuse, seules ou en association avec les chimiothérapies, qui ont un rôle immunomodulateur, ou encore avec les immunothérapies actuelles. Ceci pourrait ainsi permettre d'améliorer les réponses observées dans les cancers sensibles à ces traitements, ou de rendre « chaude » une tumeur dite « froide » en favorisant l'infiltration immunitaire, par la réactivation de ces voies de l'immunité innée via l'inflammasome, par l'inhibition de peptides inhibiteurs ou l'administration de peptides activateurs. Néanmoins, le ciblage du métabolisme cellulaire, facile à réaliser *in vitro* ou *in vivo*, peut être plus complexe chez l'Homme, avec un risque important de survenue de toxicités en l'absence de cible spécifique à la pathologie tumorale.

X. Bibliographie

Aachoui, Y., Sagulenko, V., Miao, E.A., and Stacey, K.J. (2013). Inflammasome-mediated pyroptotic and apoptotic cell death, and defense against infection. Curr. Opin. Microbiol. *16*, 319–326.

Abdel-Haleem, A.M., Lewis, N.E., Jamshidi, N., Mineta, K., Gao, X., and Gojobori, T. (2017). The Emerging Facets of Non-Cancerous Warburg Effect. Front. Endocrinol. *8*, 279.

Adams, E.J., Gu, S., and Luoma, A.M. (2015). Human gamma delta T cells: Evolution and ligand recognition. Cell. Immunol. *296*, 31–40.

Adinolfi, E., Raffaghello, L., Giuliani, A.L., Cavazzini, L., Capece, M., Chiozzi, P., Bianchi, G., Kroemer, G., Pistoia, V., and Virgilio, F.D. (2012). Expression of P2X7 Receptor Increases In Vivo Tumor Growth. Cancer Res. *72*, 2957–2969.

Afonina, I.S., Müller, C., Martin, S.J., and Beyaert, R. (2015). Proteolytic Processing of Interleukin-1 Family Cytokines: Variations on a Common Theme. Immunity *42*, 991–1004.

Aghili, M., Zahedi, F., and Rafiee, E. (2009). Hydroxyglutaric aciduria and malignant brain tumor: a case report and literature review. J. Neurooncol. *91*, 233–236.

Aguilar E, Esteves P, Sancerni T, Lenoir V, Aparicio T, Bouillaud F, Dentin R, Prip-Buus C, Ricquier D, Pecqueur C, Guilmeau S, Alves-Guerra MC. (2019). UCP2 Deficiency Increases Colon Tumorigenesis by Promoting Lipid Synthesis and Depleting NADPH for Antioxidant Defenses. Cell Rep. *28(9)*:2306-2316

Allam, R., Maillard, M.H., Tardivel, A., Chennupati, V., Bega, H., Yu, C.W., Velin, D., Schneider, P., and Maslowski, K.M. (2015). Epithelial NAIPs protect against colonic tumorigenesis. J. Exp. Med. *212*, 369–383.

Allen, I.C., TeKippe, E.M., Woodford, R.-M.T., Uronis, J.M., Holl, E.K., Rogers, A.B., Herfarth, H.H., Jobin, C., and Ting, J.P.-Y. (2010). The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. J. Exp. Med. *207*, 1045–1056.

Allen, I.C., Wilson, J.E., Schneider, M., Lich, J.D., Roberts, R.A., Arthur, J.C., Woodford, R.-M.T., Davis, B.K., Uronis, J.M., Herfarth, H.H., et al. (2012). NLRP12 suppresses colon inflammation and tumorigenesis through the negative regulation of noncanonical NF-κB signaling. Immunity *36*, 742–754.

Allison, T.J., Winter, C.C., Fournié, J.J., Bonneville, M., and Garboczi, D.N. (2001). Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. Nature *411*, 820–824.

Almeida, A.R., Correia, D.V., Fernandes-Platzgummer, A., da Silva, C.L., da Silva, M.G., Anjos, D.R., and Silva-Santos, B. (2016). Delta One T Cells for Immunotherapy of Chronic Lymphocytic Leukemia: Clinical-Grade Expansion/Differentiation and Preclinical Proof of Concept. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *22*, 5795–5804.

Anderson, J.P., Mueller, J.L., Misaghi, A., Anderson, S., Sivagnanam, M., Kolodner, R.D., and Hoffman, H.M. (2008). Initial description of the human NLRP3 promoter. Genes Immun. *9*, 721–726.

Arbore, G., West, E.E., Spolski, R., Robertson, A.A.B., Klos, A., Rheinheimer, C., Dutow, P., Woodruff, T.M., Yu, Z.X., O'Neill, L.A., et al. (2016). T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in $CD4^+$ T cells. Science *352*, aad1210.

Ayyasamy, V., Owens, K.M., Desouki, M.M., Liang, P., Bakin, A., Thangaraj, K., Buchsbaum, D.J., LoBuglio, A.F., and Singh, K.K. (2011). Cellular Model of Warburg Effect Identifies Tumor Promoting Function of UCP2 in Breast Cancer and Its Suppression by Genipin. PLOS ONE *6*, e24792.

Baccala, R., Witherden, D., Gonzalez-Quintial, R., Dummer, W., Surh, C.D., Havran, W.L., and Theofilopoulos, A.N. (2005). Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *174*, 4606–4612.

Bansal, R.R., Mackay, C.R., Moser, B., and Eberl, M. (2012). IL-21 enhances the potential of human γδ T cells to provide B-cell help. Eur. J. Immunol. *42*, 110–119.

Baroja-Mazo, A., Martín-Sánchez, F., Gomez, A.I., Martínez, C.M., Amores-Iniesta, J., Compan, V., Barberà-Cremades, M., Yagüe, J., Ruiz-Ortiz, E., Antón, J., et al. (2014). The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. Nat. Immunol. *15*, 738–748.

Barros-Martins, J., Schmolka, N., Fontinha, D., Pires de Miranda, M., Simas, J.P., Brok, I., Ferreira, C., Veldhoen, M., Silva-Santos, B., and Serre, K. (2016). Effector γδ T Cell Differentiation Relies on Master but Not Auxiliary Th Cell Transcription Factors. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *196*, 3642–3652.

Baumann, F., Leukel, P., Doerfelt, A., Beier, C.P., Dettmer, K., Oefner, P.J., Kastenberger, M., Kreutz, M., Nickl-Jockschat, T., Bogdahn, U., et al. (2009). Lactate promotes glioma migration by TGF-beta2-dependent regulation of matrix metalloproteinase-2. Neuro-Oncol. *11*, 368–380.

Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debré, P., and Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. Blood *122*, 2935–2942.

Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H.-H., and Kabelitz, D. (2008). Innate immune functions of human gammadelta T cells. Immunobiology *213*, 173–182.

Bekiaris, V., Šedý, J.R., Macauley, M.G., Rhode-Kurnow, A., and Ware, C.F. (2013). The inhibitory receptor BTLA controls γδ T cell homeostasis and inflammatory responses. Immunity *39*, 1082–1094.

Bennouna, J., Levy, V., Sicard, H., Senellart, H., Audrain, M., Hiret, S., Rolland, F., Bruzzoni-Giovanelli, H., Rimbert, M., Galéa, C., et al. (2010). Phase I study of bromohydrin pyrophosphate (BrHPP, IPH 1101), a Vgamma9Vdelta2 T lymphocyte agonist in patients with solid tumors. Cancer Immunol. Immunother. CII *59*, 1521–1530.
Bense, R.D., Sotiriou, C., Piccart-Gebhart, M.J., Haanen, J.B.A.G., van Vugt, M.A.T.M., de Vries, E.G.E., Schröder, C.P., and Fehrmann, R.S.N. (2017). Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer. J. Natl. Cancer Inst. *109*.
Birchenough, G.M.H., Nyström, E.E.L., Johansson, M.E.V., and Hansson, G.C. (2016). A sentinel goblet cell guards the colonic crypt by triggering Nlrp6-dependent Muc2 secretion. Science *352*, 1535–1542.
Biswas, S.K. (2015). Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. Immunity *43*, 435–449.
Biswas, S.K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. Nat. Immunol. *11*, 889–896.
Biswas, P., Rovere, P., De Filippi, C., Heltai, S., Smith, C., Dagna, L., Poli, G., Manfredi, A.A., and Ferrarini, M. (2000). Engagement of CD30 shapes the secretion of cytokines by human gamma delta T cells. Eur. J. Immunol. *30*, 2172–2180.
Blagih, J., Coulombe, F., Vincent, E.E., Dupuy, F., Galicia-Vázquez, G., Yurchenko, E., Raissi, T.C., van der Windt, G.J.W., Viollet, B., Pearce, E.L., et al. (2015). The energy sensor AMPK regulates T cell metabolic adaptation and effector responses in vivo. Immunity *42*, 41–54.
Błażejewski, A.J., Thiemann, S., Schenk, A., Pils, M.C., Gálvez, E.J.C., Roy, U., Heise, U., de Zoete, M.R., Flavell, R.A., and Strowig, T. (2017). Microbiota Normalization Reveals that Canonical Caspase-1 Activation Exacerbates Chemically Induced Intestinal Inflammation. Cell Rep. *19*, 2319–2330.
Bonneville, M., O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). γδ T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. Nat. Rev. Immunol. *10*, 467–478.
Born, W.K., Kemal Aydintug, M., and O'Brien, R.L. (2013). Diversity of γδ T-cell antigens. Cell. Mol. Immunol. *10*, 13–20.
Bottino, C., Tambussi, G., Ferrini, S., Ciccone, E., Varese, P., Mingari, M.C., Moretta, L., and Moretta, A. (1988). Two subsets of human T lymphocytes expressing gamma/delta antigen receptor are identifiable by monoclonal antibodies directed to two distinct molecular forms of the receptor. J. Exp. Med. *168*, 491–505.
Brand, M.D., Buckingham, J.A., Esteves, T.C., Green, K., Lambert, A.J., Miwa, S., Murphy, M.P., Pakay, J.L., Talbot, D.A., and Echtay, K.S. (2004). Mitochondrial superoxide and aging: uncoupling-protein activity and superoxide production. Biochem. Soc. Symp. *71*, 203–213.
Brandacher, G., Perathoner, A., Ladurner, R., Schneeberger, S., Obrist, P., Winkler, C., Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Weiss, H.G., Göbel, G., et al. (2006). Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *12*, 1144–1151.
Brandes, M., Willimann, K., and Moser, B. (2005). Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. Science *309*, 264–268.
Brandes, M., Willimann, K., Bioley, G., Lévy, N., Eberl, M., Luo, M., Tampé, R., Lévy, F., Romero, P., and Moser, B. (2009). Cross-presenting human gammadelta T cells induce robust CD8+ alphabeta T cell responses. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 2307–2312.
Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., et al. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat. Med. *19*, 57–64.
de Bruin, R.C.G., Veluchamy, J.P., Lougheed, S.M., Schneiders, F.L., Lopez-Lastra, S., Lameris, R., Stam, A.G., Sebestyen, Z., Kuball, J., Molthoff, C.F.M., et al. (2017). A bispecific nanobody approach to leverage the potent and widely applicable tumor cytolytic capacity of Vγ9Vδ2-T cells. Oncoimmunology *7*, e1375641.
Bui, J.D., and Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? Curr. Opin. Immunol. *19*, 203–208.
Bunt, S.K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V.K., Leips, J., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. Cancer Res. *67*, 10019–10026.
Caccamo, N., Battistini, L., Bonneville, M., Poccia, F., Fournié, J.J., Meraviglia, S., Borsellino, G., Kroczek, R.A., La Mendola, C., Scotet, E., et al. (2006). CXCR5 identifies a subset of Vgamma9Vdelta2 T cells which secrete IL-4 and IL-10 and help B cells for antibody production. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *177*, 5290–5295.
Cairns, R.A., and Mak, T.W. (2013). Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities. Cancer Discov. *3*, 730–741.
Calcinotto, A., Filipazzi, P., Grioni, M., Iero, M., De Milito, A., Ricupito, A., Cova, A., Canese, R., Jachetti, E., Rossetti, M., et al. (2012). Modulation of microenvironment acidity reverses anergy in human and murine tumor-infiltrating T lymphocytes. Cancer Res. *72*, 2746–2756.

Capietto, A.-H., Martinet, L., and Fournié, J.-J. (2011). Stimulated γδ T cells increase the in vivo efficacy of trastuzumab in HER-2+ breast cancer. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *187*, 1031–1038.
Carding, S.R., and Egan, P.J. (2002). Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. Nat. Rev. Immunol. *2*, 336–345.
Carmi, Y., Rinott, G., Dotan, S., Elkabets, M., Rider, P., Voronov, E., and Apte, R.N. (2011). Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 3462–3471.
Carr, E.L., Kelman, A., Wu, G.S., Gopaul, R., Senkevitch, E., Aghvanyan, A., Turay, A.M., and Frauwirth, K.A. (2010). Glutamine uptake and metabolism are coordinately regulated by ERK/MAPK during T lymphocyte activation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 1037–1044.
Carrascal, M.T., Mendoza, L., Valcárcel, M., Salado, C., Egilegor, E., Tellería, N., Vidal-Vanaclocha, F., and Dinarello, C.A. (2003). Interleukin-18 binding protein reduces b16 melanoma hepatic metastasis by neutralizing adhesiveness and growth factors of sinusoidal endothelium. Cancer Res. *63*, 491–497.
Casanello, P., Torres, A., Sanhueza, F., González, M., Farías, M., Gallardo, V., Pastor-Anglada, M., San Martín, R., and Sobrevia, L. (2005). Equilibrative nucleoside transporter 1 expression is downregulated by hypoxia in human umbilical vein endothelium. Circ. Res. *97*, 16–24.
Casetti, R., Agrati, C., Wallace, M., Sacchi, A., Martini, F., Martino, A., Rinaldi, A., and Malkovsky, M. (2009). Cutting edge: TGF-beta1 and IL-15 Induce FOXP3+ gammadelta regulatory T cells in the presence of antigen stimulation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 3574–3577.
Catellani, S., Poggi, A., Bruzzone, A., Dadati, P., Ravetti, J.L., Gobbi, M., and Zocchi, M.R. (2007). Expansion of Vdelta1 T lymphocytes producing IL-4 in low-grade non-Hodgkin lymphomas expressing UL-16-binding proteins. Blood *109*, 2078–2085.
Chambard, J.C., and Pouyssegur, J. (1986). Intracellular pH controls growth factor-induced ribosomal protein S6 phosphorylation and protein synthesis in the G0----G1 transition of fibroblasts. Exp. Cell Res. *164*, 282–294.
Champsaur, M., and Lanier, L.L. (2010). Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. Immunol. Rev. *235*, 267–285.
Chang, C.-H., Curtis, J.D., Maggi, L.B., Faubert, B., Villarino, A.V., O'Sullivan, D., Huang, S.C.-C., van der Windt, G.J.W., Blagih, J., Qiu, J., et al. (2013). Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. Cell *153*, 1239–1251.
Chapman, J.R., Webster, A.C., and Wong, G. (2013). Cancer in the transplant recipient. Cold Spring Harb. Perspect. Med. *3*.
Chen, D.S., and Mellman, I. (2013). Oncology Meets Immunology: The Cancer-Immunity Cycle. Immunity *39*, 1–10.
Chen, G.Y., Liu, M., Wang, F., Bertin, J., and Núñez, G. (2011). A functional role for Nlrp6 in intestinal inflammation and tumorigenesis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 7187–7194.
Chen, L., Huang, C.-F., Li, Y.-C., Deng, W.-W., Mao, L., Wu, L., Zhang, W.-F., Zhang, L., and Sun, Z.-J. (2018). Blockage of the NLRP3 inflammasome by MCC950 improves anti-tumor immune responses in head and neck squamous cell carcinoma. Cell. Mol. Life Sci. *75*, 2045–2058.
Chen, L.-C., Wang, L.-J., Tsang, N.-M., Ojcius, D.M., Chen, C.-C., Ouyang, C.-N., Hsueh, C., Liang, Y., Chang, K.-P., Chen, C.-C., et al. (2012). Tumour inflammasome-derived IL-1β recruits neutrophils and improves local recurrence-free survival in EBV-induced nasopharyngeal carcinoma. EMBO Mol. Med. *4*, 1276–1293.
Chen, Y., Chou, K., Fuchs, E., Havran, W.L., and Boismenu, R. (2002). Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 14338–14343.
Cheong, J.E., and Sun, L. (2018). Targeting the IDO1/TDO2-KYN-AhR Pathway for Cancer Immunotherapy - Challenges and Opportunities. Trends Pharmacol. Sci. *39*, 307–325.
Chiche, J., Ilc, K., Laferrière, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N.M., Brahimi-Horn, M.C., and Pouysségur, J. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. Cancer Res. *69*, 358–368.
Chien, Y., and Konigshofer, Y. (2007). Antigen recognition by gammadelta T cells. Immunol. Rev. *215*, 46–58.
Chien, Y., Meyer, C., and Bonneville, M. (2014). γδ T cells: first line of defense and beyond. Annu. Rev. Immunol. *32*, 121–155.
Chien, Y.H., Iwashima, M., Kaplan, K.B., Elliott, J.F., and Davis, M.M. (1987). A new T-cell receptor gene located within the alpha locus and expressed early in T-cell differentiation. Nature *327*, 677–682.
Chitadze, G., Lettau, M., Luecke, S., Wang, T., Janssen, O., Fürst, D., Mytilineos, J., Wesch, D., Oberg, H.-H., Held-Feindt, J., et al. (2016). NKG2D- and T-cell receptor-dependent lysis of malignant glioma cell lines by human γδ T cells: Modulation by temozolomide and A disintegrin and metalloproteases 10 and 17 inhibitors. Oncoimmunology *5*, e1093276.
Chitadze, G., Oberg, H.-H., Wesch, D., and Kabelitz, D. (2017). The Ambiguous Role of γδ T Lymphocytes in Antitumor Immunity. Trends Immunol. *38*, 668–678.

Choi, I.-K., Lee, J.-S., Zhang, S.-N., Park, J., Sonn, C.H., Lee, K.-M., and Yun, C.-O. (2011). Oncolytic adenovirus co-expressing IL-12 and IL-18 improves tumor-specific immunity via differentiation of T cells expressing IL-12Rβ2 or IL-18Rα. Gene Ther. *18*, 898–909.
Chow, M.T., Sceneay, J., Paget, C., Wong, C.S.F., Duret, H., Tschopp, J., Möller, A., and Smyth, M.J. (2012). NLRP3 Suppresses NK Cell–Mediated Responses to Carcinogen-Induced Tumors and Metastases. Cancer Res. *72*, 5721–5732.
Chung, I.-C., OuYang, C.-N., Yuan, S.-N., Lin, H.-C., Huang, K.-Y., Wu, P.-S., Liu, C.-Y., Tsai, K.-J., Loi, L.-K., Chen, Y.-J., et al. (2019). Pretreatment with a Heat-Killed Probiotic Modulates the NLRP3 Inflammasome and Attenuates Colitis-Associated Colorectal Cancer in Mice. Nutrients *11*.
Cipriani, B., Knowles, H., Chen, L., Battistini, L., and Brosnan, C.F. (2002). Involvement of classical and novel protein kinase C isoforms in the response of human V gamma 9V delta 2 T cells to phosphate antigens. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *169*, 5761–5770.
Clark, O., Yen, K., and Mellinghoff, I.K. (2016). Molecular Pathways: Isocitrate Dehydrogenase Mutations in Cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.
Coffelt, S.B., Kersten, K., Doornebal, C.W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C.-S., Verstegen, N.J.M., Ciampricotti, M., Hawinkels, L.J.A.C., Jonkers, J., et al. (2015). IL-17-producing γδ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. Nature *522*, 345–348.
Coffey, F., Lee, S.-Y., Buus, T.B., Lauritsen, J.-P.H., Wong, G.W., Joachims, M.L., Thompson, L.F., Zúñiga-Pflücker, J.C., Kappes, D.J., and Wiest, D.L. (2014). The TCR ligand-inducible expression of CD73 marks γδ lineage commitment and a metastable intermediate in effector specification. J. Exp. Med. *211*, 329–343.
Colegio, O.R., Chu, N.-Q., Szabo, A.L., Chu, T., Rhebergen, A.M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C.E., Eisenbarth, S.C., Phillips, G.M., et al. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature *513*, 559–563.
Collard, R.L., Harya, N.S., Monzon, F.A., Maier, C.E., and O'Keefe, D.S. (2006). Methylation of the ASC gene promoter is associated with aggressive prostate cancer. The Prostate *66*, 687–695.
Correia, D.V., Fogli, M., Hudspeth, K., da Silva, M.G., Mavilio, D., and Silva-Santos, B. (2011). Differentiation of human peripheral blood Vδ1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells. Blood *118*, 992–1001.
Coughlin, C.M., Salhany, K.E., Wysocka, M., Aruga, E., Kurzawa, H., Chang, A.E., Hunter, C.A., Fox, J.C., Trinchieri, G., and Lee, W.M. (1998). Interleukin-12 and interleukin-18 synergistically induce murine tumor regression which involves inhibition of angiogenesis. J. Clin. Invest. *101*, 1441–1452.
Couzi, L., Levaillant, Y., Jamai, A., Pitard, V., Lassalle, R., Martin, K., Garrigue, I., Hawchar, O., Siberchicot, F., Moore, N., et al. (2010). Cytomegalovirus-induced gammadelta T cells associate with reduced cancer risk after kidney transplantation. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *21*, 181–188.
Couzi, L., Pitard, V., Sicard, X., Garrigue, I., Hawchar, O., Merville, P., Moreau, J.-F., and Déchanet-Merville, J. (2012). Antibody-dependent anti-cytomegalovirus activity of human γδ T cells expressing CD16 (FcγRIIIa). Blood *119*, 1418–1427.
Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B.E., Förster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., Haase, V.H., Jaenisch, R., Corr, M., Nizet, V., et al. (2003). HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. Cell *112*, 645–657.
Dagenais, M., and Saleh, M. (2016). Linking cancer-induced Nlrp3 inflammasome activation to efficient NK cell-mediated immunosurveillance. Oncoimmunology *5*, e1129484.
Daley, D., Zambirinis, C.P., Seifert, L., Akkad, N., Mohan, N., Werba, G., Barilla, R., Torres-Hernandez, A., Hundeyin, M., Mani, V.R.K., et al. (2016). γδ T Cells Support Pancreatic Oncogenesis by Restraining αβ T Cell Activation. Cell *166*, 1485-1499.e15.
Daley, D., Mani, V.R., Mohan, N., Akkad, N., Pandian, G.S.D.B., Savadkar, S., Lee, K.B., Torres-Hernandez, A., Aykut, B., Diskin, B., et al. (2017). NLRP3 signaling drives macrophage-induced adaptive immune suppression in pancreatic carcinoma. J. Exp. Med. *214*, 1711–1724.
Dalton, J.E., Cruickshank, S.M., Egan, C.E., Mears, R., Newton, D.J., Andrew, E.M., Lawrence, B., Howell, G., Else, K.J., Gubbels, M.-J., et al. (2006). Intraepithelial gammadelta+ lymphocytes maintain the integrity of intestinal epithelial tight junctions in response to infection. Gastroenterology *131*, 818–829.
Dalziel, K. (1980). Isocitrate dehydrogenase and related oxidative decarboxylases. FEBS Lett. *117 Suppl*, K45-55.
Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.-Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.-R., et al. (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. Cell *146*, 772–784.
Dang, L., White, D.W., Gross, S., Bennett, B.D., Bittinger, M.A., Driggers, E.M., Fantin, V.R., Jang, H.G., Jin, S., Keenan, M.C., et al. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature *462*, 739–744.
Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature *334*, 395–402.

De Milito, A., Canese, R., Marino, M.L., Borghi, M., Iero, M., Villa, A., Venturi, G., Lozupone, F., Iessi, E., Logozzi, M., et al. (2010). pH-dependent antitumor activity of proton pump inhibitors against human melanoma is mediated by inhibition of tumor acidity. Int. J. Cancer *127*, 207–219.
De Rosa, S.C., Andrus, J.P., Perfetto, S.P., Mantovani, J.J., Herzenberg, L.A., Herzenberg, L.A., and Roederer, M. (2004). Ontogeny of gamma delta T cells in humans. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *172*, 1637–1645.
DeBarros, A., Chaves-Ferreira, M., d'Orey, F., Ribot, J.C., and Silva-Santos, B. (2011). CD70-CD27 interactions provide survival and proliferative signals that regulate T cell receptor-driven activation of human γδ peripheral blood lymphocytes. Eur. J. Immunol. *41*, 195–201.
DeClerck, K., and Elble, R.C. (2010). The role of hypoxia and acidosis in promoting metastasis and resistance to chemotherapy. Front. Biosci. Landmark Ed. *15*, 213–225.
Delgoffe, G.M., and Powell, J.D. (2009). mTOR: taking cues from the immune microenvironment. Immunology *127*, 459–465.
Delgoffe, G.M., Pollizzi, K.N., Waickman, A.T., Heikamp, E., Meyers, D.J., Horton, M.R., Xiao, B., Worley, P.F., and Powell, J.D. (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. Nat. Immunol. *12*, 295–303.
Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Frumento, G., Balsamo, M., Cantoni, C., Conte, R., Moretta, L., Moretta, A., and Vitale, M. (2006). The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. Blood *108*, 4118–4125.
Deng, B., Zhu, J.-M., Wang, Y., Liu, T.-T., Ding, Y.-B., Xiao, W.-M., Lu, G.-T., Bo, P., and Shen, X.-Z. (2013). Intratumor hypoxia promotes immune tolerance by inducing regulatory T cells via TGF-β1 in gastric cancer. PloS One *8*, e63777.
Deng, Q., Geng, Y., Zhao, L., Li, R., Zhang, Z., Li, K., Liang, R., Shao, X., Huang, M., Zuo, D., et al. (2019). NLRP3 inflammasomes in macrophages drive colorectal cancer metastasis to the liver. Cancer Lett. *442*, 21–30.
Derdák, Z., Fülöp, P., Sabo, E., Tavares, R., Berthiaume, E.P., Resnick, M.B., Paragh, G., Wands, J.R., and Baffy, G. (2006). Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF-κB activation and oxidative stress. Carcinogenesis *27*, 956–961.
Derdak, Z., Mark, N.M., Beldi, G., Robson, S.C., Wands, J.R., and Baffy, G. (2008). The Mitochondrial Uncoupling Protein-2 Promotes Chemoresistance in Cancer Cells. Cancer Res. *68*, 2813–2819.
Deswaerte, V., Nguyen, P., West, A., Browning, A.F., Yu, L., Ruwanpura, S.M., Balic, J., Livis, T., Girard, C., Preaudet, A., et al. (2018). Inflammasome Adaptor ASC Suppresses Apoptosis of Gastric Cancer Cells by an IL18-Mediated Inflammation-Independent Mechanism. Cancer Res. *78*, 1293–1307.
Devaud, C., Rousseau, B., Netzer, S., Pitard, V., Paroissin, C., Khairallah, C., Costet, P., Moreau, J.-F., Couillaud, F., Dechanet-Merville, J., et al. (2013). Anti-metastatic potential of human Vδ1(+) γδ T cells in an orthotopic mouse xenograft model of colon carcinoma. Cancer Immunol. Immunother. CII *62*, 1199–1210.
van Deventer, H.W., Burgents, J.E., Wu, Q.P., Woodford, R.-M.T., Brickey, W.J., Allen, I.C., McElvania-Tekippe, E., Serody, J.S., and Ting, J.P.-Y. (2010). The inflammasome component NLRP3 impairs antitumor vaccine by enhancing the accumulation of tumor-associated myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res. *70*, 10161–10169.
Devilder, M.-C., Maillet, S., Bouyge-Moreau, I., Donnadieu, E., Bonneville, M., and Scotet, E. (2006). Potentiation of antigen-stimulated V gamma 9V delta 2 T cell cytokine production by immature dendritic cells (DC) and reciprocal effect on DC maturation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *176*, 1386–1393.
Dieli, F., Gebbia, N., Poccia, F., Caccamo, N., Montesano, C., Fulfaro, F., Arcara, C., Valerio, M.R., Meraviglia, S., Di Sano, C., et al. (2003). Induction of gammadelta T-lymphocyte effector functions by bisphosphonate zoledronic acid in cancer patients in vivo. Blood *102*, 2310–2311.
Dieli, F., Vermijlen, D., Fulfaro, F., Caccamo, N., Meraviglia, S., Cicero, G., Roberts, A., Buccheri, S., D'Asaro, M., Gebbia, N., et al. (2007). Targeting human {gamma}delta} T cells with zoledronate and interleukin-2 for immunotherapy of hormone-refractory prostate cancer. Cancer Res. *67*, 7450–7457.
Dietl, K., Renner, K., Dettmer, K., Timischl, B., Eberhart, K., Dorn, C., Hellerbrand, C., Kastenberger, M., Kunz-Schughart, L.A., Oefner, P.J., et al. (2010). Lactic acid and acidification inhibit TNF secretion and glycolysis of human monocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *184*, 1200–1209.
Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., et al. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *26*, 4410–4417.
Dihlmann, S., Tao, S., Echterdiek, F., Herpel, E., Jansen, L., Chang-Claude, J., Brenner, H., Hoffmeister, M., and Kloor, M. (2014). Lack of Absent in Melanoma 2 (AIM2) expression in tumor cells is closely associated with poor survival in colorectal cancer patients. Int. J. Cancer *135*, 2387–2396.
Dimitrov, L., Hong, C.S., Yang, C., Zhuang, Z., and Heiss, J.D. (2015). New developments in the pathogenesis and therapeutic targeting of the IDH1 mutation in glioma. Int. J. Med. Sci. *12*, 201–213.

Dimova, T., Brouwer, M., Gosselin, F., Tassignon, J., Leo, O., Donner, C., Marchant, A., and Vermijlen, D. (2015). Effector Vγ9Vδ2 T cells dominate the human fetal γδ T-cell repertoire. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E556-565.
Ding, Q., Shen, L., Nie, X., Lu, B., Pan, X., Su, Z., Yan, A., Yan, R., Zhou, Y., Li, L., et al. (2018). MiR-223-3p overexpression inhibits cell proliferation and migration by regulating inflammation-associated cytokines in glioblastomas. Pathol. Res. Pract. *214*, 1330–1339.
Dmitrieva-Posocco, O., Dzutsev, A., Posocco, D.F., Hou, V., Yuan, W., Thovarai, V., Mufazalov, I.A., Gunzer, M., Shilovskiy, I.P., Khaitov, M.R., et al. (2019). Cell-Type-Specific Responses to Interleukin-1 Control Microbial Invasion and Tumor-Elicited Inflammation in Colorectal Cancer. Immunity *50*, 166-180.e7.
Doedens, A.L., Phan, A.T., Stradner, M.H., Fujimoto, J.K., Nguyen, J.V., Yang, E., Johnson, R.S., and Goldrath, A.W. (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. Nat. Immunol. *14*, 1173–1182.
Domblides, C., Lartigue, L., and Faustin, B. (2018). Metabolic Stress in the Immune Function of T Cells, Macrophages and Dendritic Cells. Cells *7*.
Domblides, C., Lartigue, L., and Faustin, B. (2019). Control of the Antitumor Immune Response by Cancer Metabolism. Cells *8*.
Douguet, L., Bod, L., Lengagne, R., Labarthe, L., Kato, M., Avril, M.-F., and Prévost-Blondel, A. (2016). Nitric oxide synthase 2 is involved in the pro-tumorigenic potential of γδ17 T cells in melanoma. Oncoimmunology *5*, e1208878.
Drexler, S.K., Bonsignore, L., Masin, M., Tardivel, A., Jackstadt, R., Hermeking, H., Schneider, P., Gross, O., Tschopp, J., and Yazdi, A.S. (2012). Tissue-specific opposing functions of the inflammasome adaptor ASC in the regulation of epithelial skin carcinogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. *109*, 18384–18389.
Du, Q., Wang, Q., Fan, H., Wang, J., Liu, X., Wang, H., Wang, Y., and Hu, R. (2016). Dietary cholesterol promotes AOM-induced colorectal cancer through activating the NLRP3 inflammasome. Biochem. Pharmacol. *105*, 42–54.
Du, R., Lu, K.V., Petritsch, C., Liu, P., Ganss, R., Passegué, E., Song, H., Vandenberg, S., Johnson, R.S., Werb, Z., et al. (2008). HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. Cancer Cell *13*, 206–220.
Dulloo, A.G., and Samec, S. (2001). Uncoupling proteins: their roles in adaptive thermogenesis and substrate metabolism reconsidered. Br. J. Nutr. *86*, 123–139.
Dupaul-Chicoine, J., Arabzadeh, A., Dagenais, M., Douglas, T., Champagne, C., Morizot, A., Rodrigue-Gervais, I.G., Breton, V., Colpitts, S.L., Beauchemin, N., et al. (2015). The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumoricidal Activity. Immunity *43*, 751–763.
Eckmann, L., Kagnoff, M.F., and Fierer, J. (1993). Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. Infect. Immun. *61*, 4569–4574.
Elinav, E., Strowig, T., Kau, A.L., Henao-Mejia, J., Thaiss, C.A., Booth, C.J., Peaper, D.R., Bertin, J., Eisenbarth, S.C., Gordon, J.I., et al. (2011). NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. Cell *145*, 745–757.
Espinosa, E., Belmant, C., Pont, F., Luciani, B., Poupot, R., Romagné, F., Brailly, H., Bonneville, M., and Fournié, J.J. (2001). Chemical synthesis and biological activity of bromohydrin pyrophosphate, a potent stimulator of human gamma delta T cells. J. Biol. Chem. *276*, 18337–18344.
Esteves, T.C., and Brand, M.D. (2005). The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *1709*, 35–44.
Esteves P, Pecqueur C, Ransy C, Esnous C, Lenoir V, Bouillaud F, Bulteau AL, Lombès A, Prip-Buus C, Ricquier D, Alves-Guerra MC. (2014). Mitochondrial retrograde signaling mediated by UCP2 inhibits cancer cell proliferation and tumorigenesis. Cancer Res. *74(14)*:3971-3982.
Fabbi, M., Carbotti, G., and Ferrini, S. (2015). Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. J. Leukoc. Biol. *97*, 665–675.
Facciabene, A., Peng, X., Hagemann, I.S., Balint, K., Barchetti, A., Wang, L.-P., Gimotty, P.A., Gilks, C.B., Lal, P., Zhang, L., et al. (2011). Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. Nature *475*, 226–230.
Fahl, S.P., Coffey, F., and Wiest, D.L. (2014). Origins of γδ T Cell Effector Subsets: A Riddle Wrapped in an Enigma. J. Immunol. *193*, 4289–4294.
Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C., et al. (2006). The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor ζ-Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. J. Immunol. *176*, 6752–6761.
Fan, Y., Mao, R., and Yang, J. (2013). NF-κB and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. Protein Cell *4*, 176–185.

Farshchian, M., Nissinen, L., Siljamäki, E., Riihilä, P., Piipponen, M., Kivisaari, A., Kallajoki, M., Grénman, R., Peltonen, J., Peltonen, S., et al. (2017). Tumor cell-specific AIM2 regulates growth and invasion of cutaneous squamous cell carcinoma. Oncotarget *8*, 45825–45836.
Faure, F., Jitsukawa, S., Miossec, C., and Hercend, T. (1990). CD1c as a target recognition structure for human T lymphocytes: analysis with peripheral blood gamma/delta cells. Eur. J. Immunol. *20*, 703–706.
Faustin, B., and Reed, J.C. (2013). Reconstituting the NLRP1 inflammasome in vitro. Methods Mol. Biol. Clifton NJ *1040*, 137–152.
Feng, Q., Li, P., Salamanca, C., Huntsman, D., Leung, P.C.K., and Auersperg, N. (2005). Caspase-1alpha is down-regulated in human ovarian cancer cells and the overexpression of caspase-1alpha induces apoptosis. Cancer Res. *65*, 8591–8596.
Ferrick, D.A., Schrenzel, M.D., Mulvania, T., Hsieh, B., Ferlin, W.G., and Lepper, H. (1995). Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. Nature *373*, 255–257.
Fischer, K., Hoffmann, P., Voelkl, S., Meidenbauer, N., Ammer, J., Edinger, M., Gottfried, E., Schwarz, S., Rothe, G., Hoves, S., et al. (2007). Inhibitory effect of tumor cell–derived lactic acid on human T cells. Blood *109*, 3812–3819.
Fournié, J.-J., Sicard, H., Poupot, M., Bezombes, C., Blanc, A., Romagné, F., Ysebaert, L., and Laurent, G. (2013). What lessons can be learned from γδ T cell-based cancer immunotherapy trials? Cell. Mol. Immunol. *10*, 35–41.
Franchi, L., Eigenbrod, T., and Núñez, G. (2009). Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *183*, 792–796.
Franciosi, M., Lucisano, G., Lapice, E., Strippoli, G.F.M., Pellegrini, F., and Nicolucci, A. (2013). Metformin therapy and risk of cancer in patients with type 2 diabetes: systematic review. PloS One *8*, e71583.
Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R.V., Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H., and Thompson, C.B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. Immunity *16*, 769–777.
Friberg, M., Jennings, R., Alsarraj, M., Dessureault, S., Cantor, A., Extermann, M., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Antonia, S.J. (2002). Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. Int. J. Cancer *101*, 151–155.
Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G.B. (2002). Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. J. Exp. Med. *196*, 459–468.
Gaber, T., Strehl, C., Sawitzki, B., Hoff, P., and Buttgereit, F. (2015). Cellular Energy Metabolism in T-Lymphocytes. Int. Rev. Immunol. *34*, 34–49.
Gaggero, A., De Ambrosis, A., Mezzanzanica, D., Piazza, T., Rubartelli, A., Figini, M., Canevari, S., and Ferrini, S. (2004). A novel isoform of pro-interleukin-18 expressed in ovarian tumors is resistant to caspase-1 and -4 processing. Oncogene *23*, 7552–7560.
Gao, Y., Yang, W., Pan, M., Scully, E., Girardi, M., Augenlicht, L.H., Craft, J., and Yin, Z. (2003). Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. J. Exp. Med. *198*, 433–442.
Gasparoto, T.H., de Oliveira, C.E., de Freitas, L.T., Pinheiro, C.R., Hori, J.I., Garlet, G.P., Cavassani, K.A., Schillaci, R., da Silva, J.S., Zamboni, D.S., et al. (2014). Inflammasome Activation Is Critical to the Protective Immune Response during Chemically Induced Squamous Cell Carcinoma. PLoS ONE *9*.
Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. Nature *436*, 1186–1190.
Geng, Y., Shao, Y., He, W., Hu, W., Xu, Y., Chen, J., Wu, C., and Jiang, J. (2015). Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Lung Cancer: a Meta-Analysis. Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol. *37*, 1560–1571.
Gentles, A.J., Newman, A.M., Liu, C.L., Bratman, S.V., Feng, W., Kim, D., Nair, V.S., Xu, Y., Khuong, A., Hoang, C.D., et al. (2015). The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. Nat. Med. *21*, 938–945.
Gertner-Dardenne, J., Bonnafous, C., Bezombes, C., Capietto, A.-H., Scaglione, V., Ingoure, S., Cendron, D., Gross, E., Lepage, J.-F., Quillet-Mary, A., et al. (2009). Bromohydrin pyrophosphate enhances antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity induced by therapeutic antibodies. Blood *113*, 4875–4884.
Gertner-Dardenne, J., Fauriat, C., Orlanducci, F., Thibult, M.-L., Pastor, S., Fitzgibbon, J., Bouabdallah, R., Xerri, L., and Olive, D. (2013). The co-receptor BTLA negatively regulates human Vγ9Vδ2 T-cell proliferation: a potential way of immune escape for lymphoma cells. Blood *122*, 922–931.
Gewirtz, A.T., Navas, T.A., Lyons, S., Godowski, P.J., and Madara, J.L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *167*, 1882–1885.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1β–dependent adaptive immunity against tumors. Nat. Med. *15*, 1170–1178.
Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. Science *294*, 605–609.
Gober, H.-J., Kistowska, M., Angman, L., Jenö, P., Mori, L., and Libero, G.D. (2003). Human T Cell Receptor γδ Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. J. Exp. Med. *197*, 163–168.
Gonnermann, D., Oberg, H.-H., Kellner, C., Peipp, M., Sebens, S., Kabelitz, D., and Wesch, D. (2015). Resistance of cyclooxygenase-2 expressing pancreatic ductal adenocarcinoma cells against γδ T cell cytotoxicity. Oncoimmunology *4*, e988460.
Gottfried, E., Kunz-Schughart, L.A., Ebner, S., Mueller-Klieser, W., Hoves, S., Andreesen, R., Mackensen, A., and Kreutz, M. (2006). Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression. Blood *107*, 2013–2021.
Gottlob, K., Majewski, N., Kennedy, S., Kandel, E., Robey, R.B., and Hay, N. (2001). Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. Genes Dev. *15*, 1406–1418.
Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C., et al. (2002). CTLA-4–Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. Nat. Immunol. *3*, 1097–1101.
Grohmann, U., Fallarino, F., and Puccetti, P. (2003). Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. Trends Immunol. *24*, 242–248.
Guarda, G., Zenger, M., Yazdi, A.S., Schroder, K., Ferrero, I., Menu, P., Tardivel, A., Mattmann, C., and Tschopp, J. (2011). Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 2529–2534.
Gubser, P.M., Bantug, G.R., Razik, L., Fischer, M., Dimeloe, S., Hoenger, G., Durovic, B., Jauch, A., and Hess, C. (2013). Rapid effector function of memory CD8+ T cells requires an immediate-early glycolytic switch. Nat. Immunol. *14*, 1064–1072.
Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.M., Greenberg, N.R., et al. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. Immunity *28*, 571–580.
Guerville, F., Daburon, S., Marlin, R., Lartigue, L., Loizon, S., Pitard, V., Couzi, L., Moreau, J.-F., Déchanet-Merville, J., and Faustin, B. (2015). TCR-dependent sensitization of human γδ T cells to non-myeloid IL-18 in cytomegalovirus and tumor stress surveillance. Oncoimmunology *4*, e1003011.
Guo, B., Fu, S., Zhang, J., Liu, B., and Li, Z. (2016). Targeting inflammasome/IL-1 pathways for cancer immunotherapy. Sci. Rep. *6*.
Gurung, P., Anand, P.K., Malireddi, R.K.S., Vande Walle, L., Van Opdenbosch, N., Dillon, C.P., Weinlich, R., Green, D.R., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2014). FADD and caspase-8 mediate priming and activation of the canonical and noncanonical Nlrp3 inflammasomes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *192*, 1835–1846.
Hagen, T., Taylor, C.T., Lam, F., and Moncada, S. (2003). Redistribution of intracellular oxygen in hypoxia by nitric oxide: effect on HIF1alpha. Science *302*, 1975–1978.
Halary, F., Pitard, V., Dlubek, D., Krzysiek, R., de la Salle, H., Merville, P., Dromer, C., Emilie, D., Moreau, J.-F., and Déchanet-Merville, J. (2005). Shared reactivity of V{delta}2(neg) {gamma}{delta} T cells against cytomegalovirus-infected cells and tumor intestinal epithelial cells. J. Exp. Med. *201*, 1567–1578.
Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646–674.
Hannani, D., Ma, Y., Yamazaki, T., Déchanet-Merville, J., Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2012). Harnessing γδ T cells in anticancer immunotherapy. Trends Immunol. *33*, 199–206.
Hansen, W., Hutzler, M., Abel, S., Alter, C., Stockmann, C., Kliche, S., Albert, J., Sparwasser, T., Sakaguchi, S., Westendorf, A.M., et al. (2012). Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. J. Exp. Med. *209*, 2001–2016.
Hardie, D.G. (2015). Molecular Pathways: Is AMPK a Friend or a Foe in Cancer? Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *21*, 3836–3840.
Hardie, D.G., Ross, F.A., and Hawley, S.A. (2012). AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *13*, 251–262.
Harly, C., Guillaume, Y., Nedellec, S., Peigné, C.-M., Mönkkönen, H., Mönkkönen, J., Li, J., Kuball, J., Adams, E.J., Netzer, S., et al. (2012). Key implication of CD277/butyrophilin-3 (BTN3A) in cellular stress sensing by a major human γδ T-cell subset. Blood *120*, 2269–2279.
Harrison, O.J., Srinivasan, N., Pott, J., Schiering, C., Krausgruber, T., Ilott, N.E., and Maloy, K.J. (2015). Epithelial-derived IL-18 regulates Th17 cell differentiation and Foxp3$^+$ Treg cell function in the intestine. Mucosal Immunol. *8*, 1226–1236.

Hastie, A.T., Everts, K.B., Cho, S.K., Zangrilli, J., Shaver, J.R., Pollice, M.B., Fish, J.E., and Peters, S.P. (1996). IL-1 beta release from cultured bronchial epithelial cells and bronchoalveolar lavage cells from allergic and normal humans following segmental challenge with ragweed. Cytokine *8*, 730–738.
Hayashi, T., Mo, J.-H., Gong, X., Rossetto, C., Jang, A., Beck, L., Elliott, G.I., Kufareva, I., Abagyan, R., Broide, D.H., et al. (2007). 3-Hydroxyanthranilic acid inhibits PDK1 activation and suppresses experimental asthma by inducing T cell apoptosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 18619–18624.
Hayday, A.C. (2009). Gammadelta T cells and the lymphoid stress-surveillance response. Immunity *31*, 184–196.
Hayes, S.M., and Love, P.E. (2002). Distinct structure and signaling potential of the gamma delta TCR complex. Immunity *16*, 827–838.
Hayes, S.M., Li, L., and Love, P.E. (2005). TCR signal strength influences alphabeta/gammadelta lineage fate. Immunity *22*, 583–593.
Heng, B., Lim, C.K., Lovejoy, D.B., Bessede, A., Gluch, L., and Guillemin, G.J. (2016). Understanding the role of the kynurenine pathway in human breast cancer immunobiology. Oncotarget *7*, 6506–6520.
Herbst, R.S., Soria, J.-C., Kowanetz, M., Fine, G.D., Hamid, O., Gordon, M.S., Sosman, J.A., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Gettinger, S.N., et al. (2014). Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. Nature *515*, 563–567.
Himoudi, N., Morgenstern, D.A., Yan, M., Vernay, B., Saraiva, L., Wu, Y., Cohen, C.J., Gustafsson, K., and Anderson, J. (2012). Human γδ T lymphocytes are licensed for professional antigen presentation by interaction with opsonized target cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *188*, 1708–1716.
Ho, P.-C., Bihuniak, J.D., Macintyre, A.N., Staron, M., Liu, X., Amezquita, R., Tsui, Y.-C., Cui, G., Micevic, G., Perales, J.C., et al. (2015). Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. Cell *162*, 1217–1228.
Hollenbeak, C.S., Todd, M.M., Billingsley, E.M., Harper, G., Dyer, A.-M., and Lengerich, E.J. (2005). Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. Cancer *104*, 1962–1967.
Hooper, L.V. (2015). Epithelial cell contributions to intestinal immunity. Adv. Immunol. *126*, 129–172.
Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Booth, C.J., Strowig, T., Jin, C., Eisenbarth, S.C., and Flavell, R.A. (2010). Inflammation-induced tumorigenesis in the colon is regulated by caspase-1 and NLRC4. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 21635–21640.
Hu, B., Elinav, E., Huber, S., Strowig, T., Hao, L., Hafemann, A., Jin, C., Wunderlich, C., Wunderlich, T., Eisenbarth, S.C., et al. (2013). Microbiota-induced activation of epithelial IL-6 signaling links inflammasome-driven inflammation with transmissible cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *110*, 9862–9867.
Hua, F., Kang, N., Gao, Y.-A., Cui, L.-X., Ba, D.-N., and He, W. (2013). Potential regulatory role of in vitro-expanded Vδ1 T cells from human peripheral blood. Immunol. Res. *56*, 172–180.
Huang, B., Deora, A.B., He, K.-L., Chen, K., Sui, G., Jacovina, A.T., Almeida, D., Hong, P., Burgman, P., and Hajjar, K.A. (2011). Hypoxia-inducible factor-1 drives annexin A2 system-mediated perivascular fibrin clearance in oxygen-induced retinopathy in mice. Blood *118*, 2918–2929.
Huang, C.-F., Chen, L., Li, Y.-C., Wu, L., Yu, G.-T., Zhang, W.-F., and Sun, Z.-J. (2017). NLRP3 inflammasome activation promotes inflammation-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. J. Exp. Clin. Cancer Res. CR *36*, 116.
Huang, S.C.-C., Smith, A.M., Everts, B., Colonna, M., Pearce, E.L., Schilling, J.D., and Pearce, E.J. (2016). Metabolic Reprogramming Mediated by the mTORC2-IRF4 Signaling Axis Is Essential for Macrophage Alternative Activation. Immunity *45*, 817–830.
Hurmath, K.F., Ramaswamy, P., and Nandakumar, D.N. (2014). IL-1β microenvironment promotes proliferation, migration, and invasion of human glioma cells. Cell Biol. Int. *38*, 1415–1422.
Hussain, S.A., Ganesan, R., Reynolds, G., Gross, L., Stevens, A., Pastorek, J., Murray, P.G., Perunovic, B., Anwar, M.S., Billingham, L., et al. (2007). Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer. Br. J. Cancer *96*, 104–109.
Inoue, S.-I., Niikura, M., Takeo, S., Mineo, S., Kawakami, Y., Uchida, A., Kamiya, S., and Kobayashi, F. (2012). Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing γδ T cells is responsible for protective immunity to Plasmodium parasites. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 12129–12134.
Ismaili, J., Olislagers, V., Poupot, R., Fournié, J.-J., and Goldman, M. (2002). Human gamma delta T cells induce dendritic cell maturation. Clin. Immunol. Orlando Fla *103*, 296–302.
Iwasaki, M., Tanaka, Y., Kobayashi, H., Murata-Hirai, K., Miyabe, H., Sugie, T., Toi, M., and Minato, N. (2011). Expression and function of PD-1 in human γδ T cells that recognize phosphoantigens. Eur. J. Immunol. *41*, 345–355.
Jacobs, S.R., Herman, C.E., Maciver, N.J., Wofford, J.A., Wieman, H.L., Hammen, J.J., and Rathmell, J.C. (2008). Glucose uptake is limiting in T cell activation and requires CD28-mediated Akt-dependent and independent pathways. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 4476–4486.

Janowski, A.M., Colegio, O.R., Hornick, E.E., McNiff, J.M., Martin, M.D., Badovinac, V.P., Norian, L.A., Zhang, W., Cassel, S.L., and Sutterwala, F.S. (2016). NLRC4 suppresses melanoma tumor progression independently of inflammasome activation. J. Clin. Invest. *126*, 3917–3928.
Jantsch, J., Chakravortty, D., Turza, N., Prechtel, A.T., Buchholz, B., Gerlach, R.G., Volke, M., Gläsner, J., Warnecke, C., Wiesener, M.S., et al. (2008). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 4697–4705.
Jha, A.K., Huang, S.C.-C., Sergushichev, A., Lampropoulou, V., Ivanova, Y., Loginicheva, E., Chmielewski, K., Stewart, K.M., Ashall, J., Everts, B., et al. (2015). Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization. Immunity *42*, 419–430.
Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., and Marti, H.H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O2 tension. Am. J. Physiol. *271*, C1172-1180.
Jomaa, H., Feurle, J., Lühs, K., Kunzmann, V., Tony, H.P., Herderich, M., and Wilhelm, M. (1999). Vgamma9/Vdelta2 T cell activation induced by bacterial low molecular mass compounds depends on the 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. FEMS Immunol. Med. Microbiol. *25*, 371–378.
Jones, R.G., and Thompson, C.B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. Genes Dev. *23*, 537–548.
Jung, Y.-J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. *17*, 2115–2117.
Kaelin, W.G., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Mol. Cell *30*, 393–402.
Kalyan, S., and Kabelitz, D. (2013). Defining the nature of human γδ T cells: a biographical sketch of the highly empathetic. Cell. Mol. Immunol. *10*, 21–29.
Kalyan, S., Chandrasekaran, V., Quabius, E.S., Lindhorst, T.K., and Kabelitz, D. (2014). Neutrophil uptake of nitrogen-bisphosphonates leads to the suppression of human peripheral blood γδ T cells. Cell. Mol. Life Sci. CMLS *71*, 2335–2346.
Kang, J.S., Bae, S.Y., Kim, H.R., Kim, Y.S., Kim, D.J., Cho, B.J., Yang, H.-K., Hwang, Y.-I., Kim, K.J., Park, H.S., et al. (2009a). Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. Carcinogenesis *30*, 1987–1996.
Kang, M.R., Kim, M.S., Oh, J.E., Kim, Y.R., Song, S.Y., Seo, S.I., Lee, J.Y., Yoo, N.J., and Lee, S.H. (2009b). Mutational analysis of IDH1 codon 132 in glioblastomas and other common cancers. Int. J. Cancer *125*, 353–355.
Kast, R.E. (2008). Ritonavir and disulfiram may be synergistic in lowering active interleukin-18 levels in acute pancreatitis, and thereby hasten recovery. JOP J. Pancreas *9*, 350–353.
Kayagaki, N., Warming, S., Lamkanfi, M., Vande Walle, L., Louie, S., Dong, J., Newton, K., Qu, Y., Liu, J., Heldens, S., et al. (2011). Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. Nature *479*, 117–121.
Keller, M., Sollberger, G., and Beer, H.-D. (2009). Thalidomide Inhibits Activation of Caspase-1. J. Immunol. *183*, 5593–5599.
Khare, S., Ratsimandresey, R.A., de Almeida, L., Cuda, C.M., Rellick, S.L., Misharin, A.V., Wallin, M.C., Gangopadhyay, A., Forte, E., Gottwein, E., et al. (2014). The PYRIN domain-only protein POP3 inhibits ALR inflammasomes and regulates responses to infection with DNA viruses. Nat. Immunol. *15*, 343–353.
Kim, J., Kim, C., Kim, T.S., Bang, S.I., Yang, Y., Park, H., and Cho, D. (2006a). IL-18 enhances thrombospondin-1 production in human gastric cancer via JNK pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. *344*, 1284–1289.
Kim, J., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006b). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. Cell Metab. *3*, 177–185.
Kim, K.-E., Song, H., Kim, T.S., Yoon, D., Kim, C. -w, Bang, S.I., Hur, D.Y., Park, H., and Cho, D.-H. (2007a). Interleukin-18 is a critical factor for vascular endothelial growth factor-enhanced migration in human gastric cancer cell lines. Oncogene *26*, 1468–1476.
Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K. (2007b). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. Immunology *121*, 1–14.
Klebanoff, C.A., Gattinoni, L., Torabi-Parizi, P., Kerstann, K., Cardones, A.R., Finkelstein, S.E., Palmer, D.C., Antony, P.A., Hwang, S.T., Rosenberg, S.A., et al. (2005). Central memory self/tumor-reactive CD8+ T cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 9571–9576.
Knodler, L.A., Crowley, S.M., Sham, H.P., Yang, H., Wrande, M., Ma, C., Ernst, R.K., Steele-Mortimer, O., Celli, J., and Vallance, B.A. (2014). Noncanonical inflammasome activation of caspase-4/caspase-11 mediates epithelial defenses against enteric bacterial pathogens. Cell Host Microbe *16*, 249–256.
Kobayashi, N. (1985). Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome. Jpn. J. Clin. Oncol. *15 Suppl 1*, 307–312.
Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature *450*, 903–907.

Kondo, M., Izumi, T., Fujieda, N., Kondo, A., Morishita, T., Matsushita, H., and Kakimi, K. (2011). Expansion of human peripheral blood γδ T cells using zoledronate. J. Vis. Exp. JoVE.
Kono, K., Salazar-Onfray, F., Petersson, M., Hansson, J., Masucci, G., Wasserman, K., Nakazawa, T., Anderson, P., and Kiessling, R. (1996). Hydrogen peroxide secreted by tumor-derived macrophages down-modulates signal-transducing zeta molecules and inhibits tumor-specific T cell-and natural killer cell-mediated cytotoxicity. Eur. J. Immunol. *26*, 1308–1313.
Kopf, H., de la Rosa, G.M., Howard, O.M.Z., and Chen, X. (2007). Rapamycin inhibits differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. Int. Immunopharmacol. *7*, 1819–1824.
Krawczyk, C.M., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., DeBerardinis, R.J., Cross, J.R., Jung, E., Thompson, C.B., Jones, R.G., et al. (2010). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. Blood *115*, 4742–4749.
Krelin, Y., Voronov, E., Dotan, S., Elkabets, M., Reich, E., Fogel, M., Huszar, M., Iwakura, Y., Segal, S., Dinarello, C.A., et al. (2007). Interleukin-1beta-driven inflammation promotes the development and invasiveness of chemical carcinogen-induced tumors. Cancer Res. *67*, 1062–1071.
Kreslavsky, T., Garbe, A.I., Krueger, A., and von Boehmer, H. (2008). T cell receptor-instructed alphabeta versus gammadelta lineage commitment revealed by single-cell analysis. J. Exp. Med. *205*, 1173–1186.
Kreslavsky, T., Gleimer, M., Garbe, A.I., and von Boehmer, H. (2010). αβ versus γδ fate choice: counting the T-cell lineages at the branch point. Immunol. Rev. *238*, 169–181.
Kühl, A.A., Pawlowski, N.N., Grollich, K., Loddenkemper, C., Zeitz, M., and Hoffmann, J.C. (2007). Aggravation of intestinal inflammation by depletion/deficiency of gammadelta T cells in different types of IBD animal models. J. Leukoc. Biol. *81*, 168–175.
Kühl, A.A., Pawlowski, N.N., Grollich, K., Blessenohl, M., Westermann, J., Zeitz, M., Loddenkemper, C., and Hoffmann, J.C. (2009). Human peripheral gammadelta T cells possess regulatory potential. Immunology *128*, 580–588.
Kunzmann, V., Bauer, E., and Wilhelm, M. (1999). Gamma/delta T-cell stimulation by pamidronate. N. Engl. J. Med. *340*, 737–738.
Labbé, K., McIntire, C.R., Doiron, K., Leblanc, P.M., and Saleh, M. (2011). Cellular inhibitors of apoptosis proteins cIAP1 and cIAP2 are required for efficient caspase-1 activation by the inflammasome. Immunity *35*, 897–907.
Lafont, V., Sanchez, F., Laprevotte, E., Michaud, H.-A., Gros, L., Eliaou, J.-F., and Bonnefoy, N. (2014). Plasticity of γδ T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. Front. Immunol. *5*.
Laird, R.M., Wolf, B.J., Princiotta, M.F., and Hayes, S.M. (2013). γδ T cells acquire effector fates in the thymus and differentiate into cytokine-producing effectors in a Listeria model of infection independently of CD28 costimulation. PloS One *8*, e63178.
Lamb, L.S., Henslee-Downey, P.J., Parrish, R.S., Godder, K., Thompson, J., Lee, C., and Gee, A.P. (1996). Increased frequency of TCR gamma delta + T cells in disease-free survivors following T cell-depleted, partially mismatched, related donor bone marrow transplantation for leukemia. J. Hematother. *5*, 503–509.
Lamb, L.S., Bowersock, J., Dasgupta, A., Gillespie, G.Y., Su, Y., Johnson, A., and Spencer, H.T. (2013). Engineered Drug Resistant γδ T Cells Kill Glioblastoma Cell Lines during a Chemotherapy Challenge: A Strategy for Combining Chemo- and Immunotherapy. PLoS ONE *8*.
Lamkanfi, M., and Dixit, V.M. (2014). Mechanisms and functions of inflammasomes. Cell *157*, 1013–1022.
Lança, T., Correia, D.V., Moita, C.F., Raquel, H., Neves-Costa, A., Ferreira, C., Ramalho, J.S., Barata, J.T., Moita, L.F., Gomes, A.Q., et al. (2010). The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity. Blood *115*, 2407–2411.
Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. Genes Dev. *16*, 1466–1471.
Langowski, J.L., Zhang, X., Wu, L., Mattson, J.D., Chen, T., Smith, K., Basham, B., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Oft, M. (2006). IL-23 promotes tumour incidence and growth. Nature *442*, 461–465.
Lanier, L.L. (2015). NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. Cancer Immunol. Res. *3*, 575–582.
Lardner, A. (2001). The effects of extracellular pH on immune function. J. Leukoc. Biol. *69*, 522–530.
Latini, A., Scussiato, K., Rosa, R.B., Llesuy, S., Belló-Klein, A., Dutra-Filho, C.S., and Wajner, M. (2003). D-2-hydroxyglutaric acid induces oxidative stress in cerebral cortex of young rats. Eur. J. Neurosci. *17*, 2017–2022.
Latz, E., Xiao, T.S., and Stutz, A. (2013). Activation and regulation of the inflammasomes. Nat. Rev. Immunol. *13*, 397–411.
Lauritsen, J.P.H., Haks, M.C., Lefebvre, J.M., Kappes, D.J., and Wiest, D.L. (2006). Recent insights into the signals that control alphabeta/gammadelta-lineage fate. Immunol. Rev. *209*, 176–190.
Lauritsen, J.P.H., Wong, G.W., Lee, S.-Y., Lefebvre, J.M., Ciofani, M., Rhodes, M., Kappes, D.J., Zúñiga-Pflücker, J.C., and Wiest, D.L. (2009). Marked induction of the helix-loop-helix protein Id3 promotes the gammadelta T cell fate and renders their functional maturation Notch independent. Immunity *31*, 565–575.

Lee, G.K., Park, H.J., Macleod, M., Chandler, P., Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2002). Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. Immunology *107*, 452–460.
Lee, J., Walsh, M.C., Hoehn, K.L., James, D.E., Wherry, E.J., and Choi, Y. (2014). Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *192*, 3190–3199.
Legut, M., Cole, D.K., and Sewell, A.K. (2015). The promise of γδ T cells and the γδ T cell receptor for cancer immunotherapy. Cell. Mol. Immunol. *12*, 656–668.
Levy, M., Thaiss, C.A., Zeevi, D., Dohnalová, L., Zilberman-Schapira, G., Mahdi, J.A., David, E., Savidor, A., Korem, T., Herzig, Y., et al. (2015). Microbiota-Modulated Metabolites Shape the Intestinal Microenvironment by Regulating NLRP6 Inflammasome Signaling. Cell *163*, 1428–1443.
Li, C., Zhang, Y., Cheng, X., Yuan, H., Zhu, S., Liu, J., Wen, Q., Xie, Y., Liu, J., Kroemer, G., et al. (2018a). PINK1 and PARK2 Suppress Pancreatic Tumorigenesis through Control of Mitochondrial Iron-Mediated Immunometabolism. Dev. Cell *46*, 441-455.e8.
Li, W., Kubo, S., Okuda, A., Yamamoto, H., Ueda, H., Tanaka, T., Nakamura, H., Yamanishi, H., Terada, N., and Okamura, H. (2010). Effect of IL-18 on Expansion of γδ T Cells Stimulated by Zoledronate and IL-2. J. Immunother. *33*, 287–296.
Li, W., Zhang, C., Jackson, K., Shen, X., Jin, R., Li, G., Kevil, C.G., Gu, X., Shi, R., and Zhao, Y. (2015). UCP2 Knockout Suppresses Mouse Skin Carcinogenesis. Cancer Prev. Res. (Phila. Pa.) *8*, 487–491.
Li, Y., Innocentin, S., Withers, D.R., Roberts, N.A., Gallagher, A.R., Grigorieva, E.F., Wilhelm, C., and Veldhoen, M. (2011). Exogenous stimuli maintain intraepithelial lymphocytes via aryl hydrocarbon receptor activation. Cell *147*, 629–640.
Li, Y., Wang, L., Pappan, L., Galliher-Beckley, A., and Shi, J. (2012). IL-1β promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation. Mol. Cancer *11*, 87.
Li, Y., Hermanson, D.L., Moriarity, B.S., and Kaufman, D.S. (2018b). Human iPSC-Derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-tumor Activity. Cell Stem Cell *23*, 181-192.e5.
Lim, H.X., Hong, H.-J., Cho, D., and Kim, T.S. (2014). IL-18 enhances immunosuppressive responses by promoting differentiation into monocytic myeloid-derived suppressor cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *193*, 5453–5460.
Lin, L., Hu, X., Zhang, H., and Hu, H. (2019). Tertiary Lymphoid Organs in Cancer Immunology: Mechanisms and the New Strategy for Immunotherapy. Front. Immunol. *10*.
Lin, S., Wan, S., Sun, L., Hu, J., Fang, D., Zhao, R., Yuan, S., and Zhang, L. (2012). Chemokine C-C motif receptor 5 and C-C motif ligand 5 promote cancer cell migration under hypoxia. Cancer Sci. *103*, 904–912.
Lin, X.Y., Choi, M.S.K., and Porter, A.G. (2000). Expression Analysis of the Human Caspase-1 Subfamily Reveals Specific Regulation of the CASP5 Gene by Lipopolysaccharide and Interferon-γ. J. Biol. Chem. *275*, 39920–39926.
Litzenburger, U.M., Opitz, C.A., Sahm, F., Rauschenbach, K.J., Trump, S., Winter, M., Ott, M., Ochs, K., Lutz, C., Liu, X., et al. (2014). Constitutive IDO expression in human cancer is sustained by an autocrine signaling loop involving IL-6, STAT3 and the AHR. Oncotarget *5*, 1038–1051.
Liu, R., Truax, A.D., Chen, L., Hu, P., Li, Z., Chen, J., Song, C., Chen, L., and Ting, J.P.-Y. (2015). Expression profile of innate immune receptors, NLRs and AIM2, in human colorectal cancer: correlation with cancer stages and inflammasome components. Oncotarget *6*, 33456–33469.
Liu, W., Luo, Y., Dunn, J.H., Norris, D.A., Dinarello, C.A., and Fujita, M. (2013). Dual Role of Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD (ASC) in Tumorigenesis of Human Melanoma. J. Invest. Dermatol. *133*, 518–527.
Liu, Z., Eltoum, I.-E.A., Guo, B., Beck, B.H., Cloud, G.A., and Lopez, R.D. (2008). Protective immunosurveillance and therapeutic antitumor activity of gammadelta T cells demonstrated in a mouse model of prostate cancer. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 6044–6053.
Lo Presti, E., Dieli, F., and Meraviglia, S. (2014). Tumor-Infiltrating γδ T Lymphocytes: Pathogenic Role, Clinical Significance, and Differential Programing in the Tumor Microenvironment. Front. Immunol. *5*, 607.
Lo Presti, E., Caccamo, N., Orlando, V., Dieli, F., and Meraviglia, S. (2016). Activation and selective IL-17 response of human Vγ9Vδ2 T lymphocytes by TLR-activated plasmacytoid dendritic cells. Oncotarget *7*, 60896–60905.
Locher, C., Conforti, R., Aymeric, L., Ma, Y., Yamazaki, T., Rusakiewicz, S., Tesnière, A., Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Morel, Y., et al. (2010). Desirable cell death during anticancer chemotherapy. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1209*, 99–108.
Lunt, S.Y., and Vander Heiden, M.G. (2011). Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. *27*, 441–464.
Luoma, A.M., Castro, C.D., Mayassi, T., Bembinster, L.A., Bai, L., Picard, D., Anderson, B., Scharf, L., Kung, J.E., Sibener, L.V., et al. (2013). Crystal structure of Vδ1 T cell receptor in complex with CD1d-sulfatide shows MHC-like recognition of a self-lipid by human γδ T cells. Immunity *39*, 1032–1042.

Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Wevers, E., Schwartz, T., Hunborg, P., Varvares, M.A., Hoft, D.F., et al. (2012a). Tumor-infiltrating γδ T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *189*, 5029–5036.
Ma, L., Lan, F., Zheng, Z., Xie, F., Wang, L., Liu, W., Han, J., Zheng, F., Xie, Y., and Huang, Q. (2012b). Epidermal growth factor (EGF) and interleukin (IL)-1β synergistically promote ERK1/2-mediated invasive breast ductal cancer cell migration and invasion. Mol. Cancer *11*, 79.
Ma, S., Cheng, Q., Cai, Y., Gong, H., Wu, Y., Yu, X., Shi, L., Wu, D., Dong, C., and Liu, H. (2014). IL-17A produced by γδ T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. Cancer Res. *74*, 1969–1982.
Macia, L., Tan, J., Vieira, A.T., Leach, K., Stanley, D., Luong, S., Maruya, M., Ian McKenzie, C., Hijikata, A., Wong, C., et al. (2015). Metabolite-sensing receptors GPR43 and GPR109A facilitate dietary fibre-induced gut homeostasis through regulation of the inflammasome. Nat. Commun. *6*, 6734.
Macintyre, A.N., and Rathmell, J.C. (2013). Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis. Cancer Metab. *1*, 5.
Maciolek, J.A., Pasternak, J.A., and Wilson, H.L. (2014). Metabolism of activated T lymphocytes. Curr. Opin. Immunol. *27*, 60–74.
MacIver, N.J., Blagih, J., Saucillo, D.C., Tonelli, L., Griss, T., Rathmell, J.C., and Jones, R.G. (2011). The liver kinase B1 is a central regulator of T cell development, activation, and metabolism. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *187*, 4187–4198.
MacIver, N.J., Michalek, R.D., and Rathmell, J.C. (2013). Metabolic regulation of T lymphocytes. Annu. Rev. Immunol. *31*, 259–283.
Maeurer, M.J., Martin, D., Walter, W., Liu, K., Zitvogel, L., Halusczcak, K., Rabinowich, H., Duquesnoy, R., Storkus, W., and Lotze, M.T. (1996). Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin. J. Exp. Med. *183*, 1681–1696.
Majima, T., Ichikura, T., Chochi, K., Kawabata, T., Tsujimoto, H., Sugasawa, H., Kuranaga, N., Takayama, E., Kinoshita, M., Hiraide, H., et al. (2006). Exploitation of interleukin-18 by gastric cancers for their growth and evasion of host immunity. Int. J. Cancer *118*, 388–395.
Malik, A., and Kanneganti, T.-D. (2017). Inflammasome activation and assembly at a glance. J. Cell Sci. *130*, 3955–3963.
Man, S.M., Zhu, Q., Zhu, L., Liu, Z., Karki, R., Malik, A., Sharma, D., Li, L., Malireddi, R.K.S., Gurung, P., et al. (2015). Critical Role for the DNA Sensor AIM2 in Stem Cell Proliferation and Cancer. Cell *162*, 45–58.
Mancino, A., Schioppa, T., Larghi, P., Pasqualini, F., Nebuloni, M., Chen, I.-H., Sozzani, S., Austyn, J.M., Mantovani, A., and Sica, A. (2008). Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. Blood *112*, 3723–3734.
Maniar, A., Zhang, X., Lin, W., Gastman, B.R., Pauza, C.D., Strome, S.E., and Chapoval, A.I. (2010). Human gammadelta T lymphocytes induce robust NK cell-mediated antitumor cytotoxicity through CD137 engagement. Blood *116*, 1726–1733.
Mannava, S., Grachtchouk, V., Wheeler, L.J., Im, M., Zhuang, D., Slavina, E.G., Mathews, C.K., Shewach, D.S., and Nikiforov, M.A. (2008). Direct role of nucleotide metabolism in C-MYC-dependent proliferation of melanoma cells. Cell Cycle Georget. Tex *7*, 2392–2400.
Marlin, R., Pappalardo, A., Kaminski, H., Willcox, C.R., Pitard, V., Netzer, S., Khairallah, C., Lomenech, A.-M., Harly, C., Bonneville, M., et al. (2017). Sensing of cell stress by human γδ TCR-dependent recognition of annexin A2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, 3163–3168.
Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL-β. Mol. Cell *10*, 417–426.
Masoud, G.N., and Li, W. (2015). HIF-1α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. Acta Pharm. Sin. B *5*, 378–389.
Mattarollo, S.R., Loi, S., Duret, H., Ma, Y., Zitvogel, L., and Smyth, M.J. (2011). Pivotal role of innate and adaptive immunity in anthracycline chemotherapy of established tumors. Cancer Res. *71*, 4809–4820.
Mattiasson, G., and Sullivan, P.G. (2006). The Emerging Functions of UCP2 in Health, Disease, and Therapeutics. Antioxid. Redox Signal. *8*, 1–38.
Mayor, A., Martinon, F., De Smedt, T., Pétrilli, V., and Tschopp, J. (2007). A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses. Nat. Immunol. *8*, 497–503.
Mazzio, E.A., Boukli, N., Rivera, N., and Soliman, K.F.A. (2012). Pericellular pH homeostasis is a primary function of the Warburg effect: inversion of metabolic systems to control lactate steady state in tumor cells. Cancer Sci. *103*, 422–432.
McGaha, T.L., Huang, L., Lemos, H., Metz, R., Mautino, M., Prendergast, G.C., and Mellor, A.L. (2012). Amino acid catabolism: a pivotal regulator of innate and adaptive immunity. Immunol. Rev. *249*, 135–157.
Mellor, A.L., Keskin, D.B., Johnson, T., Chandler, P., and Munn, D.H. (2002). Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *168*, 3771–3776.

Mendler, A.N., Hu, B., Prinz, P.U., Kreutz, M., Gottfried, E., and Noessner, E. (2012). Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation. Int. J. Cancer *131*, 633–640.
Meraviglia, S., Eberl, M., Vermijlen, D., Todaro, M., Buccheri, S., Cicero, G., La Mendola, C., Guggino, G., D'Asaro, M., Orlando, V., et al. (2010). In vivo manipulation of Vgamma9Vdelta2 T cells with zoledronate and low-dose interleukin-2 for immunotherapy of advanced breast cancer patients. Clin. Exp. Immunol. *161*, 290–297.
Meraviglia, S., Lo Presti, E., Tosolini, M., La Mendola, C., Orlando, V., Todaro, M., Catalano, V., Stassi, G., Cicero, G., Vieni, S., et al. (2017). Distinctive features of tumor-infiltrating γδ T lymphocytes in human colorectal cancer. Oncoimmunology *6*, e1347742.
Mezrich, J.D., Fechner, J.H., Zhang, X., Johnson, B.P., Burlingham, W.J., and Bradfield, C.A. (2010). An Interaction between Kynurenine and the Aryl Hydrocarbon Receptor Can Generate Regulatory T Cells. J. Immunol. *185*, 3190–3198.
Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Inoue, M., Kazmin, D., Chang, C.-Y., Dwyer, M.A., Nelson, E.R., Pollizzi, K.N., Ilkayeva, O., et al. (2011a). Estrogen-related receptor-α is a metabolic regulator of effector T-cell activation and differentiation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 18348–18353.
Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Jacobs, S.R., Macintyre, A.N., MacIver, N.J., Mason, E.F., Sullivan, S.A., Nichols, A.G., and Rathmell, J.C. (2011b). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *186*, 3299–3303.
Michel, M.-L., Pang, D.J., Haque, S.F.Y., Potocnik, A.J., Pennington, D.J., and Hayday, A.C. (2012). Interleukin 7 (IL-7) selectively promotes mouse and human IL-17-producing γδ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 17549–17554.
Mills, E.L., Kelly, B., Logan, A., Costa, A.S.H., Varma, M., Bryant, C.E., Tourlomousis, P., Däbritz, J.H.M., Gottlieb, E., Latorre, I., et al. (2016). Succinate Dehydrogenase Supports Metabolic Repurposing of Mitochondria to Drive Inflammatory Macrophages. Cell *167*, 457-470.e13.
Mishra, B.B., Rathinam, V.A.K., Martens, G.W., Martinot, A.J., Kornfeld, H., Fitzgerald, K.A., and Sassetti, C.M. (2013). Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1β. Nat. Immunol. *14*, 52–60.
Molgora, M., Bonavita, E., Ponzetta, A., Riva, F., Barbagallo, M., Jaillon, S., Popović, B., Bernardini, G., Magrini, E., Gianni, F., Zelenay, S., Jonjić, S., Santoni, A., Garlanda, C., Mantovani, A.. (2017). IL-1R8 is a checkpoint in NK cells regulating anti-tumour and anti-viral activity. Nature. *551*, 110-114.
Moriwaki, K., Balaji, S., McQuade, T., Malhotra, N., Kang, J., and Chan, F.K.-M. (2014). The Necroptosis Adaptor RIPK3 Promotes Injury-Induced Cytokine Expression and Tissue Repair. Immunity *41*, 567–578.
Mortimer, L., Moreau, F., MacDonald, J.A., and Chadee, K. (2016). NLRP3 inflammasome inhibition is disrupted in a group of auto-inflammatory disease CAPS mutations. Nat. Immunol. *17*, 1176–1186.
Mullen, A.R., Wheaton, W.W., Jin, E.S., Chen, P.-H., Sullivan, L.B., Cheng, T., Yang, Y., Linehan, W.M., Chandel, N.S., and DeBerardinis, R.J. (2012). Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. Nature *481*, 385–388.
Muller, A.J., DuHadaway, J.B., Donover, P.S., Sutanto-Ward, E., and Prendergast, G.C. (2005). Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy. Nat. Med. *11*, 312–319.
Muller, A.J., DuHadaway, J.B., Chang, M.Y., Ramalingam, A., Sutanto-Ward, E., Boulden, J., Soler, A.P., Mandik-Nayak, L., Gilmour, S.K., and Prendergast, G.C. (2010). Non-hematopoietic expression of IDO is integrally required for inflammatory tumor promotion. Cancer Immunol. Immunother. CII *59*, 1655–1663.
Munn, D.H., and Mellor, A.L. (2016). IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. Trends Immunol. *37*, 193–207.
Munn, D.H., Sharma, M.D., Hou, D., Baban, B., Lee, J.R., Antonia, S.J., Messina, J.L., Chandler, P., Koni, P.A., and Mellor, A.L. (2004). Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. J. Clin. Invest. *114*, 280–290.
Muñoz, M., Eidenschenk, C., Ota, N., Wong, K., Lohmann, U., Kühl, A.A., Wang, X., Manzanillo, P., Li, Y., Rutz, S., et al. (2015). Interleukin-22 induces interleukin-18 expression from epithelial cells during intestinal infection. Immunity *42*, 321–331.
Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Núñez, G. (2013). K^+ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. Immunity *38*, 1142–1153.
Muñoz-Ruiz, M., Sumaria, N., Pennington, D.J., and Silva-Santos, B. (2017). Thymic Determinants of γδ T Cell Differentiation. Trends Immunol. *38*, 336–344.
Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat. Rev. Immunol. *11*, 723–737.
Nagai, H., Hara, I., Horikawa, T., Oka, M., Kamidono, S., and Ichihashi, M. (2002). Gene transfer of secreted-type modified interleukin-18 gene to B16F10 melanoma cells suppresses in vivo tumor growth through inhibition of tumor vessel formation. J. Invest. Dermatol. *119*, 541–548.

Nakamura, K., Kassem, S., Cleynen, A., Chrétien, M.-L., Guillerey, C., Putz, E.M., Bald, T., Förster, I., Vuckovic, S., Hill, G.R., et al. (2018). Dysregulated IL-18 Is a Key Driver of Immunosuppression and a Possible Therapeutic Target in the Multiple Myeloma Microenvironment. Cancer Cell *33*, 634-648.e5.
Nakao, S., Kuwano, T., Tsutsumi-Miyahara, C., Ueda, S., Kimura, Y.N., Hamano, S., Sonoda, K., Saijo, Y., Nukiwa, T., Strieter, R.M., et al. (2005). Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. J. Clin. Invest. *115*, 2979–2991.
Narayan, K., Sylvia, K.E., Malhotra, N., Yin, C.C., Martens, G., Vallerskog, T., Kornfeld, H., Xiong, N., Cohen, N.R., Brenner, M.B., et al. (2012). Intrathymic programming of effector fates in three molecularly distinct γδ T cell subtypes. Nat. Immunol. *13*, 511–518.
Newman, A.C., and Maddocks, O.D.K. (2017). One-carbon metabolism in cancer. Br. J. Cancer *116*, 1499–1504.
Newton, R., Priyadharshini, B., and Turka, L.A. (2016). Immunometabolism of regulatory T cells. Nat. Immunol. *17*, 618–625.
Nielsen, M.M., Witherden, D.A., and Havran, W.L. (2017). γδ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. Nat. Rev. Immunol. *17*, 733–745.
Nishio, S., Yamada, N., Ohyama, H., Yamanegi, K., Nakasho, K., Hata, M., Nakamura, Y., Fukunaga, S., Futani, H., Yoshiya, S., et al. (2008). Enhanced suppression of pulmonary metastasis of malignant melanoma cells by combined administration of alpha-galactosylceramide and interleukin-18. Cancer Sci. *99*, 113–120.
Noman, M.Z., Janji, B., Kaminska, B., Van Moer, K., Pierson, S., Przanowski, P., Buart, S., Berchem, G., Romero, P., Mami-Chouaib, F., et al. (2011). Blocking hypoxia-induced autophagy in tumors restores cytotoxic T-cell activity and promotes regression. Cancer Res. *71*, 5976–5986.
Normand, S., Delanoye-Crespin, A., Bressenot, A., Huot, L., Grandjean, T., Peyrin-Biroulet, L., Lemoine, Y., Hot, D., and Chamaillard, M. (2011). Nod-like receptor pyrin domain-containing protein 6 (NLRP6) controls epithelial self-renewal and colorectal carcinogenesis upon injury. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 9601–9606.
Novitskiy, S.V., Ryzhov, S., Zaynagetdinov, R., Goldstein, A.E., Huang, Y., Tikhomirov, O.Y., Blackburn, M.R., Biaggioni, I., Carbone, D.P., Feoktistov, I., et al. (2008). Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function. Blood *112*, 1822–1831.
Nowarski, R., Jackson, R., Gagliani, N., de Zoete, M.R., Palm, N.W., Bailis, W., Low, J.S., Harman, C.C.D., Graham, M., Elinav, E., et al. (2015). Epithelial IL-18 Equilibrium Controls Barrier Function in Colitis. Cell *163*, 1444–1456.
Nübel, T., Emre, Y., Rabier, D., Chadefaux, B., Ricquier, D., and Bouillaud, F. (2008). Modified glutamine catabolism in macrophages of Ucp2 knock-out mice. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. *1777*, 48–54.
Nussbaumer, O., Gruenbacher, G., Gander, H., Komuczki, J., Rahm, A., and Thurnher, M. (2013). Essential Requirements of Zoledronate-Induced Cytokine and γδ T Cell Proliferative Responses. J. Immunol. *191*, 1346–1355.
O'Brien, R.L., and Born, W.K. (2010). gammadelta T cell subsets: a link between TCR and function? Semin. Immunol. *22*, 193–198.
O'Brien, R.L., Lahn, M., Born, W.K., and Huber, S.A. (2001). T cell receptor and function cosegregate in gamma-delta T cell subsets. Chem. Immunol. *79*, 1–28.
Odegaard, J.I., and Chawla, A. (2011). Alternative macrophage activation and metabolism. Annu. Rev. Pathol. *6*, 275–297.
Ohashi, K., Maruvka, Y.E., Michor, F., and Pao, W. (2013). Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor-Resistant Disease. J. Clin. Oncol. *31*, 1070–1080.
Ohtsuka, T., Ryu, H., Minamishima, Y.A., Macip, S., Sagara, J., Nakayama, K.I., Aaronson, S.A., and Lee, S.W. (2004). ASC is a Bax adaptor and regulates the p53-Bax mitochondrial apoptosis pathway. Nat. Cell Biol. *6*, 121–128.
Opitz, C.A., Litzenburger, U.M., Sahm, F., Ott, M., Tritschler, I., Trump, S., Schumacher, T., Jestaedt, L., Schrenk, D., Weller, M., et al. (2011). An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. Nature *478*, 197–203.
Orloff, D.G., Ra, C.S., Frank, S.J., Klausner, R.D., and Kinet, J.P. (1990). Family of disulphide-linked dimers containing the zeta and eta chains of the T-cell receptor and the gamma chain of Fc receptors. Nature *347*, 189–191.
Pagès, F., Berger, A., Henglein, B., Piqueras, B., Danel, C., Zinzindohoue, F., Thiounn, N., Cugnenc, P.H., and Fridman, W.H. (1999). Modulation of interleukin-18 expression in human colon carcinoma: consequences for tumor immune surveillance. Int. J. Cancer *84*, 326–330.
Palazon-Riquelme, P., and Lopez-Castejon, G. (2018). The inflammasomes, immune guardians at defence barriers. Immunology *155*, 320–330.
Pantschenko, A.G., Pushkar, I., Anderson, K.H., Wang, Y., Miller, L.J., Kurtzman, S.H., Barrows, G., and Kreutzer, D.L. (2003). The interleukin-1 family of cytokines and receptors in human breast cancer: implications for tumor progression. Int. J. Oncol. *23*, 269–284.

Park, S.Y., Arase, H., Wakizaka, K., Hirayama, N., Masaki, S., Sato, S., Ravetch, J.V., and Saito, T. (1995). Differential contribution of the FcR gamma chain to the surface expression of the T cell receptor among T cells localized in epithelia: analysis of FcR gamma-deficient mice. Eur. J. Immunol. *25*, 2107–2110.
Passardi, A., Canale, M., Valgiusti, M., and Ulivi, P. (2017). Immune Checkpoints as a Target for Colorectal Cancer Treatment. Int. J. Mol. Sci. *18*.
Patil, R.S., Shah, S.U., Shrikhande, S.V., Goel, M., Dikshit, R.P., and Chiplunkar, S.V. (2016). IL17 producing γδT cells induce angiogenesis and are associated with poor survival in gallbladder cancer patients. Int. J. Cancer *139*, 869–881.
Patsos, G., Germann, A., Gebert, J., and Dihlmann, S. (2010). Restoration of absent in melanoma 2 (AIM2) induces G2/M cell cycle arrest and promotes invasion of colorectal cancer cells. Int. J. Cancer *126*, 1838–1849.
Paudel, S., Ghimire, L., Jin, L., Baral, P., Cai, S., and Jeyaseelan, S. (2019). NLRC4 suppresses IL-17A-mediated neutrophil-dependent host defense through upregulation of IL-18 and induction of necroptosis during Gram-positive pneumonia. Mucosal Immunol. *12*, 247–257.
Paugh, S.W., Bonten, E.J., Savic, D., Ramsey, L.B., Thierfelder, W.E., Gurung, P., Malireddi, R.K.S., Actis, M., Mayasundari, A., Min, J., et al. (2015). NALP3 inflammasome upregulation and CASP1 cleavage of the glucocorticoid receptor cause glucocorticoid resistance in leukemia cells. Nat. Genet. *47*, 607–614.
Paul, S., and Lal, G. (2016). Regulatory and effector functions of gamma-delta (γδ) T cells and their therapeutic potential in adoptive cellular therapy for cancer. Int. J. Cancer *139*, 976–985.
Pavlova, N.N., and Thompson, C.B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell Metab. *23*, 27–47.
Pearce, E.L., and Pearce, E.J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. Immunity *38*, 633–643.
Pearce, E.L., Walsh, M.C., Cejas, P.J., Harms, G.M., Shen, H., Wang, L.-S., Jones, R.G., and Choi, Y. (2009). Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. Nature *460*, 103–107.
Pello, O.M., De Pizzol, M., Mirolo, M., Soucek, L., Zammataro, L., Amabile, A., Doni, A., Nebuloni, M., Swigart, L.B., Evan, G.I., et al. (2012). Role of c-MYC in alternative activation of human macrophages and tumor-associated macrophage biology. Blood *119*, 411–421.
Peng, G., Wang, H.Y., Peng, W., Kiniwa, Y., Seo, K.H., and Wang, R.-F. (2007). Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. Immunity *27*, 334–348.
Peng, M., Yin, N., Chhangawala, S., Xu, K., Leslie, C.S., and Li, M.O. (2016). Aerobic glycolysis promotes T helper 1 cell differentiation through an epigenetic mechanism. Science *354*, 481–484.
Perera, A.P., Fernando, R., Shinde, T., Gundamaraju, R., Southam, B., Sohal, S.S., Robertson, A.A.B., Schroder, K., Kunde, D., and Eri, R. (2018). MCC950, a specific small molecule inhibitor of NLRP3 inflammasome attenuates colonic inflammation in spontaneous colitis mice. Sci. Rep. *8*, 8618.
Perez-Yepez, E.A., Ayala-Sumuano, J.-T., Lezama, R., and Meza, I. (2014). A novel β-catenin signaling pathway activated by IL-1β leads to the onset of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer cells. Cancer Lett. *354*, 164–171.
Peter, K., Rehli, M., Singer, K., Renner-Sattler, K., and Kreutz, M. (2015). Lactic acid delays the inflammatory response of human monocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. *457*, 412–418.
Peyssonnaux, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E.A., Gallo, R.L., Hurtado-Ziola, N., Nizet, V., and Johnson, R.S. (2005). HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. J. Clin. Invest. *115*, 1806–1815.
Pitard, V., Roumanes, D., Lafarge, X., Couzi, L., Garrigue, I., Lafon, M.-E., Merville, P., Moreau, J.-F., and Déchanet-Merville, J. (2008). Long-term expansion of effector/memory Vdelta2-gammadelta T cells is a specific blood signature of CMV infection. Blood *112*, 1317–1324.
Plas, D.R., Rathmell, J.C., and Thompson, C.B. (2002). Homeostatic control of lymphocyte survival: potential origins and implications. Nat. Immunol. *3*, 515–521.
Polet, F., and Feron, O. (2013). Endothelial cell metabolism and tumour angiogenesis: glucose and glutamine as essential fuels and lactate as the driving force. J. Intern. Med. *273*, 156–165.
Poli, G., Cochetti, G., Boni, A., Egidi, M.G., Brancorsini, S., and Mearini, E. (2017). Characterization of inflammasome-related genes in urine sediments of patients receiving intravesical BCG therapy. Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig. *35*, 674.e19-674.e24.
Pont, F., Familiades, J., Déjean, S., Fruchon, S., Cendron, D., Poupot, M., Poupot, R., L'faqihi-Olive, F., Prade, N., Ycart, B., et al. (2012). The gene expression profile of phosphoantigen-specific human γδ T lymphocytes is a blend of αβ T-cell and NK-cell signatures. Eur. J. Immunol. *42*, 228–240.
Possemato, R., Marks, K.M., Shaul, Y.D., Pacold, M.E., Kim, D., Birsoy, K., Sethumadhavan, S., Woo, H.-K., Jang, H.G., Jha, A.K., et al. (2011). Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. Nature *476*, 346–350.

Pouysségur, J., Sardet, C., Franchi, A., L'Allemain, G., and Paris, S. (1984). A specific mutation abolishing Na+/H+ antiport activity in hamster fibroblasts precludes growth at neutral and acidic pH. Proc. Natl. Acad. Sci. *81*, 4833–4837.
Powell, J.D., and Delgoffe, G.M. (2010). The mammalian target of rapamycin: linking T cell differentiation, function, and metabolism. Immunity *33*, 301–311.
Prendergast, G., Y. Chang, M., Mandik-Nayak, L., Metz, R., and J. Muller, A. (2011). Indoleamine 2,3-dioxygenase as a Modifier of Pathogenic Inflammation in Cancer and other Inflammation-Associated Diseases. Curr. Med. Chem. *18*, 2257–2262.
Py, B.F., Kim, M.-S., Vakifahmetoglu-Norberg, H., and Yuan, J. (2013). Deubiquitination of NLRP3 by BRCC3 critically regulates inflammasome activity. Mol. Cell *49*, 331–338.
Qin, G., Mao, H., Zheng, J., Sia, S.F., Liu, Y., Chan, P.-L., Lam, K.-T., Peiris, J.S.M., Lau, Y.-L., and Tu, W. (2009). Phosphoantigen-expanded human gammadelta T cells display potent cytotoxicity against monocyte-derived macrophages infected with human and avian influenza viruses. J. Infect. Dis. *200*, 858–865.
Qu, Y., Misaghi, S., Izrael-Tomasevic, A., Newton, K., Gilmour, L.L., Lamkanfi, M., Louie, S., Kayagaki, N., Liu, J., Kömüves, L., et al. (2012). Phosphorylation of NLRC4 is critical for inflammasome activation. Nature *490*, 539–542.
Ramapriyan, R., Caetano, M.S., Barsoumian, H.B., Mafra, A.C.P., Zambalde, E.P., Menon, H., Tsouko, E., Welsh, J.W., and Cortez, M.A. (2019). Altered cancer metabolism in mechanisms of immunotherapy resistance. Pharmacol. Ther. *195*, 162–171.
Rauch, I., Deets, K.A., Ji, D.X., von Moltke, J., Tenthorey, J.L., Lee, A.Y., Philip, N.H., Ayres, J.S., Brodsky, I.E., Gronert, K., et al. (2017). NAIP-NLRC4 Inflammasomes Coordinate Intestinal Epithelial Cell Expulsion with Eicosanoid and IL-18 Release via Activation of Caspase-1 and -8. Immunity *46*, 649–659.
Rei, M., Gonçalves-Sousa, N., Lança, T., Thompson, R.G., Mensurado, S., Balkwill, F.R., Kulbe, H., Pennington, D.J., and Silva-Santos, B. (2014). Murine CD27(-) Vγ6(+) γδ T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *111*, E3562-3570.
Rei, M., Pennington, D.J., and Silva-Santos, B. (2015). The emerging Protumor role of γδ T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy. Cancer Res. *75*, 798–802.
Reynolds, M.R., Lane, A.N., Robertson, B., Kemp, S., Liu, Y., Hill, B.G., Dean, D.C., and Clem, B.F. (2014). Control of glutamine metabolism by the tumor suppressor Rb. Oncogene *33*, 556–566.
Rezende, R.M., da Cunha, A.P., Kuhn, C., Rubino, S., M'Hamdi, H., Gabriely, G., Vandeventer, T., Liu, S., Cialic, R., Pinheiro-Rosa, N., et al. (2015). Identification and characterization of latency-associated peptide-expressing γδ T cells. Nat. Commun. *6*, 8726.
Rhodes, K.A., Andrew, E.M., Newton, D.J., Tramonti, D., and Carding, S.R. (2008). A subset of IL-10-producing gammadelta T cells protect the liver from Listeria-elicited, CD8(+) T cell-mediated injury. Eur. J. Immunol. *38*, 2274–2283.
Ribas, A. (2012). Tumor Immunotherapy Directed at PD-1. N. Engl. J. Med. *366*, 2517–2519.
Ribeiro, S.T., Ribot, J.C., and Silva-Santos, B. (2015). Five Layers of Receptor Signaling in γδ T-Cell Differentiation and Activation. Front. Immunol. *6*.
Ribot, J.C., deBarros, A., Pang, D.J., Neves, J.F., Peperzak, V., Roberts, S.J., Girardi, M., Borst, J., Hayday, A.C., Pennington, D.J., et al. (2009). CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets. Nat. Immunol. *10*, 427–436.
Ribot, J.C., Chaves-Ferreira, M., d'Orey, F., Wencker, M., Gonçalves-Sousa, N., Decalf, J., Simas, J.P., Hayday, A.C., and Silva-Santos, B. (2010). Cutting Edge: Adaptive Versus Innate Receptor Signals Selectively Control the Pool Sizes of Murine IFN-γ– or IL-17–Producing γδ T Cells upon Infection. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 6421–6425.
Riond, J., Rodriguez, S., Nicolau, M.-L., al Saati, T., and Gairin, J.E. (2009). In vivo major histocompatibility complex class I (MHCI) expression on MHCIlow tumor cells is regulated by gammadelta T and NK cells during the early steps of tumor growth. Cancer Immun. *9*, 10.
Rolf, J., Zarrouk, M., Finlay, D.K., Foretz, M., Viollet, B., and Cantrell, D.A. (2013). AMPKα1: a glucose sensor that controls CD8 T-cell memory. Eur. J. Immunol. *43*, 889–896.
Rudrabhatla, S.R., Mahaffey, C.L., and Mummert, M.E. (2006). Tumor Microenvironment Modulates Hyaluronan Expression: The Lactate Effect. J. Invest. Dermatol. *126*, 1378–1387.
Sabbione, F., Gabelloni, M.L., Ernst, G., Gori, M.S., Salamone, G., Oleastro, M., Trevani, A., Geffner, J., and Jancic, C.C. (2014). Neutrophils suppress γδ T-cell function. Eur. J. Immunol. *44*, 819–830.
Sadasivam, S., Gupta, S., Radha, V., Batta, K., Kundu, T.K., and Swarup, G. (2005). Caspase-1 activator Ipaf is a p53-inducible gene involved in apoptosis. Oncogene *24*, 627–636.
Saijo, Y., Tanaka, M., Miki, M., Usui, K., Suzuki, T., Maemondo, M., Hong, X., Tazawa, R., Kikuchi, T., Matsushima, K., et al. (2002). Proinflammatory cytokine IL-1 beta promotes tumor growth of Lewis lung

carcinoma by induction of angiogenic factors: in vivo analysis of tumor-stromal interaction. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *169*, 469–475.
Saito, H., Kranz, D.M., Takagaki, Y., Hayday, A.C., Eisen, H.N., and Tonegawa, S. (1984). A third rearranged and expressed gene in a clone of cytotoxic T lymphocytes. Nature *312*, 36–40.
Salcedo, R., Worschech, A., Cardone, M., Jones, Y., Gyulai, Z., Dai, R.-M., Wang, E., Ma, W., Haines, D., O'hUigin, C., et al. (2010). MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. J. Exp. Med. *207*, 1625–1636.
Salminen, A., Kauppinen, A., Hiltunen, M., and Kaarniranta, K. (2014). Epigenetic regulation of ASC/TMS1 expression: potential role in apoptosis and inflammasome function. Cell. Mol. Life Sci. *71*, 1855–1864.
Sattler, U.G.A., Meyer, S.S., Quennet, V., Hoerner, C., Knoerzer, H., Fabian, C., Yaromina, A., Zips, D., Walenta, S., Baumann, M., et al. (2010). Glycolytic metabolism and tumour response to fractionated irradiation. Radiother. Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol. *94*, 102–109.
Scharping, N.E., Menk, A.V., Moreci, R.S., Whetstone, R.D., Dadey, R.E., Watkins, S.C., Ferris, R.L., and Delgoffe, G.M. (2016). The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. Immunity *45*, 374–388.
Schauer, I.G., Sood, A.K., Mok, S., and Liu, J. (2011). Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. Neoplasia N. Y. N *13*, 393–405.
Schild, H., Mavaddat, N., Litzenberger, C., Ehrich, E.W., Davis, M.M., Bluestone, J.A., Matis, L., Draper, R.K., and Chien, Y.H. (1994). The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. Cell *76*, 29–37.
Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science *331*, 1565–1570.
Schroder, K., Sagulenko, V., Zamoshnikova, A., Richards, A.A., Cridland, J.A., Irvine, K.M., Stacey, K.J., and Sweet, M.J. (2012). Acute lipopolysaccharide priming boosts inflammasome activation independently of inflammasome sensor induction. Immunobiology *217*, 1325–1329.
Scotet, E., Martinez, L.O., Grant, E., Barbaras, R., Jenö, P., Guiraud, M., Monsarrat, B., Saulquin, X., Maillet, S., Estève, J.-P., et al. (2005). Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. Immunity *22*, 71–80.
Sebestyen, Z., Prinz, I., Déchanet-Merville, J., Silva-Santos, B., and Kuball, J. (2019). Translating gammadelta (γδ) T cells and their receptors into cancer cell therapies. Nat. Rev. Drug Discov.
Sellin, M.E., Müller, A.A., Felmy, B., Dolowschiak, T., Diard, M., Tardivel, A., Maslowski, K.M., and Hardt, W.-D. (2014). Epithelium-intrinsic NAIP/NLRC4 inflammasome drives infected enterocyte expulsion to restrict Salmonella replication in the intestinal mucosa. Cell Host Microbe *16*, 237–248.
Semenza, G.L. (2009). Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Physiol. Bethesda Md *24*, 97–106.
Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell *148*, 399–408.
Semino, C., Carta, S., Gattorno, M., Sitia, R., and Rubartelli, A. (2018). Progressive waves of IL-1β release by primary human monocytes via sequential activation of vesicular and gasdermin D-mediated secretory pathways. Cell Death Dis. *9*, 1088.
Serre, K., and Silva-Santos, B. (2013). Molecular Mechanisms of Differentiation of Murine Pro-Inflammatory γδ T Cell Subsets. Front. Immunol. *4*.
Sharma, M.D., Shinde, R., McGaha, T.L., Huang, L., Holmgaard, R.B., Wolchok, J.D., Mautino, M.R., Celis, E., Sharpe, A.H., Francisco, L.M., et al. (2015). The PTEN pathway in Tregs is a critical driver of the suppressive tumor microenvironment. Sci. Adv. *1*, e1500845.
Sheets, A.R., Fülöp, P., Derdák, Z., Kassai, A., Sabo, E., Mark, N.M., Paragh, G., Wands, J.R., and Baffy, G. (2008). Uncoupling protein-2 modulates the lipid metabolic response to fasting in mice. Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol. *294*, G1017–G1024.
Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L., and Shao, F. (2014). Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. Nature *514*, 187–192.
Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., and Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. Nature *526*, 660–665.
Shi, L.Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R., and Chi, H. (2011). HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. J. Exp. Med. *208*, 1367–1376.
Shiels, M.S., Cole, S.R., Kirk, G.D., and Poole, C. (2009). A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. 1999 *52*, 611–622.
Shime, H., Yabu, M., Akazawa, T., Kodama, K., Matsumoto, M., Seya, T., and Inoue, N. (2008). Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 7175–7183.

Shio, M.T., Tiemi Shio, M., Eisenbarth, S.C., Savaria, M., Vinet, A.F., Bellemare, M.-J., Harder, K.W., Sutterwala, F.S., Bohle, D.S., Descoteaux, A., et al. (2009). Malarial hemozoin activates the NLRP3 inflammasome through Lyn and Syk kinases. PLoS Pathog. *5*, e1000559.
Shitara, S., Hara, T., Liang, B., Wagatsuma, K., Zuklys, S., Holländer, G.A., Nakase, H., Chiba, T., Tani-ichi, S., and Ikuta, K. (2013). IL-7 produced by thymic epithelial cells plays a major role in the development of thymocytes and TCRγδ+ intraepithelial lymphocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *190*, 6173–6179.
Siegers, G.M., and Lamb, L.S. (2014). Cytotoxic and regulatory properties of circulating Vδ1+ γδ T cells: a new player on the cell therapy field? Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther. *22*, 1416–1422.
Siegmund, B., Fantuzzi, G., Rieder, F., Gamboni-Robertson, F., Lehr, H.A., Hartmann, G., Dinarello, C.A., Endres, S., and Eigler, A. (2001). Neutralization of interleukin-18 reduces severity in murine colitis and intestinal IFN-gamma and TNF-alpha production. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. *281*, R1264-1273.
Silva-Santos, B., Serre, K., and Norell, H. (2015). γδ T cells in cancer. Nat. Rev. Immunol. *15*, 683–691.
Sinclair, L.V., Rolf, J., Emslie, E., Shi, Y.-B., Taylor, P.M., and Cantrell, D.A. (2013). Control of amino-acid transport by antigen receptors coordinates the metabolic reprogramming essential for T cell differentiation. Nat. Immunol. *14*, 500–508.
Sivakumar, P.V., Westrich, G.M., Kanaly, S., Garka, K., Born, T.L., Derry, J.M.J., and Viney, J.L. (2002). Interleukin 18 is a primary mediator of the inflammation associated with dextran sulphate sodium induced colitis: blocking interleukin 18 attenuates intestinal damage. Gut *50*, 812–820.
Smith, C., Chang, M.Y., Parker, K.H., Beury, D.W., DuHadaway, J.B., Flick, H.E., Boulden, J., Sutanto-Ward, E., Soler, A.P., Laury-Kleintop, L.D., et al. (2012). IDO Is a Nodal Pathogenic Driver of Lung Cancer and Metastasis Development. Cancer Discov. *2*, 722–735.
Smith-Garvin, J.E., Koretzky, G.A., and Jordan, M.S. (2009). T cell activation. Annu. Rev. Immunol. *27*, 591–619.
Song, X., Krelin, Y., Dvorkin, T., Bjorkdahl, O., Segal, S., Dinarello, C.A., Voronov, E., and Apte, R.N. (2005). CD11b+/Gr-1+ immature myeloid cells mediate suppression of T cells in mice bearing tumors of IL-1beta-secreting cells. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *175*, 8200–8208.
Sonohara, F., Inokawa, Y., Kanda, M., Nishikawa, Y., Yamada, S., Fujii, T., Sugimoto, H., Kodera, Y., and Nomoto, S. (2017). Association of Inflammasome Components in Background Liver with Poor Prognosis After Curatively-resected Hepatocellular Carcinoma. Anticancer Res. *37*, 293–300.
Sorrentino, R., Terlizzi, M., Di Crescenzo, V.G., Popolo, A., Pecoraro, M., Perillo, G., Galderisi, A., and Pinto, A. (2015). Human lung cancer-derived immunosuppressive plasmacytoid dendritic cells release IL-1α in an AIM2 inflammasome-dependent manner. Am. J. Pathol. *185*, 3115–3124.
Spada, F.M., Grant, E.P., Peters, P.J., Sugita, M., Melián, A., Leslie, D.S., Lee, H.K., van Donselaar, E., Hanson, D.A., Krensky, A.M., et al. (2000). Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. J. Exp. Med. *191*, 937–948.
Spranger, S., Spaapen, R.M., Zha, Y., Williams, J., Meng, Y., Ha, T.T., and Gajewski, T.F. (2013). Up-regulation of PD-L1, IDO, and T(regs) in the melanoma tumor microenvironment is driven by CD8(+) T cells. Sci. Transl. Med. *5*, 200ra116.
Srinivasula, S.M., Poyet, J.-L., Razmara, M., Datta, P., Zhang, Z., and Alnemri, E.S. (2002). The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1. J. Biol. Chem. *277*, 21119–21122.
Stanic, A.K., Park, J.-J., and Joyce, S. (2003). Innate self recognition by an invariant, rearranged T-cell receptor and its immune consequences. Immunology *109*, 171–184.
Su, S., Zhao, J., Xing, Y., Zhang, X., Liu, J., Ouyang, Q., Chen, J., Su, F., Liu, Q., and Song, E. (2018). Immune Checkpoint Inhibition Overcomes ADCP-Induced Immunosuppression by Macrophages. Cell *175*, 442-457.e23.
Sutton, C.E., Mielke, L.A., and Mills, K.H.G. (2012). IL-17-producing γδ T cells and innate lymphoid cells. Eur. J. Immunol. *42*, 2221–2231.
Suzuki, T., Terao, S., Acharya, B., Naoe, M., Yamamoto, S., Okamura, H., and Gotoh, A. (2010). The antitumour effect of {gamma}{delta} T-cells is enhanced by valproic acid-induced up-regulation of NKG2D ligands. Anticancer Res. *30*, 4509–4513.
Takagaki, Y., DeCloux, A., Bonneville, M., and Tonegawa, S. (1989). Diversity of gamma delta T-cell receptors on murine intestinal intra-epithelial lymphocytes. Nature *339*, 712–714.
Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. Cell *140*, 805–820.
Tan, J.T., Dudl, E., LeRoy, E., Murray, R., Sprent, J., Weinberg, K.I., and Surh, C.D. (2001). IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 8732–8737.
Tandon, P., Gallo, C.A., Khatri, S., Barger, J.F., Yepiskoposyan, H., and Plas, D.R. (2011). Requirement for ribosomal protein S6 kinase 1 to mediate glycolysis and apoptosis resistance induced by Pten deficiency. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 2361–2365.
Tarassishin, L., Casper, D., and Lee, S.C. (2014). Aberrant expression of interleukin-1β and inflammasome activation in human malignant gliomas. PloS One *9*, e103432.

Teng, M.W.L., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. J. Leukoc. Biol. *84*, 988–993.
Teng, M.W.L., Ngiow, S.F., Ribas, A., and Smyth, M.J. (2015). Classifying Cancers Based on T-cell Infiltration and PD-L1. Cancer Res. *75*, 2139–2145.
Terlizzi, M., Colarusso, C., Popolo, A., Pinto, A., and Sorrentino, R. (2016). IL-1α and IL-1β-producing macrophages populate lung tumor lesions in mice. Oncotarget *7*, 58181–58192.
Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., et al. (2011). IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. Cancer Res. *71*, 5393–5399.
Théate, I., van Baren, N., Pilotte, L., Moulin, P., Larrieu, P., Renauld, J.-C., Hervé, C., Gutierrez-Roelens, I., Marbaix, E., Sempoux, C., et al. (2015). Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. Cancer Immunol. Res. *3*, 161–172.
Thedrez, A., Harly, C., Morice, A., Salot, S., Bonneville, M., and Scotet, E. (2009). IL-21-mediated potentiation of antitumor cytolytic and proinflammatory responses of human V gamma 9V delta 2 T cells for adoptive immunotherapy. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *182*, 3423–3431.
Tie, G., Yan, J., Khair, L., Messina, J.A., Deng, A., Kang, J., Fazzio, T., and Messina, L.M. (2017). Hypercholesterolemia Increases Colorectal Cancer Incidence by Reducing Production of NKT and γδ T Cells from Hematopoietic Stem Cells. Cancer Res. *77*, 2351–2362.
Tosolini, M., Pont, F., Poupot, M., Vergez, F., Nicolau-Travers, M.-L., Vermijlen, D., Sarry, J.-E., Dieli, F., and Fournié, J.-J. (2017). Assessment of tumor-infiltrating TCRVγ9Vδ2 γδ lymphocyte abundance by deconvolution of human cancers microarrays. Oncoimmunology *6*, e1284723.
Toutirais, O., Cabillic, F., Le Friec, G., Salot, S., Loyer, P., Le Gallo, M., Desille, M., de La Pintière, C.T., Daniel, P., Bouet, F., et al. (2009). DNAX accessory molecule-1 (CD226) promotes human hepatocellular carcinoma cell lysis by Vgamma9Vdelta2 T cells. Eur. J. Immunol. *39*, 1361–1368.
Tyrakis, P.A., Palazon, A., Macias, D., Lee, K.L., Phan, A.T., Veliça, P., You, J., Chia, G.S., Sim, J., Doedens, A., et al. (2016). S-2-hydroxyglutarate regulates CD8(+) T-lymphocyte fate. Nature *540*, 236–241.
Uldrich, A.P., Le Nours, J., Pellicci, D.G., Gherardin, N.A., McPherson, K.G., Lim, R.T., Patel, O., Beddoe, T., Gras, S., Rossjohn, J., et al. (2013). CD1d-lipid antigen recognition by the γδ TCR. Nat. Immunol. *14*, 1137–1145.
Vajjhala, P.R., Lu, A., Brown, D.L., Pang, S.W., Sagulenko, V., Sester, D.P., Cridland, S.O., Hill, J.M., Schroder, K., Stow, J.L., et al. (2015). The Inflammasome Adaptor ASC Induces Procaspase-8 Death Effector Domain Filaments. J. Biol. Chem. *290*, 29217–29230.
Valle, A., Oliver, J., and Roca, P. (2010). Role of Uncoupling Proteins in Cancer. Cancers *2*, 567–591.
Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology. Nat. Rev. Immunol. *13*, 88–100.
Vats, D., Mukundan, L., Odegaard, J.I., Zhang, L., Smith, K.L., Morel, C.R., Wagner, R.A., Greaves, D.R., Murray, P.J., and Chawla, A. (2006). Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. Cell Metab. *4*, 13–24.
Végran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., and Feron, O. (2011). Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-κB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. Cancer Res. *71*, 2550–2560.
Verma, D., Bivik, C., Farahani, E., Synnerstad, I., Fredrikson, M., Enerbäck, C., Rosdahl, I., and Söderkvist, P. (2012). Inflammasome polymorphisms confer susceptibility to sporadic malignant melanoma. Pigment Cell Melanoma Res. *25*, 506–513.
Vermijlen, D., Ellis, P., Langford, C., Klein, A., Engel, R., Willimann, K., Jomaa, H., Hayday, A.C., and Eberl, M. (2007). Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *178*, 4304–4314.
Vidal-Vanaclocha, F., Amézaga, C., Asumendi, A., Kaplanski, G., and Dinarello, C.A. (1994). Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastases. Cancer Res. *54*, 2667–2672.
Vidal-Vanaclocha, F., Fantuzzi, G., Mendoza, L., Fuentes, A.M., Anasagasti, M.J., Martín, J., Carrascal, T., Walsh, P., Reznikov, L.L., Kim, S.H., et al. (2000). IL-18 regulates IL-1beta-dependent hepatic melanoma metastasis via vascular cell adhesion molecule-1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *97*, 734–739.
Voigt, C., May, P., Gottschlich, A., Markota, A., Wenk, D., Gerlach, I., Voigt, S., Stathopoulos, G.T., Arendt, K.A.M., Heise, C., et al. (2017). Cancer cells induce interleukin-22 production from memory CD4+ T cells via interleukin-1 to promote tumor growth. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *114*, 12994–12999.
Voronov, E., Shouval, D.S., Krelin, Y., Cagnano, E., Benharroch, D., Iwakura, Y., Dinarello, C.A., and Apte, R.N. (2003). IL-1 is required for tumor invasiveness and angiogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. *100*, 2645–2650.
Wakita, D., Sumida, K., Iwakura, Y., Nishikawa, H., Ohkuri, T., Chamoto, K., Kitamura, H., and Nishimura, T. (2010). Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. Eur. J. Immunol. *40*, 1927–1937.

Wang, G.L., and Semenza, G.L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J. Biol. Chem. *270*, 1230–1237.
Wang, H., Henry, O., Distefano, M.D., Wang, Y.-C., Räikkönen, J., Mönkkönen, J., Tanaka, Y., and Morita, C.T. (2013). Butyrophilin 3A1 Plays an Essential Role in Prenyl Pyrophosphate Stimulation of Human Vγ2Vδ2 T Cells. J. Immunol. 1300658.
Wang, H., Wang, Y., Du, Q., Lu, P., Fan, H., Lu, J., and Hu, R. (2016a). Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. Exp. Cell Res. *342*, 184–192.
Wang, H., Luo, Q., Feng, X., Zhang, R., Li, J., and Chen, F. (2018). NLRP3 promotes tumor growth and metastasis in human oral squamous cell carcinoma. BMC Cancer *18*, 500.
Wang, R., Dillon, C.P., Shi, L.Z., Milasta, S., Carter, R., Finkelstein, D., McCormick, L.L., Fitzgerald, P., Chi, H., Munger, J., et al. (2011). The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. Immunity *35*, 871–882.
Wang, X.-F., Wang, H.-S., Wang, H., Zhang, F., Wang, K.-F., Guo, Q., Zhang, G., Cai, S.-H., and Du, J. (2014). The role of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in immune tolerance: focus on macrophage polarization of THP-1 cells. Cell. Immunol. *289*, 42–48.
Wang, Y., Wang, Y., Kong, H., Kong, H., Zeng, X., Zeng, X., Liu, W., Liu, W., Wang, Z., Wang, Z., et al. (2016b). Activation of NLRP3 inflammasome enhances the proliferation and migration of A549 lung cancer cells. Oncol. Rep. *35*, 2053–2064.
Warburg, O. (1956). On the origin of cancer cells. Science *123*, 309–314.
Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. Am. J. Pathol. *174*, 1149–1153.
Waugh, D.J.J., and Wilson, C. (2008). The interleukin-8 pathway in cancer. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 6735–6741.
Weber, A., Wasiliew, P., and Kracht, M. (2010). Interleukin-1 (IL-1) pathway. Sci. Signal. *3*, cm1.
Wei, Q., Mu, K., Li, T., Zhang, Y., Yang, Z., Jia, X., Zhao, W., Huai, W., Guo, P., and Han, L. (2014). Deregulation of the NLRP3 inflammasome in hepatic parenchymal cells during liver cancer progression. Lab. Invest. *94*, 52–62.
Wencker, M., Turchinovich, G., Di Marco Barros, R., Deban, L., Jandke, A., Cope, A., and Hayday, A.C. (2014). Innate-like T cells straddle innate and adaptive immunity by altering antigen-receptor responsiveness. Nat. Immunol. *15*, 80–87.
Westbom, C., Thompson, J.K., Leggett, A., MacPherson, M., Beuschel, S., Pass, H., Vacek, P., and Shukla, A. (2015). Inflammasome Modulation by Chemotherapeutics in Malignant Mesothelioma. PloS One *10*, e0145404.
Wiemann, B., and Starnes, C.O. (1994). Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. Pharmacol. Ther. *64*, 529–564.
Wilhelm, M., Kunzmann, V., Eckstein, S., Reimer, P., Weissinger, F., Ruediger, T., and Tony, H.-P. (2003). Gammadelta T cells for immune therapy of patients with lymphoid malignancies. Blood *102*, 200–206.
Willcox, C.R., Pitard, V., Netzer, S., Couzi, L., Salim, M., Silberzahn, T., Moreau, J.-F., Hayday, A.C., Willcox, B.E., and Déchanet-Merville, J. (2012). Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human γδ T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor. Nat. Immunol. *13*, 872–879.
Williams, T.M., Leeth, R.A., Rothschild, D.E., Coutermarsh-Ott, S.L., McDaniel, D.K., Simmons, A.E., Heid, B., Cecere, T.E., and Allen, I.C. (2015). The NLRP1 Inflammasome Attenuates Colitis and Colitis-Associated Tumorigenesis. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *194*, 3369–3380.
Wilson, J.E., Petrucelli, A.S., Chen, L., Koblansky, A.A., Truax, A.D., Oyama, Y., Rogers, A.B., Brickey, W.J., Wang, Y., Schneider, M., et al. (2015). Inflammasome-independent role of AIM2 in suppressing colon tumorigenesis via DNA-PK and Akt. Nat. Med. *21*, 906–913.
Wlodarska, M., Thaiss, C.A., Nowarski, R., Henao-Mejia, J., Zhang, J.-P., Brown, E.M., Frankel, G., Levy, M., Katz, M.N., Philbrick, W.M., et al. (2014). NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. Cell *156*, 1045–1059.
Wu, D., Wu, P., Qiu, F., Wei, Q., and Huang, J. (2017). Human γδT-cell subsets and their involvement in tumor immunity. Cell. Mol. Immunol. *14*, 245–253.
Wu, P., Wu, D., Ni, C., Ye, J., Chen, W., Hu, G., Wang, Z., Wang, C., Zhang, Z., Xia, W., et al. (2014a). γδT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. Immunity *40*, 785–800.
Wu, Y.-L., Ding, Y.-P., Tanaka, Y., Shen, L.-W., Wei, C.-H., Minato, N., and Zhang, W. (2014b). γδ T cells and their potential for immunotherapy. Int. J. Biol. Sci. *10*, 119–135.
Xu, B., Pizarro, J.C., Holmes, M.A., McBeth, C., Groh, V., Spies, T., and Strong, R.K. (2011). Crystal structure of a gammadelta T-cell receptor specific for the human MHC class I homolog MICA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *108*, 2414–2419.
Yang, J., and Weinberg, R.A. (2008). Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. Dev. Cell *14*, 818–829.

Yang, B., Kang, H., Fung, A., Zhao, H., Wang, T., and Ma, D. (2014). The Role of Interleukin 17 in Tumour Proliferation, Angiogenesis, and Metastasis. Mediators Inflamm. *2014*.
Yang, K., Neale, G., Green, D.R., He, W., and Chi, H. (2011). The tumor suppressor Tsc1 enforces quiescence of naive T cells to promote immune homeostasis and function. Nat. Immunol. *12*, 888–897.
Yang, M., Ma, C., Liu, S., Shao, Q., Gao, W., Song, B., Sun, J., Xie, Q., Zhang, Y., Feng, A., et al. (2010). HIF-dependent induction of adenosine receptor A2b skews human dendritic cells to a Th2-stimulating phenotype under hypoxia. Immunol. Cell Biol. *88*, 165–171.
Yang, S., Wang, B., Humphries, F., Jackson, R., Healy, M.E., Bergin, R., Aviello, G., Hall, B., McNamara, D., Darby, T., et al. (2013). Pellino3 ubiquitinates RIP2 and mediates Nod2-induced signaling and protective effects in colitis. Nat. Immunol. *14*, 927–936.
Yang, Y., Cheon, S., Jung, M.K., Song, S.B., Kim, D., Kim, H.J., Park, H., Bang, S.I., and Cho, D. (2015). Interleukin-18 enhances breast cancer cell migration via down-regulation of claudin-12 and induction of the p38 MAPK pathway. Biochem. Biophys. Res. Commun. *459*, 379–386.
Ye, J., Ma, C., Wang, F., Hsueh, E.C., Toth, K., Huang, Y., Mo, W., Liu, S., Han, B., Varvares, M.A., et al. (2013a). Specific Recruitment of γδ Regulatory T Cells in Human Breast Cancer. Cancer Res. *73*, 6137–6148.
Ye, J., Ma, C., Hsueh, E.C., Eickhoff, C.S., Zhang, Y., Varvares, M.A., Hoft, D.F., and Peng, G. (2013b). Tumor-derived γδ regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *190*, 2403–2414.
Yin, X.-F., Zhang, Q., Chen, Z.-Y., Wang, H.-F., Li, X., Wang, H.-X., Li, H.-X., Kang, C.-M., Chu, S., Li, K.-F., et al. (2018). NLRP3 in human glioma is correlated with increased WHO grade, and regulates cellular proliferation, apoptosis and metastasis via epithelial-mesenchymal transition and the PTEN/AKT signaling pathway. Int. J. Oncol. *53*, 973–986.
Yu, J., Du, W., Yan, F., Wang, Y., Li, H., Cao, S., Yu, W., Shen, C., Liu, J., and Ren, X. (2013). Myeloid-derived suppressor cells suppress antitumor immune responses through IDO expression and correlate with lymph node metastasis in patients with breast cancer. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *190*, 3783–3797.
Zaki, M.H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010a). IL-18 production downstream of the Nlrp3 inflammasome confers protection against colorectal tumor formation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *185*, 4912–4920.
Zaki, M.H., Boyd, K.L., Vogel, P., Kastan, M.B., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2010b). The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. Immunity *32*, 379–391.
Zaki, M.H., Vogel, P., Malireddi, R.K.S., Body-Malapel, M., Anand, P.K., Bertin, J., Green, D.R., Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.-D. (2011). The NOD-like receptor NLRP12 attenuates colon inflammation and tumorigenesis. Cancer Cell *20*, 649–660.
Zambrano, A., Jara, E., Murgas, P., Jara, C., Castro, M.A., Angulo, C., and Concha, I.I. (2010). Cytokine stimulation promotes increased glucose uptake via translocation at the plasma membrane of GLUT1 in HEK293 cells. J. Cell. Biochem. *110*, 1471–1480.
Zeng, H., Yang, K., Cloer, C., Neale, G., Vogel, P., and Chi, H. (2013). mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. Nature *499*, 485–490.
Zhai, L., Spranger, S., Binder, D.C., Gritsina, G., Lauing, K.L., Giles, F.J., and Wainwright, D.A. (2015). Molecular Pathways: Targeting IDO1 and Other Tryptophan Dioxygenases for Cancer Immunotherapy. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *21*, 5427–5433.
Zhang, L., Chen, S., Ruan, J., Wu, J., Tong, A.B., Yin, Q., Li, Y., David, L., Lu, A., Wang, W.L., et al. (2015). Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. Science *350*, 404–409.
Zhang, L., Li, H., Zang, Y., and Wang, F. (2019). NLRP3 inflammasome inactivation driven by miR-223-3p reduces tumor growth and increases anticancer immunity in breast cancer. Mol. Med. Rep. *19*, 2180–2188.
Zhao, Y., and Shao, F. (2015). The NAIP-NLRC4 inflammasome in innate immune detection of bacterial flagellin and type III secretion apparatus. Immunol. Rev. *265*, 85–102.
Zheng, B., Marinova, E., Han, J., Tan, T.-H., and Han, S. (2003). Cutting edge: gamma delta T cells provide help to B cells with altered clonotypes and are capable of inducing Ig gene hypermutation. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *171*, 4979–4983.
Zhong, F.L., Mamaï, O., Sborgi, L., Boussofara, L., Hopkins, R., Robinson, K., Szeverényi, I., Takeichi, T., Balaji, R., Lau, A., et al. (2016). Germline NLRP1 Mutations Cause Skin Inflammatory and Cancer Susceptibility Syndromes via Inflammasome Activation. Cell *167*, 187-202.e17.
Zhou, R., Tardivel, A., Thorens, B., Choi, I., and Tschopp, J. (2010). Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. Nat. Immunol. *11*, 136–140.
Zhu, Y., Zhu, M., and Lance, P. (2012). IL1β-mediated Stromal COX-2 signaling mediates proliferation and invasiveness of colonic epithelial cancer cells. Exp. Cell Res. *318*, 2520–2530.

RESUME

Les lymphocytes T gamma delta sont des sentinelles des barrières épithéliales qui jouent un rôle majeur dans la défense contre les agressions. Dans le cancer, elles participent à l'immunosurveillance et leur présence au sein du stroma tumoral constitue le principal facteur pronostic positif. Il s'agit donc d'une population qui pourrait constituer une cible thérapeutique privilégiée en oncoimmunologie. La fonction des LT γδ est finement régulée par un ensemble de cytokines et en particulier par l'interleukine 18 (IL-18). L'IL-18 est une cytokine proinflammatoire correspondant à l'un des plus puissants stimulateurs solubles des LT γδ, impliquée dans l'homéostasie tissulaire au niveau des barrières épithéliales. Elle est sécrétée grâce à l'activation de l'inflammasome, complexe cytosolique composé de Nod-Like Receptors (NLRs). Néanmoins, in vitro, certaines lignées cancéreuses n'en sécrètent plus, probablement du fait de la perte d'expression des constituants de l'inflammasome.

Nous avons donc voulu évaluer l'expression protéique *in vivo* des constituants des inflammasomes, et leur impact pronostic en clinique. L'expression protéique a été analysée dans 104 tumeurs colorectales appariées aux tissus sains, par immunofluorescence sur un tissue micro-array (TMA). Un comarquage de la cytokératine a été effectué pour évaluer l'expression de ces composants spécifiquement dans les cellules épithéliales, qu'elles soient tumorales ou saines. Nos résultats ont montré une diminution de l'expression de l'ensemble des constituants de l'inflammasome dans l'épithélium des tissus tumoraux, ainsi que de la caspase-1 et des interleukines. Néanmoins, seules les pertes d'expression de NLRC4, de NLRP6 ou de l'IL-18 étaient associées à une maladie plus avancée ainsi qu'à la mortalité des patients. De plus, la perte combinée de ces 3 marqueurs était associée à un pronostic encore plus mauvais. Ainsi, seulement 22.2% des patients $NLRC4^{bas}/NLRP6^{bas}/IL\text{-}18^{bas}$ étaient encore vivants à 5 ans contre 85.2% pour les patients $NLRC4^{haut}/NLRP6^{haut}/IL\text{-}18^{haut}$. De plus, la perte d'expression de NLRC4 et de l'IL-18 semblait corrélée à une diminution plus importante de l'infiltrat en cellules immunitaires et en particulier en lymphocytes T $CD3^{+}$. Nous avons également montré grâce à un modèle in vitro que la réexpression de NLRC4 était associée à une diminution de la prolifération des cellules tumorales coliques métastatiques. Enfin, en trancriptomique, cette réexpression de NLRC4 induisait l'expression de médiateurs de la voie de l'interféron de type I. Dans l'ensemble, ces résultats montrent que la perte d'expression protéique de NLRC4, NLRP6 et IL-18 par la tumeur pourrait constituer un mécanisme de résistance à l'immunité antitumorale et semblerait être un facteur pronostic majeur.

Dans un second temps, nous avons étudié la régulation des LT γδ par des molécules solubles non cytokiniques, dépendantes du métabolisme tumorale. Ainsi, nous avons montré que l'activation de l'AMPK dans les cellules cancéreuses de côlon permettait d'augmenter l'expression d'un antigène de stress appelé EphA2 reconnu par les LT γδ humains. De plus, l'induction *in vitro* de l'activation de l'AMPK permettait la sécrétion de petits peptides qui modulent la réponse immunitaire. Ainsi, par une série de chromatographies sur les surnageants de cellules tumorales reprogrammées, nous avons pu identifier un peptide capable d'inhiber l'activation des LB *in vitro*. Nous tentons actuellement d'identifier d'autres cibles immunitaires, mais également d'identifier les mécanismes qui induisent cet effet.

Ces 2 axes constituent autant de cibles potentielles en thérapeutiques anticancéreuse, seules ou en association avec les chimiothérapies ou avec les immunothérapies actuelles. Ceci pourrait ainsi permettre d'améliorer les réponses observées dans les cancers.

Mots clés : cancer, inflammasome, métabolisme, régulation, lymphocytes T gamma delta

ABSTRACT

Immunometabolic mechanisms involved in human gamma delta T cell activation in cancer

Gamma delta (γδ) T cells are sentinels of the intestinal barrier, protecting the host from aggressions. In cancer, they have a crucial role in immunosurveillance and the stromal infiltration of γδ T cells is the more important prognostic factor among all immune cells. Indeed, this population could be an interesting therapeutic target in oncoimmunology. The activation of γδ T cells is tightly regulated by several cytokines and especially interleukin-18 (IL-18). IL-18 is a proinflammatory cytokine corresponding to the most powerful soluble activator of γδ T cells, involved in tissue homeostasis in the epithelial barriers. It is secreted through the activation of the inflammasome, a cytosolic complex consisting in Nod-Like Receptors (NLRs). However, *in vitro*, some cancer cell lines do not secrete IL-18, probably due to a loss of expression and/or activation of inflammasome components.

We have assessed the protein expression *in vivo* of inflammasome components, and their correlation with clinical outcome of colorectal cancer patients. The expression was evaluated in 104 colorectal tumours, matched with normal tissue for each patient, through an immunofluorescence assay on a tissue micro-array (TMA). We also performed a cytokeratin staining to assess the expression of each components specifically in epithelial cells from tumour or normal tissue. We showed a decreased expression of all inflammasome components, including caspase-1 and cytokines, in the tumour epithelium compared to normal tissue. However, only the expressions of NLRC4, NLRP6 or IL-18 were associated to a more aggressive disease and to a worse outcome. Furthermore, combined downregulation of these 3 components was correlated to a poor prognosis. Indeed, only 22.2% of patients $NLRC4^{low}/NLRP6^{low}/IL\text{-}18^{low}$ were still alive after 5 years, versus 85.2% for $NLRC4^{high}/NLRP6^{high}/IL\text{-}18^{high}$ patients. Furthermore, the downregulation of NLRC4 and IL-18 was associated with a decreased immune infiltration especially for CD3 positive T cells. We also showed *in vitro* that NLRC4 reexpression was associated to a decreased proliferation of metastatic colon cancer cell line. Finally, at a transcriptomic level, the expression of NLRC4 in these cell lines was correlated to an interferon type I signature. All these results show that the downregulation of NLRC4, NLRP6 and IL-18 by tumour cells could constitute a resistance mechanism to the antitumor immune response and seems to be an important prognostic factor.

The activation of γδ T cells could also been regulated by molecules that are not cytokines, depending on tumour metabolism. Indeed, we showed that the activation of AMPK in colon cancer cell lines induced the expression of the stress antigen receptor EphA2, recognised by human γδ T lymphocytes. Furthermore, the *in vitro* induction of AMPK activation favoured the released of small soluble molecules that modulate the immune response. Indeed, after several chromatography of the supernatant from reprogrammed cancer cell lines, we have identified a peptide that is able to inhibit the activation of B cells in an *in vitro* model. We are trying to identify the mechanisms underlying this inhibition.

In conclusion, we have identify potential therapeutic targets in cancer treatment, alone or in association with chemotherapies and/or immunotherapies. This could help to improve antitumor immune response and patient outcomes.

Keywords : Cancer,Human gamma delta T cell,Metabolism,Inflammasome,Regulation