



HAL
open science

Facteurs essentiels pour le succès des chimiothérapies immunogènes

Sandy Adjemian

► **To cite this version:**

Sandy Adjemian. Facteurs essentiels pour le succès des chimiothérapies immunogènes. Immunologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T090 . tel-01124067

HAL Id: tel-01124067

<https://theses.hal.science/tel-01124067v1>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE PARIS XI
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Champ disciplinaire : Immunologie

Ecole doctorale de rattachement : Cancérologie, Biologie, Médecine, Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Sandy ADJEMIAN

Le 18 décembre 2012

**FACTEURS ESSENTIELS POUR LE SUCCES DES
CHIMIOETHERAPIES IMMUNOGENES**

Directeur de thèse

Pr. Guido KROEMER

Président du jury

Pr. Franck PAGES

Rapporteur

Dr. Jean-Luc TEILLAUD

Rapporteur

Pr. José COHEN

Examineur

Dr. Jérôme GALON

Examineur

Pr. Pierre GALANAUD

REMERCIEMENTS

Je souhaite tout d'abord remercier le professeur Guido Kroemer, mon directeur de thèse, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, et m'avoir supervisé tout au long de ces trois années. Sa bonne humeur, sa disponibilité et ses conseils avisés m'ont permis d'avancer rapidement et dans de bonnes conditions. Je suis ravie d'avoir intégré son laboratoire et d'avoir eu l'opportunité de travailler avec ce chercheur exceptionnel.

Je remercie également les membres de mon jury de thèse :

Le professeur Franck Pagès pour avoir accepté de présider ce jury.

Le docteur Jean-Luc Teillaud ainsi que le professeur José Cohen d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. J'ai conscience du temps et de l'investissement que cela représente. Je remercie les professeurs Jérôme Galon et Pierre Galanaud pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Un immense merci à Isabelle et Shensi qui m'ont supporté pendant presque trois ans dans le même bureau et labo (et parfois même sur la même paillasse !). Merci pour votre aide de tous les jours, je garde de très bons souvenirs de tous les moments passés ensemble! Heureusement que vous étiez là!

Merci également aux autres membres de l'équipe immuno, Yuting, Mickaël, Laurie, Abdul, Oliver, Erika, Yidan, Fred, ce fut un plaisir de travailler avec vous.

Yuting et Mickaël merci pour votre aide, pour les discussions qu'on a pu avoir et votre disponibilité. Laurie, Abdul, Erika et Yidan, merci pour votre solidarité et entraide entre thésards, on a finalement passé du bon temps ensemble !

Je remercie aussi les autres membres du labo avec qui je n'ai pas forcément travaillé, mais avec qui je me suis liée d'amitié, ma grande copine Marie, Sylvie, la reine des gâteaux au chocolat, notre super secrétaire Lynda, Chiara, Santi que je n'oublie pas, Didier, ainsi que Laura, Raza, Shoaib, Mireia, Guillermo, Laurent, Audrey, Claire Séror, Elodie, Fédé, Rocco, Lorenzo, Judith, Delphine, David, Max.

Merci aussi aux titulaires du labo, pour leur gentillesse et disponibilité et grâce à qui j'ai beaucoup appris : Maria, Jean-Luc, Nazanine, Aména, Naoufal.

Je retiendrai beaucoup de choses de ces trois années, parmi lesquelles la bonne humeur, la gentillesse et la disponibilité des gens, les pots réguliers, les summer/winter/spring party, les petit-déj du mercredi matin... Je suis vraiment heureuse d'avoir connu et partagé ces moments avec vous tous, grâce à vous j'ai passé trois années inoubliables !

Je dédie cette thèse à ma famille :

A mon père et ma mère qui ont toujours été là pour moi, pour leur aide morale et financière, leur soutien et leurs encouragements.

A ma belle-mère Joce, qui depuis qu'elle est entrée dans ma vie a toujours été un exemple pour moi, et car c'est aussi grâce à elle que j'en suis là aujourd'hui. Elle m'a aidé à trouver ma voie et m'a aussi soutenue et encouragée.

A mes sœurs et mon frère adorés : Jessy, Laurie, Lévon et Eléa.

Enfin à mon mari, João Paulo, qui a aussi été là pour moi durant ces trois années, dont une année merveilleuse où nous avons eu la chance de travailler ensemble. Merci pour ton aide immense et ton soutien.

RESUME

La plupart des chimiothérapies sont connues pour exercer une immunosuppression en plus de leur effet cytotoxique, car elles ciblent sans distinction les cellules à prolifération rapide telles que les cellules tumorales ainsi que les cellules du système immunitaire. Cependant, la radiothérapie ainsi que certaines chimiothérapies comme les anthracyclines ou l'oxaliplatine ont montré une propriété immunostimulante, grâce à l'induction d'une mort cellulaire dite immunogène. Cette mort cellulaire se caractérise par la libération de signaux de danger par la cellule mourante qui vont activer le système immunitaire. Tout d'abord, l'exposition de la calréticuline à la surface de la cellule va être un signal de phagocytose pour les cellules dendritiques. Les cellules succombant à la mort cellulaire libèrent aussi HMGB1 qui en se liant à TLR4 permet un apprêtement et une présentation des antigènes tumoraux efficace. Ensuite, la libération d'ATP qui agit sur les récepteurs P2RX7 permet l'activation de l'inflammasome NLRP3 et conduit à la sécrétion d'IL-1 β indispensable pour l'activation des lymphocytes T CD8⁺ sécrétant de l'IFN- γ .

L'autophagie est un processus de dégradation permettant de limiter l'instabilité génomique et l'initiation de cancers. L'autophagie, peut être induite après un stress du réticulum endoplasmique, qui est nécessaire à l'exposition de la calréticuline lors de la mort cellulaire immunogène. Nous avons donc cherché à évaluer l'importance de l'autophagie après traitement aux chimiothérapies immunogènes. Nous avons montré que l'autophagie est requise pour induire la libération d'ATP lors de la mort cellulaire immunogène. De plus, nous avons montré que l'ATP libéré par les cellules mourantes après traitement aux chimiothérapies immunogènes permet le recrutement de cellules de type monocyte inflammatoire (CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻) ainsi que de leurs précurseurs. En outre, l'ATP est un facteur important dans la différenciation de ces cellules en cellules dendritiques inflammatoires. Les cellules CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ ont montré une grande capacité à présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8⁺ permettant leur activation. Les cellules déficientes pour l'autophagie n'ont quant à elles pas permis le recrutement de cellules dendritiques dans les tumeurs ni l'activation de lymphocytes T CD8⁺.

Ces travaux ont permis de montrer l'importance de l'autophagie pour mettre en place une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique lors du traitement avec des chimiothérapies immunogènes. De plus, nous avons montré que l'ATP est impliqué dans le recrutement et la différenciation de cellules avec un phénotype de monocytes inflammatoires. L'ensemble de ces résultats apporte de nouveaux éléments dans la caractérisation du processus de mort cellulaire immunogène.

SUMMARY

Most of the cytotoxic agents used in cancer therapy are known to be immunosuppressive, because of their unspecific targeting of rapidly dividing cells, like tumor cells, but also cells of the immune system. However, radiotherapy, as well as some chemotherapeutic agents such as anthracyclines or oxaliplatin were reported to have immunostimulatory effects, thanks to their capacity to induce immunogenic tumor cell death. This type of cell death is characterized by the release of danger signals from the dying tumor cell, which will activate the immune system. As a first event, exposure of calreticulin from the dying tumor cell will act as an « eat-me » signal for dendritic cells. Once released, the nuclear protein HMGB1 will bind to TLR4, facilitating antigen processing and presentation. The dying tumor cells will also release ATP, which acts on P2X7 receptors and activates NLRP3 inflammasome, leading to IL-1 β release, necessary for IFN- γ - producing CD8⁺ T cells activation.

Autophagy is a degradation process limiting genomic instability and cancer initiation. It can be induced after a stress of the endoplasmic reticulum (ER). ER-stress is also involved in calreticulin exposure during immunogenic cell death, so we aimed at understanding the role of autophagy in immunogenic cell death. We found that autophagy is required for the release of ATP after treatment with immunogenic chemotherapies. Moreover, we showed that ATP released from the dying cells is necessary for the recruitment of immune cells with inflammatory monocyte phenotype (CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻), as well as their precursors. ATP was also important for the differentiation of these inflammatory monocytes into dendritic cells. These CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells were efficient in presenting the tumor antigens to CD8⁺ T cells, and to induce a tumor-specific immune response. However, autophagy-deficient cells were not able to recruit dendritic cells or to induce CD8⁺ T cells activation.

These studies showed the importance of autophagy in tumor-specific immune response, after treatment with immunogenic chemotherapies. We also reported that ATP is involved in the recruitment and differentiation of cells with inflammatory monocytes phenotype. Altogether, these results give new insights in the concept of immunogenic cell death.

ABBREVIATIONS

ARN : Acide Ribonucléique
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AIF : apoptosis-inducing factor
APAF-1 : apoptosis protease activating factor 1
APC : Cellules présentatrices d'antigène
ATF6 : activating transcription factor 6
ATP : adenosine 5'-triphosphate
BCR : B cell receptor
Bcl-2 : B-cell lymphoma 2
BH : Bcl-2 homology
Ca²⁺ : Calcium
cDC : conventional DC
CDDP : Cisplatine
CDP : Common DC precursor
CRT : Calréticuline
CLP : Common lymphoid progenitor
CMP : Common myeloid progenitor
Cyt *c* : Cytochrome *c*
CMHI ou II : Complexe majeur d'histocompatibilité
DAMP : Damage associated molecular pattern
DC : Cellules dendritiques
DISC : death-inducing signaling complex
DX : Doxorubicine
eIF2 α : Eukaryotic translation initiation factor
ER : Réticulum endoplasmique
ERp57 : ER protein of 57 kDa
FADD : Fas-associating death domain-containing protein
Flt3 : fms-like tyrosine kinase 3
GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GMP : Granulocyte-macrophage progenitor
HCQ : Hydroxychloroquine
HMGB1 : High mobility group box 1
HSP : Heat shock protein
IAP : Inhibitor of apoptosis protein
IFN- γ : Interferon- γ
IL-1, 2, etc... : Interleukine 1, 2, etc...
i.p. : intrapéritonéal
IRE1 : inositol-requiring enzyme 1
i.t. : intratumoral
LC3 : microtubule-associated protein light chain 3
LT : Lymphocyte T
LTc : Lymphocyte T cytotoxique
LTh : Lymphocyte T helper
LT β : lymphotoxin- β
MC : Mitomycin C
MCA : Methylcholanthrene
M-CSF : Macrophage colony stimulating factor

MDSCs : Myeloid derived suppressor cells
MDPs : Monocyte, macrophage, dendritic cell precursor
MTX : Mitoxantrone
mTOR : mammalian target of rapamycin
MyD88 : Myeloid differentiation primary response protein
Na⁺ : Sodium
NK : Natural killer
NLRP3 : NOD-like receptor family, pyrin domain containing-3 protein
Omi/HtrA2: Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2
OVA : Ovalbumine
OXA : Oxaliplatin
PAMPs : Pathogen-associated molecular patterns
PERK : protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase
pDC : Plasmacytoid DC
PDGF : Platelet-derived growth factor
PD-L1 : programmed cell death ligand 1
PI3KIII : Class III Phosphatidylinositol-3-kinase
Pre-cDC : Pre-conventional DC
PRR : Pattern recognition receptor
rCRT : recombinant calreticulin
ROS : Reactive oxygen species
SCID : severe combined immunodeficient
Smac/DIABLO : second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with a low pI
Stat3 : Signal transducer and activator of transcription 3
TAMs : Tumor-Associated Macrophages
TANs : Tumor-Associated Neutrophils
tBid : truncated Bid
TCR : T cell receptor
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
Th : T helper
TLR-4 : Toll-like receptor 4
T_{regs} : Lymphocytes T régulateurs
TRIF : Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN α
UPR : unfolded protein response
UVRAG : UV radiation resistance associated gene
VEGF : Vascular endothelial growth factor
WT : Wild-type, sauvage

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
RESUME	4
SUMMARY	5
ABREVIATIONS	6
SOMMAIRE	8
AVANT-PROPOS	10
INTRODUCTION	12
1. CANCER – GENERALITES ET CARACTERISTIQUES.....	12
1.1. <i>Mort et survie cellulaire</i>	14
1.1.1. Apoptose.....	15
1.1.2. Autophagie.....	19
<i>Conclusion Partie 1</i>	23
2. LA MORT CELLULAIRE IMMUNOGENE.....	24
2.1. <i>Calréticuline et ERp57, Heat shock protein : un signal de phagocytose pour les cellules dendritiques</i>	26
2.1.1. Calréticuline et ERp57.....	26
2.1.2. Heat shock proteins.....	28
2.2. <i>Libération d'ATP et activation de l'inflammasome NLRP3</i>	29
2.2.1. ATP et récepteurs purinergiques.....	29
2.2.1. Libération d'ATP et mort cellulaire immunogène.....	31
2.3. <i>Libération d'HMGB1 et liaison à TLR4</i>	32
2.4. <i>Réponse immunitaire induite par les anthracyclines</i>	33
<i>Conclusion Partie 2</i>	34
3. IMMUNITE ANTI-TUMORALE.....	35
3.1. <i>Effecteurs de l'immunité innée et adaptative</i>	36
3.1.1. Cellules dendritiques.....	40
3.1.2. Macrophages.....	44
3.1.2. Neutrophiles.....	46
3.2. <i>Reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire</i>	46
4. IMMUNOEDITING.....	48
4.1. <i>Elimination</i>	51
4.2. <i>Equilibre</i>	51
4.3. <i>Echappement</i>	52
5. INFLAMMATION ET MICROENVIRONNEMENT TUMORAL IMMUNOSUPPRESSIF.....	54
5.1. <i>MDSC (Myeloid-derived suppressor cells)</i>	55
5.2. <i>Foxp3⁺ T_{reg}, cellules Th17</i>	56
<i>Conclusion Parties 3 à 5</i>	57
6. OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	58
MATERIEL ET METHODES	59
RESULTATS	66
1. IMPORTANCE DE L'ATP ET DE L'AUTOPHAGIE DANS LE SUCCES DES CHIMIOETHERAPIES IMMUNOGENES.....	66
2. ACCUMULATION DE CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE DANS LES TUMEURS TRAITÉES AUX CHIMIOETHERAPIES IMMUNOGENES.....	68
DISCUSSION	71
1. ROLE DE L'AUTOPHAGIE DANS LA MORT CELLULAIRE IMMUNOGENE.....	71
2. MODULATION DE LA CONCENTRATION D'ATP EXTRACELLULAIRE.....	72
3. ROLE DE L'ATP DANS LE RECRUTEMENT ET LA DIFFERENCIATION DES CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENE.....	73

4. PHENOTYPE DES CELLULES MYELOÏDES RECRUTEES A LA TUMEUR	74
5. PROPRIETES DES CELLULES CD11B ⁺ LY6C ^{HIGH} LY6G ⁻	77
CONCLUSION	78
REFERENCES	80

AVANT-PROPOS

Le cancer représente actuellement la première cause de mortalité en France pour l'homme et la deuxième cause de mortalité pour la femme. Alors que le taux d'incidence des cancers en France a progressé au cours de la dernière décennie, le taux de mortalité a subi une légère baisse plus marquée chez l'homme que chez la femme. Le cancer de la prostate, le plus fréquent chez l'homme a augmenté de 26 cas en 1980 à 125,7 cas en 2005 pour 100 000 personnes. La femme quant à elle, est plus touchée par le cancer du sein, et l'on observe aussi une progression de l'incidence de ce cancer, de 56,8 à 99,7 cas pour 100 000 femmes.

Le cancer du poumon chez l'homme et du sein chez la femme sont les plus mortels (21 000 décès pour le cancer du poumon et 11 500 pour le cancer du sein) (InVs, 2011). Pourtant, le plan Cancer, lancé en France par Jacques Chirac en 2003, a permis la mise en place de mesures, articulées autour de 5 axes majeurs, parmi lesquelles figurent des actions permettant d'accélérer le transfert des avancées de la recherche au bénéfice des patients. De plus, des avancées considérables ont été faites pour la prise en charge des malades et pour un dépistage précoce. Malgré ces progrès, il reste encore primordial de trouver de nouveaux traitements, et de plus en plus, l'objectif est d'aboutir à une médecine plus personnalisée, où le profil génétique de chaque cancer sera dressé afin de pouvoir adapter les soins.

La conception du cancer a beaucoup évolué ces deux dernières décennies, et de cela découle aussi le changement des méthodes expérimentales utilisées pour étudier cette pathologie. Ainsi, alors que les cellules immortalisées en culture étaient le moyen principal d'étude des mécanismes moléculaire du cancer, cette ultra-simplification impliquant que les cellules cancéreuses sont indépendantes de leur environnement, est en fait loin de la réalité (Hanahan and Weinberg, 2000) . Les modèles *in vivo* sont maintenant privilégiés, permettant d'analyser les cellules tumorales et leurs interactions avec les cellules voisines, et permettant également d'apprécier la complexité d'une tumeur, composée de différents types cellulaires, dont des cellules normales formant le stroma, des cellules endothéliales, ou encore des cellules du système immunitaire. On parle maintenant de « microenvironnement tumoral », et l'hétérogénéité des tumeurs implique une complexité considérable. De la découverte de ce microenvironnement tumoral, en résulte la notion que les cellules recrutées à la tumeur interagissent avec les cellules néoplasiques de manière paracrine, en sécrétant divers facteurs de croissances et cytokines, participant ainsi à la tumorigenèse. La dualité du système immunitaire dans le cancer a ainsi été mise en évidence. D'un côté, il peut aider à éliminer les cellules cancéreuses, ainsi inhibant la croissance tumorale, mais il peut aussi la favoriser, en

créant des conditions propices à son développement dans le microenvironnement (Hanahan and Weinberg, 2011). D'autres concepts sont apparus, tels que l'« immunoediting », qui consiste à décrire la tumorigenèse en 3 étapes successives : à un stade précoce, le système immunitaire inné et adaptatif élimine les cellules tumorales, il peut alors y avoir suppression de la tumeur, ou persistance de celle-ci. Dans ce cas, un équilibre entre le système immunitaire et la tumeur se produit, n'engendrant pas de croissance tumorale. Des mutations peuvent alors se produire, induisant un échappement au contrôle du système immunitaire, et la progression de la tumeur. Ainsi, les immunothérapies ont eu pour objectif majeur l'activation du système immunitaire (Schreiber et al., 2011).

Dans cette quête incessante de nouvelles approches thérapeutiques, notre laboratoire a mis en évidence la capacité de certaines chimiothérapies telles que les anthracyclines ou l'oxaliplatine, à induire une mort cellulaire immunogène. Les cellules tumorales mourantes vont agir comme un vaccin et permettre de déclencher une réaction immunitaire spécifique et ainsi permettre une survie prolongée du patient. Dès lors, nous avons cherché à caractériser les mécanismes impliqués dans cette mort cellulaire immunogène, et cette étude se penche sur deux aspects. Tout d'abord, nous avons voulu savoir si l'autophagie, processus souvent altéré dans les cancers, pouvait interférer avec la mort cellulaire immunogène induite par la chimiothérapie. Ensuite, nous avons identifié les cellules du système immunitaire qui étaient essentielles pour la réponse aux chimiothérapies immunogènes. Ces résultats viennent donc appuyer le concept de la mort cellulaire immunogène, et nous espérons que les chimiothérapies immunogènes seront favorisées lors des traitements des cancers.

INTRODUCTION

1. Cancer – Généralités et caractéristiques

En 2000, après plusieurs décennies de recherche sur le cancer, D. Hanahan et R. Weinberg publient dans *Cell*, une revue qui va résumer les 6 caractéristiques des cellules cancéreuses qui sont retrouvées dans la plupart, sinon tous les cancers. Ces propriétés, acquises durant la tumorigenèse, en général par des mutations du génome, sont obtenues par des mécanismes et un ordre d'apparition qui est propre à chaque tumeur. Ainsi, pour devenir maligne, une cellule devient capable de produire ses propres facteurs de croissance, ne dépendant plus du microenvironnement tissulaire, et ne répond plus aux signaux antiprolifératif. Elle acquiert aussi la capacité d'échapper à l'apoptose, mort programmée des cellules qui est normalement déclenchée par les mutations, ainsi qu'un potentiel de réplication illimité. Ces cellules vont aussi avoir la faculté d'activer l'angiogenèse, afin que la tumeur soit irriguée et enfin vont pouvoir envahir les autres tissus et former des métastases, qui sont responsables de la plupart des décès des patients cancéreux. Pour finir cette revue, les auteurs reprochent la vue simpliste des recherches, à savoir que seules sont considérées les cellules tumorales et leurs mutations. Ils espèrent que les tumeurs seront dès lors considérées comme un environnement complexe comprenant des cellules recrutées, qui interagissent avec les cellules tumorales et favorisent leur croissance, afin d'améliorer les thérapies (Hanahan and Weinberg, 2000). En 2011, alors que les connaissances se sont accumulées dans cette thématique de recherche, les mêmes auteurs font une mise à jour de leur revue, et ajoutent deux nouvelles caractéristiques. La première concerne le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses qui est reprogrammé pour permettre la croissance et la division cellulaire. La seconde résulte de la théorie de l'immunosurveillance, selon laquelle le système immunitaire est toujours en alerte et permet d'éliminer les tumeurs naissantes. Cette théorie se base sur le fait que des études utilisant des souris déficientes pour plusieurs composants du système immunitaire inné ou adaptatif montrent une augmentation du nombre de tumeurs induites par des carcinogènes en comparaison avec des souris immunocompétentes. Ainsi le système immunitaire permet la détection et l'éradication des cellules cancéreuses, mais certaines cellules faiblement immunogènes arrivent à échapper à cette immunosurveillance et à former des tumeurs (Hanahan and Weinberg, 2011).

L'échappement à la mort cellulaire ainsi qu'à la surveillance du système immunitaire sont deux mécanismes d'intérêt pour notre laboratoire, et la restauration de ces deux phénomènes nous paraît être une stratégie prometteuse pour l'amélioration des thérapies actuelles.

1.1. Mort et survie cellulaire

Du fait de son importance dans l'initiation du cancer, la mort cellulaire est un processus qui a fait l'objet de nombreuses études au cours des dernières décades, et qui passionne toujours de nombreux chercheurs. Différents types de mort cellulaires ont été identifiées et classées selon leurs caractéristiques morphologiques. Le comité de nomenclature de la mort cellulaire (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD), regroupant des chercheurs experts dans ce domaine, a proposé en 2005, 2009 et maintenant en 2012, des recommandations pour définir les termes à employer lorsque l'on aborde les différents types de mort cellulaires. Ceci afin d'unifier la nomenclature qui permettra de faciliter les communications entre les chercheurs, et une avancée plus rapide de la recherche (Kroemer et al., 2005; Kroemer et al., 2009) (Galluzzi et al., 2012b). Leur dernier rapport propose l'utilisation d'une nouvelle classification basée sur les caractéristiques biochimiques de la mort cellulaire, et non morphologiques, comme c'était le cas jusqu'à présent. C'est ainsi que sont définies les voies extrinsèques et intrinsèques de l'apoptose, la mort cellulaire programmée des cellules qui est impliquée dans l'homéostasie mais aussi, lorsqu'elle est dérégulée, dans le cancer. L'apoptose a pendant longtemps été décrite comme silencieuse ou tolérogène car la dégradation des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires ne permettait pas d'induire de réponse immunitaire. Nous savons désormais que l'apoptose peut être immunogène lorsqu'elle est induite par certaines chimiothérapies, grâce à l'exposition à la membrane et la libération de signaux de danger (Apetoh et al., 2007; Ghiringhelli et al., 2009; Obeid et al., 2007). En revanche, la nécrose, une autre modalité de mort cellulaire ayant pour caractéristique principale l'explosion de la cellule et la libération de son contenu dans le microenvironnement tissulaire, est considérée comme pro-inflammatoire. Longtemps considérée comme une mort accidentelle et non régulée, il a maintenant été démontré que la nécrose pouvait aussi être régulée. Parmi les types de mort cellulaire les plus étudiés, la catastrophe mitotique se réfère à une mort cellulaire déclenchée après un défaut lors de la mitose. L'autophagie est désormais considéré comme un processus de survie cellulaire et montre une importante vacuolisation cytoplasmique. Ce processus de dégradation peut permettre d'augmenter la survie de la cellule, mais peut aussi au contraire être responsable de la mort de la cellule, par exemple lorsque celle-ci ne peut entrer en apoptose. (Kroemer et al., 2005; Kroemer et al., 2009) (Galluzzi et al., 2012b).

L'apoptose et l'autophagie, processus de mort et de survie cellulaire respectivement, sont importants dans cette étude et seront décrits de façon plus détaillée ci-dessous.

1.1.1. Apoptose

Initialement décrite en 1972, par Kerr *et al.*, l'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée présentant des caractéristiques spécifiques. Grâce à des images de microscopie électronique, ces derniers ont pu montrer l'aspect morphologique de l'apoptose. En effet, ils ont observé une condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau et un bourgeonnement de la cellule aboutissant à la formation de corps apoptotiques, qui sont ensuite ingérés par des cellules phagocytaires voisines (Kerr et al., 1972). En contraste avec la nécrose, il ne se produit pas de rupture de la membrane plasmique, d'où une absence de réponse inflammatoire. L'apoptose se produit dans des conditions physiologiques, lors du développement embryonnaire et post-embryonnaire pour l'élimination des cellules superflues, mais permet aussi la dégradation de cellules ayant subi des mutations ou étant infectées par des virus. Une dérégulation de l'apoptose peut entraîner diverses maladies telles que des troubles neuro-dégénératifs ou un cancer (Strasser et al., 2011) (Martin and Green, 1995), (Pereira and Amarante-Mendes, 2011). De nombreuses études ont démontré que deux voies de signalisations principales mènent à l'apoptose : la voie extrinsèque, qui est activée par des récepteurs membranaires, et la voie intrinsèque ou mitochondriale, activée par des signaux intracellulaires. Ces deux voies aboutissent à l'activation d'une classe de protéase appelée « caspases » qui vont mener à l'apoptose. Lorsque la voie extrinsèque est mise en place, la liaison des récepteurs de mort tels que FAS/CD95 ou TRAIL-R à leurs ligands (FasL ou TRAIL respectivement) provoque le recrutement et l'oligomérisation d'une protéine adaptatrice, FADD (Fas-associating death domain-containing protein) et la mise en place du complexe DISC (death-inducing signaling complex). Il en résulte une activation de la caspase 8 qui va ensuite cliver et activer les caspases exécutrices 3, 6 et 7, qui vont mener à la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine. La voie intrinsèque, qui peut être déclenchée suite à un dommage de l'ADN ou un stress du réticulum endoplasmique, induit une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Cette perméabilisation provoque une libération de plusieurs facteurs pro-apoptotiques normalement contenus dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie (Cytochrome *c* (Cyt *c*), apoptosis-inducing factor (AIF), second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP binding protein with a low pI (Smac/DIABLO) et Omi stress-regulated endoprotease/high temperature requirement protein A2 (Omi/HtrA2)). Le Cyt *c* va ensuite former le complexe multi-protéique apoptosome, avec la pro-caspase 9, APAF-1 (apoptosis protease activating factor 1) et ATP/dATP. Ce complexe permet l'activation de la caspase 9 qui va ensuite activer les

caspases effectrices. Une fois libéré de la mitochondrie, AIF va être transloqué dans le noyau avec l'endonucléase G et ces deux protéines vont aussi permettre la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine. En revanche, Smac/DIABLO et Omi/HtrA2 vont provoquer l'apoptose de façon indirecte en se liant aux protéines IAP (inhibitor of apoptosis protein), et donc empêcher leur action inhibitrice sur les caspases. De plus, il existe un lien entre les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose, mettant en jeu la protéine pro-apoptotique BID. La caspase 8, activée après l'engagement des récepteurs de mort et la formation du complexe DISC, peut aussi entraîner le clivage de BID en tBID (truncated BID). tBID va ensuite induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (**Fig. 1**) (Kroemer et al., 2007) (Garrido and Kroemer, 2004) (Strasser et al., 2011).

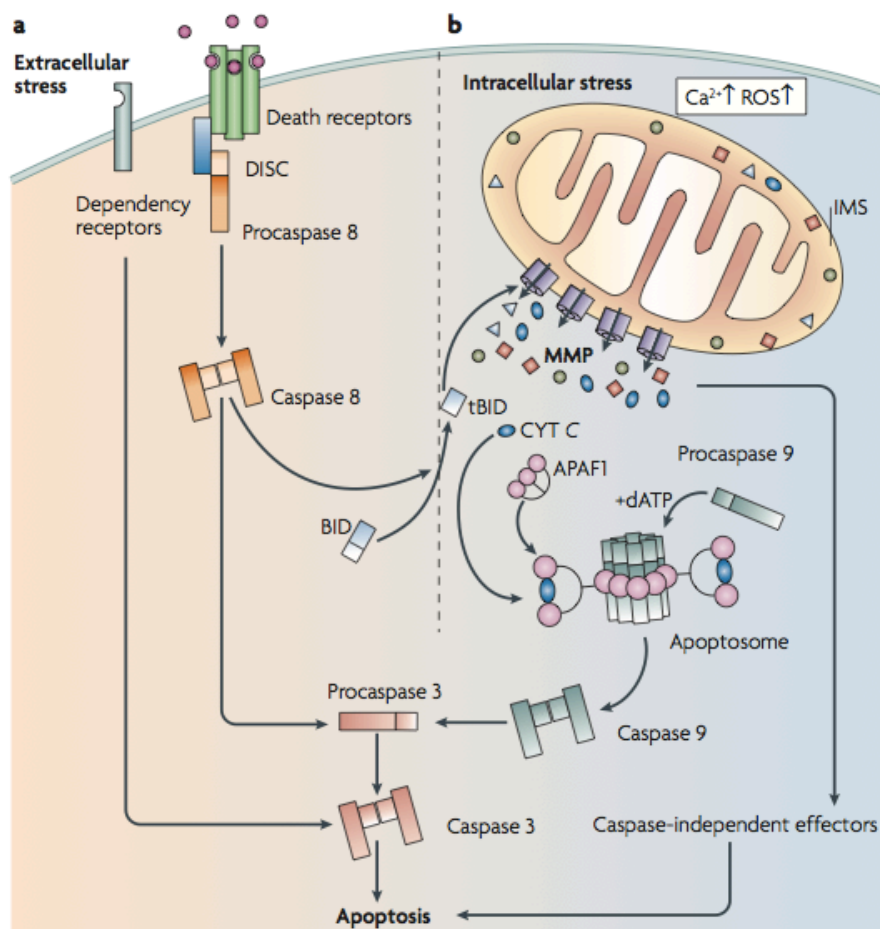


Fig. 1. Voies de signalisation de l'apoptose extrinsèque et intrinsèque. a. Signalisation activée après un stress extracellulaire, mettant en jeu les récepteurs de mort et déclenchant l'activation des caspases. b. Signalisation intrinsèque, après un stress intracellulaire, la membrane externe mitochondriale est perforée et la libération de protéines intramitochondriale induit l'activation des caspases (Galluzzi et al., 2009).

La simplification de la figure 1 ne permet pas de présenter la famille de protéine Bcl-2, qui est divisée en protéines de fonctions pro- ou anti- apoptotiques et qui régule la voie mitochondriale de l'apoptose. La sous-famille Bcl-2 comprend des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, qui partagent des régions d'homologie appelées BH (Bcl-2 homology) 1 à 4. En revanche, le sous-groupe BAX, avec BAX et BAK est pro-apoptotique, et partage les domaines BH1 à 3. La dernière sous-famille rassemble des protéines pro-apoptotiques ne présentant que la région d'homologie BH3, telles que BIM, BAD, Noxa, Puma, ou encore BID (**Fig 2.a**). Les interactions entre ces diverses protéines régulent la décision d'entrer ou non en apoptose. Ainsi, alors que les protéines de survies telle que Bcl-2 permettent de protéger les cellules contre divers stress cytotoxiques, les protéines de type BH3 comme BIM, paraissent agir comme des antagonistes de Bcl-2 et autres protéines anti-apoptotiques. De nombreuses études ont montré qu'après un signal de stress, les protéines BH3 vont se lier aux protéines de survies pour lesquelles elles ont le plus d'affinité, ce qui va empêcher ces dernières d'exercer leur action antagoniste sur les protéines telles que BAX, qui vont alors être transférées à la membrane mitochondriale externe, perturber son intégrité et permettre ainsi la libération de cytochrome *c*, menant à l'apoptose (**Fig. 2.b**) (Adams and Cory, 2007a) (Adams and Cory, 2007b; Cory et al., 2003; O'Connor et al., 1998) (Chen et al., 2005; Wolter et al., 1997). Suite à ces découvertes sur les voies de signalisations apoptotiques et sur le rôle de Bcl-2 dans la résistance des cancers aux traitements par chimiothérapie, de nombreux « BH3-mimetics » ont été développés. Ces agents vont mimer les protéines BH3 et donc agir comme des antagonistes des protéines de survies comme Bcl-2, restaurant l'apoptose dans les cellules cancéreuses (**Fig. 2.b**) (van Delft et al., 2006).

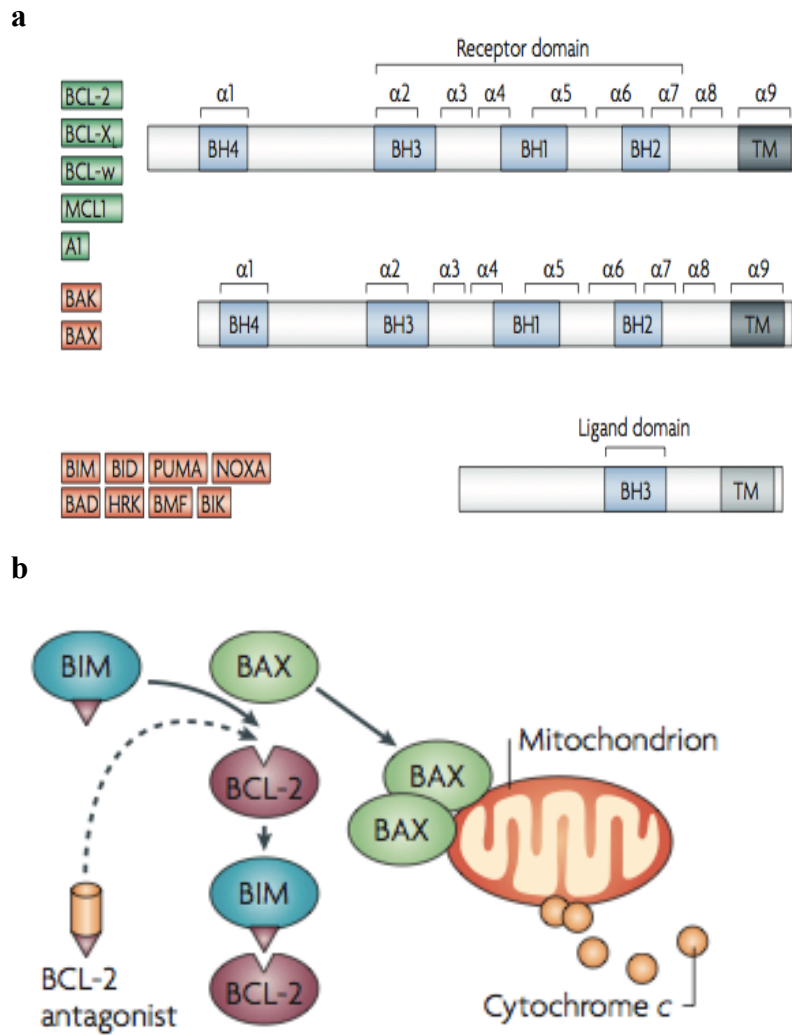


Fig. 2. Protéines de la famille Bcl-2 et leur rôle dans la voie mitochondriale de l'apoptose. a. Les différentes régions d'homologie des 3 sous-familles (Lessene et al., 2008). b. Mode d'action des protéines BH3 et BAX dans l'apoptose, et l'utilisation d'antagonistes de Bcl-2 pour induire l'apoptose (Cotter, 2009).

1.1.2. Autophagie

L'autophagie (ou macroautophagie) est une voie de dégradation lysosomale qui se produit de manière physiologique à un niveau basal, et qui permet le recyclage de composants cellulaires défectueux à des fins de biosynthèse générant ainsi des acides aminés, acides gras et nucléosides. Cette voie de dégradation présente un avantage sur celle de l'ubiquitine et du protéasome, car elle permet la dégradation de très grosses protéines, de lipides, d'ADN ou d'ARN, voire même d'organelles. L'autophagie met en jeu un certain nombre de protéines, appelées « Atg » qui participent à la formation des autophagosomes, vésicules à double membrane qui renferment les protéines ou organelles endommagées à recycler. Ce processus de dégradation est inhibé par la kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) qui phosphoryle Atg13 et l'empêche par la même occasion de former un complexe multiprotéique nécessaire à l'initiation de l'autophagie. Lors de la première phase, dite de nucléation, la kinase PI3KCIII (Class III Phosphatidylinositol-3-kinase) forme un complexe avec Beclin1 (Atg6 chez la levure) et UVRAG (UV radiation resistance associated gene) qui induit la formation du phagophore, une membrane qui peut être dérivée du réticulum endoplasmique, de la membrane mitochondriale externe, ou de la membrane plasmique, et qui séquestre les protéines à dégrader. L'étape suivante d'élongation du phagophore implique l'action d'enzymes, les ligases type E1, E2 ou E3 (Atg7, 3 et 5 respectivement) médiant une ubiquitination qui permet d'activer LC3-I (microtubule-associated protein light chain 3), qui après lipidation est converti en LC3-II, forme associée à l'autophagosome. Ces protéines, ainsi que Atg10, 12, et 16L achèvent ainsi la formation de l'autophagosome. Ce dernier fusionne ensuite avec un lysosome, contenant des hydrolases qui seront responsables de la digestion du cargo autophagique (**Fig. 3**, (Janku et al., 2011) (Maiuri et al., 2007)).

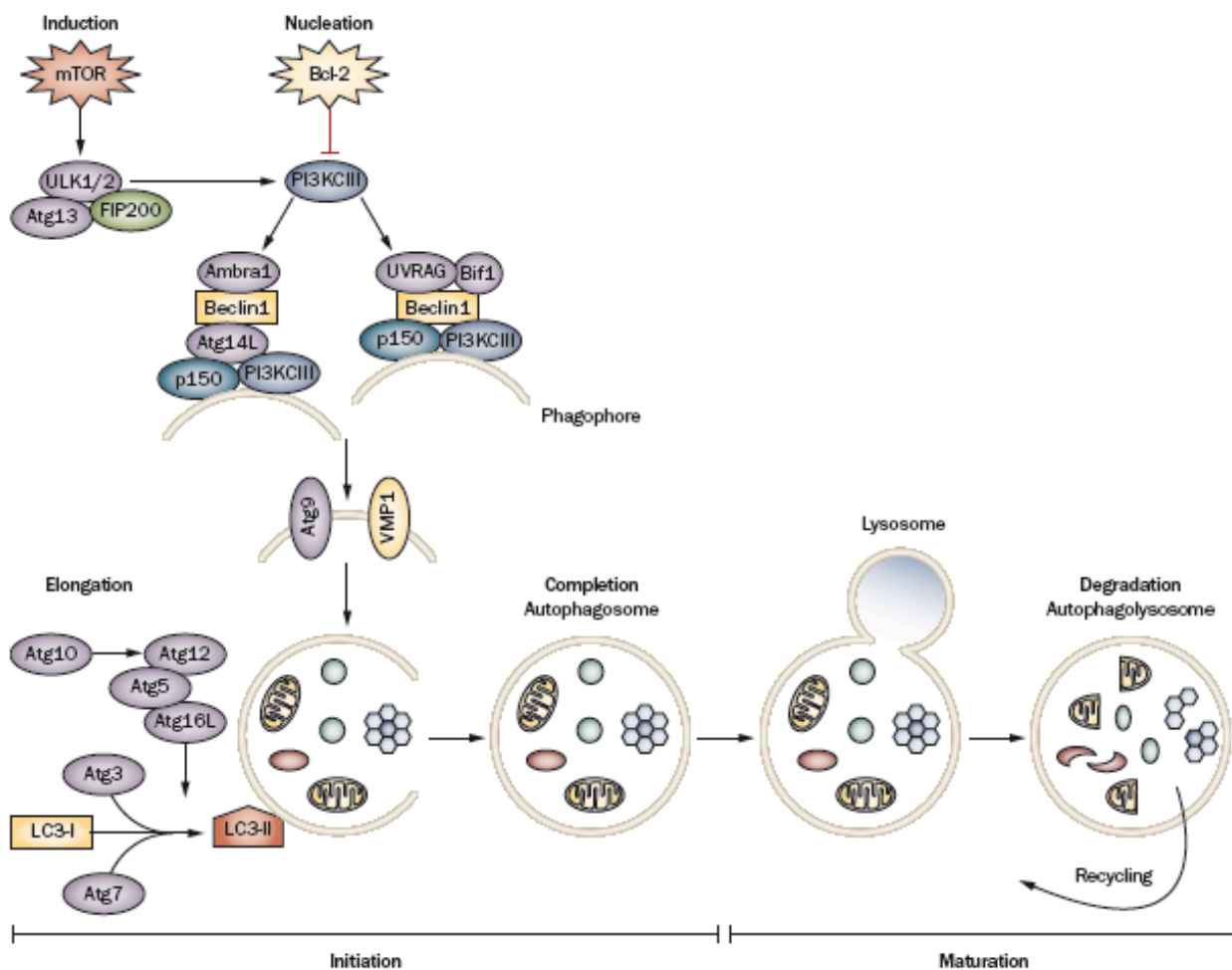


Fig. 3. Voie de signalisation de l'autophagie. L'autophagie est régulée par les protéines Atg qui sont responsable de la formation de l'autophagosome, qui séquestre le cargo autophagique. La fusion de celui-ci avec le lysosome pour former l'autophagolysosome induit la dégradation du cargo à des fins de recyclage. (Janku et al., 2011)

Plusieurs types de stress peuvent induire une augmentation importante de l'autophagie, telle que la privation de nutriments, et outre son rôle protecteur, l'autophagie peut aussi contribuer à la mort cellulaire lorsque le stress est prolongé et que la cellule est submergée par la dégradation et le recyclage de protéines et d'organelles. Cependant la mort cellulaire par autophagie ne s'observe que dans certaines conditions, et reste donc très controversée (Kroemer and Levine, 2008). En effet, seul dans le cas où la mort cellulaire montrant des caractéristiques de l'autophagie telles que la lipodation de LC3 peut être bloquée par un inhibiteur de l'autophagie, peut-on définir cette mort cellulaire comme autophagique (Galluzzi et al., 2012b).

Plusieurs études ont montré qu'un stress du réticulum endoplasmique (ER) pouvait induire l'autophagie (Yorimitsu et al., 2006), (Ciechomska et al., 2012). En effet, une des voies d'activation du stress du ER, appelé unfolded protein response (UPR) implique PERK (protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase), IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) et ATF6 (activating transcription factor 6) (Ogata et al., 2006), (Rutkowski and Kaufman, 2004). Cette voie permet de détecter l'accumulation de protéines mal repliées. Outre son rôle de phosphoryler eIF2 α dans la voie du stress du ER, PERK permet aussi l'activation transcriptionnelle de LC3 et Atg5 dans des conditions d'hypoxie (Rouschop et al., 2010), (Ciechomska et al., 2012).

L'autophagie a un double rôle dans le cancer, tantôt agissant comme mécanisme suppresseur de tumeur tantôt permettant la croissance tumorale. En effet, grâce à sa fonction de dégradation d'organelles endommagées ou de protéines mal repliées toxiques, l'autophagie permet aussi d'assurer la stabilité génomique (Mathew et al., 2009).

Dans des conditions de stress, et lorsque la cellule est capable de déclencher le procédé d'autophagie, les protéines ou organelles endommagées sont efficacement digérées, p62 est dégradé, permettant ainsi d'empêcher la formation d'une tumeur.

En revanche, une déficience pour l'autophagie entraîne l'accumulation de p62 et de mitochondries endommagées pouvant mener à la production de ROS (Reactive oxygen species). De plus, ces cellules déficientes pour l'autophagie peuvent présenter des dommages de l'ADN, une instabilité génomique, et ainsi provoquer un dommage tissulaire engendrant une inflammation chronique. Il en résulte alors une réponse inflammatoire qui peut permettre le développement de la tumeur, notamment à cause de la production de cytokines et chimiokines (**Fig. 4**, (White, 2012)).

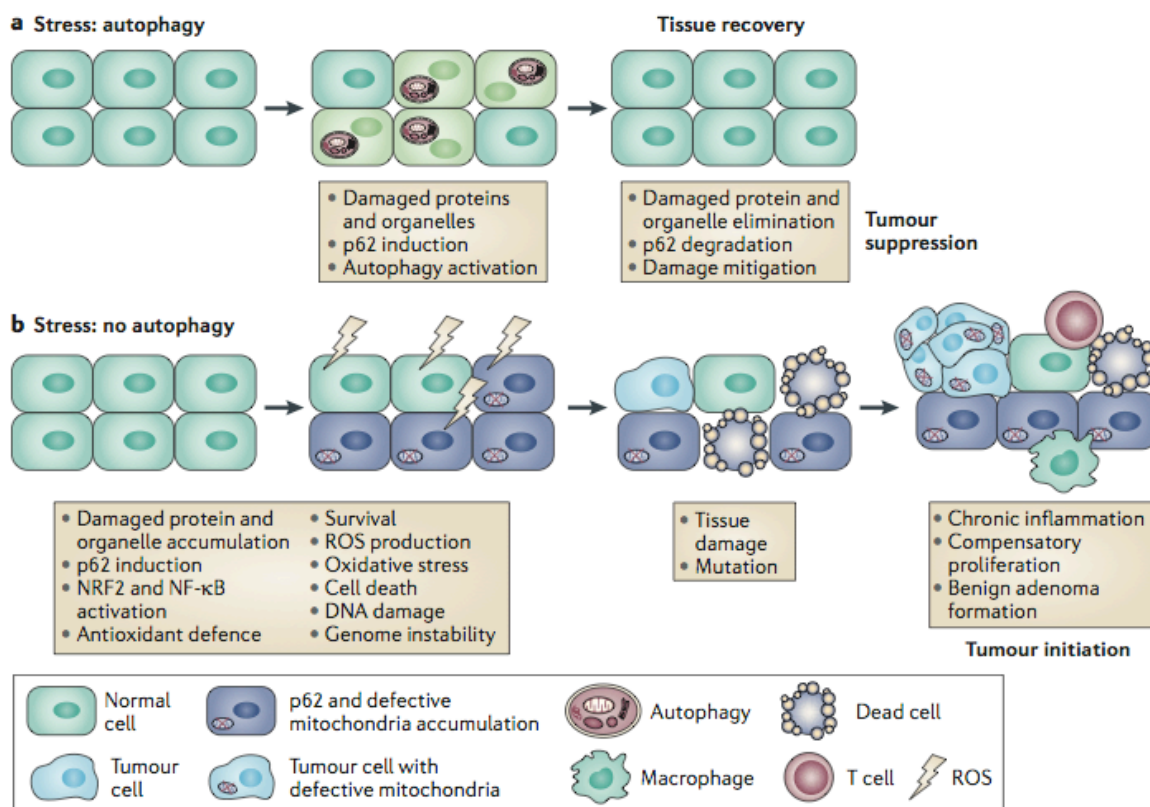


Fig. 4. Autophagie et suppression des tumeurs. a. Lors de conditions de stress, l'autophagie permet la dégradation des protéines endommagées, évitant ainsi la formation de tumeurs. b. Lorsque le tissu est déficient pour l'autophagie, p62 ainsi que les protéines et organelles endommagées s'accumulent, menant à la production de ROS (reactive oxygen species), à l'inflammation et l'instabilité génomique, créant un environnement propice à la formation de tumeurs (White, 2012).

Les cellules normales ont un niveau basal d'autophagie. Cependant, l'autophagie est activée dans les cellules tumorales par différents stimuli tels que la privation de facteurs de croissance, l'hypoxie, la privation de nutriments, et en général, l'induction de l'autophagie induit la survie de la cellule en réponse au stress. Lorsque l'apoptose est inhibée, l'induction de l'autophagie en réponse à la privation de facteurs de croissance va induire un état de latence, permettant la survie de la cellule pendant plusieurs semaines. Lors du retour à des conditions normales, la croissance cellulaire va se poursuivre (Lum et al., 2005).

Dans des conditions de déficience en autophagie, les cellules tumorales accumulant des mitochondries défectives sont sujettes à la mort cellulaire dans les régions hypoxiques, conduisant à l'arrêt de la croissance tumorale, et l'atrophie de la tumeur (**Fig. 5**, (Takamura et al., 2011), (White, 2012)).

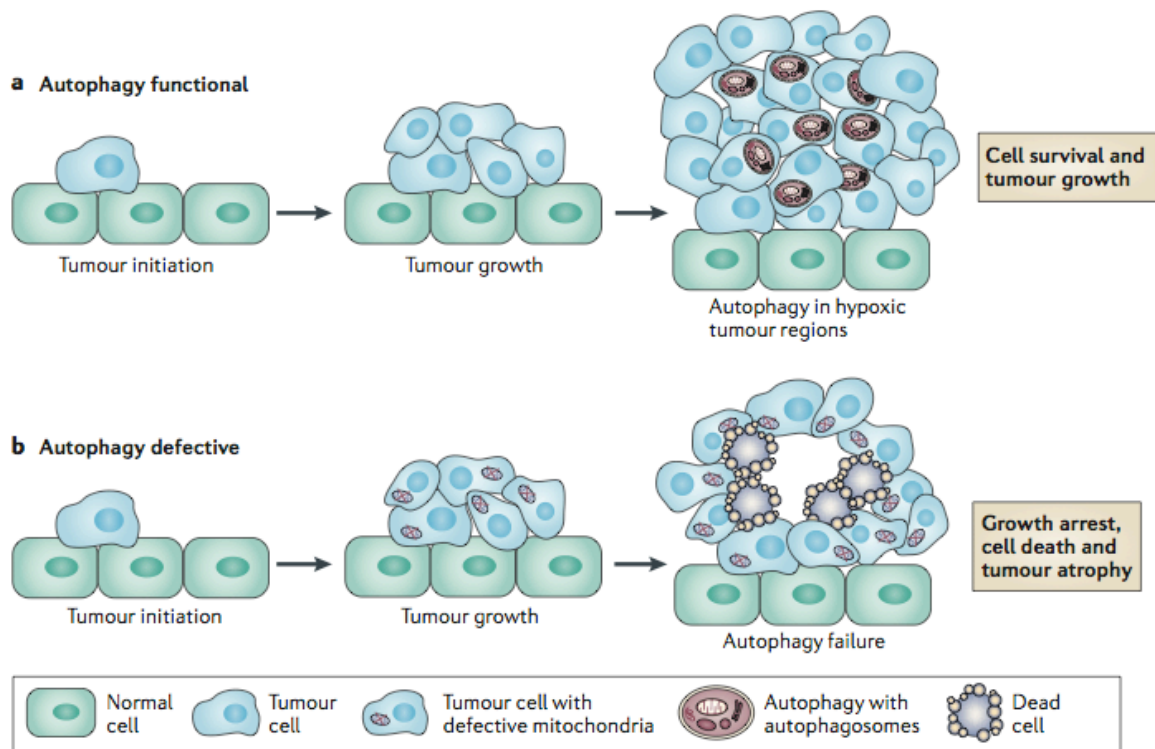


Fig. 5. Autophagie et croissance tumorale. a. L'autophagie est induite dans les régions hypoxiques des cancers et permet ainsi la survie des tumeurs b. En l'absence d'autophagie, les cellules tumorales meurent dans les régions d'hypoxies, menant à l'atrophie de la tumeur (White, 2012).

Conclusion Partie 1

L'apoptose et l'autophagie sont deux processus dérégulés dans le cancer et sont des cibles pour le développement de nouvelles thérapies. Notre laboratoire travaille sur l'induction d'une apoptose immunogène, durant laquelle des signaux de danger sont émis pour alerter le système immunitaire. Parmi ces signaux, l'exposition de la calréticuline est liée à l'induction du stress du réticulum endoplasmique (ER). Or, l'induction du stress du ER permet de déclencher l'autophagie (Ciechomska et al., 2012), (Yorimitsu et al., 2006), suggérant que l'autophagie pourrait aussi être impliquée dans la mort cellulaire immunogène.

2. La mort cellulaire immunogène

La plupart des agents cytotoxiques anti-cancéreux utilisés en clinique affectent sans distinction les cellules tumorales et les cellules à prolifération rapide, telles que les cellules du système immunitaire, d'où leur action immunosuppressive. De plus, la majorité de ces chimiothérapies induisent l'apoptose, procédé de mort cellulaire se produisant généralement de façon silencieuse, les corps apoptotiques étant rapidement digérés par des cellules phagocytaires. Cependant, de récentes études ont montré que certaines chimiothérapies telles que les anthracyclines et l'oxaliplatine, ou la radiothérapie étaient capables d'induire une mort cellulaire immunogène, qui permet le déclenchement d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique (Casares et al., 2005), (Apetoh et al., 2007), (Ghiringhelli et al., 2009). Les anthracyclines, telles que la Mitoxantrone (MTX) et la Doxorubicine (DX) sont des agents intercalants de l'ADN utilisées depuis une cinquantaine d'année en clinique pour le traitement de différents types de cancer. Tandis que la MTX est indiquée dans le cas de cancer de la prostate, leucémie aigüe et cancer du sein, la DX est utilisée pour le traitement de nombreux cancer tels que lymphomes, cancer du sein, leucémie aigüe lymphocytaire et myéloïde, cancer du foie, du pancréas parmi tant d'autres. L'oxaliplatine quant à elle, est un agent dérivé du platine, utilisée dans les cas de cancer de l'ovaire et du côlon métastatique (Vacchelli et al., 2012).

En 2005, Casares *et al.* ont montré que la DX, contrairement à la Mitomycine C (MC), un autre agent cytotoxique, était capable d'induire une mort cellulaire immunogène. Ces deux agents ont la capacité d'induire une activation des caspases et la condensation de la chromatine, mais seule la MC mène à une fragmentation de l'ADN. Les cellules dendritiques ont montré un pouvoir phagocytaire plus important pour les cellules traitées à la DX par rapport à celles traitées à la MC. De plus, le traitement combiné de DX avec Z-VAD-fmk, un inhibiteur à large spectre des caspases, induit une diminution de la phagocytose par les cellules dendritiques ainsi qu'une diminution de l'immunogénicité induite par la DX. Cette étude montre aussi que les cellules traitées par la DX sont très efficaces pour provoquer l'activation de Lymphocytes T cytotoxiques (LTc) spécifique à la tumeur. Ces résultats suggèrent donc l'implication d'une apoptose immunogène à l'origine de l'efficacité de la DX (Casares et al., 2005). De plus, de nombreux agents anticancéreux ont été testés pour leur capacité à induire une réponse immunitaire responsable de leur efficacité anti-tumorale. Grâce à l'utilisation de souris C57BL/6 ou BALB/c immunocompétentes ou *nu/nu*, l'oxaliplatine et la DX, ont montré une bonne efficacité anti-tumorale dans les souris immunocompétentes,

alors qu'en absence de lymphocyte T, chez les souris *nu/nu*, ces chimiothérapies ne sont plus efficaces. Ces résultats suggèrent donc que ces chimiothérapies s'appuient sur un système immunitaire intact et une réponse T-dépendante pour éliminer efficacement les tumeurs (Apetoh et al., 2007). Depuis, plusieurs travaux dans notre laboratoire ainsi que dans d'autres équipes, ont tenté d'élucider les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la mort cellulaire immunogène, permettant ainsi de définir plusieurs points clés nécessaires pour ce processus. Ainsi, après traitement avec un agent immunogène, la cellule tumorale mourante va exposer à sa surface la Calréticuline, une protéine du réticulum endoplasmique, qui va accélérer la phagocytose par les cellules dendritiques. L'ATP et HMGB1 (High mobility group box 1) libérés par la cellule mourante vont agir sur les récepteurs P2X7 et TLR4 (Toll-like receptor 4) respectivement. La liaison de l'ATP à P2X7 va entraîner une activation de l'inflammasome, un complexe multiprotéique qui active la Caspase-1, nécessaire pour la libération d'interleukin-1 β (IL-1 β). L'IL-1 β est ensuite responsable de l'activation des lymphocytes T CD8⁺ sécrétant l'interferon- γ , médiant la réponse immunitaire anti-tumorale via l'activation des macrophages et un effet anti-angiogénique (**Fig. 6**, (Apetoh et al., 2007; Ghiringhelli et al., 2009; Locher et al., 2010; Obeid et al., 2007)).

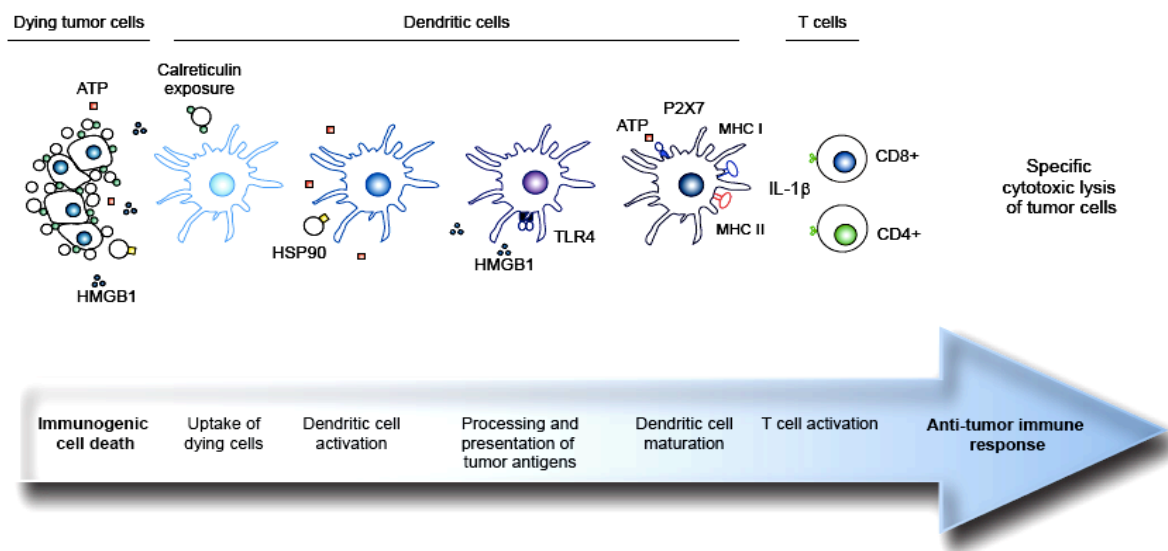


Fig. 6. Mécanismes de la mort cellulaire immunogène. L'exposition de la calréticuline, la libération d'ATP et d'HMGB1 sont les principaux signaux de danger émis par les cellules mourantes traitées par une chimiothérapie immunogène. Ceux-ci induisent une phagocytose des cellules mourantes par les cellules dendritiques, et l'activation de Lymphocytes T CD8⁺ responsables de la réponse immunitaire anti-tumorale. (Tesniere et al., 2008)

Les trois signaux de danger (exposition de la calréticuline, libération d'ATP et d'HMGB1) émis par les cellules mourantes, déterminent l'immunogénicité de la mort cellulaire (Green et al., 2009).

2. 1. Calréticuline et ERp57, Heat shock protein : un signal de phagocytose pour les cellules dendritiques

2.1.1. Calréticuline et ERp57

La Calréticuline (CRT) est une protéine résidente du réticulum endoplasmique (ER), qui agit comme une protéine chaperonne, s'assurant du repliement correct des glycoprotéines nouvellement synthétisées. C'est une protéine soluble, qui présente un site lectine lui conférant son affinité pour les oligosaccharides. La CRT présente aussi des sites de liaison pour l'ATP, le Calcium (Ca^{2+}) et interagit avec ERp57 (ER protein of 57 kDa), une disulfide isomérase qui permet de créer des ponts disulfures lors du repliement des protéines (Williams, 2006). Grâce à son domaine C-terminal chargé négativement, la CRT peut se lier à une grande quantité de Ca^{2+} et permet ainsi de réguler l'homéostasie du Ca^{2+} dans le ER (Villamil Giraldo et al., 2010). Lors d'une phase précoce de l'apoptose immunogène, la CRT se retrouve exposée à la surface à la suite de plusieurs étapes complexes. Les agents immunogènes induisent un stress du ER, ainsi que la production d'espèces réactives de l'oxygène. Ceci est accompagné de la phosphorylation de eIF2 α (eukaryotic translation initiation factor) par la kinase PERK (PKR-like endoplasmic reticulum kinase). Certains agents, telles que les anthracyclines, sont responsables de la dissociation du complexe PP1/GADD34, phosphatase de eIF2 α , ceux-ci permettent donc l'induction de l'exposition de CRT (Kepp et al., 2009). De la même façon, l'utilisation de mutants de eIF2 α non phosphorylables, abolit l'exposition de la CRT, alors que la suppression d'autres voies menant au stress du ER, par exemple ATF6 ou IRE1 ne permet pas cette abolition (Panaretakis et al., 2009). PERK est aussi essentiel pour l'exposition de la CRT, car sa perte, suite à l'utilisation de siRNA empêche les cellules traitées aux anthracyclines d'exposer la CRT et d'être immunogènes (Panaretakis et al., 2009). Ce module de stress du ER mène à l'activation de la caspase 8, qui permet le clivage de Bap31, une protéine interagissant avec Bcl-2. Ceci va induire l'activation de BAX et BAK. Après l'exécution du module apoptotique, la CRT est transportée à la membrane plasmique, de la lumière du ER, en passant par le Golgi, grâce à des vésicules d'exocytose. La disulfide isomérase ERp57 accompagne la CRT jusqu'à

la membrane plasmique, et ceci est indispensable pour l'exposition de cette dernière (**Fig. 7**, (Panaretakis et al., 2008; Zitvogel et al., 2010)).

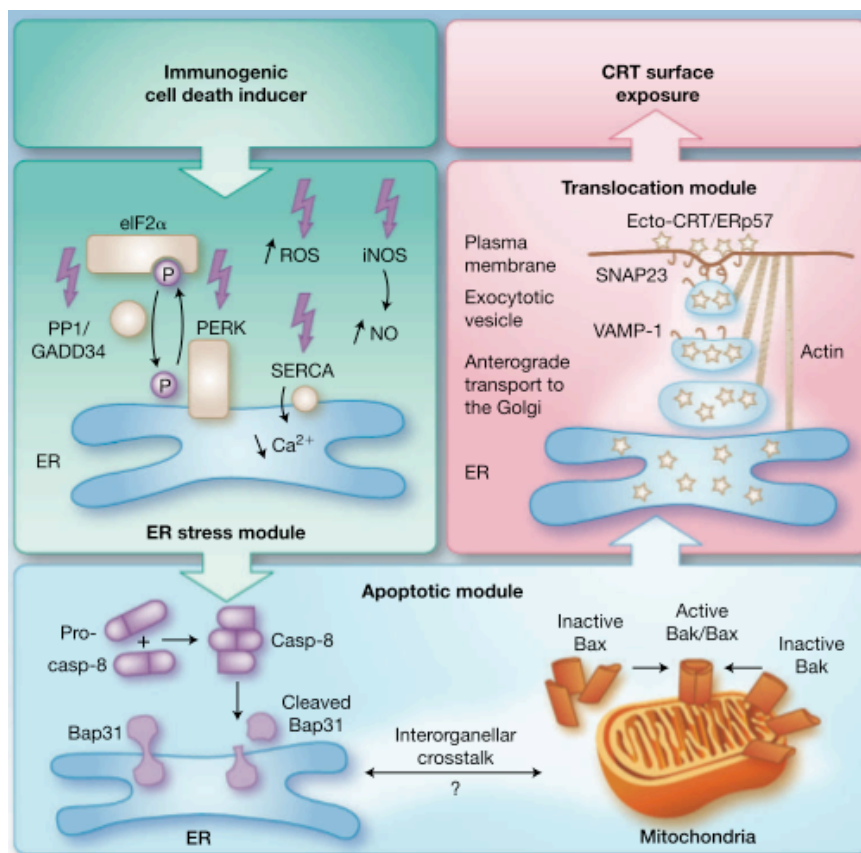


Fig. 7. Les modules nécessaires à l'exposition de la CRT/ERp57 à la membrane plasmique. Le stress du ER induit un module apoptotique mettant en jeu la caspase 8, BAX et BAK, et mène ainsi au module de translocation par exocytose (Zitvogel et al., 2010).

Obeid et *al.* ont montré en 2007 que l'exposition de la CRT à la membrane plasmique des cellules mourantes est requise pour la phagocytose de celles-ci par les cellules dendritiques. En effet, la CRT agit comme un signal « eat me », lorsqu'elle se trouve exposée, et confère l'immunogénicité aux cellules tumorales mourantes. Ainsi après l'utilisation d'un siRNA contre la CRT, les cellules traitées aux anthacyclines ne sont plus immunogènes, alors que la réintroduction de CRT (rCRT : recombinant Calreticulin), restaure l'immunogénicité de ces cellules déficientes en CRT. Après traitement avec la DX ou la MTX, les cellules tumorales mourantes exposent la CRT et sont phagocytées très rapidement, après seulement quelques heures de traitement, même avant que tout signe caractéristique de l'apoptose apparaisse (Obeid et al., 2007).

La MTX, DX ou oxaliplatine (OXA) sont capables d'induire l'exposition de la CRT à la membrane plasmique menant ainsi à une mort cellulaire immunogène. En revanche, le cisplatine (CDDP), un composé apparenté à l'OXA, n'induit pas l'exposition de la CRT, du fait de son incapacité à provoquer un stress du ER. En effet, dans un autre travail du laboratoire, nous avons montré que le CDDP ne permet pas l'activation de PERK et la phosphorylation de eIF2 α , deux mécanismes indispensables pour la translocation de la CRT à la surface. Cependant, nous avons trouvé que la combinaison du CDDP avec la thapsigargine, un inducteur du stress du ER, permettait la restauration de l'exposition de la CRT par le CDDP. La thapsigargine est un inhibiteur de l'ATPase SERCA qui permet l'entrée du Ca²⁺ dans le ER, de façon ATP-dépendante. La thapsigargine induit donc une déplétion du Ca²⁺ dans le ER, et n'est pas capable d'induire l'exposition de la CRT seule, suggérant que l'induction du stress du ER n'est pas suffisante pour cela (Martins et al., 2011).

2.1.2. Heat shock proteins

Autres acteurs de la mort cellulaire immunogène, les protéines très conservées HSPs (Heat shock proteins) sont induites lors de conditions de stress. Comme la CRT, elles ont un rôle de protéines chaperonnes, aidant au repliement des protéines mal repliées ou tout juste générées. Les HSPs sont classées en plusieurs familles selon leur poids moléculaire, et HSP70 et 90, sont les plus étudiées dans le cancer. HSP70 est très peu présente dans les cellules normales, mais son expression est très élevée dans les cellules cancéreuses, participant ainsi à la résistance aux chimiothérapies. En revanche, HSP90 est une protéine très abondante, mais se retrouve aussi accumulée dans les cellules tumorales. Ces HSPs sont capables de bloquer les voies intrinsèques et extrinsèques de l'apoptose à différents niveaux, faisant de ces protéines des cibles intéressantes pour la thérapie anticancéreuse (Joly et al., 2010). Plusieurs inhibiteurs de HSP90 sont d'ailleurs en essai clinique de Phase I et II (Lancet et al., 2010). De plus, les HSPs peuvent aussi interagir avec le système immunitaire inné, en agissant comme cytokines activant les cellules présentatrices de l'antigène (APCs), ou grâce à leur fonction de chaperonne, elles peuvent transporter les peptides antigéniques aux APCs, qui vont ensuite être présentés via le CMH de classe I, ainsi activant la voie de présentation croisée. De ces capacités, en résulte leur surnom de « chaperokines », à la fois chaperonne, et cytokine. Les HSP70 et 90 peuvent servir de signaux de danger pour le système immunitaire, lorsqu'elles sont libérées dans le milieu extracellulaire, car elles peuvent se lier à des cellules du système immunitaire et stimuler la libération de molécules immunes. En effet, il a été montré que HSP70 peut se lier à la membrane plasmique des monocytes, et induire l'expression de

cytokines pro-inflammatoires dont IL-1 β , IL-6 et TNF α (Asea et al., 2002). Les cellules tumorales qui expriment une grande quantité de HSPs, peuvent libérer dans l'espace extracellulaire des complexes peptide tumoral-HSP, qui vont interagir avec les APCs via certains récepteurs (CD91 ou CD40 par exemple (Calderwood et al., 2007)) et être endocytés. Le complexe est ensuite dégradé et le peptide antigénique va être présenté via le CMH de classe I aux lymphocytes T CD8.

Avec leurs propres mécanismes, la CRT ainsi que les HSPs induisent la phagocytose des antigènes tumoraux par les APCs, permettant ainsi l'induction d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique.

2. 2. Libération d'ATP et activation de l'inflammasome NLRP3

2.2.1. ATP et récepteurs purinergiques

L'ATP (adenosine 5'-triphosphate) appartient à la famille des purines, et se compose de l'adénine, d'un ribose, ainsi que d'une chaîne de phosphates. C'est une molécule fondamentale, source universelle d'énergie pour les cellules. L'ATP est générée lors de divers mécanismes telle que la glycolyse aérobie, qui dégrade le glucose en pyruvate, qui entre ensuite dans la mitochondrie pour suivre le cycle de Krebs et générer NADH. Ce dernier est le donneur d'électrons nécessaires lors de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. Toutes ces voies biochimiques génèrent 38 molécules d'ATP par molécule de glucose, dont l'hydrolyse sera nécessaire pour fournir de l'énergie aux cellules (Kroemer and Pouyssegur, 2008; Munoz-Pinedo et al., 2012).

En plus de son rôle de source d'énergie, l'ATP est aussi une molécule capable d'induire une signalisation extracellulaire. Ainsi, outre son implication dans la neurotransmission, l'ATP est aussi impliqué dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose dans différents tissus et dans le système immunitaire (Burnstock and Knight, 2004).

Deux familles de purinocepteurs ont été identifiées, la famille des récepteurs P1 pour l'adénosine et la famille des récepteurs P2 pour l'ATP et l'ADP. En 1990, Les récepteurs P1 et P2 ont été clonés et caractérisés, montrant alors qu'il existait deux types de récepteurs P2, les récepteurs P2X, de type canal ionique, et les récepteurs P2Y, qui sont des récepteurs couplés à la protéine G (Lustig et al., 1993; Webb et al., 1993). Plusieurs types cellulaires expriment différents récepteurs (**Tableau 1**), rendant la signalisation purinergique très complexe. En effet, des concentrations différentes d'ATP (ou ADP, ou adénosine) activent

des récepteurs différents, et certains récepteurs induisent une signalisation lente, alors que d'autres induisent une signalisation rapide (Burnstock, 2012).

Smooth muscle	P2X1, P2X2, P2X4, P2X7, P2Y ₁ , P2Y ₂
Cardiac muscle	P2X1-6, P2Y ₂ (plus P2X7 and P2Y ₁ in isolated ventricle myocytes)
Skeletal muscle	P2X1-6, P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ (transiently expressed during development)
Osteoblasts	P2X7, P2Y ₁ , P2Y ₂
Cartilage	P2X2, P2Y ₁ , P2Y ₂ , A _{2A} , A _{2B}
Keratinocytes	P2X2, P2X3, P2X5, P2X7, P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , A _{2B}
Fibroblasts	P2X7, P2Y ₁ , P2Y ₂ , A _{2A}
Adipocytes	P2X1, P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , A ₁
Epithelial cells	P2X4, P2X5, P2X6, P2X7, P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , A ₁ , A _{2A} , A ₃
Hepatocytes	P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₃ , A _{2A} , A ₃
Glial cells	P2X1-7, P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , P2Y ₁₁ , P2Y ₁₂ , P2Y ₁₃ , A ₁ , A ₂
Sperm	P2X2, P2X7, P2Y ₂ , A ₁
Endothelial cells	P2X1, P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , P2Y ₆ , A ₁ , A _{2A}
Erythrocytes	P2X2, P2X4, P2X7, P2Y ₁
Platelets	P2X1, P2Y ₁ , P2Y ₁₂ , A _{2A}
Immune cells ^a	P2X1, P2X4, P2X7, P2Y ₁ , P2Y ₂ , A _{2A} , A ₃
Exocrine cells	P2X1, P2X4, P2X7, P2Y ₁ , P2Y ₂ , P2Y ₄ , A ₁ , A _{2A}
Endocrine cells	P2X1-7, P2Y ₂ , P2Y ₄ , A ₁ , A _{2A} , A _{2B} , A ₃
Special senses	
Inner ear	P2X1, P2X2, P2X3, P2X7, P2Y ₂ , P2Y ₄ , A ₁
Eye	P2X2, P2X7, P2Y ₂ , A ₁ , A ₂ , A ₃ ,
Tongue	P2X2, P2X3, P2Y ₁ , A ₁
Olfactory organ	P2X2, P2X4, P2Y ₁ , P2Y ₂ , A _{2A} , A ₃

Tableau. 1. Plusieurs récepteurs sont exprimés par différents types cellulaires. Les cellules immunes comprennent : lymphocytes, neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques parmi d'autres (Burnstock, 2012).

Dans des conditions physiologiques, l'activation des récepteurs P2X, va mener à un influx de Na⁺ et Ca²⁺, ainsi qu'à un efflux de K⁺ à travers la membrane cellulaire, menant à une dépolarisation de la membrane plasmique et une augmentation de la concentration en Na⁺ et Ca²⁺. Les récepteurs de type P2Y contiennent sept domaines transmembranaires avec un domaine N-terminal extracellulaire et un C-terminal intracellulaire et peuvent induire différentes voies de signalisation menant à l'activation de la phospholipase C, la modulation directe de canal ionique, parmi d'autres.

Parmi les récepteurs purinergiques, le récepteur P2X7 est exprimé très fortement sur les cellules du système immunitaire, en particulier les cellules de type monocyte-macrophage. Ce récepteur est homotrimerique, et une fois activé par l'ATP, ouvre un canal ionique qui laisse passer un efflux massif de K⁺, un cofacteur de l'assemblage de l'inflammasome NLRP3, et la sécrétion d'interleukines inflammatoires par les cellules myéloïdes. Cependant, la stimulation prolongée de P2X7 peut entraîner la mort de la cellule par apoptose (Wiley et al., 2011).

2.2.1. Libération d'ATP et mort cellulaire immunogène

Plusieurs études ont montré que l'ATP pouvait être libéré et que sa présence dans le milieu extracellulaire jouait un rôle dans la réponse immunitaire. En effet, Martins et *al.* ont montré que de nombreuses chimiothérapies induisaient une libération d'ATP dans le surnageant de culture, bien avant que les signes d'apoptose apparaissent (Martins et al., 2009). De plus, l'équipe du Dr Ravichandran a observé que l'ATP et l'UTP, libérés par des cellules apoptotiques agissaient comme des signaux "find-me", ainsi induisant le recrutement des monocytes et macrophages et la dégradation des corps apoptotiques. Ils ont montré que ce recrutement était dépendant du récepteur P2Y2, car ces effets étaient abolis ou diminués lors de l'utilisation de souris déficientes pour P2Y2, ainsi que lors de l'inhibition pharmacologique de ce récepteur avec la Suramine (Elliott et al., 2009). Ce même laboratoire a par ailleurs montré que la libération d'ATP et d'UTP se faisait via le canal Pannexin 1, car l'inhibition de celui-ci diminuait la libération de ces nucléotides, ainsi que le recrutement des monocytes (Chekeni et al., 2010).

Dans un article à Nature, Ghiringhelli et *al.* montrent que les chimiothérapies immunogènes induisent la libération d'ATP par les cellules tumorales mourantes, et que celui-ci va se lier au récepteur P2X7 présent sur les cellules dendritiques. L'efflux de K^+ qui en résulte induit la mise en place de l'inflammasome NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing-3 protein), un complexe multiprotéique, comprenant ASC (apoptosis-associated speck-like protein containing a carboxy-terminal CARD), et la pro-caspase-1. L'inflammasome permet l'activation de la caspase-1, qui va permettre la transformation de la pro-IL-1 β en IL-1 β qui va être sécrétée. De plus, l'activation de l'inflammasome, de la caspase-1 et la sécrétion d'IL-1 β est indispensable pour l'activation des lymphocytes CD8 $^+$ produisant de l'IFN- γ car des souris déficientes pour l'une de ces protéines ne permet pas la production d'IFN- γ . De manière importante, un polymorphisme de P2X7 entraînant une perte de fonction qui réduit l'affinité de ce récepteur pour l'ATP compromet l'efficacité de la chimiothérapie aux anthracyclines chez des patientes atteintes de cancer du sein. Ceci montre donc l'importance du point de vue clinique de cette voie de signalisation (Ghiringhelli et al., 2009).

2. 3. Libération d'HMGB1 et liaison à TLR4

HMGB1 (High mobility group box 1) est une protéine nucléaire, de type non-histone, attachée à la chromatine, agissant comme une chaperonne de l'ADN, permettant ainsi le repliement de l'ADN et favorisant l'assemblage de protéines transcriptionnelles sur des cibles d'ADN spécifiques. HMGB1 participe à la réplication de l'ADN, sa recombinaison, transcription, et réparation. Cette protéine peut aussi interagir et augmenter l'activité de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans le développement du cancer tel que p53. HMGB1 peut être libéré passivement par les cellules nécrotiques, ou par les cellules mourantes succombant aux chimiothérapies, et peut aussi être sécrété activement par des cellules vivantes inflammatoires, et lorsqu'elle est libérée dans le milieu extracellulaire, elle agit comme un signal de danger, ou DAMP (damage associated molecular pattern) (Tang et al., 2010b; Todorova and Pasheva, 2012). Après libération dans le milieu extracellulaire, HMGB1 peut interagir avec divers récepteurs parmi lesquels TLR2, TLR4, TLR9 (Toll-like receptors), ou RAGE (receptor for advanced glycation end-products) et participer à l'induction d'une réponse immunitaire. Il a été montré que HMGB1 était un inducteur d'autophagie, et que cette fonction était médiée via son récepteur RAGE (Kang et al., 2011; Kang et al., 2010; Tang et al., 2011a). De plus, cette protéine peut être trouvée dans le milieu extracellulaire sous forme réduite ou oxydée, la forme réduite induisant l'autophagie, la forme oxydée menant à l'apoptose (Tang et al., 2010a; Tang et al., 2011b; Tang et al., 2011c).

Les récepteurs TLRs sont des PRR (pattern recognition receptor) qui reconnaissent des molécules dérivées de pathogènes ainsi que des signaux de dangers. Après activation, les TLRs peuvent donner naissance à deux voies de signalisation distinctes, mettant en jeu deux protéines adaptatrices: TRIF (Toll/IL-1R domain-containing adaptor inducing IFN α) ou MyD88 (Myeloid differentiation primary response protein). Ils sont présents à la surface des cellules dendritiques et macrophages et peuvent permettre leur activation, en outre, ils contrôlent aussi l'apprêtement et la présentation de peptides dérivés d'un cargo internalisé (Blander and Medzhitov, 2006).

Dans le contexte de la mort cellulaire immunogène, la recherche du récepteur TLR impliqué dans ce processus par Apetoh et al., a permis la mise en évidence du TLR4, et a donc mené à la découverte du signal de danger HMGB1, tous deux indispensables pour la mise en place d'une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique. En effet, des cellules dendritiques (DCs) déficientes pour le TLR4 ou pour MyD88 ne sont pas capables de présenter l'antigène des cellules tumorales mourantes, alors que des DCs déficientes pour les

autres TLRs (TLR1, 2, 3, 5, 6, 7, 9) ou pour TRIF, en ont la capacité. Il a été montré que le TLR4 inhibe la dégradation lysosomale du cargo phagocytaire contenant les antigènes tumoraux, permettant ainsi une présentation de l'antigène tumoral efficace (Shiratsuchi et al., 2004), ceci ayant été aussi démontré dans le cas de la mort cellulaire immunogène. De plus, les cellules tumorales traitées aux anthracyclines présentent une libération d'HMGB1 mais pas d'autres protéines endogènes normalement connues pour se lier à TLR4 telles que, entre autres, HSP60, 70, la fibronectine, ou la β -defensine-2. Cette même étude montre aussi que HMGB1 libéré par les cellules tumorales mourantes se lie au TLR4, et que sa neutralisation empêche la stimulation des lymphocytes T, et ne permet pas une vaccination anti-tumorale. De plus, un polymorphisme de TLR4 (Asp299Gly) affecte la liaison de HMGB1 à celui-ci et réduit la capacité de DCs dérivées de monocytes à effectuer une présentation croisée de l'antigène aux lymphocytes T. L'analyse d'une cohorte de 280 patientes atteintes de cancer du sein avec un envahissement ganglionnaire et recevant des anthracyclines comme thérapie adjuvante, a montré que les patientes présentant la mutation Asp299Gly ont une augmentation de la fréquence des métastases dans les 5 ans suivant la chirurgie, montrant l'importance d'une voie HMGB1/TLR4 intacte pour le succès de la chimiothérapie aux anthracyclines dans le cancer chez l'Homme (Apetoh et al., 2007).

2. 4. Réponse immunitaire induite par les anthracyclines

Comme décrit précédemment, les anthracyclines peuvent induire une réponse immunitaire impliquant les lymphocytes T CD8⁺ produisant de l'IFN- γ (Ghiringhelli et al., 2009). De plus, Ma *et al.* ont caractérisé la réponse induite par les anthracyclines et ont trouvé un profil Th1 huit jours après le traitement, ainsi que la présence de l'IL-17 dès trois jours après traitement. Dans cette étude, la source majeure d'IL-17 s'est avérée être les cellules T $\gamma\delta$ plutôt que les lymphocytes CD4⁺ Th17. En outre, les cellules T $\gamma\delta$ produisant de l'IL-17 sont retrouvées peu de temps après la chimiothérapie et précèdent l'infiltration des T CD8⁺ productrices d'IFN- γ au site tumoral. Ces cellules T $\gamma\delta$ sont par ailleurs nécessaires pour la stimulation des cellules T CD8⁺. La sécrétion d'IL-17 par ces lymphocytes $\gamma\delta$ est dépendante de l'IL-1 β , et ces cellules sont indispensables au succès de la chimiothérapie car des souris déficientes pour l'IL-17, pour les chaînes V γ 4/6 ou pour le TCR δ ne répondent plus au traitement aux anthracyclines (Ma et al., 2011b).

Conclusion Partie 2

La mort cellulaire immunogène est donc un processus très important car elle permet de mettre en place une réponse immunitaire durable, avec l'intervention de lymphocytes T effecteurs-mémoire spécifiques de la tumeur, qui peut persister des années après la chimiothérapie, permettant ainsi de protéger le patient contre une rechute. Cependant, tous les patients ne sont pas éligibles pour ce genre de thérapie, et le succès thérapeutique repose sur le fait que la voie de signalisation menant à la réponse du système immunitaire est intacte. Ainsi, le moindre défaut, qu'il soit lié à la thérapie, à l'hôte ou à la tumeur, risque de conduire à l'échec de la thérapie. Néanmoins, certaines anomalies peuvent être corrigées (Martins et al., 2011), ce qui permet de prendre en considération un plus grand nombre de patients. De plus, le dosage ainsi que l'ordre d'administration des thérapies doivent être définis pour un résultat optimal (**Fig. 8**, (Galluzzi et al., 2012a)).

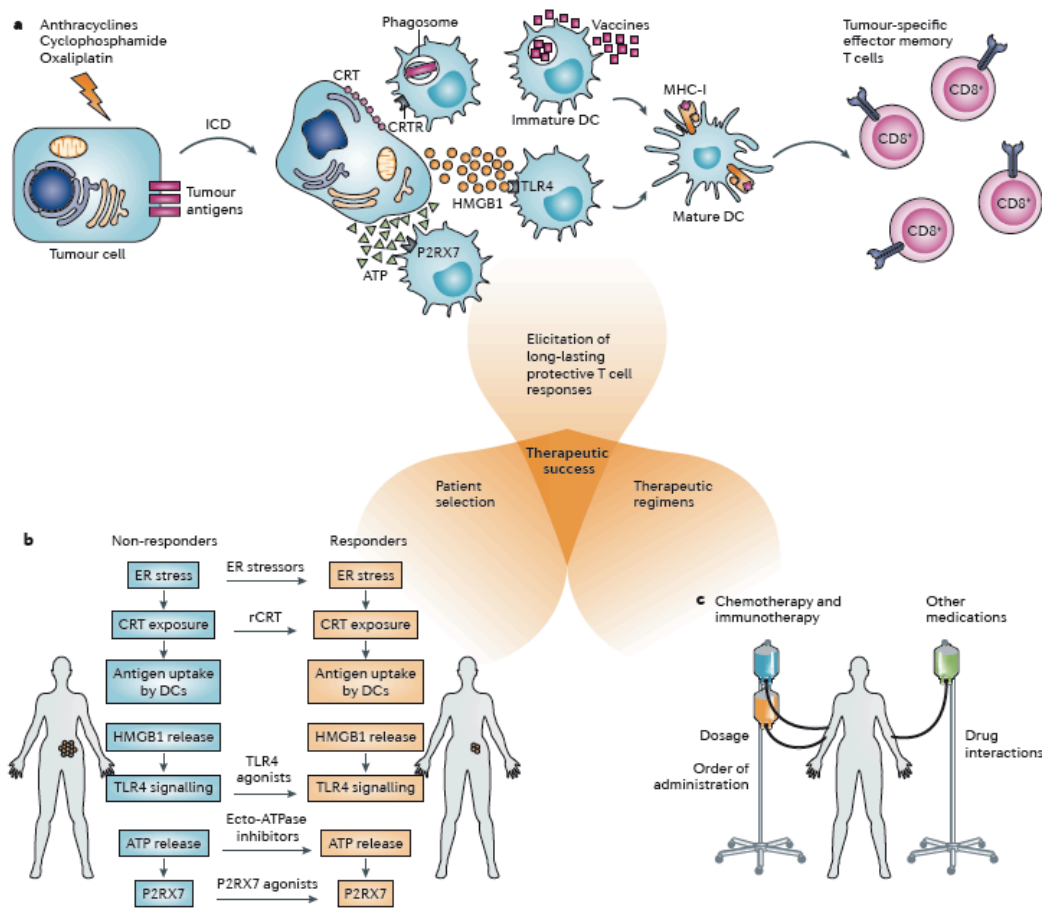


Fig. 8. Éléments nécessaires pour une chimiothérapie immunogène efficace. Thérapies ou vaccins induisant une réponse immunitaire avec des lymphocytes T mémoires-effecteurs, doivent être choisis. Seuls les patients avec une voie intacte menant à la mort cellulaire immunogène doivent être sélectionnés. Enfin, l'ordre d'administration, le dosage et les interactions médicamenteuses doivent être soigneusement définis (Galluzzi et al., 2012a).

3. Immunité anti-tumorale

En 1909, Paul Ehrlich fut le premier à émettre l'hypothèse selon laquelle le système immunitaire pouvait avoir un rôle protecteur dans le cancer. Cependant, ce n'est qu'en 1950 que cette théorie trouva de l'appui, dès lors que les outils pour étudier le système immunitaire se développèrent. Ainsi, en 1950, Brunet et Thomas suggèrent que les lymphocytes dégradent continuellement des cellules cancéreuses ou précancéreuses avant qu'elles ne puissent se développer mais les premières expériences avec des souris immunodéficientes ne furent pas convaincantes. En effet, les souris nudes CBA/H utilisées développèrent des tumeurs spontanées de la même manière que les souris sauvages (wild-type, WT) après exposition au méthylcholanthère (MCA), rejetant ainsi la théorie de l'immunosurveillance proposée (Stutman, 1974). Nous savons désormais que ces souris CBA/H expriment très fortement une isoforme de l'enzyme métabolisant le MCA, transformant celui-ci en composé carcinogène, dont l'efficacité massive a pu masquer les effets du système immunitaire. Le concept d'immunité anti-tumorale a donc été temporairement délaissé après ces premières études, pour être à nouveau d'actualité depuis une dizaine d'années.

Nous disposons dorénavant d'un panel de souris génétiquement modifiées pour être déficientes pour un ou plusieurs éléments du système immunitaire. Il a ainsi été montré que des souris déficientes pour les lymphocytes T CD8⁺, ou CD4⁺, faisant partie du système acquis de l'immunité, développent plus facilement des tumeurs que les souris WT, et il en est de même pour les souris déficientes en cellules NK (natural killer), éléments de l'immunité innée. De plus, des souris combinant une déficience en lymphocytes T et cellules NK, sont encore plus propices au développement de cancers, suggérant que l'immunité innée et adaptative contribuent toutes deux à l'immunosurveillance et à l'éradication des tumeurs (Teng et al., 2008). En effet, les cellules cancéreuses très immunogènes sont éliminées dans les hôtes immunocompétents, selon un procédé appelé immunoediting. Les cellules restantes peu immunogènes, vont alors se multiplier et générer des tumeurs solides (Smyth et al., 2006). Mais les cellules immunogènes peuvent aussi éviter l'élimination par le système immunitaire par différents moyens. En effet, elles peuvent sécréter divers facteurs immunosuppresseurs ou bien induire le recrutement de cellules inflammatoires immunosuppressives telles que les T_{regs} (Lymphocytes T régulateurs) ou les MDSCs (Myeloid derived suppressor cells). Ces cellules immunosuppressives peuvent alors supprimer l'action des lymphocytes T (Mougiakakos et al., 2010). Au vu des données accumulées, il est désormais considéré que les tumeurs sont

infiltrées par plusieurs types de cellules du système immunitaire, certaines pro- et d'autres anti-tumorales, présentes dans des proportions différentes. Les cellules inflammatoires pro-tumorales infiltrant les tumeurs peuvent comprendre certains types de macrophages, neutrophiles, lymphocytes T et B, et libèrent plusieurs cytokines ou chimiokines qui aident à l'inflammation. Ainsi ces cellules peuvent favoriser l'angiogénèse, la prolifération cancéreuse, les métastases (Coffelt et al., 2010; Mantovani et al., 2008; Murdoch et al., 2008). De plus, des progéniteurs myéloïdes partiellement différenciés ont aussi été identifiés dans les tumeurs, eux aussi ayant des activités pro-tumorales (Murdoch et al., 2008).

Cela supporte donc l'idée selon laquelle le système immunitaire joue un double rôle dans le cancer, il peut aider à détruire les cellules tumorales, avec l'aide des parties innées et adaptatives. En outre, le système immunitaire innée est impliqué dans le procédé de réparation tissulaire, permettant le nettoyage des cellules mortes mettant en jeu des cellules inflammatoires, qui lorsqu'elles sont recrutées à la tumeur, aident celle-ci à se développer.

3. 1. Effecteurs de l'immunité innée et adaptative

Le système immunitaire est un ensemble complexe de cellules et d'effecteurs qui interagissent entre eux afin de protéger l'hôte d'une agression. Il comprend une partie dite innée, qui se met en place rapidement après une infection, et fait intervenir des cellules et protéines qui vont répondre de manière non-spécifique. L'immunité innée repose sur la reconnaissance des PAMPs et DAMPS (Pathogene or damage-associated molecular patterns) par les PRR (Pattern recognition receptor), tels que les TLR (Toll-like receptor) (Chow et al., 2012). Ses effecteurs sont les protéines du complément, des protéines plasmatiques activées lors d'une cascade protéolytique et agissant en couvrant la surface des microbes, permettant ainsi leur lyse ou phagocytose. Les mastocytes ainsi que les granulocytes éosinophiles, basophiles et neutrophiles font aussi partie de la première ligne de défense de l'organisme. Ils sont caractérisés par la présence de granules dans leur cytoplasme, qu'ils déversent pour combattre les agents infectieux. De plus, les neutrophiles sont des phagocytes faisant partie des cellules inflammatoires retrouvées dans les tumeurs, et dont le rôle reste controversé (Fridlender and Albelda, 2012). Les macrophages, faisant aussi partie de l'immunité innée, sont aussi des cellules phagocytes associées aux tumeurs, et selon l'environnement tumoral, ils peuvent présenter un phénotype M1 anti-tumoral, ou M2 pro-tumoral (Sica et al., 2008). Autre type cellulaire impliqué dans l'immunité innée, les cellules NK qui peuvent sécréter de l'IFN- γ et présentent des récepteurs inhibiteurs spécifiques du CMHI. Elles peuvent ainsi

reconnaître les cellules tumorales ou infectées ayant une expression plus faible du CMHI, et les détruire (Vivier et al., 2012). Enfin, les cellules dendritiques, qui sont un lien entre le système inné et adaptatif grâce à leur fonction de cellule présentatrice d'antigène, sont capables d'activer les lymphocytes T et ainsi permettre l'induction de l'immunité adaptative (Mellman and Steinman, 2001).

Lorsque l'immunité adaptative se met en place, celle-ci va agir de manière spécifique contre l'agent étranger, et donc va répondre de façon plus lente. De plus, l'immunité adaptative permettra aussi de garder une mémoire de l'infection afin de pouvoir répondre plus rapidement lors d'un prochain contact avec le même agent infectieux. L'immunité adaptative est définie par la présence de lymphocytes B et T qui peuvent répondre à un grand nombre d'antigènes grâce à l'expression clonale d'un répertoire immense de BCRs (B cell receptor) et TCRs (T cell receptor) ayant une spécificité antigénique propre. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ et NK sont des lymphocytes cytotoxiques à l'interface entre le système inné et adaptatif (**Fig. 9**, (Dranoff, 2004)).

En 1986, Mosmann et *al.* ont décrit l'existence de deux phénotypes de lymphocyte T auxiliaire CD4⁺ (T helper, Th) : Th1 et Th2 dont la sécrétion de cytokines diffère. Les Th1 sécrètent l'IL-2, l'IFN- γ et la lymphotoxine tandis que les Th2 produisent l'IL-4, IL-5, IL-6 et permettent la prolifération des lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps (Mosmann et al., 1986).

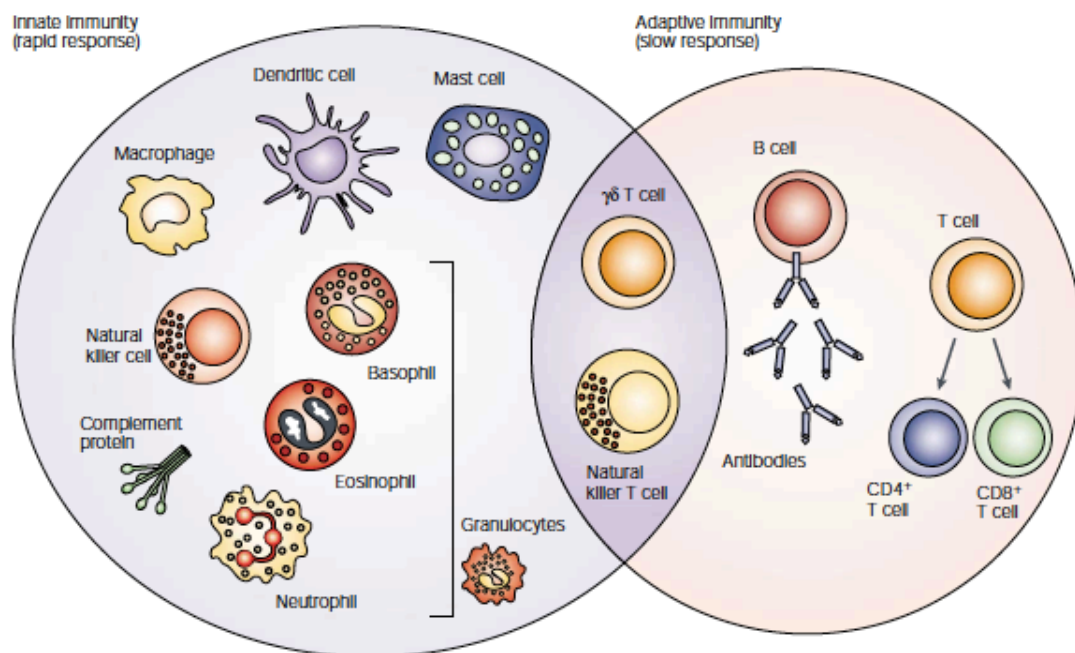


Fig. 9. Le système immunitaire inné et adaptatif. Le système immunitaire inné, mis en place rapidement après infection fait intervenir différentes populations cellulaires telles que macrophages, DCs, mastocytes, granulocytes, et protéines du complément. L'immunité adaptative en revanche est plus lente à être mise en place et mets en jeu les lymphocytes B et T. Les cellules T NK et $\gamma\delta$ sont à l'interface entre le système inné et adaptatif (Dranoff, 2004).

Parmi tous ces effecteurs du système immunitaire, les cellules dendritiques, macrophages et neutrophiles, sont les cellules d'intérêt dans cette étude, et seront donc décrites ci-dessous. De plus, un bref rappel du rôle des cytokines sera réalisé.

3.1.1. Cytokines

Les cytokines sont des facteurs solubles, généralement sécrétées par des cellules du système immunitaire, ayant un rôle important dans la différenciation, maturation et activation de différentes cellules immunes. Plusieurs cytokines sont mentionnées dans ce manuscrit, et la majorité sont répertoriées ci-dessous, afin d'avoir un aperçu sur leur rôle dans le système immunitaire.

3.1.1.1. Cytokines de l'immunité innée

Ces cytokines sont sécrétées par les cellules de l'immunité innée : macrophages, DCs, cellules NK, granulocytes.

Nom	Source	Rôle	Références
IL-1	Macrophages, cellules endothéliales	Activation des cellules endothéliales (inflammation, coagulation)	(Feldmeyer et al., 2010), (Dinarelo, 2009), (Gabay et al., 2010)
IL-18	Macrophages	Production d'IFN- γ par les LT et les NK.	(Dinarelo, 2006), (van de Veerdonk et al., 2011), (Parameswaran and Patial, 2010), (Eissner et al., 2004), (Horiuchi et al., 2010)
TNF-α	Macrophages, LT	Activation des neutrophiles. Apoptose dans plusieurs types cellulaires	(Kishimoto, 2005), (Martin and Dorf, 1991)
IL-6	Macrophages, cellules endothéliales, LT (Th2)	Prolifération de LB sécrétant des anticorps	(Doherty et al., 1996)
IL-15	Macrophages	Prolifération des cellules NK et LT	(Xu et al., 2010)
IL-12	DCs, Macrophages	Production d'IFN- γ par les LT et les NK. Différenciation en Th1. Génération de LTC.	(Xu et al., 2010)
IL-23	DCs, Macrophages	Prolifération des T CD4 ⁺ mémoire et production de IL-17 et IL-22. Expansion et maintenance des Th17.	(Xu et al., 2010)
IL-27	DCs, Macrophages	Prolifération des LT naïfs CD4 ⁺ , induction de la différenciation en Th1, génération de LTC et de T _{regs} produisant de l'IL-10. Suppression des différenciations en Th2 et Th17. Production de cytokines pro-inflammatoires	(Xu et al., 2010)
IL-10	Macrophages, LT (principalement Th2)	Inhibition de la production d'IL-12 par les macrophages, diminution de l'expression des molécules de co-stimulation et des molécules du CMHII	(Duell et al., 2012), (Bouabe, 2012), (Fiorentino et al., 1989), (Moore et al., 2001)
Chimiokines	Macrophages, LT, cellules endothéliales, fibroblastes	Chimiotaxie et activation des leucocytes	(Zlotnik and Yoshie, 2000), (Yu et al., 2012), (Moser et al., 2004)

Tableau 2. Cytokines majeures de l'immunité innée.

3.1.1.1. Cytokines de l'immunité adaptative

Ce sont les cytokines produites par les Lymphocytes T ou B.

Nom	Source	Rôle	Références
IL-2	LT	Prolifération des LT, augmentation de leur sécrétion de cytokines. Activation et prolifération des cellules NK. Prolifération et synthèse d'anticorps des LB.	(Lechner et al., 2011), (Liao et al., 2011)
IL-4	LT CD4 ⁺ (Th2)	Prolifération et différenciation des Th2. Inhibition de l'activation des macrophages par IFN- γ	(Oliphant et al., 2011)
IL-5	LT CD4 ⁺ (Th2)	Activation des éosinophiles. Prolifération des LB	(Oliphant et al., 2011)
IL-13	LT CD4 ⁺ (Th2)	Inhibition des macrophages	(Doherty et al., 1993)
IL-35	T _{regs}	Suppression du système immunitaire	(Xu et al., 2010)
IFN-γ	LT (Th1, CD8 ⁺), NK	Activation des macrophages. Différenciation des LT en Th1. Augmentation de l'expression du CMHI et II. Augmentation de l'apprêtement et la présentation des antigènes au LT.	(Schroder et al., 2004), (Boehm et al., 1997), (Zaidi and Merlino, 2011)
TGF-β	LT, macrophages	Inhibition de la prolifération et des fonctions effectrices des LT. Inhibition de la prolifération des LB. Inhibition des macrophages	(Letterio and Roberts, 1998)
Lymphotoxin	LT	Recrutement et activation des neutrophiles, genèse des organes lymphoïdes	(Ware, 2005)

Tableau 3. Cytokines majeures de l'immunité adaptative.

3.1.1. Cellules dendritiques

3.1.1.1. Fonctions

Découvertes dans les années 1970 par Ralph Steinman, les cellules dendritiques (DCs) sont les cellules ayant le potentiel le plus important de présentation d'antigène. Elles sont le lien entre l'immunité innée et adaptative grâce à leur capacité à reconnaître et présenter les antigènes sous forme de peptides couplés au CMHI ou II à plusieurs types cellulaires parmi lesquels les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ (LTc), les lymphocytes helper CD4⁺ (LTh) ou les lymphocytes B (Banchereau et al., 2000). Lorsque les DCs sont activées, elles subissent une maturation durant laquelle elles perdent leur capacité de phagocytose, et augmentent l'expression en surface des complexes peptides antigéniques-CMHI et II ainsi que des molécules de co-stimulations telles que CD40, CD80 ou CD86. Elles sécrètent aussi des cytokines pro-inflammatoires et présentent une plus grande expression de récepteurs de chimiokines, permettant leur migration dans les ganglions lymphatiques. Elles se retrouvent alors en proximité avec les lymphocytes T naïfs, et induisent ainsi une réponse immunitaire mettant en jeu les lymphocytes T (Liu, 2001).

Le rôle important des DCs dans le cancer est souligné par un certain nombre d'études qui ont montré que la présence de DCs dans les tissus tumoraux corrélait avec un bon pronostic clinique (Almand et al., 2001).

En outre, les DCs sont aussi impliquées dans la tolérance aux antigènes du soi dans le thymus. En effet, les DCs présentent les antigènes du soi couplés aux molécules du CMH, et les lymphocytes T qui ont une affinité trop importante pour ces antigènes sont éliminés lors de la sélection négative (Banchereau and Steinman, 1998).

Les DC tolérogènes sont caractérisées par une importante capacité à incorporer et présenter l'antigène aux lymphocytes T spécifiques mais n'expriment pas les marqueurs de co-stimulation nécessaires à l'activation et la prolifération des cellules T effectrices. De cela, en découle la mort des LT, leur anergie, ou encore l'induction et l'expansion des T_{regs} (Lymphocytes T régulateurs) qui ont un potentiel immunosuppresseur (Morelli and Thomson, 2007).

3.1.1.2. Origine et différenciation

Il existe plusieurs sous-populations de DCs, dont les phénotypes diffèrent entre l'Homme et la souris et ici, nous nous intéresserons aux DCs murins. Dans la moëlle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques $CD34^+$ se différencient en progéniteurs lymphoïdes (CLP, common lymphoid progenitor) et myéloïdes (CMP, common myeloid progenitor). Tandis que les progéniteurs lymphoïdes peuvent se différencier en lymphocytes T, B ou NK, les progéniteurs myéloïdes donnent naissance aux MDPs (Monocyte, macrophage, dendritic cell precursor). Ces précurseurs vont se différencier en monocytes $Ly6C^+$, ou en CDP (Common DC precursor). Ces CDPs vont alors se différencier en Pre-cDC (Pre-conventional DC), ou pDC (Plasmacytoid DC). Les Pre-cDC circulent dans le sang et entrent dans les tissus pour donner les cDC (conventional DC), dont différentes sous-populations existent selon leur expression de marqueurs membranaires distincts. En l'absence d'infection, il existe ainsi les cDC $CD8^+$, et les cDC $CD103^+$, dépendantes du facteur de transcription Batf3 (Edelson et al., 2010) ; les cDC $CD8^-$, et les $CD103^-$ (**Fig. 10**).

Dans des conditions d'inflammation, les monocytes peuvent se différencier en cellules dendritiques inflammatoires, qui peuvent sécréter du $TNF-\alpha$ (tumor necrosis factor α), de l'IL-12, et qui sont recrutées aux sites d'inflammations où elles ont la capacité de présentation d'antigène (**Fig. 10**).

Plusieurs cytokines et facteurs de transcription sont aussi impliqués dans le développement des différentes sous-populations de DCs. Ainsi, les précurseurs communs lymphoïdes ou myéloïdes auront la capacité de se différencier en pDC, $CD8^+$ ou $CD8^-$ DCs s'ils expriment le récepteur de cytokine Flt3 (fms-like tyrosine kinase 3) (D'Amico and Wu, 2003). De plus, un traitement avec le M-CSF (Macrophage colony stimulating factor), a

permet la génération de cDC et pDC *in vitro* et *in vivo*, qui présentent le récepteur au M-CSF (Fancke et al., 2008). Le niveau de GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor) n'est pas détectable dans des conditions normales, il est cependant augmenté lors d'une inflammation. Il a été montré que le GM-CSF était impliqué dans le développement des DCs inflammatoires à partir des monocytes (Varol et al., 2007). De plus, le GM-CSF pourrait aussi agir sur les progéniteurs précoces, en les engageant vers la production de monocytes et DCs inflammatoires plutôt que vers la production de DCs non inflammatoires. L'IL-6 est impliqué dans la différenciation et maturation des DCs, et un traitement à l'IL-6 permet la différenciation des monocytes en macrophages, plutôt qu'en DC inflammatoire (Chomarat et al., 2000). La lymphotoxin- β (LT β), un membre de la famille du TNF (tumor necrosis factor) a un rôle dans la croissance et la survie des DCs CD8⁻, car le nombre de ces dernières est réduit dans les rates de souris déficientes en LT β , et présentent une prolifération réduite (Kabashima et al., 2005).

Concernant les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des DCs, Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) est indispensable à la génération de DCs dans des conditions normales et pour la voie Flt3 (Laouar et al., 2003). PU.1 est quant à lui exprimé par les cDC et pDC ainsi que dans les précurseurs de DC (Schotte et al., 2004) et plusieurs membres de la famille Irf (Interferon regulatory factor) ont aussi été impliqués dans le développement de plusieurs sous-populations de DC. Ainsi, les souris déficientes en *irf2* et *irf4* ont un nombre réduit de cDC CD8⁻, et celles déficientes en *irf8* ont un nombre réduit de pDC, de DC résidentes CD8⁺ et de cellules de Langherans, sans toutefois présenter de différence pour les cDC CD8⁻ (Ichikawa et al., 2004; Schiavoni et al., 2002; Suzuki et al., 2004). De plus, RelB, un facteur de transcription de la famille NF- κ B (Nuclear factor- κ B) est requis pour la différenciation en DC CD8⁻ (Wu et al., 1998) et Id2 (Inhibitor of DNA binding 2) est impliqué dans la différenciation en cDC résidentes CD8⁺, et migratoires CD103⁺, et cellules de Langherans (Edelson et al., 2010). Batf3 (Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3) est un autre facteur de transcription important pour certaines sous-populations de DCs. Il a en effet été montré que les souris déficientes en Batf3 ne possèdent pas de cDCs CD8⁺ et CD103⁺ alors qu'elles possèdent toujours les cDCs CD8⁻ et CD11b⁺ (Edelson et al., 2010), **Fig 10**.

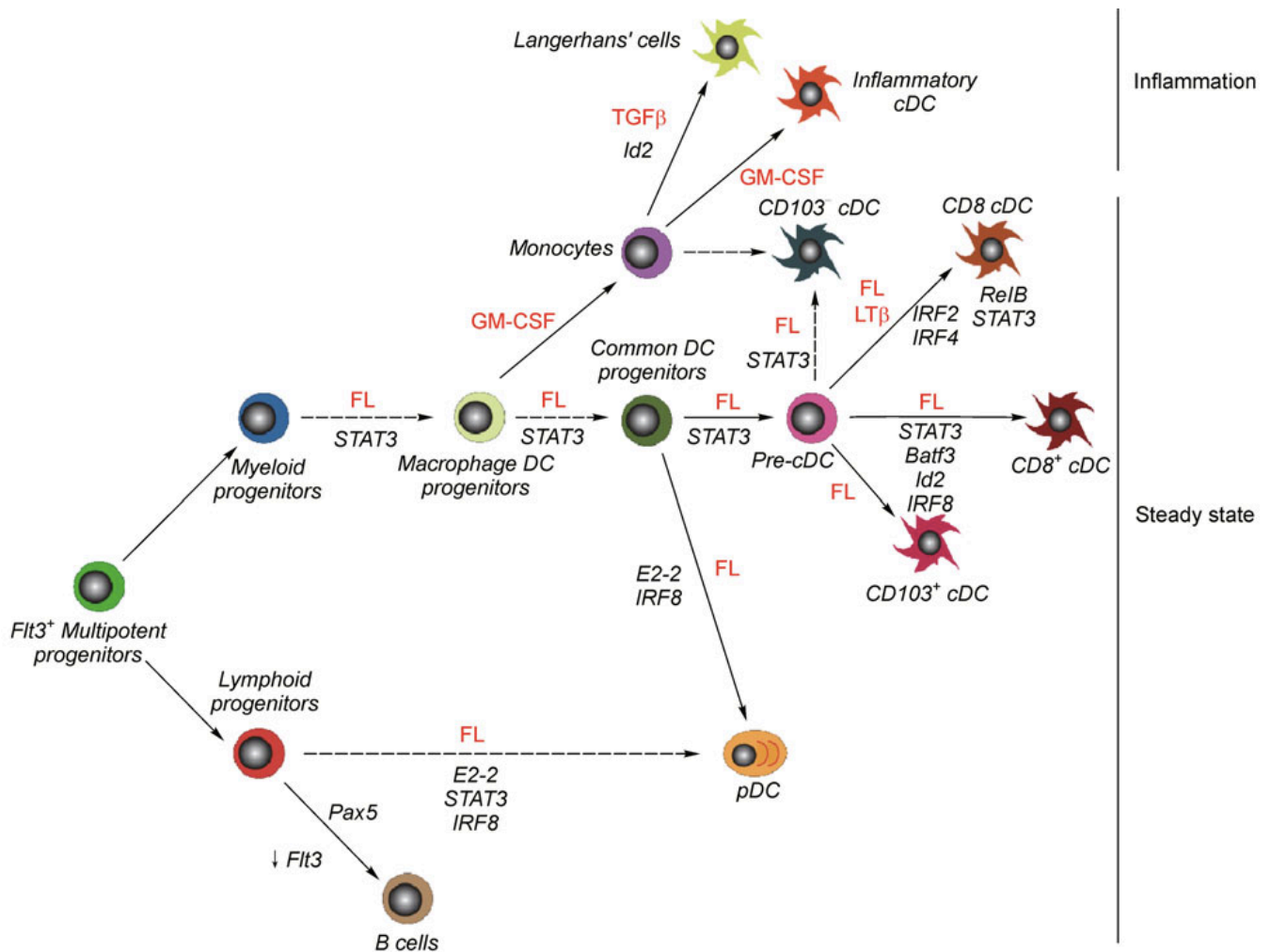


Fig. 10. Origine des différentes sous-populations de cellules dendritiques - cytokines et facteurs de transcriptions impliqués. Les progéniteurs multipotents de la moëlle ont la capacité de se différencier en plusieurs sous-populations de cellules dendritiques, après quelques précurseurs intermédiaires, dans des conditions normales ou d'inflammation. FL : Flt3 ligand, LTβ : lymphotoxin-β (Sathe and Wu, 2011).

Les monocytes, précurseurs des DCs inflammatoires, expriment le marqueur Ly6C. Lorsqu'ils sont libérés dans le sang, ces monocytes exprimant le récepteur à chimiokine CCR2 peuvent adopter un phénotype Ly6C^{mid} associé à l'expression de CCR7 et CCR8 et ils peuvent ensuite former des monocytes Ly6C⁻, caractérisés par l'expression d'un autre récepteur à chimiokine, CX₃CR1. Dans des conditions d'inflammation, les monocytes Ly6C⁺ et Ly6C^{mid} peuvent répondre au signal donné par la chimiokine CCL2 (chemokine ligand 2), et être ainsi recrutés au site d'inflammation où ils peuvent se différencier en macrophage, ou en DC (monocyte-derived DC). Dans des conditions normales, les monocytes Ly6C⁻CX₃CR1⁺ peuvent entrer dans les tissus où ils se différencient en DC ou macrophages résidants dans les tissus (**Fig. 11** (Geissmann et al., 2010; Gordon and Taylor, 2005; Yona and Jung, 2010)).

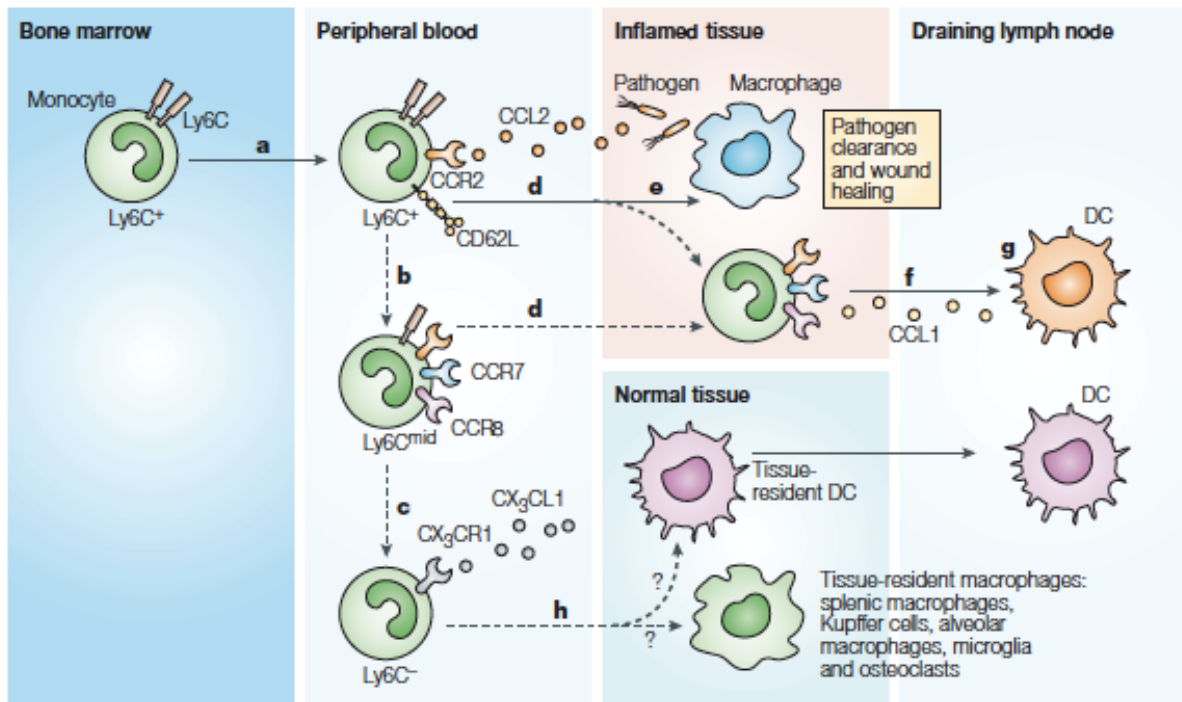


Fig. 11. Différenciation des monocytes chez la souris. Les monocytes peuvent se différencier en DC ou macrophages dans des conditions normales ou inflammatoires (Gordon and Taylor, 2005).

3.1.2. Macrophages

Les macrophages font partie du mécanisme de défense inné, fournissant une défense immédiate contre les agents pathogènes étrangers, et peuvent aussi induire une immunité spécifique *via* l'activation des lymphocytes T. Malgré cela, de nombreuses études ont montré que la présence de macrophages dans les tumeurs était associée à un mauvais pronostic, une croissance tumorale et une angiogenèse favorisée ainsi qu'une suppression du système immunitaire. Ce rôle paradoxal des macrophages dans le cancer peut s'expliquer par leur polarisation qui différencie un phénotype pro- ou anti-tumoral selon le microenvironnement tumoral. Les macrophages peuvent sécréter l'IL-12 ou l'IL-10 favorisant ainsi une réponse Th1 ou Th2 respectivement. Ils sont appelés M1 ou M2 selon le type de réponse qu'ils induisent (Allavena et al., 2008; Trinchieri, 2003).

L'activation des macrophages de type M1 se fait en réponse à des infections microbiennes ou à l'IFN- γ et se caractérise par une grande capacité à présenter l'antigène, la production importante d'IL-12 et IL-23 permettant l'activation d'une réponse polarisée de type 1, ainsi qu'une production de monoxyde d'azote (NO). Les macrophages M1 sont donc considérés comme de puissantes cellules effectrices qui peuvent tuer les microorganismes ou les cellules tumorales et produire une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires.

Les macrophages M2 quant à eux, sont activés par différents signaux comme l'IL-4, IL-13, ou l'IL-10 et peuvent induire une réponse Th2 ainsi que l'angiogenèse et la réparation tissulaire. Ces macrophages contribuent à la progression tumorale, et sont ceux appelés TAMs (Tumor-Associated Macrophages). Ils présentent une fonction immunosuppressive et leur présence dans la tumeur est associée à un mauvais pronostic (Mantovani et al., 2004; Sica et al., 2008).

Ces caractéristiques ont conduit à l'analyse des profils d'expression géniques de ces deux sous-populations de macrophages et ont donné naissance à une liste de gènes associés au profil M1 ou M2 (**Tableau 4**, (Murray and Wynn, 2011)).

Marker type	Associated signalling molecules	Gene (alternative names)	Comments
M2 markers	STAT6 phosphorylation <i>in vivo</i> and <i>ex vivo</i> without further perturbation	<i>Relma</i> (<i>Fizz1</i> , <i>Retnla</i>)	Highly induced by IL-4 and IL-13. Not expressed in humans
		<i>Socs2</i>	Highly induced by IL-4 and IL-13. Not macrophage-specific
		<i>Irf4</i>	Highly induced by IL-4 and IL-13. Not macrophage-specific
		<i>Ch1a</i> (<i>Amcase</i>)	Highly induced by IL-4 and IL-13. Not macrophage-specific
		<i>Chi3l1</i> (<i>Gp39</i> , <i>Ykl40</i>)	Highly induced by IL-4 and IL-13. Not macrophage-specific
		<i>Chi3l2</i> (<i>Ykl39</i>)	Not expressed in mice
		<i>Chi3l3</i> (<i>Ym1</i>)	Not expressed in humans. Can be highly induced by IL-4 and IL-13 in some situations
		<i>Cxcl13</i>	Chemokine linked to T _H 2 cell responses
		<i>Ccl12</i>	Chemokine linked to T _H 2 cell responses
		<i>Ccl24</i>	Chemokine linked to T _H 2 cell responses
		<i>Klf4</i>	Transcription factor induced by IL-4 in both mouse and human macrophages ¹⁷¹
M1 markers	<ul style="list-style-type: none"> • STAT3 and/or STAT1 phosphorylation <i>in vivo</i> and <i>ex vivo</i> (linked to IL-6 and IL-10 in the microenvironment) • Evidence of an interferon-γ signature • Absence of STAT6 phosphorylation <i>in vivo</i> and <i>ex vivo</i>⁸ 	<i>Marco</i>	Calmodulin-associated. Also found in other activation scenarios
		<i>Socs3</i>	Induced by IL-10, IL-6 and many other factors
		<i>Nos2</i>	Not readily expressed in human macrophages
		<i>Il12b</i>	Highly induced in M1 activation
		<i>Ptgs2</i> (<i>Cox2</i>)	Highly induced in M1 activation
		<i>Il23a</i> (<i>Il23p19</i>)	Highly induced in M1 activation
Context-dependent markers		<i>Ido1</i>	Useful marker of human and mouse exposure to type 1 and 2 interferons
		<i>Arg1</i>	Can be induced by the STAT6 or STAT3 pathways ^{172,173}
		<i>Il10</i>	Differentially produced by most, if not all macrophages ¹⁷⁴
		<i>Mrc1</i>	Linked with M2 macrophages but widely expressed on many macrophage subsets

Tableau 4 . Liste des gènes associés aux phénotypes M1 et M2 des macrophages. Afin de déterminer le phénotype des macrophages, plusieurs gènes ont été montrés comme étant spécifiques de l'une ou l'autre des populations (Murray and Wynn, 2011).

3.1.2. Neutrophiles

Les neutrophiles constituent la population leucocytaire circulante prédominante. Ils jouent un rôle dans les défenses innées de l'hôte par leur capacité à infiltrer les tissus et tuer les microorganismes envahissants en libérant des cytokines telles que le TNF- α , l'IL-1 et des IFN, ainsi que des défensines, des substances toxiques et des ROS (Reactive Oxygen Species). Plusieurs travaux les ont montrés comme étant associés aux tumeurs et leur fonction dans le microenvironnement tumoral reste encore controversé.

En analogie avec la polarisation des macrophages M1 et M2, l'existence des TANs (Tumor-Associated Neutrophils) N1 et N2, respectivement anti- et pro-tumoral, a été démontrée. Elle apparaît aussi être régulée par le microenvironnement tumoral (Fridlender et al., 2009). Ainsi, en présence de la cytokine immunosuppressive TGF- β (Transforming Growth Factor- β), les neutrophiles acquièrent un phénotype pro-tumoral N2 et cette cytokine empêche par la même occasion la génération de neutrophiles anti-tumoraux N1. En l'absence de TGF- β , les neutrophiles N1 permettent d'augmenter l'expression de cytokines et chimiokines activant le système immunitaire. Ils présentent une capacité supérieure pour tuer les cellules tumorales et peuvent également activer les lymphocytes T cytotoxiques (Fridlender et al., 2009).

3. 2. Reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire

Deux mécanismes sont impliqués dans la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Tout d'abord, les cellules du système inné utilisent des PRRs (Pattern-Recognition Receptors), ainsi que d'autres molécules de surface pour détecter les cellules tumorales. Les cellules cancéreuses expriment souvent MICA et MICB, des protéines apparentées au CMHI. Elles sont exprimées en condition de stress et sont des ligands du récepteur NKG2D exprimé par les cellules NK et certains lymphocytes cytotoxiques (Diefenbach and Raulet, 2002). Les NK repèrent aussi la perte du CMHI à la surface des cellules, fréquente dans les cas de cancer (Karre, 2002). Les cellules dendritiques peuvent phagocyter les cellules tumorales apoptotiques via CD36 et l'intégrine $\alpha\beta 5$ (Albert et al., 1998). Les DCs ainsi que les macrophages peuvent aussi reconnaître par l'intermédiaire du récepteur CD91 les peptides couplés aux protéines chaperonnes libérées par les cellules tumorales mourantes et ainsi les phagocyter (**Fig. 12a**, (Basu et al., 2001)).

Le second mécanisme fait intervenir l'immunité adaptative. La présentation croisée est la stimulation de lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ par des cellules dendritiques ayant incorporé un antigène étranger, le présentant ainsi avec le CMHI. Ce mécanisme permet la reconnaissance des cellules tumorales par l'immunité adaptative car les cellules tumorales n'expriment pas souvent les molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86 (aussi appelées B7.1 et B7.2) nécessaires à la stimulation des LTc, alors que les DCs ayant incorporé les antigènes tumoraux augmentent leur expression en CD80 et CD86 et migrent dans les ganglions lymphatiques pour stimuler les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques des antigènes tumoraux (**Fig. 12b** (Sharpe and Freeman, 2002), (Banchereau and Steinman, 1998)).

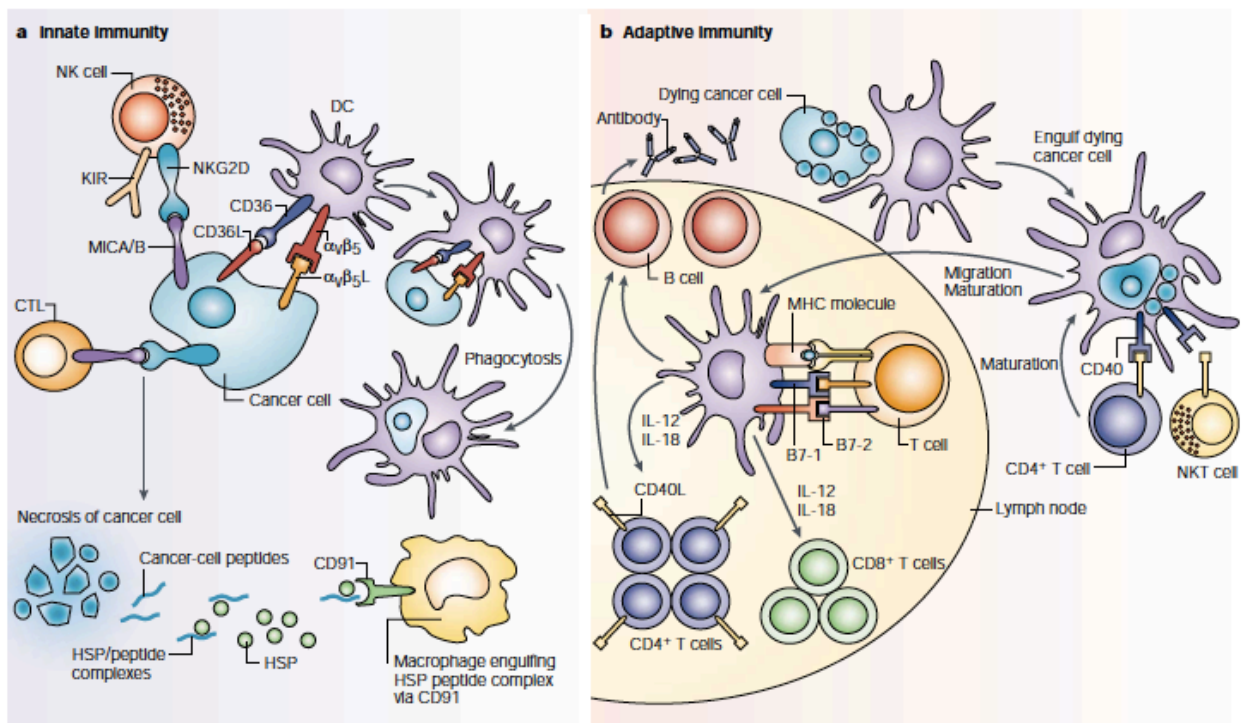


Fig. 12. Reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire inné et adaptatif. Le système immunitaire inné met en jeu les cellules NK, macrophages et cellules dendritiques pour reconnaître les cellules cancéreuses, alors que l'immunité adaptative est activée par cross-présentation grâce aux cellules dendritiques (Dranoff, 2004).

4. Immunoediting

Après l'abandon de la théorie de l'immunosurveillance dans les années 1950, une étude de 1994 par R. Schreiber montrant l'importance de l'IFN- γ dans la réjection de cellules tumorales transplantées a permis de relancer l'intérêt porté à ce domaine de recherche (Dighe et al., 1994). D'autres travaux du même laboratoire, et d'autres équipes ont par la suite appuyés ces résultats, notamment la découverte selon laquelle les souris déficientes pour une réponse à l'IFN- γ ou pour des effecteurs de l'immunité adaptative (lymphocytes T et B, cellules NK) étaient plus susceptibles de développer des tumeurs spontanées ou induites par des carcinogènes (Girardi et al., 2001; Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001; Smyth et al., 2000b; Street et al., 2002).

Le concept d'immunoediting résulte ainsi de ces différentes études sur l'importance du système immunitaire dans la protection contre le cancer. De plus, des expériences ont montré que les cellules tumorales induites par un carcinogène et provenant de souris immunocompétentes, peuvent former des tumeurs sur des souris immunodéficientes et sur des souris naïves syngéniques. Ainsi, cette tumeur qui s'est formée en premier lieu dans une souris avec un système immunitaire intact a été « éditée », elle est moins immunogène et a échappé au contrôle du système immunitaire. Cependant, lorsque la même expérience a été réalisée avec des souris immunodéficientes traitées avec un carcinogène et dont les cellules tumorales ont ensuite été transplantées sur des souris immunocompétentes, seulement la moitié des souris recevant ces cellules ont développé des tumeurs. Ces tumeurs sont dites « non-éditées », et sont plus immunogènes (**Fig. 13**, (Shankaran et al., 2001), (Schreiber et al., 2011)).

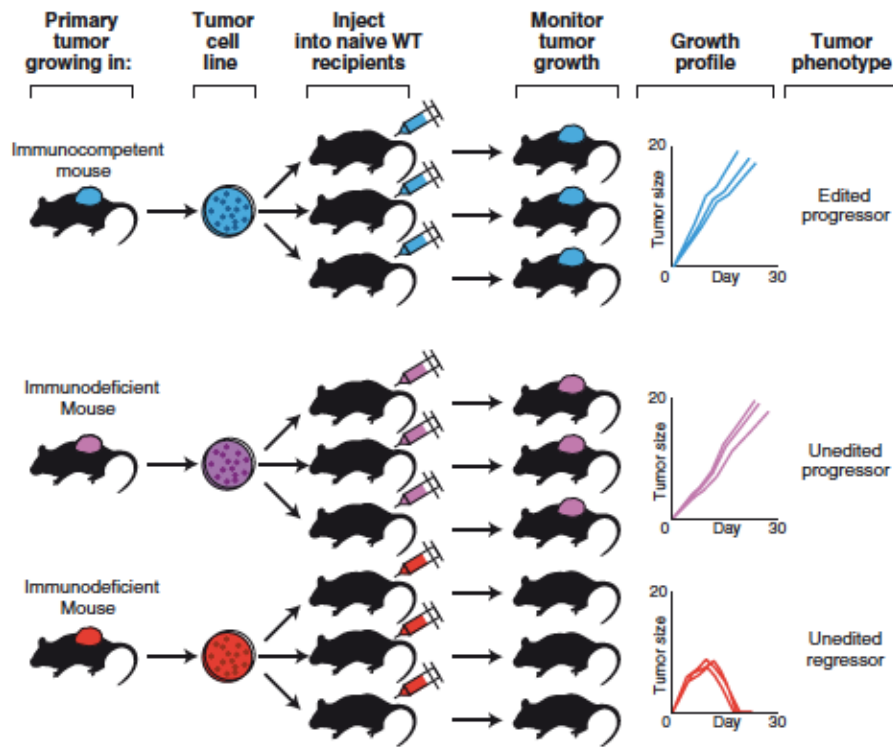


Fig. 13. Découverte du concept d'immunoediting. Les tumeurs se développant sur des souris immunocompétentes ou immunodéficientes sont différentes. Alors que les tumeurs se développant sur des souris avec un système immunitaire intact sont éditées, et ont déjà échappé au système immunitaire, les tumeurs se développant sur des souris immunodéficientes sont dites non-éduitées et sont plus immunogènes (Schreiber et al., 2011).

L'immunoediting consiste en trois phases successives appelées élimination, équilibre et échappement. Cependant il peut aussi arriver qu'une tumeur entre directement en phase d'équilibre ou d'échappement sans passer par la phase d'élimination (Fig. 14).

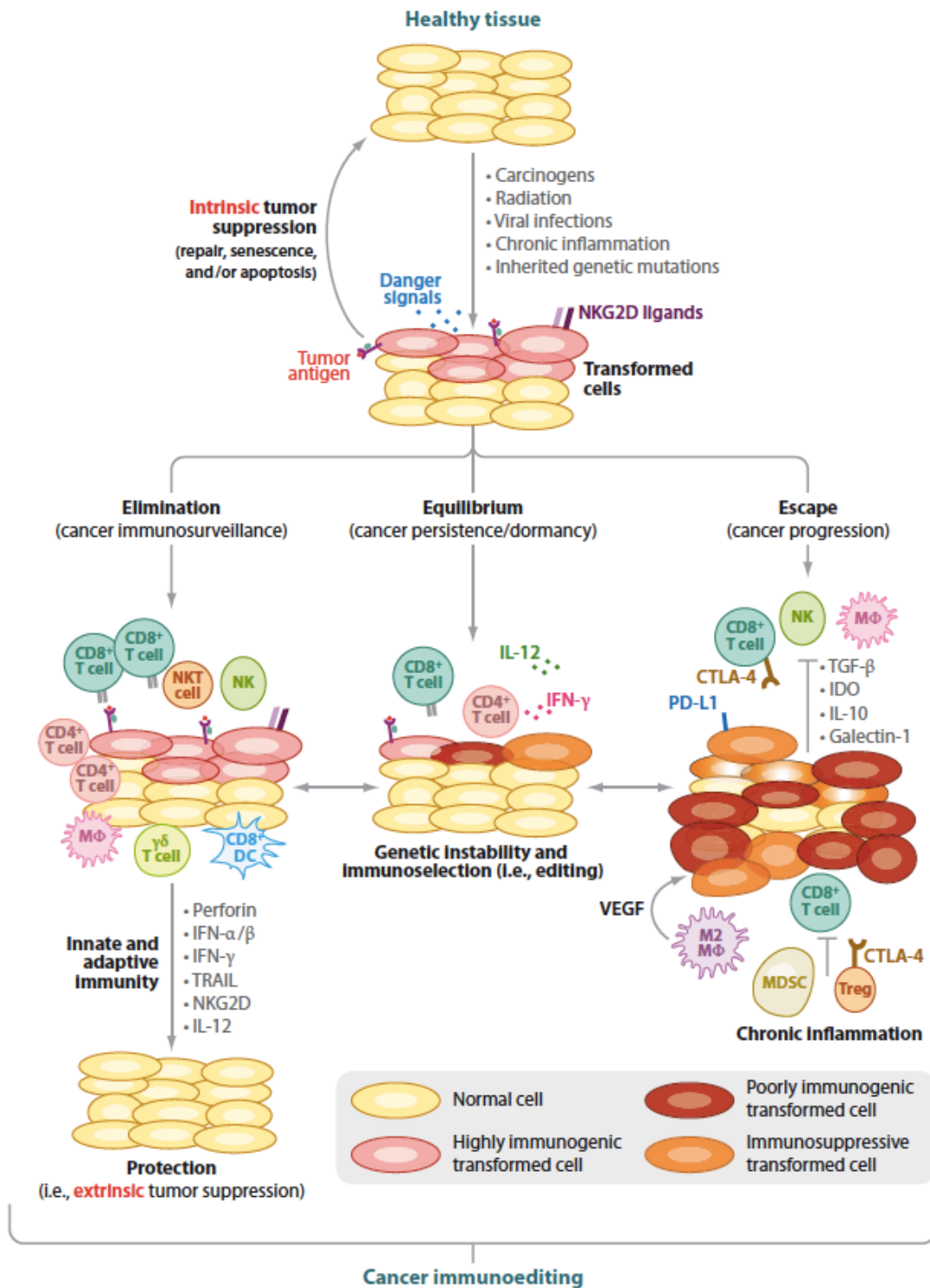


Fig. 14. Immunoediting. Trois phases caractérisent le procédé d'immunoediting: une phase d'élimination, correspondant à la surveillance anti-tumorale, une phase d'équilibre, lorsque les cellules cancéreuses sont en phase de latence, et une phase dite d'échappement, qui correspond au développement de la tumeur (Vesely et al., 2011).

4.1. Elimination

La phase d'élimination correspond en fait au concept d'immunosurveillance. Le système immunitaire inné et adaptatif, avec l'intervention de leurs effecteurs, détectent les cellules tumorales et permettent leur destruction, bien avant qu'elles deviennent cliniquement détectables. L'importance du système immunitaire dans l'élimination des cellules tumorales a été évaluée grâce à un panel de souris déficientes pour un ou plusieurs effecteurs de l'immunité innée ou adaptative, ou grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisant ces derniers. Ainsi, les souris déficientes pour les lymphocytes T, B, et NK telles que les *Rag1^{-/-}*, *Rag2^{-/-}*, SCID (severe combined immunodeficient), et nude ont toutes montré une augmentation dans l'incidence des tumeurs après exposition au carcinogène MCA (Methylcholanthrene) (Engel et al., 1997; Smyth et al., 2001). De la même façon, les cellules T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ sont importantes pour l'élimination des tumeurs induites par le MCA (Girardi et al., 2003). En ce qui concerne les cellules de l'immunité innée, les NK et éosinophiles présentent également un rôle dans la surveillance immunitaire (Simson et al., 2007; Smyth et al., 2001).

Plusieurs autres souris déficientes pour des molécules effectrices du système immunitaire ont aussi été utilisées, et ont permis de montrer leur importance dans l'élimination des tumeurs induites par le MCA : perforin, IFN- γ , IFNAR1 et 2 (IFN α and β receptors), TRAIL, IL-12 et TNF- α (**Fig. 14**, (Cretney et al., 2002; Kaplan et al., 1998; Smyth et al., 2000a; Street et al., 2001)).

4.2. Equilibre

Si les tumeurs ne sont pas détruites par le système immunitaire durant la phase d'élimination, elles entrent alors en phase d'équilibre ou de latence. Dans cette phase, le système immunitaire empêche la croissance de la tumeur mais ne permet pas son éradication. Les cellules tumorales constituent une population hétérogène, certaines cellules ayant échappé à la reconnaissance et à la destruction par le système immunitaire. Cette phase d'« editing » est la plus longue et correspondrait au temps nécessaire à la tumeur pour être cliniquement détectable. Cette phase a été expérimentalement démontrée grâce à l'utilisation de petites quantités de MCA, avec seulement quelques souris ayant développé des tumeurs. Les souris sans tumeurs ont ensuite subi une déplétion des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ainsi qu'une neutralisation de l'IFN- γ , et la moitié ont développé des tumeurs à l'endroit du traitement antérieur au MCA. Ces cellules de l'immunité acquise ont été montrées responsables de la croissance des cellules cancéreuses latentes. Cependant, aucune cellule de l'immunité innée

n'a montré une capacité similaire. Ainsi, seule l'immunité acquise a un rôle dans le maintien de la phase d'équilibre (**Fig. 14**, (Koebel et al., 2007)).

4.3. Echappement

Lors de la phase d'échappement, les cellules tumorales peu immunogènes ayant réussi à échapper au contrôle du système immunitaire et donc à la destruction, vont se développer jusqu'à devenir visibles. Les cellules cancéreuses mettent en place plusieurs mécanismes afin d'échapper au système immunitaire. Elles peuvent par exemple, sur-exprimer des inhibiteurs de l'apoptose tel que Bcl-XL, ou exprimer PD-L1 (programmed cell death ligand 1) ou FasL, des protéines transmembranaires qui permettent de tuer les lymphocytes T cytotoxiques. Les cellules tumorales peuvent également produire des protéines inhibant la fonction des cellules immunitaires effectrices comme le TGF- β , l'IL-10, le VEGF (Vascular endothelial growth factor), ou encore recruter des cellules immunitaires immunosuppressives, qui vont permettre l'établissement d'un microenvironnement immunosuppresseur dû à la production entre autres de GM-CSF, IL-1 β , IL-4 ou IL-13. Ces deux dernières cytokines sont d'ailleurs responsables de la polarisation des précurseurs myéloïdes en macrophages de type M2 qui produisent du TGF- β , IL-10 et PDGF (Platelet-derived growth factor) inhibant les lymphocytes T. Ces derniers sont aussi inhibés par les MDSCs, accumulées au niveau de la tumeur après la sécrétion de cytokines immunosuppressives (**Fig. 14 et 15** (Vesely et al., 2011)).

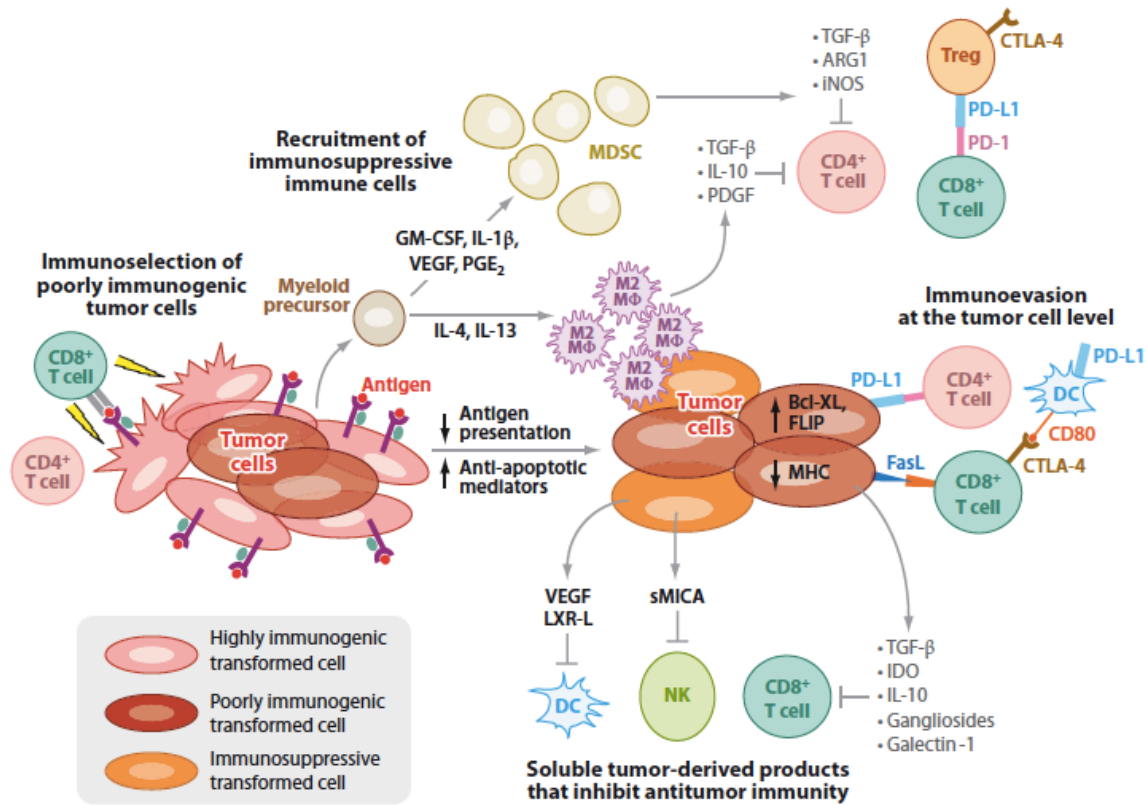


Fig. 15. Mécanismes d'échappement tumoral. Plusieurs mécanismes sont développés pour permettre à la tumeur d'échapper au système immunitaire. Parmi ceux-ci, les cellules tumorales peuvent sécréter des cytokines permettant la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur propice à l'accumulation de MDSC, ou macrophages de type M2, qui inhibent les lymphocytes effecteurs. (Vesely et al., 2011)

5. Inflammation et microenvironnement tumoral immunosuppresseur

L'inflammation fonctionne dans l'homéostasie suite à une infection ou à un dommage tissulaire, et consiste en l'infiltration de leucocytes sur le site inflammatoire. Cependant, dès 1863, après avoir observé une infiltration leucocytaire dans les tumeurs, Rudolf Virchow montra la première indication d'un lien entre l'inflammation et le cancer. Ce n'est toutefois que durant la dernière décennie que cette hypothèse s'est confirmée, avec des preuves claires du rôle de l'inflammation durant le procédé de tumorigenèse. En effet, l'inflammation peut contribuer à l'initiation du cancer, par la génération de stress génotoxique. Elle peut aussi induire la prolifération cellulaire, ou augmenter l'angiogenèse et l'invasion tissulaire (Grivennikov et al., 2010). La réponse inflammatoire développée suite à un cancer permet de construire un microenvironnement pro-tumoral (Mantovani et al., 2008) mais il semblerait que l'immunosurveillance avec l'immunité innée et adaptative peuvent co-exister dans ce même microenvironnement tumoral inflammé (Swann et al., 2008).

En outre, l'inflammation chronique prédispose les personnes à une variété de cancers et il est estimé qu'une réponse inflammatoire est liée à environ 20% des décès du cancer dans le monde (Balkwill and Mantovani, 2001). Plusieurs facteurs peuvent déclencher une inflammation chronique parmi lesquels les infections microbiennes (l'infection avec *Helicobacter pylori* est associée avec le cancer gastrique), les maladies auto-immunes (les maladies inflammatoires chroniques intestinales sont associées au cancer du côlon), ainsi que les autres conditions inflammatoires telle que la prostatite qui est associée avec le cancer de la prostate (Mantovani et al., 2008).

La nature de l'infiltration leucocytaire est différente selon que ces cellules sont attirées par une inflammation chronique ou l'immunosurveillance. Le microenvironnement inflammatoire tumoral est caractérisé par la présence de cellules inflammatoires ainsi que de médiateurs inflammatoires tels que chimiokines, cytokines. Les macrophages de type M2, les MDSCs (Myeloid-derived suppressor cells), neutrophiles ou encore les Tregs Foxp3⁺CD4⁺, sont des cellules inflammatoires présentes dans les tumeurs et induisant une croissance de ces dernières (Fridman et al., 2011). Les macrophages et neutrophiles ayant été présentés plus haut, seuls les MDSCs et Treg seront détaillés ci-dessous.

5.1. MDSC (Myeloid-derived suppressor cells)

Les MDSCs sont un groupe de cellules myéloïdes comprenant des précurseurs de macrophages, granulocytes et cellules dendritiques à un stade plus précoce de différenciation. A travers un certain nombre de facteurs sécrétés par les tumeurs tels que IL-6, IL-10, GM-CSF, M-CSF ou VEGF, les cellules immatures myéloïdes se différencient en MDSCs. Ces dernières ont un rôle immunosuppresseur (Rabinovich et al., 2007). Chez la souris, cette population de cellules est définie de façon large comme Gr-1⁺CD11b⁺, et est présente dans la moëlle osseuse et la rate. Les MDSCs peuvent se différencier en cellules myéloïdes matures telles que macrophages, granulocytes et DCs. Elles ont également été décrites chez les patients atteints de cancer et peuvent inhiber la réponse anti-tumorale médiée par les lymphocytes T (Almand et al., 2001; Gallina et al., 2006). De plus, parmi des patients ayant atteint le stade le plus avancé, ceux présentant des métastases importantes ont montré le plus grand pourcentage en MDSCs (Diaz-Montero et al., 2009).

Cette population de cellules hétérogènes reste difficile à caractériser car elle est composée de cellules myéloïdes immatures à différents stades de différenciation, et ces dernières sont produites en réponse à des facteurs dérivés des tumeurs, ces facteurs étant spécifiques à chacune de ces tumeurs. Cela peut expliquer les résultats contradictoires des phénotypes décrits dans différentes études. L'antigène Gr-1 consiste en deux épitopes reconnus par les anticorps anti-Ly6G et anti-Ly6C. Ainsi, ces cellules Gr-1⁺CD11b⁺ sont constituées de deux sous-populations: des cellules avec un phénotype granulocytaire, exprimant le marqueur Ly6G et des cellules ayant un phénotype monocytaire exprimant Ly6C. De plus, il est possible de différencier les cellules exprimant fortement ou faiblement Ly6C (Ly6C^{high} ou Ly6C^{low}). Ces différentes sous-populations ont des fonctions différentes dans le cancer (Movahedi et al., 2008). Une étude ayant cherché à analyser quelle sous-population de cellules MDSCs était retrouvée dans un panel de modèles de tumeurs, a identifié les cellules de phénotype granulocytaire CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{low} comme étant celles présentes dans le plus grand nombre de tumeurs (Youn et al., 2008).

5.2. Foxp3⁺ T_{reg}, cellules Th17

Les cellules T_{regs} sont positives pour les marqueurs de surface CD4, CD25 (le récepteur de l'IL-2) et un marqueur intracellulaire, le facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3). Les cellules T_{regs} ont un rôle dans le maintien de la tolérance du soi et de l'homéostasie en réprimant des réponses immunitaires physiologiques et pathologiques contre le soi et le non-soi et régulent l'immunité en réponse à une infection virale, bactérienne ou parasitaire (Sakaguchi, 2004). Elles peuvent aussi freiner les réponses immunitaires dirigées contre les tumeurs ou les tissus transplantés (Nishikawa and Sakaguchi, 2010). Il semblerait que les T_{regs} FoxP3⁺ exercent leur fonction de suppression par un contact direct avec les DCs et lymphocytes T effecteurs (Tadokoro et al., 2006), *via* par exemple TGF- β , CTLA-4 ou encore perforin/granzyme (Cao et al., 2007; Nakamura et al., 2001; Wing et al., 2008). CTLA-4, exprimé par les T_{regs}, est un ligand pour les molécules de costimulation CD80 et CD86, présentes sur les DCs. Les T_{regs} FoxP3⁺ peuvent aussi sécréter des cytokines immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF- β , et l'IL-35 (Collison et al., 2009).

Les cellules Th17 sont une sous-population de lymphocytes T helper, différentes des cellules Th1 et Th2, produisant de l'IL-17, IL-22 et IL-23, cette dernière cytokine stabilisant le phénotype Th17. Les cellules T naïves sont polarisées en Th17 après exposition au TGF- β , IL-6 ou IL-21. L'IL-17 est une cytokine pro-inflammatoire qui agit sur les cellules stromales, épithéliales et endothéliales ainsi que sur certains monocytes afin d'induire la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires tels que IL-8, CXCL1, TNF et G-CSF (Kastelein et al., 2007). Les cellules Th17 sont capables d'induire l'angiogenèse, de recruter des cellules inflammatoires et d'activer des facteurs de transcription pro-tumoraux. Cependant, quelques études ont montré leur rôle anti-tumoral, celui-ci dépendant de l'IFN- γ (Hinrichs et al., 2009; Muranski et al., 2008). En effet, l'IL-17 sécrétée par les Th17 ainsi que l'IFN- γ peuvent induire la sécrétion de CXCL9 et CXCL10 par les cellules tumorales, qui attirent les cellules T effectrices à la tumeur (Kryczek et al., 2009).

Conclusion Parties 3 à 5

Le microenvironnement tumoral, plus complexe qu'initialement pensé, comprend plusieurs types cellulaires qui interagissent avec les cellules cancéreuses. Parmi ces types cellulaires, on peut trouver des cellules du système immunitaire infiltrant ces tumeurs, et dont le rôle peut être contradictoire selon le contexte et les cytokines sécrétées. D'autres cellules participent aussi à la formation du microenvironnement tumoral parmi lesquels des péricytes, des cellules endothéliales participant à l'angiogenèse, des cellules fibroblastiques jouant un rôle de soutien pour les cancéreuses (**Fig. 16**, (Hanahan and Coussens, 2012)).

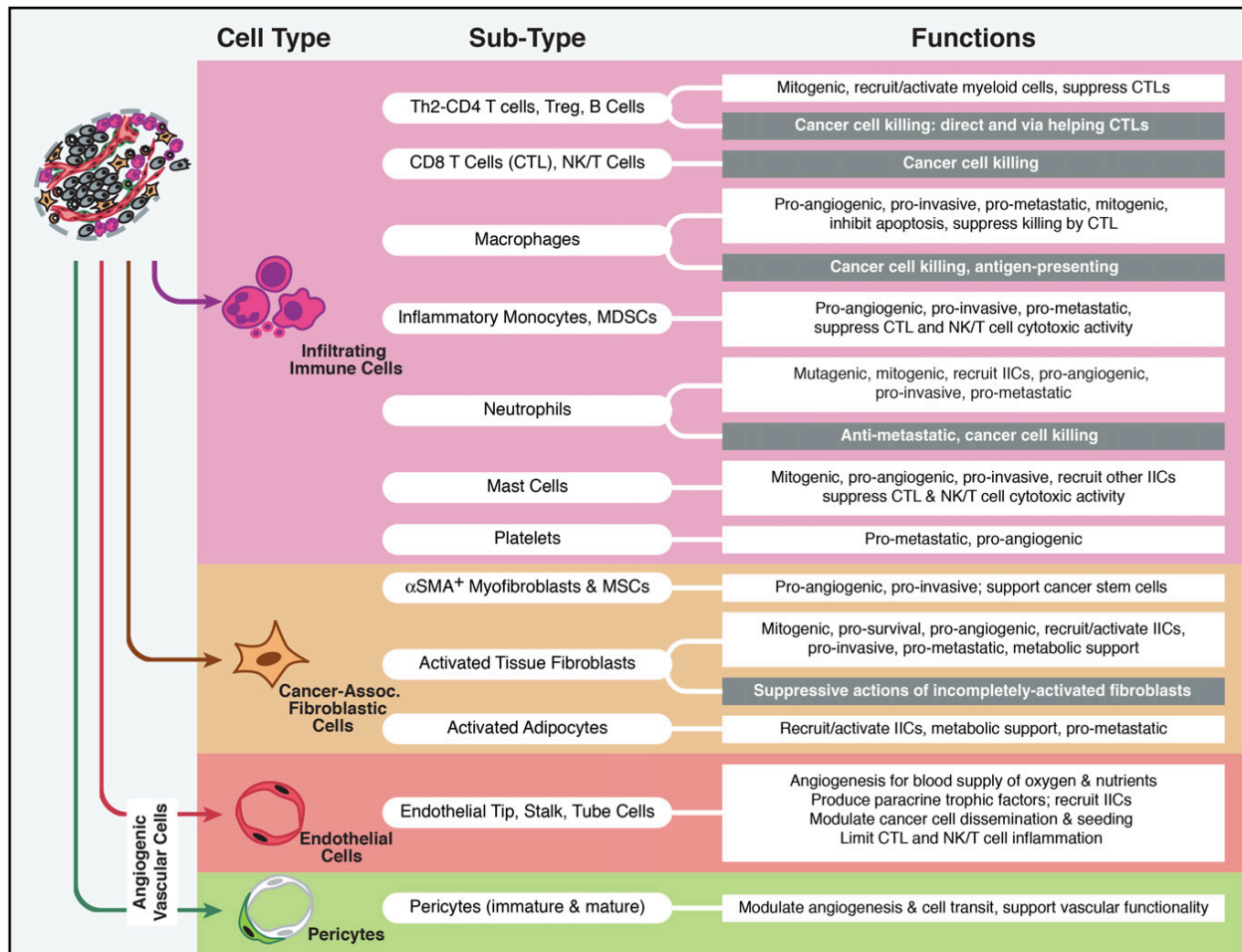


Fig.16. Un microenvironnement tumoral complexe. Le microenvironnement tumoral comprend plusieurs types de cellules parmi lesquels des cellules du système immunitaire, des fibroblastes, péricytes et des cellules endothéliales qui peuvent permettre soit le développement des cellules cancéreuses, soit leur destruction. α SMA, alpha smooth muscle actin; MSCs, mesenchymal stem cells (Hanahan and Coussens, 2012).

6. Objectifs de l'étude

La mort cellulaire immunogène est un concept important dont l'étude des mécanismes est nécessaire afin d'améliorer les traitements actuels du cancer.

Les recherches menées par notre laboratoire ont permis de caractériser l'émission de trois signaux de danger nécessaires afin d'induire une stimulation du système immunitaire. L'exposition de la calréticuline sert de signal de phagocytose pour les cellules dendritiques, la libération d'HMGB1 et sa liaison à TLR4 sur les cellules dendritiques permet de faciliter l'apprêtement et la présentation des antigènes tumoraux (Obeid et al., 2007), (Apetoh et al., 2007). La libération d'ATP qui agit sur P2RX7 permet l'activation de l'inflammasome conduisant à la libération d'IL-1 β (Ghiringhelli et al., 2009). De plus, nous savons quels effecteurs de l'immunité adaptative interviennent dans les tumeurs après traitement aux anthracyclines et participent à leur effet thérapeutique. En effet, les cellules T $\gamma\delta$ produisant de l'IL-17 infiltrent les tumeurs trois jours après le traitement aux anthracyclines et précèdent l'arrivée des cellules T CD8⁺ sécrétant de l'IFN- γ (Ma et al., 2011b).

Pour compléter ces travaux, nous avons caractérisé les effecteurs de l'immunité innée participant à la réponse aux anthracyclines et évalué leur contribution à la présentation des antigènes aux lymphocytes T.

En outre, il a été montré que l'ATP est impliqué dans le recrutement et la différenciation de cellules du système immunitaire (Elliott et al., 2009), (Barbosa et al., 2011).

Nous avons aussi étudié le rôle de l'ATP dans le recrutement et la différenciation des cellules de l'immunité innée retrouvées dans les tumeurs après chimiothérapie immunogène.

L'autophagie est un autre axe important de recherche dans notre laboratoire, qui a participé à l'avancée des découvertes dans ce domaine. Désormais considéré comme un mécanisme de survie cellulaire, ce processus de dégradation permet de limiter l'instabilité génomique lors de la formation des tumeurs, mais participe aussi à la croissance tumorale lors d'un stade plus avancé. L'autophagie peut être induite suite à un stress du réticulum endoplasmique. Nous savons que les chimiothérapies immunogènes induisent un stress du ER, permettant ainsi l'exposition à la membrane de la calréticuline.

Nous avons donc voulu évaluer le rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire immunogène.

MATERIEL ET METHODES

Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires suivantes ont été cultivées dans du milieu RPMI 1640 : fibrosarcome murin MCA205 sauvages et exprimant OVA, lymphome de souris EL4 (syngénique pour les souris C57BL/6), carcinome mammaire H2N100 et AT3, carcinome de colon murin CT26 (syngénique pour les souris BALB/c), et leurs dérivés (SCR, Atg7KD, Atg5KD, CD39⁺, MyrPalm-GFP). Les cellules d'ostéosarcome humain U2OS et leurs dérivés ont été cultivés dans du DMEM. Tous les milieux ont été complétés avec 10% de sérum de veau fœtal, 1mM de pyruvate de sodium, 10mM de tampon HEPES, 1% d'acides aminés non essentiels, 100 unités/mL pénicilline G et 100 µg/mL streptomycine. Toutes les lignées ont été cultivées à 37°C, avec 5% de CO₂.

ARN interférence

Les siRNA (small-interfering RNA) contrôles ou spécifiques pour les protéines d'intérêt proviennent de chez Sigma-ProLigo (The Woodlands, TX, USA).

Leurs séquences sont :

murine Atg3 (sense 5'-CAUAUCUCCGACAGACAdTdT-3')

murine Atg5 (sense 5'-CAUCAACCGGAAACUCAUdTdT-3')

murine Atg7 (sense 5'-AGUUUCCAGUCCGUUGAAdTdT-3')

murine Atg10 (sense 5'-CUAAAGAAUUCACAGAAAdTdT-3')

human ATG5 (sense 5'-CCUUUGGCCUAAGAAGAAATdTdT-3')

human ATG7 (sense 5'-CGACUUGUCCUUACGGAATdTdT-3')

human BCN1 (sense 5'-CAGUGGAUCUAAAUCUCAATdTdT-3')

Un siRNA spécifique pour Beclin-1 murin provient de chez Santa Cruz Biotechnology (BCN1, sc-29798).

Les cellules CT26, MCA205 et U2OS ont été transfectées avec 100 nM de siRNA, grâce au réactif de transfection HiPerfect (Qiagen) selon les indications du fabricant.

Induction de la mort cellulaire

Les cellules CT26 ou MCA205 (5x10⁵) ont été traitées aux concentrations indiquées pendant 18h puis analysées par cytométrie de flux pour quantifier les cellules ayant incorporé

l'iodure de propidium et/ou ayant externalisé la phosphatidylsérine, grâce à un kit FITC-conjugated AnnexinV (BD Biosciences), selon les instructions du fabricant.

Quantification de la libération d'ATP *in vitro*

Les concentrations d'ATP extra et intra cellulaire ont été mesurées à l'aide des kits ENLITEN ATP Assay (Promega) et ATP assay (Calbiochem), respectivement. Ces kits sont basés sur l'utilisation de luciférine, qui en présence d'ATP (facteur limitant) et de luciférase va émettre une lumière mesurable avec un luminomètre Fluostar.

Microscopie automatisée à haut débit pour la détection d'autophagie

Les cellules U2OS exprimant LC3-GFP ont été traitées aux concentrations indiquées pendant 6 ou 48 h, puis fixées pendant 20 minutes avec 4% de formaldéhyde contenant 10 μ M de Hoechst 33342, avant d'être lavées au PBS. Dans d'autres expériences, les cellules CT26 ou MCA205 ont été traitées aux concentrations indiquées pendant 24h puis fixées et lavées dans les mêmes conditions que précédemment, avant d'être incubées avec un anticorps primaire anti-LC3B (M152-3, Abcam), et un anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (Invitrogen). Pour chaque puits, 4 images ont été réalisées à l'aide d'un microscope automatisé BD pathway 855. Les images ont ensuite été segmentées et la quantification de vacuoles de LC3-GFP a été réalisée avec le logiciel BD AttoVision.

Détection de la libération d'HMGB1

Les cellules MCA205 ont été traitées pendant 24h aux concentrations indiquées. Les surnageants des cultures ont été récupérés, avant d'être centrifugés et gardés à -80°C ou analysés immédiatement. La quantification d'HMGB1 dans le surnageant a été réalisée à l'aide d'un kit ELISA (HMGB1 ELISA kit II, Gentaur Europe), selon les recommandations du fabricant.

Expérimentation sur les animaux

Les animaux ont été maintenus dans des conditions contrôlées sans pathogènes à l'Institut Gustave Roussy (IGR, Villejuif, France), suivant les recommandations de la FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Association) ou au Peter MacCallum Cancer Center (East Melbourne, Australie). Les expériences animales ont été approuvées par le comité d'éthique de l'IGR (CEEA IRCIV/IGR n°26, enregistré au Ministère de la Recherche français) ou par le comité d'éthique du Peter MacCallum Center. Des souris

femelles âgées de 6 à 14 semaines ont été utilisées et euthanasiées lorsque leur tumeur dépassait 20-25% de leur poids. Les souris BALB/c (H2d), C57BL/6 (H2b) et les souris transgéniques OT1 présentant un TCR spécifique de l'Ovalbumine (OVA) (H2b), ont été fournies par Janvier (Le Genest St Isle, France), Harlan (Gannat, France) ou Charles River (Wilmington, MA, USA). Les souris Batf3^{-/-} ont été généreusement fournies par Kenneth Murphy (Washington University School of Medicine, St Louis, MO, USA). Les souris C57BL/6 exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur CD11c ont été obtenues chez le European Mouse Mutant Archive (Munich, Allemagne), et élevées au CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal, Orléans, France).

Libération d'ATP *in vivo* en temps réel

Des cellules CT26 exprimant de façon stable pmeLUC (5 x 10⁵) ont été injectées en sous-cutané dans le flanc de souris BALB/c. Lorsque les tumeurs ont atteint une taille de 25-40 mm², les souris ont reçu du PBS ou 5,17 mg/kg de mitoxantrone en i.p. (intra-péritonéal), ou encore 5,17 mg/kg de mitoxantrone en i.p. en combinaison avec 1,6 mg/kg d'ARL67156 en i.t. (intra-tumoral). Immédiatement ou 48h après, les souris ont été anesthésiées et ont reçu 150 mg/kg de D-luciferin en i.p. 15 min avant l'acquisition avec une caméra Lumina à grande sensibilité CCD IVIS. La luminescence a été quantifiée avec le logiciel Living ImageH.

Chimiothérapies sur tumeurs établies

Pour chaque lignée cellulaire, 2-10x10⁵ cellules ont été injectées en sous-cutanée dans 100 µL de PBS, dans le flanc droit de la souris. Lorsque la tumeur atteint une taille palpable, les souris sont traitées avec 200 µL de solution à 1 mM de mitoxantrone en i.p., ou 50 µL d'une solution à 4 mM de doxorubicine en i.t.. D'autres souris ont reçu 5 mg/kg d'oxaliplatine dans 200 µL de PBS en i.p.. Le traitement par la suramine (100 mg/kg dans 40 µL de PBS) a été effectué en intraveineux le même jour que la chimiothérapie. Certaines souris ont reçu un anticorps anti-CD11b (clone 5C6, 12,5 mg/kg, jour -1, 0 et chaque semaine, fourni par Mark J. Smyth, Peter MacCallum Cancer Center, Australie), ou un anticorps anti-PDCA-1 (clone JF05-1C2.4.1, Miltenyi Biotec), un anticorps anti-IL-7 (clone M25, BioXcell), un anticorps anti-IL-7R (clone A7R34, BioXCell), ou encore la protéine de fusion LTβR-Fc. La croissance des tumeurs a été mesurée trois fois par semaine avec l'aide d'un caliper.

Vaccination anti-tumorale

Les cellules MCA205 ont été traitées par 1 μM de mitoxantrone pendant 24h, puis injectées en sous cutanée (3×10^5 dans 100 μL de PBS) dans le flanc gauche des souris C57BL/6. Sept jours plus tard, 3×10^4 cellules MCA205 vivantes ont été inoculées en sous cutanée dans le flanc opposé de ces souris.

Les cellules CT26 ont été traitées par 2 μM de mitoxantrone pendant 24h puis injectées en sous cutanée ($2,5 \times 10^6$ dans 100 μL de PBS) dans le flanc gauche de souris BALB/c. Sept jours plus tard, 3×10^5 cellules CT26 vivantes ont été inoculées en sous cutanée dans le flanc opposé de ces souris.

Lors de certaines expériences, le traitement à la mitoxantrone a été combiné avec 20 μM d'hydroxychloroquine ou 50 nM de bafilomycin A1. Lorsque cela a été indiqué, les cellules vivantes ont été inoculées en combinaison avec 0.5 $\times 10^{-3}$ mg/kg d'interleukin 1- β , 1.6 mg/kg d'ARL67156, 100 mg/kg de suramine, ou 4 mg/kg de sel de sodium de l'acide periodique oxydé (oxy-ATP).

Dans d'autres expériences, les cellules myéloïdes CD11b+Ly6Chigh, CD11b+Ly6Clow ou CD11b+Ly6G+ (2×10^4) sont extraites par cytométrie de flux de tumeurs MCA205 exprimant OVA. Ces cellules ont ensuite été injectées dans le coussinet plantaire de souris C57BL/6. Dix jours plus tard, 5×10^4 cellules MCA205 exprimant OVA ont été injectées en sous cutanée dans la patte opposée de ces souris.

Expérience de présentation d'antigène

Les cellules myéloïdes extraites de tumeurs MCA205-OVA (2×10^4) ont été co-cultivées durant 72h avec des cellules de rates OT-1 (obtenues à partir de souris transgéniques TCR OT1 avec le kit d'isolation des lymphocytes T CD8 α + murins, Miltenyi Biotec). Dans d'autres expériences, ces cellules myéloïdes ont été cultivées pendant 36h avec des cellules B3Z (2×10^4). Ces co-cultures ont été effectuées dans des plaques 96-puits en présence de 200 μL de milieu complet. Les supernageants de ces co-cultures ont ensuite été utilisés pour évaluer les concentrations d'IFN- γ et d'IL-2 grâce à des kits ELISA spécifiques (AN-18 pour IFN- γ et OptEIATM BD Pharmingen) pour IL-2.

Tests d'activation de LT spécifiques

Les cellules MCA205 SCR, Atg5KD, Atg7KD (5×10^5) ou CT26 SCR, Atg5KD, Atg7KD (2×10^5) ont été injectées dans le coussinet plantaire de souris C57BL/6 ou BALB/c, respectivement. Six jours plus tard, les cellules des ganglions poplités ont été récupérées et

restimulées in vitro pendant 72h avec 3 x 10⁴ cellules CT26 ou MCA205 ayant subi un choc thermique (5 min à 42°C, puis un cycle de congélation/décongélation dans l'azote liquide). La quantification d'interféron- γ sécrété a été évaluée avec un kit ELISA (BD Biosciences).

Cytométrie de flux sur des cellules issues de tumeurs

Les tumeurs ont été récupérées et coupées en petits morceaux dans du milieu RPMI 1640 sans sérum contenant les enzymes DNase I (200 U/mL) et Liberase (0,4 unités Wünsch/mL). Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la préparation a été filtrée au travers de filtres de 100 μ m. Le marquage aux anticorps (2 μ g/mL ; Tableau 1) a ensuite été réalisé pendant 30 minutes à 4°C. Les cytomètres BD LSR II et Gallios ont été utilisés (BD Biosciences et Beckman Coulter respectivement).

Anticorps	Clone	Entreprise
CD34	RAM34	eBioscience
CD45.1	A20	eBioscience
CD45.2	104	eBioscience
CD115	AFS98	eBioscience
CD117	2B8	eBioscience
F4/80	BM8	eBioscience
Ki-67	SolA15	eBioscience
Sca-1	D7	eBioscience
SiglecH	eBio0440c	eBioscience
CD11b	M1/70	BD Pharmingen
CD11c	N418	BD Pharmingen
CD16/32	2.4G2	BD Pharmingen
Ly6C	AL-21	BD Pharmingen
B220	RA3-6B2	Biologend
I-A/I-E	M5/114.15.2	Biologend
Ly6G	1A8	Biologend

Tableau 5 – Liste des anticorps utilisés en cytométrie de flux

Immunohistochimie

Les cellules MCA205 SCR, Atg5KD ou Atg7KD (5x10⁵) ont été injectées en sous cutanée, dans le flanc droit des souris C57BL/6. Lorsque les tumeurs ont atteint une taille de 25-40 mm², les souris ont été traitées par la mitoxantrone en intrapéritonéal (5 mg/kg, 200 μ L). 48h après traitement, les tumeurs ont été prélevées, fixées pendant 4h à température ambiante dans de la formaline 10%, puis transférées dans du saccharose 30 % pour la nuit, à 4°C. Les tumeurs ont ensuite été congelées dans du Tissue-Tek OCT (Sakura, Villeneuve d'Ascq, France) sur de la glace sèche. Des sections de 5 μ m d'épaisseur ont ensuite été réalisées à l'aide d'un cryostat. Elles ont alors été lavées avec du PBS, et les sites non-spécifiques ont été bloqués avec 10% de FBS, pendant 45 minutes à température ambiante.

Les anticorps primaires (Tableau 2) ont été incubés dans 10% de FBS pendant 1h à température ambiante. Lorsque l'anticorps primaire n'était pas couplé à un fluorochrome, les sections ont été lavées 3 fois avec 10% de FBS, avant d'être incubées avec l'anticorps secondaire spécifique pendant 30 minutes à température ambiante. Les sections ont ensuite été lavées au PBS avant d'être marquées avec 10 µm de Hoechst 33342 pendant 5 minutes et montées entre lame et lamelle avec le Fluoromount-G mounting medium (Southern Biotechnologies, USA).

Anticorps primaire	Clone	Entreprise	Dilution anticorps primaire	Anticorps secondaire	Dilution anticorps secondaire
CD11b-Alexa 647	M1/70	eBioscience	1 :100	Non	
CD11b-FITC	M1/70	Biologend	1 :100	Non	
CD11c	223H7	MBL International	1 :50	Alexa 488 α-rat	1 :100
CD86-Alexa 647	GL-1	Biologend	1 :100	Non	
CD169/Sialoadhesin	3D6.112	Abcam	1 :300	Alexa 488 α-rat	1 :500
Cleaved Caspase 3	Asp175	Cell Signaling	1 :300	Alexa 568 α-rabbit	1 :500
F4/80-Alexa 647	CI :A3-1	Biologend	1 :300	Non	
Ly6G-PE	1A8	Biologend	1 :100	Non	

Tableau 6 – Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie

RT-PCR quantitative

L'extraction d'ARN total a été réalisée à l'aide du kit RNeasy Micro Kit (Qiagen), selon les instructions. 2 µg d'ARN ont ensuite été reverse-transcrit en ADNc avec la reverse transcriptase SuperScript III (Invitrogen). Selon les expériences, les RT-PCR ont été effectuées avec la technique Taqman ou SYBR Green (Applied Biosystems).

Test de formation de colonies et coloration May-Grünwald-Giemsa

Les sous-populations myéloïdes d'intérêt ont été resuspendues à raison de 2 x 10⁴ cellules/mL dans du milieu MethoCult GF M3434 (Stemcell technologies). 1 mL de cette suspension de cellules a été redistribué dans des boîtes de Petri de 35 mm. Ces boîtes ont été maintenues en atmosphère humide pendant 7 à 14 jours, à 37°C, et avec 5% de CO₂.

Les colonies ont ensuite été collectées et « cytopspinées » sur des lames de poly-lysine. Un marquage May-Grünwald-Giemsa a été réalisé avec le kit de marquage rapide RAL555 (RAL diagnostics), selon les instructions du fabricant.

Tests de différenciation *in vitro* et *in vivo*

Pour les tests de différenciation *in vitro*, les cellules CD11b+Ly6Chigh (4 x 10⁴) ont été extraites de la moëlle osseuse de souris C57BL/6. Elles ont ensuite été co-cultivées avec des

cellules MCA205 WT CD39+ (2 x 10⁴), qui ont été auparavant traitées pendant 20h avec 25 µM de Doxorubicin, ou avec des cellules MCA205 WT ou CD39+ vivantes (2,5 x 10³). Ces co-cultures ont été effectuées en présence de 5 ng/mL de GM-CSF murin et de 5 ng/mL d'IL-4. Lorsque cela a été indiqué, les agents chimiques suivant ont été ajoutés : 10 µM d'acide diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic (DiDS), 500 µM d'oxy-ATP, 2 mM de suramine, 20 µg/mL d'IL-1RA ou 20 µg/mL d'etanercept. Le phénotype des cellules CD11b+ a été évalué après 72h par cytométrie de flux.

Pour les tests de différenciation *in vivo*, des souris C57BL/6 (H2Kb, CD45.2) portant des tumeurs de fibrosarcome MCA205 ont été traitées *in i.t.* avec 2,9 mg/Kg de doxorubicin. Les cellules myéloïdes infiltrant les tumeurs de ces souris ont été triées par FACS après 24-38 h de traitement. Ces cellules ont été resuspendues (200 000 cellules dans 50 µL de PBS) et transférées *in i.t.* dans des tumeurs MCA205 portées par des souris B6.SLJ (H2b, CD45.1) qui ont été préalablement traitées avec 2,9 mg/kg de doxorubicin ou du PBS.

Dans d'autres expériences, les cellules extraites des tumeurs ont été marquées avec 5 µM de CFSE pendant 8 min. Après des lavages avec 20 % de FBS et du PBS, ces cellules ont été injectées dans les tumeurs MCA205 WT ou CD39+ portées par des souris C57BL/6 qui ont été prétraitées par 5,2 mg/kg de mitoxantrone *in i.p.* ou au PBS. Les tumeurs ont été récupérées 48 h plus tard et utilisées en immunohistochimie.

Analyses statistiques

Les résultats analysés ont été comparés par test t de Student lorsqu'il s'agissait de distribution normale. Les courbes de survie Kaplan-Meier ont été analysées avec le Log-rank test. Une p value < 0,05 a été considérée comme statistiquement significative. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5 ou Excel 2007.

RESULTATS

1. Importance de l'ATP et de l'autophagie dans le succès des chimiothérapies immunogènes

Les résultats de l'article **Michaud M, Martins I et al** seront présentés dans cette partie. Ce travail s'intitule « *Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice* » (Science, 2011).

L'efficacité des anthracyclines et de l'oxaliplatine repose sur l'intervention du système immunitaire, après déclenchement de la mort cellulaire immunogène. Celle-ci est caractérisée par l'exposition pré-apoptotique de Calréticuline (CRT), la libération post-apoptotique de HMGB1, et la libération d'ATP. Alors que l'exposition de CRT et la libération de HMGB1 induite par les chimiothérapies ont été caractérisées, le mécanisme de libération d'ATP n'a pas encore été élucidé.

L'objet de cette étude étant de connaître l'importance de l'autophagie dans le succès des chimiothérapies immunogènes, des cellules de cancer du côlon CT26 et des MEF (Mouse embryonic fibroblasts) déficientes pour ce processus de dégradation (déficientes pour Atg5 ou Atg7) ont été analysées quant à leur capacité à émettre les trois signaux immunogènes. Les cellules déficientes pour Atg5 ou Atg7 ont montré une capacité similaire à exposer la CRT ou libérer HMGB1 après traitement à la mitoxantrone (MTX) ou à l'oxaliplatine (OXA). Cependant, la libération d'ATP après traitement avec ces chimiothérapies immunogènes était moindre en comparaison aux cellules compétentes pour l'autophagie (**Fig. 1A, B, C**). Ceci montre que dans le contexte d'un traitement avec des chimiothérapies immunogènes, l'autophagie est requise pour la libération d'ATP mais pas pour l'exposition de la CRT ou la libération d'HMGB1.

Bien que capables d'induire une apoptose équivalente aux cellules compétentes pour l'autophagie en réponse à la MTX, les cellules déficientes pour l'autophagie n'ont pas réussi à vacciner les souris contre une deuxième injection avec les mêmes cellules vivantes. De plus, ces cellules déficientes pour Atg5 ou Atg7 n'ont pas non plus été capable d'activer les lymphocytes T in vivo, évalué par la sécrétion d'IFN- γ (**Fig. 2A, B**). Cependant, l'injection d'ARL67156, un inhibiteur des apyrases (enzymes dégradant l'ATP), qui permet d'augmenter

la concentration extracellulaire d'ATP, restaure l'immunogénicité de ces cellules Atg5 ou Atg7 knock-down, mais cet effet est aboli avec l'utilisation d'antagonistes des récepteurs purinergiques tels que oxidized ATP et Suramine (**Fig. 2C**).

Il a précédemment été montré que le traitement aux anthracyclines induisait une réponse immunitaire faisant intervenir des lymphocytes T $\gamma\delta$ sécrétant de l'IL-17, et plus tardivement des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sécrétant de l'IFN- γ (Ma et al., 2011b), (Ghiringhelli et al., 2009). Contrairement aux cellules compétentes pour l'autophagie, les cellules déficientes n'ont pas permis le recrutement intra-tumoral de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ sécrétant de l'IFN- γ , ni de lymphocytes T $\gamma\delta$ sécrétant de l'IL-17 après traitement aux anthracyclines (**Fig. 3D**). De même que les cellules déficientes pour Atg5 et Atg7 n'ont pas induit de recrutement de cellules dendritiques CD11c⁺ dans les tumeurs après traitement à la MTX.

L'ensemble de ces résultats mettent en évidence l'incapacité des cellules déficientes pour le procédé d'autophagie à induire une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique suite à une chimiothérapie immunogène. Ainsi l'autophagie est requise lors de la mort cellulaire immunogène pour une mise en place efficace de la réponse immunitaire.

De plus, la réponse immunitaire a pu être restaurée après l'injection d'ARL67156 dans les tumeurs déficientes pour l'autophagie, avec une augmentation de la concentration d'ATP extracellulaire, l'infiltration de cellules dendritiques et lymphocytes T.

Alors que les tumeurs déficientes pour l'autophagie ne répondaient pas au traitement à la MTX dans des souris immunocompétentes, après injection d'ARL67156, la chimiothérapie induit une diminution de la croissance tumorale, comparable à celle observée dans les tumeurs compétentes pour l'autophagie.

Ces résultats suggèrent que la restauration de la concentration l'ATP extracellulaire dans les tumeurs déficientes pour l'autophagie est suffisante pour permettre le succès de la chimiothérapie.

Our results offer an explanation for how long-term memories can be stably embedded into networks as quiescent and overlapping Hebbian assemblies. Unlike previous studies, our network does not exhibit the behavior of an attractor network, in which activated cell assemblies will compete with each other and the winning pattern often exhibits persistent elevated activity. Instead, the network remains quiet unless the balance of one or more assemblies is modulated in favor of the excitation and returns to the background state when the modulation is turned off. We have shown this effect here by driving a subset of cells with an external stimulus, but there are several conceivable methods to modulate the balance of excitation and inhibition (SOM). The possibility to activate several patterns simultaneously allows the analog combination of patterns into larger composite memories. The capacity of storable and retrievable patterns is likely to depend on complex interactions between dynamics, size, and connectivity of the assemblies and the host network, as well as several other parameters.

We show that a simple, Hebbian plasticity rule on inhibitory synapses leads to robust and self-organized balance of excitation and inhibition that requires virtually no fine-tuning (figs. S6 to S9) and captures an unexpected number of recent experimental findings. The precision of the learned balance depends on the degree of correlation between the excitatory and the inhibitory inputs to the cell, ranging from a global balance in the absence of correlated inputs to a detailed balance for strong correlations. The phenomenon is robust to the shape of the learning rule, as long as it obeys two fundamental requirements: Postsynaptic activity must potentiate activated inhibitory synapses, whereas in the absence of postsynaptic firing inhibitory synapses must decay. Because the balance is self-organized, inhibitory plasticity will most likely maintain balance also in the presence of excitatory plasticity, as long as excitation changes more slowly than inhibition or when excitatory plasticity events are rare.

The mammalian brain hosts a wide variety of inhibitory cell types with different synaptic time scales, response patterns, and morphological target regions. Presumably, these cell types serve different functions, and consequently their synapses may obey several different plasticity rules (31). In our simplified model, the dynamics of inhibitory plasticity powerfully contributes to the functional state of cortical architectures and may have a strong impact on cortical coding schemes.

References and Notes

1. N. Brunel, *J. Comput. Neurosci.* **8**, 183 (2000).
2. C. van Vreeswijk, H. Sompolinsky, *Science* **274**, 1724 (1996).
3. M. Tsodyks, T. Sejnowski, *Network Comput. Neural Syst.* **6**, 111 (1995).
4. A. Renart *et al.*, *Science* **327**, 587 (2010).
5. M. Wehr, A. M. Zador, *Nature* **426**, 442 (2003).
6. M. Okun, I. Lampl, *Nat. Neurosci.* **11**, 535 (2008).
7. R. C. Froemke, M. M. Merzenich, C. E. Schreiner, *Nature* **450**, 425 (2007).

8. J. de la Rocha, C. Marchetti, M. Schiff, A. D. Reyes, *J. Neurosci.* **28**, 9151 (2008).
9. B. K. Murphy, K. D. Miller, *Neuron* **61**, 635 (2009).
10. Y. Shu, A. Hasenstaub, D. A. McCormick, *Nature* **423**, 288 (2003).
11. T. P. Vogels, L. F. Abbott, *Nat. Neurosci.* **12**, 483 (2009).
12. W. Gerstner, *Neural Comput.* **12**, 43 (2000).
13. T. P. Vogels, L. F. Abbott, *J. Neurosci.* **25**, 10786 (2005).
14. A. Kumar, S. Rotter, A. Aertsen, *Nat. Rev. Neurosci.* **11**, 615 (2010).
15. J. Cafaro, F. Rieke, *Nature* **468**, 964 (2010).
16. T. Hromádka, M. R. Deweese, A. M. Zador, *PLoS Biol.* **6**, e16 (2008).
17. M. A. Woodin, K. Ganguly, M. M. Poo, *Neuron* **39**, 807 (2003).
18. V. Kilman, M. C. W. van Rossum, G. G. Turrigiano, *J. Neurosci.* **22**, 1328 (2002).
19. K. Hartmann, C. Bruehl, T. Golovko, A. Draguhn, *PLoS One* **3**, e2979 (2008).
20. M. R. DeWeese, M. Wehr, A. M. Zador, *J. Neurosci.* **23**, 7940 (2003).
21. H. Yao, L. Shi, F. Han, H. Gao, Y. Dan, *Nat. Neurosci.* **10**, 772 (2007).
22. S. Crochet, J. F. Poulet, Y. Kremer, C. C. Petersen, *Neuron* **69**, 1160 (2011).
23. L. M. Aitkin, D. J. Anderson, J. F. Brugge, *J. Neurophysiol.* **33**, 421 (1970).
24. I. O. Volkov, A. V. Galazjuk, *Neuroscience* **43**, 307 (1991).
25. P. Seriès, P. E. Latham, A. Pouget, *Nat. Neurosci.* **7**, 1129 (2004).
26. J. Beck, V. R. Bejanki, A. Pouget, *Neural Comput.* **23**, 1484 (2011).

27. D. Hebb, *The Organization of Behavior; a Neuropsychological Theory* (Wiley-Interscience, New York, 1949).
28. W. Gerstner, R. Ritz, J. L. van Hemmen, *Biol. Cybern.* **69**, 503 (1993).
29. D. J. Amit, N. Brunel, *Cereb. Cortex* **7**, 237 (1997).
30. A. Renart, R. Moreno-Bote, X.-J. Wang, N. Parga, *Neural Comput.* **19**, 1 (2007).
31. M. A. Woodin, A. Maffei, *Inhibitory Synaptic Plasticity* (Springer, New York, 2010).

Acknowledgments: Research was supported by Swiss National Science Foundation grant no. 200020 13287 (Coding Characteristics) and CRSIKO 122697 (Sinergia). Additionally, T.P.V. was supported by the European Community's Seventh Framework Marie Curie International Reintegration grant no. 268436, and H.S. and F.Z. by the European Community's Seventh Framework Program under grant agreement no. 243914 (BRAIN-I-NETS) and 237955 (FACETS-ITN), respectively. C.C. received additional support from a French National Science grant ANR-08-SYSC-005. Thanks to G. Hennequin and A. Woodruff for helpful discussions.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.1211095/DC1
Materials and Methods
SOM Text
Figs. S1 to S10
Tables S1 and S2
References (31–49)

13 July 2011; accepted 20 October 2011
Published online 10 November 2011;
10.1126/science.1211095

Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice

Mickaël Michaud,^{1,2,3*} Isabelle Martins,^{1,2,3*} Abdul Qader Sukkurwala,^{1,2,3} Sandy Adjemian,^{1,2,3} Yuting Ma,^{2,3,4,5} Patrizia Pellegatti,⁶ Shensi Shen,^{1,2,3} Oliver Kepp,^{1,2,3} Marie Scoazec,^{2,7} Grégoire Mignot,^{8,9} Santiago Rello-Varona,^{1,2,3} Maximilien Tailler,^{1,2,3} Laurie Menger,^{1,2,3} Erika Vacchelli,^{1,2,3} Lorenzo Galluzzi,^{1,2,3} François Ghiringhelli,^{8,9} Francesco di Virgilio,⁶ Laurence Zitvogel,^{2,3,4,5†} Guido Kroemer^{1,2,10,11,12†}

Antineoplastic chemotherapies are particularly efficient when they elicit immunogenic cell death, thus provoking an anticancer immune response. Here we demonstrate that autophagy, which is often disabled in cancer, is dispensable for chemotherapy-induced cell death but required for its immunogenicity. In response to chemotherapy, autophagy-competent, but not autophagy-deficient, cancers attracted dendritic cells and T lymphocytes into the tumor bed. Suppression of autophagy inhibited the release of adenosine triphosphate (ATP) from dying tumor cells. Conversely, inhibition of extracellular ATP-degrading enzymes increased pericellular ATP in autophagy-deficient tumors, reestablished the recruitment of immune cells, and restored chemotherapeutic responses but only in immunocompetent hosts. Thus, autophagy is essential for the immunogenic release of ATP from dying cells, and increased extracellular ATP concentrations improve the efficacy of antineoplastic chemotherapies when autophagy is disabled.

Transplantable or primary murine cancers respond to chemotherapy with anthracyclines or oxaliplatin much more efficiently when they grow in syngenic immunocompetent mice than in immunodeficient hosts (1, 2). Similarly, clinical studies indicate that severe lymphopenia negatively affects the chemotherapeutic response of solid cancers (3), and immune defects are negative predictors of the response to chemotherapy with anthracyclines or oxaliplatin (2, 4, 5). Apparently, some successful chemo-

therapeutics can induce a type of tumor cell stress and death that is immunogenic (6–8), implying that the patient's dying cancer cells serve as a therapeutic vaccine that stimulates an antitumor immune response, which in turn can control residual cancer cells (9, 10). Immunogenic cell death is characterized by the preapoptotic exposure of calreticulin (CRT) on the cell surface (11), postapoptotic release of the chromatin-binding protein high mobility group B1 (HMGB1) (2), and secretion of adenosine triphosphate (ATP) (4).

¹INSERM, U848, Villejuif, France. ²Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. ³Université Paris Sud, Faculté de Médecine Paris XI, Le Kremlin Bicêtre, France. ⁴INSERM, U1015, Villejuif, France. ⁵Center of Clinical Investigations in Biotherapies of Cancer (CICBT) 507, Villejuif, France. ⁶Department of Experimental and Diagnostic Medicine, Section of General Pathology, Interdisciplinary Center for the Study of Inflammation, University of Ferrara, Ferrara, Italy. ⁷Metabolomics Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. ⁸Department of Medical Oncology, Georges François Leclerc Center, Dijon, France. ⁹INSERM Avenir Team INSERM, CRI-866 University of Burgundy, Dijon, France. ¹⁰Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France. ¹¹Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France. ¹²Université Paris Descartes, Paris 5, Paris, France.

*These authors contributed equally to this work.

†To whom correspondence should be addressed. E-mail: kroemer@orange.fr (G.K.); zitvogel@igr.fr (L.Z.)

CRT, HMGB1, and ATP interact with the receptors CD91, toll-like receptor 4 (TLR4), and purinergic P2RX7 receptors, respectively, which are present on the surface of dendritic cells (DCs). CD91, TLR4, and P2RX7 are present on DCs and promote engulfment of dying cells (12, 13), presentation of tumor antigens (2, 14), and production of interleukin-1 β (IL-1 β), respectively (4, 15).

CRT exposure results from an endoplasmic reticulum (ER) stress response induced by chemotherapy (16), whereas HMGB1 release occurs when cells undergo postapoptotic necrosis (2). The mechanism accounting for chemotherapy-elicited ATP release has been elusive. Because autophagy may be connected to the ER stress

response, as well as to xenophagy (17), an innate immune response, we wondered whether autophagy might participate in immunogenic signaling in the context of anticancer chemotherapies. To investigate this possibility, we studied the emission of immunogenic signals by autophagy-deficient (Atg5^{KD} or Atg7^{KD}) CT26 tumor cells. Mass spectrometric analyses of supernatants from mitoxantrone (MTX)-treated CT26 colorectal carcinoma cells revealed that, as compared to their autophagy-competent counterparts, autophagy-deficient CT26 cells released lower amounts of ATP (Fig. 1A). Accordingly, autophagy-competent tumor cells released more ATP when treated with MTX or oxaliplatin than did cells rendered

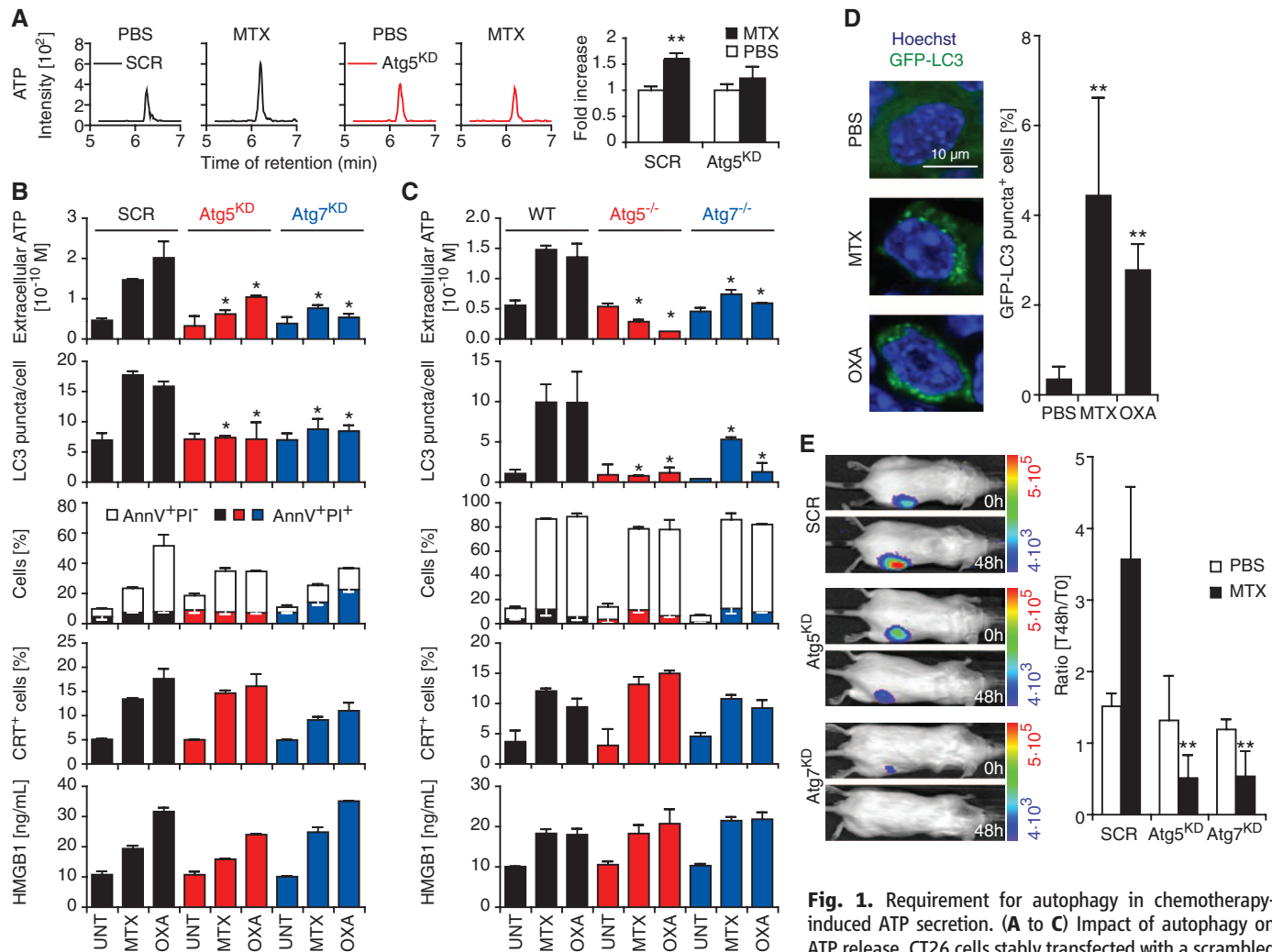


Fig. 1. Requirement for autophagy in chemotherapy-induced ATP secretion. (A to C) Impact of autophagy on ATP release. CT26 cells stably transfected with a scrambled (SCR) shRNA or an Atg5-specific shRNA (Atg5^{KD}) were cultured with MTX or left untreated (PBS, phosphate-buffered saline), and extracellular ATP was determined by mass spectrometry (A). Alternatively, ATP release induced by MTX or oxaliplatin (OXA) in Atg5^{KD} and Atg7^{KD} CT26 cells (B) or Atg5^{-/-} and Atg7^{-/-} MEFs (C) was measured by enzymatic methods, and autophagy, cell death, CRT exposure, and HMGB1 release were determined. Results are reported as means \pm SEM of triplicates, and asterisks indicate significant ($P < 0.05$, unpaired Student's t test) differences as compared to autophagy-competent cells cultured in similar conditions. (D) Induction of autophagy by chemotherapy in vivo. Subcutaneous GFP-LC3-expressing CT26-derived tumors were treated by intraperitoneal chemotherapy, and the percentage of tumor cells with cytoplasmic GFP-LC3 dots was determined 48 hours later (means of 10 determinations \pm SEM). Asterisks indicate significant ($P < 0.01$, unpaired Student's t test) autophagy induction as compared to control conditions (PBS). (E) Extracellular ATP concentration before and after chemotherapy in vivo. Mice bearing palpable luciferase-expressing CT26-derived tumors that had been engineered to express a control shRNA (SCR) or shRNAs targeting Atg5 or Atg7 were treated with PBS or MTX, and D-luciferin-dependent chemoluminescence was measured before treatment (0 hour) or 48 hours later. Results are reported as means \pm SEM of triplicates. Asterisks indicate significant ($*P < 0.01$, unpaired Student's t test) inhibition of ATP release as compared to autophagy-competent controls.

autophagy-deficient by the knockdown (KD) or the knockout (KO) of an array of essential autophagy proteins including Atg5 and Atg7 (Fig. 1, B and C, and figs. S1 to S4). CT26 or MCA205 fibrosarcoma cells underwent apoptosis in response to MTX or oxaliplatin in vitro irrespective of their autophagic competence. Moreover, autophagy-deficient and autophagy-competent cancer cells similarly exposed CRT and released HMGB1 in response to chemotherapy (Fig. 1B and figs. S1 and S2). *Atg5*^{-/-} or *Atg7*^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) also failed to release ATP, yet exposed CRT and released HMGB1, in response to anticancer agents (Fig. 1C and fig. S3). In human osteosarcoma U2OS cells stably expressing a green fluorescent protein (GFP)-LC3 fusion protein, the depletion of several *Atg* gene products (ATG5, ATG7, ATG10, Beclin 1) significantly decreased the MTX-driven accumulation of autophagosomes containing GFP-LC3 as well as ATP release, yet failed to reduce the release of HMGB1 or the exposure of CRT at the plasma membrane surface (fig. S4). Thus, autophagy is required for optimal ATP release but dispensable for the emission of other immunogenic signals.

Pharmacological inhibition of autophagy with bafilomycin A1 or 3-hydroxychloroquine limited the chemotherapy-induced release of ATP, as did the inhibition of caspases with Z-VAD-fmk (fig. S5). However, pharmacological induction of autophagy with rapamycin (fig. S5) or other agents (not shown) failed to trigger ATP release. CT26 tumors showed the autophagic aggregation of a GFP-LC3 reporter fusion protein 48 hours after chemotherapy in vivo, indicating that MTX can induce autophagy in vivo (Fig. 1D). Moreover, CT26 cancers engineered to express the ATP sensor luciferase on the cell surface (18) exhibited a significant increase in ATP-dependent luminescence 48 hours after systemic chemotherapy with MTX, which was absent in their autophagy-deficient (*Atg5*^{KD} or *Atg7*^{KD}) counterparts (Fig. 1E). Together, these results indicate that, in the context of apoptosis induction, autophagy is required for chemotherapeutics to induce ATP release.

Autophagy-competent CT26 tumor cells [class I major histocompatibility complex (MHC) haplotype H-2^d] treated with MTX in vitro and then subcutaneously injected in the absence of

any adjuvant elicited a protective anticancer immune response and vaccinated syngenic BALB/c mice against further inoculation with live tumor cells of the same type (Fig. 2A). CT26 cells that were rendered autophagy-incompetent by the depletion of *Atg5* or *Atg7* with small interfering RNA (siRNA, fig. S6) or a short hairpin RNA (shRNA, figs. S2 and S7) mounted apoptotic responses to MTX similar to those of autophagy-competent control cells, in vitro (Fig. 1B and fig. S2), yet largely failed to induce antitumor immunity in vivo, in prophylactic vaccination experiments (Fig. 2A and fig. S7). These results were confirmed with MCA205 cells (class I MHC haplotype H-2^b) in syngenic C57BL/6 mice and ultraviolet treatment (fig. S8). When combined with MTX, bafilomycin A1 and 3-hydroxychloroquine also reduced the immunogenic potential of tumor cells (fig. S8). Moreover, autophagy-deficient cells failed to prime T cells in vivo, as determined by experiments in which dying cells were inoculated into footpads, and T cells were recovered from draining lymph nodes 6 days later, restimulated with tumor antigens, and assessed for secretion of interferon- γ (IFN- γ) (Fig. 2B). The failure of

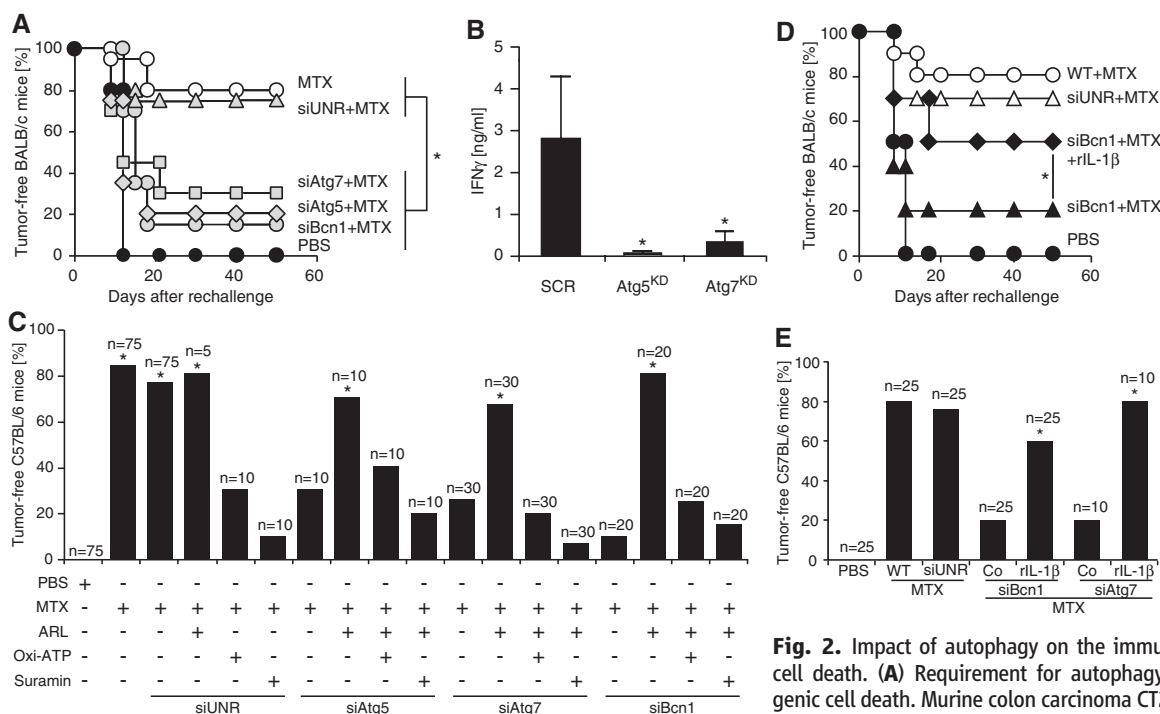
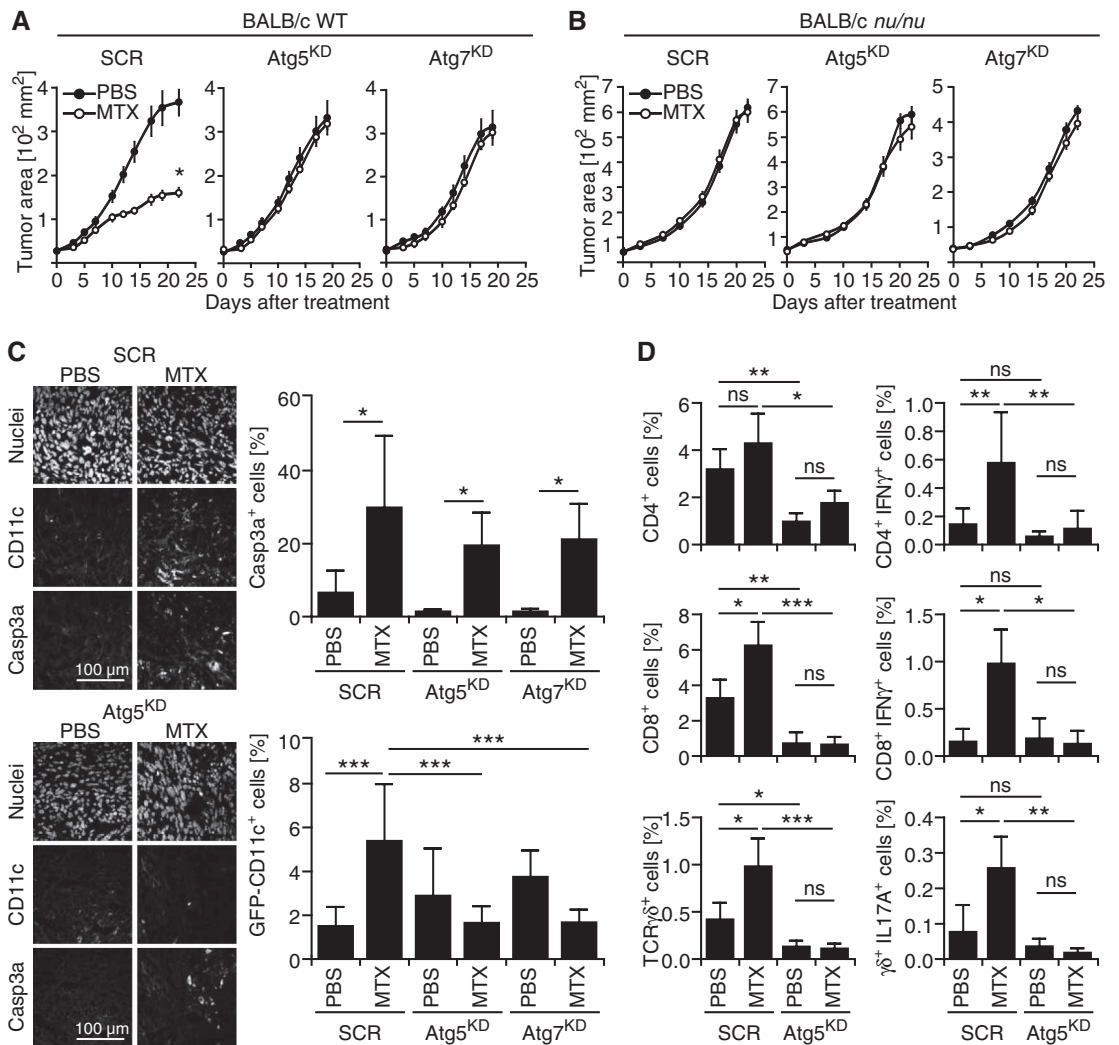


Fig. 2. Impact of autophagy on the immunogenicity of cell death. (A) Requirement for autophagy in immunogenic cell death. Murine colon carcinoma CT26 cells transfected with the indicated siRNAs were treated with MTX in vitro and then subcutaneously injected into BALB/c mice (20 mice per group) that were inoculated with living CT26 cells 7 days later. (B) Requirement for autophagy in T cell priming. MTX-treated autophagy-competent (SCR) or deficient (*Atg5*^{KD} or *Atg7*^{KD}) CT26 cells were injected into the footpad, followed by restimulation of popliteal lymph node cells by CT26 lysates in vitro and quantification of IFN- γ secretion. Results are reported as means \pm SEM of triplicates. (C) Implication of ATP and purinergic receptors in the reduced immunogenicity of autophagy-deficient cells. Murine fibrosarcoma MCA205 cells were transfected with the indicated siRNAs and then treated with MTX, followed by subcutaneous injection in the presence or absence of the ecto-ATPase inhibitor ARL67156 (ARL) and/or purinergic receptor antagonists (oxidized ATP or suramin). One week later, mice were rechallenged with live MCA205 cells, and the absence of tumor growth was scored 60 days later as the indication of an anticancer immune response. (D and E) Recombinant IL-1 β restores the defective immunogenicity of autophagy-deficient cells succumbing to chemotherapy. CT26 (D) or MCA205 cells (E) were transfected with the indicated siRNAs, cultured with MTX, and subcutaneously injected, either alone or in the presence of recombinant IL-1 β (rIL-1 β), into syngenic mice. Seven days later, mice were subcutaneously inoculated with the same tumor cell type. Tumor incidence was monitored for 60 days. Kaplan-Meier curves were statistically evaluated by the logrank test (**P* < 0.05, as compared to the same siRNA-transfected MTX-treated cells without rIL-1 β). [**P* < 0.05, unpaired Student's *t* test in (B); logrank test in (A) and (D); χ^2 test in (C) and (E) to indicate significant vaccination; *n* = 10 unless otherwise indicated.]

vitro and then subcutaneously injected into BALB/c mice (20 mice per group) that were inoculated with living CT26 cells 7 days later. (B) Requirement for autophagy in T cell priming. MTX-treated autophagy-competent (SCR) or deficient (*Atg5*^{KD} or *Atg7*^{KD}) CT26 cells were injected into the footpad, followed by restimulation of popliteal lymph node cells by CT26 lysates in vitro and quantification of IFN- γ secretion. Results are reported as means \pm SEM of triplicates. (C) Implication of ATP and purinergic receptors in the reduced immunogenicity of autophagy-deficient cells. Murine fibrosarcoma MCA205 cells were transfected with the indicated siRNAs and then treated with MTX, followed by subcutaneous injection in the presence or absence of the ecto-ATPase inhibitor ARL67156 (ARL) and/or purinergic receptor antagonists (oxidized ATP or suramin). One week later, mice were rechallenged with live MCA205 cells, and the absence of tumor growth was scored 60 days later as the indication of an anticancer immune response. (D and E) Recombinant IL-1 β restores the defective immunogenicity of autophagy-deficient cells succumbing to chemotherapy. CT26 (D) or MCA205 cells (E) were transfected with the indicated siRNAs, cultured with MTX, and subcutaneously injected, either alone or in the presence of recombinant IL-1 β (rIL-1 β), into syngenic mice. Seven days later, mice were subcutaneously inoculated with the same tumor cell type. Tumor incidence was monitored for 60 days. Kaplan-Meier curves were statistically evaluated by the logrank test (**P* < 0.05, as compared to the same siRNA-transfected MTX-treated cells without rIL-1 β). [**P* < 0.05, unpaired Student's *t* test in (B); logrank test in (A) and (D); χ^2 test in (C) and (E) to indicate significant vaccination; *n* = 10 unless otherwise indicated.]

Fig. 3. Failure of autophagy-deficient tumor cells to induce a therapeutic immune response. (A and B). Reduced T cell-dependent therapeutic response of autophagy-incompetent tumors. Palpable CT26-derived tumors stably transfected with the indicated constructs growing on immunocompetent BALB/c mice (A) or immunodeficient *nu/nu* hosts (B) ($n = 10$ per group) were treated with one intraperitoneal injection of MTX or vehicle (PBS) (day 0), and tumor growth was monitored. (C) Failure of autophagy-deficient tumors to recruit DCs upon chemotherapy. Control (SCR) or autophagy-deficient (*Atg5*^{KD}) tumors were implanted on transgenic mice expressing GFP under the control of the CD11c promoter. Once tumors became palpable, mice were treated with MTX or vehicle (PBS), and 48 hours later tumors were subjected to immunofluorescence detection of apoptotic cells (that stain positively for active caspase-3, Casp3a) and GFP-positive cells. (D) Failure of autophagy-deficient tumors to recruit T lymphocytes. Control (SCR) or autophagy-deficient (*Atg5*^{KD}) CT26-derived tumors were recovered 7 days after MTX or PBS injection, and the frequency of cells with the indicated immunophenotypes was determined by cytofluorometry. Results are reported as means \pm SEM (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, unpaired Student's t test; ns, not significant).



MTX-treated cancer cells depleted from *Atg5*, *Atg7*, or *Beclin 1* to induce a protective immune response *in vivo* could be corrected by co-injecting ARL67156 (ARL), an inhibitor of ecto-ATPases (apyrases) that artificially increases extracellular ATP concentrations (19). Such an immunogenic activity of ARL was neutralized by the addition of the purinergic receptor antagonists oxidized (oxi)-ATP and suramin (Fig. 2C). Moreover, the immunogenicity of MTX-treated autophagy-deficient cells could be restored by co-injecting recombinant IL-1 β (Fig. 2, D and E), whose production depends on the action of ATP on purinergic receptors (4, 15), but not by co-injecting recombinant CRT (fig. S9).

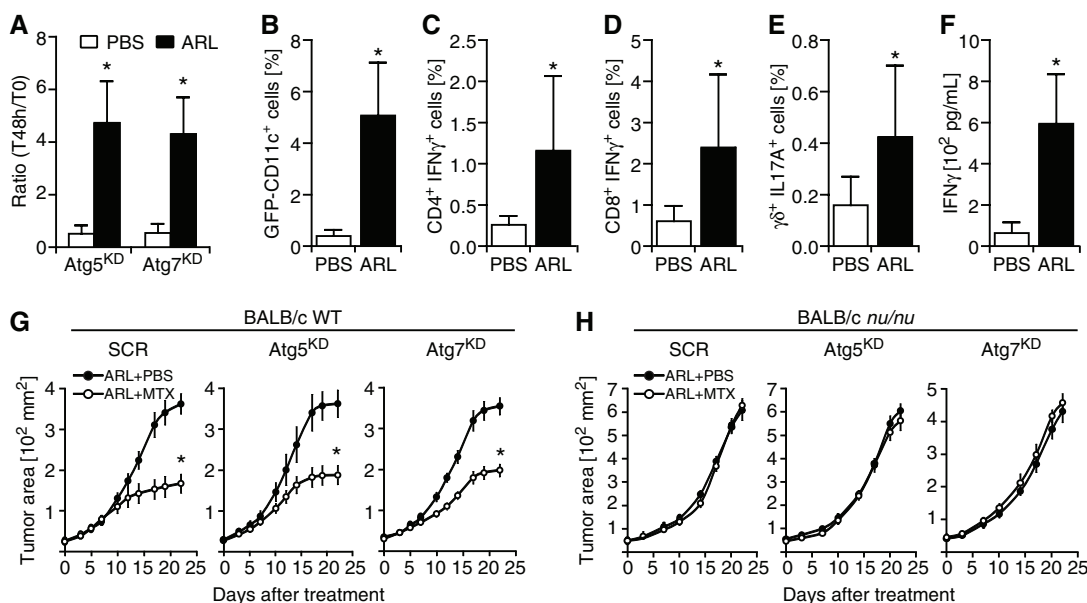
CT26 and MCA205 cells that were rendered autophagy-deficient by depletion of *Atg5* or *Atg7* normally underwent apoptosis-associated phosphatidylserine exposure and cell death *in vitro*, in response to MTX or oxaliplatin (Fig. 1B and figs. S2 and S6). Moreover, the proliferation of autophagy-competent and autophagy-deficient tumors growing in immunodeficient mice was inhibited to

similar extents by the intratumoral injection of high doses of MTX (fig. S10). By contrast, systemic MTX treatment only limited the growth of autophagy-competent tumors when such tumors were growing in normal, immunocompetent mice (Fig. 3A and fig. S10). This therapeutic response to systemic MTX was lost by all tumors, irrespective of their autophagic competence, when they were grown in immunodeficient, athymic (*nu/nu*) mice (Fig. 3B). Although autophagy-deficient tumor cells (fig. S11) exhibited an apoptotic response to systemic MTX *in vivo* (and hence stained positively for activated caspase-3, and accumulated apoptotic as well as HMGB1-negative nuclei) (Fig. 3C and fig. S12), they failed to attract DCs that were rendered visible by transgenic expression of GFP under the control of the CD11c promoter (Fig. 3C). In addition, autophagy-deficient tumor cells failed to elicit a local immune response characterized by the recruitment of CD4⁺ or CD8⁺ T cells, which produce IFN- γ , and of $\gamma\delta$ T cells, which secrete IL-17 (20) (Fig. 3D). Thus, autophagy deficits

abolish the capacity of cancer cells to elicit an immune response.

Intratumoral injections of ARL performed in the context of systemic MTX treatment enhanced pericellular ATP concentrations around autophagy-deficient tumor cells (as assessed by tumor cells engineered to express surface luciferase) (Fig. 4A), enhanced the recruitment of DCs (as shown in CD11c-GFP transgenic mice) (Fig. 4B), stimulated the recruitment of IFN- γ -producing CD4⁺ or CD8⁺ $\alpha\beta$ T cells and of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T lymphocytes into the tumor bed (Fig. 4, C to E, and fig. S13), and restored T cell priming by autophagy-deficient tumor cells (Fig. 4F). Although ARL did not increase the cytotoxic potential of MTX, ARL injections restored the efficacy of MTX-based chemotherapy against autophagy-deficient CT26- or MCA205-derived cancers, hence significantly reducing tumor growth (fig. S14). Similarly, autophagy-deficient MCA205 fibrosarcomas failed to respond to oxaliplatin *in vivo*, unless chemotherapy was accompanied by ARL injections (fig. S15). Intratumoral ARL

Fig. 4. Restoration of therapeutic immune responses by injection of ecto-ATPase inhibitors into autophagy-deficient tumors. **(A)** Restoration of ATP levels. Extracellular ATP was measured in Atg5-deficient (Atg5^{KD}) and Atg7-deficient (Atg7^{KD}) CT26 cell-derived tumors ($n = 3$ per group) engineered to express luciferase, 48 hours after the intraperitoneal injection of MTX in combination with the intratumoral injection of PBS or of the ecto-ATPase inhibitor ARL67156 (ARL). **(B to E)** Restoration of DC and lymphocyte recruitment by ARL. Atg5^{KD} tumors were treated with MTX as they became palpable and injected with either PBS or ARL. Then, the percentage of infiltrating dendritic or T cells among all cells was determined on day 9, as in Fig. 3, C and D. Results are means \pm SEM ($n = 10$ mice per group). **(F)** ARL-mediated restoration of T cell priming by Atg5-deficient tumor cells, determined as in Fig. 2B ($n = 5$ per group). **(G and H)** Effect of ecto-ATPase inhibition on immune-dependent chemotherapy responses in vivo. Autophagy-competent or -deficient CT26-derived tumors



administration also improved the defective chemotherapeutic response of tumors engineered to overexpress the ecto-ATPase CD39 (fig. S16), but did not enhance the response of normal CT26- or MCA205-derived cancers to chemotherapy with MTX or oxaliplatin (Fig. 4G and figs. S13 to S15), presumably because in this latter context extracellular ATP concentrations are already optimal. Another apyrase inhibitor, NGXT191, recapitulated the effects of ARL in that it ameliorated the growth-inhibitory effect of MTX on autophagy-deficient cancers (fig. S16). The ARL- or NGXT191-mediated amelioration of the therapeutic response to MTX or oxaliplatin was clearly T cell-dependent, as it was lost in mice lacking T lymphocytes (Fig. 4H and figs. S14 to S16). Together, these results, which have been obtained with immunogenic cancers, indicate that restoring extracellular ATP concentrations suffices to reestablish the chemotherapeutic response of autophagy-deficient tumors.

The activation of several oncogene products (in particular phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K; the protein kinase AKT1; and antiapoptotic proteins from the Bcl-2 family) and the inactivation of multiple tumor suppressor proteins (such as DAPK1, PTEN, TSC1, TSC2, LKB1/STK11, and proapoptotic “BH3-only” proteins from the BCL-2 family) result in disabled autophagy (21). Moreover, Beclin 1, which is required for autophagy induction, acts as a haploinsufficient tumor suppressor protein, and additional essential mediators of autophagy (such as ATG4C, UVRAG, and BIF-1) are bona fide tumor suppressors (22–24). Failing autophagy contributes to oncogenesis through several potential mechanisms, such as increased genomic instability (25),

increased nuclear factor κ B signaling (26), reduced senescence (27), or increased survival in conditions of oncogenic stress (for instance, upon the activation of oncogenic *RAS*) (28). As a result, autophagy is often disabled in (pre-)malignant cells, especially during early oncogenesis. By contrast, tumor progression is frequently coupled to enhanced autophagy, likewise as an adaptation to stressful conditions (22–24). This implies that tumors are highly heterogeneous with regard to their autophagic potential (SOM Text). If our findings could be translated to humans, patients with autophagy-deficient cancers might profit from pharmacological strategies designed to compensate defective immunogenic signaling. Beyond the development of cancer-specific autophagy inducers (29), one such compensatory strategy might be to enhance local ATP concentrations through the application of apyrase inhibitors.

References and Notes

1. N. Casares *et al.*, *J. Exp. Med.* **202**, 1691 (2005).
2. L. Apetoh *et al.*, *Immunol. Rev.* **220**, 47 (2007).
3. I. Ray-Coquard *et al.*; European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group, *Cancer Res.* **69**, 5383 (2009).
4. F. Ghiringhelli *et al.*, *Nat. Med.* **15**, 1170 (2009).
5. A. Tesniere *et al.*, *Oncogene* **29**, 482 (2010).
6. D. R. Green, T. Ferguson, L. Zitvogel, G. Kroemer, *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 353 (2009).
7. R. Zappasodi *et al.*, *Cancer Res.* **70**, 9062 (2010).
8. T. A. Ferguson, J. Choi, D. R. Green, *Immunol. Rev.* **241**, 77 (2011).
9. O. J. Finn, *N. Engl. J. Med.* **358**, 2704 (2008).
10. L. Zitvogel, O. Kepp, G. Kroemer, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **8**, 151 (2011).
11. M. Obeid *et al.*, *Nat. Med.* **13**, 54 (2007).
12. S. J. Gardai *et al.*, *Cell* **123**, 321 (2005).
13. M. P. Chao *et al.*, *Sci. Transl. Med.* **2**, 63ra94 (2010).

14. M. E. Bianchi, *J. Leukoc. Biol.* **86**, 573 (2009).
15. C. Mutini *et al.*, *J. Immunol.* **163**, 1958 (1999).
16. T. Panaretakis *et al.*, *EMBO J.* **28**, 578 (2009).
17. B. Levine, N. Mizushima, H. W. Virgin, *Nature* **469**, 323 (2011).
18. P. Pellegatti *et al.*, *PLoS ONE* **3**, e2599 (2008).
19. M. Mandapathil *et al.*, *J. Biol. Chem.* **285**, 7176 (2010).
20. Y. Ma *et al.*, *J. Exp. Med.* **208**, 491 (2011).
21. M. C. Maiuri *et al.*, *Cell Death Differ.* **16**, 87 (2009).
22. R. K. Amaravadi *et al.*, *Clin. Cancer Res.* **17**, 654 (2011).
23. R. Mathew, E. White, *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**, 113 (2011).
24. D. Hanahan, R. A. Weinberg, *Cell* **144**, 646 (2011).
25. V. Karantzis-Wadsworth *et al.*, *Genes Dev.* **21**, 1621 (2007).
26. R. Mathew *et al.*, *Cell* **137**, 1062 (2009).
27. A. R. Young *et al.*, *Genes Dev.* **23**, 798 (2009).
28. M. Elgendy, C. Sheridan, G. Brumatti, S. J. Martin, *Mol. Cell* **42**, 23 (2011).
29. A. Fleming, T. Noda, T. Yoshimori, D. C. Rubinsztein, *Nat. Chem. Biol.* **7**, 9 (2011).

Acknowledgments: G.K. and L.Z. are supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipes labélisées), Agence Nationale pour la Recherche (ANR), European Commission (Active p53, Apo-Sys, ChemoRes, ApopTrain INFLACare), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Fondation Bettencourt-Schueller Institut National du Cancer (INCa), and Cancéropôle Ile-de-France and the LabEx Oncolmunology. G.M. is supported by Association pour la Recherche sur le Cancer. F.d.V. and P.P. are supported by Italian Association for Cancer Research (AIRC). M.M. is supported by FRM. I.M., S.A., M.T. are supported by La Ligue Nationale contre le Cancer and Y.M. by China Scholarship Council. A.Q.S. is supported by Higher Education Commission of Pakistan. S.R.-V. is supported by Fondation de France. L.Z. has served as a paid consultant for Innate Pharma S.A., a biopharmaceutical company developing immunotherapy drugs for cancer.

Supporting Online Material

www.sciencemag.org/cgi/content/full/334/6062/1573/DC1
 Materials and Methods
 SOM Text
 Figs. S1 to S16
 References (30–73)
 13 May 2011; accepted 27 October 2011
 10.1126/science.1208347

2. Accumulation de cellules présentatrices d'antigène dans les tumeurs traitées aux chimiothérapies immunogènes

Les résultats de l'article **Ma Y, Adjemian S et al** seront présentés ici. Ce travail s'intitule « *Intratatumoral antigen presentation in chemotherapy-induced anticancer immune responses* ». (soumis à Immunity).

Les chimiothérapies immunogènes induisent le recrutement intra-tumoral de lymphocytes $T\gamma\delta$ sécrétant de l'IL-17, et plus tardivement des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ sécrétant de l'IFN- γ (Ma et al., 2011b), (Ghiringhelli et al., 2009). Dans cette étude, nous avons voulu caractériser la population de cellule présentatrices d'antigène intervenant suite à un traitement aux anthracyclines.

Grâce à des techniques d'immunohistochimie et de cytométrie, la présence de cellules myéloïdes a été montré dans les tumeurs, après traitement à la mitoxantrone (MTX) ou à la doxorubicine (DX). Ces cellules myéloïdes appartiennent à différentes sous-populations et présentent un phénotype de cellules dendritiques matures $CD11c^+CD86^+$, de macrophages $F4/80^+CD169^+$, ou de neutrophiles $CD11b^+Ly6G^+$ (**Fig. 1**). L'importance de l'ATP et des récepteurs purinergiques dans le recrutement de ces cellules myéloïdes a été évalué grâce à l'utilisation de cellules de fibrosarcome murin MCA205 exprimant l'ecto-ATPase $CD39$ à leur surface (l'ATP présent dans le milieu extracellulaire est donc dégradé) et de souris déficientes pour les récepteurs purinergiques $P2Y2$ ou $P2X7$. Alors que les tumeurs $CD39^+$ et celles se développant dans des souris $P2Y2^{-/-}$ n'ont pas pu recruter les cellules $CD11c^+CD86^+$, $F4/80^+CD169^+$ et $CD11b^+Ly6G^+$ après traitement à la MTX, les tumeurs de souris $P2RX7^{-/-}$ n'ont pas permis le recrutement des cellules $CD11c^+CD86^+$, avec en revanche une présence accrue de macrophages $F4/80^+CD169^+$. De plus, les tumeurs ayant reçu de la Suramine (un antagoniste à spectre large des récepteurs purinergiques), et les tumeurs $CD39^+$ traitées à la MTX, n'ont pas permis d'observer un ralentissement de la croissance tumorale (**Fig. 2, S3**).

L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle important de l'ATP et des récepteurs purinergiques dans le recrutement des cellules myéloïdes à la tumeur, ainsi que pour l'efficacité de la chimiothérapie aux anthracyclines.

Afin de trouver les cellules responsables de la présentation d'antigène lors du traitement aux anthracyclines, nous avons utilisé des cellules du cancer du côlon murin CT26 exprimant

l'EGFP dans le feuillet interne de la membrane plasmique. Après traitement aux anthracyclines, nous avons pu observé qu'une grande partie de la population CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ sont devenus positives pour l'EGFP (**Fig. 3B**). De plus, ces cellules se sont montrées très efficaces pour induire la sécrétion d'IFN- γ par les cellules T CD8⁺ (**Fig. 3E**). Dans d'autres expériences, les cellules CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ ont été purifiées à partir de tumeurs MCA205 exprimant l'OVA (ovalbumine) traitées ou non aux anthracyclines et transférées dans des souris naïves qui ont reçu dix jours plus tard une injection de MCA205-OVA vivantes, et ont été capable de diminuer la croissance et l'incidence des tumeurs (**Fig. 3F**). Tout ceci montre la capacité de ces cellules à fonctionner comme des cellules présentatrices d'antigènes efficaces.

Le phénotypage plus poussé des cellules myéloïdes recrutées à la tumeur a montré qu'après traitement aux anthracyclines, une partie conséquente de ces cellules présente un phénotype de précurseur CMP ou GMP (Common myeloid progenitor, granulocyte-monocyte progenitor) CD34⁺c-Kit⁺Sca-1⁻CD16/32⁺. Ce phénotype de précurseur s'est avéré être réduit lorsque les cellules tumorales expriment l'ecto-ATPase CD39 (**Fig. 4A**). Lors d'expériences de formation de colonies, les cellules CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ ont montré la capacité à former des colonies sous l'effet des anthracyclines, et en revanche l'expression de CD39 n'a pas permis d'observer un tel résultat (**Fig. 4C-E**).

En outre, une co-culture a été effectuée entre des cellules MCA205 sauvages ou CD39⁺ (traitées ou non aux anthracyclines) et avec des cellules CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ obtenues à partir de la moëlle. Ces cellules se sont différenciées en cellules dendritiques CD11c⁺MHCII⁺ seulement en présence de cellules MCA205 sauvages traitées aux anthracyclines, et non en présence de cellules non-traitées ou de cellules CD39⁺ (**Fig. 5I**).

Ceci indique que les anthracyclines peuvent induire le recrutement de cellules précurseurs ayant la capacité de se différencier en cellules dendritiques, et cette différenciation est dépendante de l'ATP.

Afin d'identifier la sous-population de cellules dendritiques impliquée dans l'induction de la réponse immunitaire aux anthracyclines, différents modèles ont été utilisés pour éliminer tour à tour chaque type cellulaire. Les cellules plasmacytoïdes ont ainsi été supprimées grâce à un anticorps anti-PDCA1. Des souris déficientes pour le facteur de transcription Batf3 ont été utilisées, ces souris ne présentant pas de cellules dendritiques CD8 α ⁺CD103⁺Langerin⁺. De plus, un anticorps bloquant les cellules CD11b⁺ a permis d'empêcher l'infiltration de ces

cellules dans les tumeurs. Tous ces modèles nous ont permis de conclure que seule la sous-population de cellules dendritiques CD11b+CD11c+ était primordiale pour l'efficacité de la chimiothérapie car seule l'élimination de ces cellules a perturbé l'action anti-tumorale des anthracyclines.

Intratatumoral antigen presentation in chemotherapy-induced anticancer immune responses

Yuting Ma^{1-3,*}, Sandy Adjemian^{1-3,*}, Stephen R. Mattarollo^{4,5}, Takahiro Yamazaki^{2,3,6}, Laetitia Aymeric^{2,3,6}, Heng Yang^{3,7}, João Paulo Portela Catani^{1,8}, Dalil Hannani^{2,3,6}, Helene Duret^{4,9}, Kim Steegh^{4,9}, Isabelle Martins¹⁻³, Frederic Schlemmer¹⁻³, Mickaël Michaud¹⁻³, Oliver Kepp¹⁻³, Abdul Qader Sukkurwala¹⁻³, Laurie Menger¹⁻³, Erika Vacchelli¹⁻³, Nathalie Droin^{2,10}, Lorenzo Galluzzi^{2,11}, Roman Krzysiek^{7,12,13}, Siamon Gordon¹⁴, Philip R. Taylor¹⁵, Peter Van Endert¹⁶, Eric Solary^{2,3,10}, Mark J. Smyth^{4,8}, Laurence Zitvogel^{2,3,6,#}, and Guido Kroemer^{1,11,17-19,#}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U848, Villejuif, France; ²Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ³Université Paris Sud/Paris 11, Le Kremlin Bicêtre, France; ⁴Cancer Immunology Program, Peter MacCallum Cancer Centre, East Melbourne, Australia; ⁵The University of Queensland, Diamantina Institute, Woolloongabba, Australia; ⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1015, CBT1017, Villejuif, France; ⁷Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, UMR 996, LabEx LERMIT, Clamart, France; ⁸Laboratorio de Vetores Virais, Instituto do Coração, FM-USP, São Paulo, Brasil; ⁹Sir Peter MacCallum Department of Oncology, University of Melbourne, Parkville, Australia; ¹⁰Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1009, Villejuif, France; ¹¹Université Paris Descartes/Paris V, Sorbonne Paris Cité, Paris, France; ¹²Institut Paris-Sud d'Innovation Thérapeutique (IPSIT), Faculté de Pharmacie, Châtenay Malabry, France; ¹³Service d'Immunologie biologique, Centre Hospitalier Universitaire de Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin Bicêtre, France; ¹⁴Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom; ¹⁵Cardiff Institute of Infection and Immunity, Cardiff University School of Medicine, Cardiff, United Kingdom; ¹⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U1013, Paris, France; ¹⁷Metabolomics Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; ¹⁸Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; ¹⁹Pôle de Biologie, Hôpital Européen Georges Pompidou, AP-HP, Paris, France.

*YM and SA equally contributed to this paper.

LZ and GK share senior co-authorship.

Correspondence to: Prof. Dr. Guido Kroemer, INSERM U848, Institut Gustave Roussy, PR1, 39 rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif, France, Tel. 33-1-42 11 60 46, Fax 33-1-42 11 60 47, e-mail: kroemer@orange.fr; Laurence Zitvogel: zitvogel@igr.fr.

Running title: Antigen-presenting cells in anthracycline therapy

Keywords: ATP; CD39; granulocyte-monocyte progenitors; *in situ* antigen presentation; MCA205.

Highlights

- Anthracyclines induce tumor infiltration by CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} DC-like cells
- This phenomenon requires the release of ATP by dying tumor cells *in vivo*
- These cells can present tumor antigens to T cells and vaccinate mice against cancer
- These cells contain myeloid precursors and ATP favors their differentiation to DCs

Summary

The therapeutic efficacy of anthracyclines appears to rely on antitumor immune responses elicited by dying cancer cells. How chemotherapy-induced cell death leads to efficient antigen presentation to T cells, however, remains a conundrum. Here, we show that intratumoral CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} cells, which display some characteristics of inflammatory dendritic cells and include granulomonocytic precursors, are crucial for anthracycline-induced anticancer immune responses. ATP released by dying cancer cells recruited myeloid cells into tumors and stimulated the local differentiation of CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} cells. Such cells efficiently engulfed tumor antigens *in situ* and presented them to T lymphocytes, thus vaccinating mice, upon adoptive transfer, against a challenge with cancer cells. Manipulations preventing tumor infiltration by CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} cells, like the local overexpression of ectonucleotidases, the blockade of purinergic receptors or the neutralization of CD11b, abolished the immune system-dependent antitumor activity of anthracyclines. Our results identify a subset of tumor-infiltrating leukocytes as therapy-relevant antigen-presenting cells.

Introduction

Although it has been generally believed that cytotoxic antineoplastic agents mediate their therapeutic effects in a cancer cell-autonomous fashion, recent results indicate that at least some chemotherapeutics inhibit tumor growth also indirectly, via the immune system (Mellman et al., 2011; Schreiber et al., 2011). Thus, a variety of transplantable or chemically induced, primary mouse cancers respond more efficiently to anthracyclines when they develop in hosts carrying an intact immune system. In many cases, tumors evolving in immunodeficient mice fail to respond to anthracyclines in conditions in which the same tumors growing in immunocompetent mice do so (Apetoh et al., 2007; Casares et al., 2005; Ghiringhelli et al., 2009; Michaud et al., 2011). Accordingly, clinical studies indicate that anthracycline-killed tumor cells are particularly efficient in stimulating a therapeutic immune response in cancer patients (Zappasodi et al., 2010). Moreover, anthracycline-based neoadjuvant therapy of breast cancer patients is more effective when the tumor is infiltrated by T cells before the beginning of chemotherapy (Denkert et al., 2010) as well as if chemotherapy causes a significant influx of CD8⁺ T cells into the tumor bed and/or reduces the accumulation of immunosuppressive regulatory T cells (Tregs) (Ladoire et al., 2011).

Several immune effectors that are essential for the therapeutic effect of anthracyclines have been characterized in mouse models. Indeed, the knockout of genes coding for several cytokines (*Il1b*, *Il17a*, *Ifng*) or their receptors (*Il1r*, *Il17r*, *Ifngr*) abolishes the anticancer effects of anthracyclines, and so does the injection of antibodies that neutralize IL-1 β , IL-17 and IFN γ or deplete CD4⁺, CD8⁺ and $\gamma\delta$ T cells (Ghiringhelli et al., 2009; Ma et al., 2011; Michaud et al., 2011; Obeid et al., 2007). Functional experiments suggest a hierarchy of events whereby IL-1 β produced by

dendritic cells (DCs) allow for the activation of IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells, which eventually condition the accumulation of IFN γ -producing CD8⁺ T cells into the tumor bed, one week after the chemotherapy has started (Ma et al., 2011). The reason why anthracyclines provoke this complex anticancer immune response has only been partially elucidated.

In contrast to most other cytotoxic chemotherapeutics, anthracyclines stimulate immunogenic cell death. This type of cell death is characterized by a compendium of subtle biochemical changes in the properties of the plasma membrane as well as in the microenvironment of dying cancer cells (Galluzzi et al., 2012; Green et al., 2009). These changes include the pre-apoptotic exposure of calreticulin (CRT) on the cell surface (which facilitates the engulfment of portions of the dying cells by antigen-presenting cells, APCs) (Gardai et al., 2005) and the post-apoptotic release of high mobility group box 1 (HMGB1) from the nucleus (which binds TLR4 receptors and hence stimulates antigen presentation) (Apetoh et al., 2007). Recently, we have found that the release of ATP by dying tumor cells is also essential for cell death to be perceived as immunogenic. Indeed, ATP stimulates the recruitment of inflammatory cells into the tumor bed and binds P2RX7 receptors on DCs, hence facilitating the activation of the NLRP3 inflammasome and the consequent secretion of IL-1 β by APCs (Ghiringhelli et al., 2009; Martins et al., 2009). Neoplasms in which the pathways leading to CRT exposure or ATP release have been interrupted are refractory to anthracyclines *in vivo* (Michaud et al., 2011; Panaretakis et al., 2009). Along similar lines, the elimination of TLR4 or P2RX7 - as well as that of their intracellular signal transducers MYD88, NLRP3 and caspase-1 - from the host immune system is detrimental for the efficacy of anthracycline-based chemotherapy (Ghiringhelli et al., 2009; Obeid et al., 2007).

An abundant literature has described different DC subsets that would be endowed with the capacity to capture dead cell-associated antigens and to stimulate or subvert anticancer immune responses *in vivo* (Mellman et al., 2011; Palucka and Banchereau, 2012). Beyond plasmacytoid DCs (pDCs), which are mostly tolerogenic (Matta et al., 2010), conventional DCs (cDCs) have been sub-classified into inflammatory and BATF3-dependent DCs. The former exhibit a CD11c⁺CD11b⁺Ly6C⁺ surface phenotype and play an important role in CD4⁺ T-cell and anti-microbial responses (Kool et al., 2008). The latter express CD8 α and/or CD103 and are particularly efficient at engulfing and cross-presenting antigens from dead cells to CD8⁺ T lymphocytes (Albert et al., 1998; Hildner et al., 2008). The differentiation requirements and functional properties of these DC subsets are highly heterogeneous, suggesting their specific involvement in peculiar sets of immune responses (Mellman et al., 2011; Palucka and Banchereau, 2012).

Here, we addressed the question as to how dead tumor cell antigens are presented to T cells after anthracycline treatment *in vivo*. We observed that anthracyclines-based chemotherapy stimulates the ATP-driven and purinergic receptor-dependent accumulation of CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} tumor-infiltrating leukocytes (TILs). This subset of TILs appeared particularly efficient at presenting tumor antigens to CD8⁺ T cells *in vitro* and *in vivo*. Accordingly, experimental manipulations that suppress the recruitment of CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} cells into the tumor bed, such as the enzymatic degradation of local ATP, the pharmacological inhibition of purinergic receptors as well as the injection of neutralizing anti-CD11b antibodies, all abolished the therapeutic effects of anthracyclines. Our results support the notion that CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} TILs are essential for the efficacy of anthracycline-based chemotherapy.

Results

Chemotherapy-induced recruitment of myeloid cells into the tumor bed. When murine MCA205 fibrosarcomas growing in syngenic C57Bl/6 mice reached a diameter of 5 to 10 mm, they contained <1% cells with the surface phenotype of mature DCs (CD11c⁺CD86⁺), macrophages (F4/80⁺CD169⁺) and granulocytes (CD11b⁺Ly6G⁺) and <10% of cells bearing the general myeloid marker CD11b, as detectable by *in situ* immunofluorescence and confocal microscopy. Systemic chemotherapy with the prototypic anthracycline mitoxantrone (MTX) led to a rapid (12 h) increase in the prevalence of CD11c⁺CD86⁺ cells, followed by a slightly delayed (48 h) accumulation of F4/80⁺CD169⁺ and CD11b⁺Ly6G⁺ TILs (**Figures 1A and 1B**). These three cell types were localized in the immediate proximity of dying tumor cells, as shown by the distance to the closest cancer cell positive for cleaved caspase-3 (a marker of apoptosis), which was significantly shorter than that to the closest living cancer cell (**Figures 1C and 1D**). As previously reported (Chow et al., 2011), CD11c⁺CD86⁺ cells were significantly more elongated than F4/80⁺CD169⁺ and CD11b⁺Ly6G⁺ TILs, while both CD11c⁺CD86⁺ and F4/80⁺CD169⁺ cells were larger than CD11b⁺Ly6G⁺ cells (**Figure 1C**). Mechanic and enzymatic dissociation of tumors followed by immunofluorescence and cytofluorometric analyses confirmed the recruitment of myeloid (CD45⁺ CD11b⁺) cells, and more specifically DCs (CD11c⁺MHC class II⁺), bearing monocytic markers (Ly6C⁺7/4⁺), but not of other cell types such as Tregs (CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺) or Th17 cells (CD3⁺CD4⁺IL17⁺), into the tumor bed 2 days after chemotherapy with doxorubicin (DX, another widely employed anthracycline), correlating with the induction of cancer cell death (**Figures 1E and 1F, Figures S1 and S2**). Altogether, these results indicate that distinct classes of myeloid cells accumulate in the tumor bed post-chemotherapy.

Critical involvement of ATP and purinergic receptors in the recruitment of myeloid cells.

To elucidate the mechanisms accounting for the chemotherapy-induced recruitment of myeloid cells into the tumor bed, we took advantage of MCA205 cells that had been engineered to express the ecto-ATPase CD39 on the cell surface (Michaud et al., 2011; Stagg and Smyth, 2010). In response to MTX-based chemotherapy, CD39⁺ MCA205 tumors failed to attract CD11c⁺CD86⁺, F4/80⁺CD169⁺ or CD11b⁺Ly6G⁺ cells, while control tumors (derived from MCA205 cells transduced with an empty vector) did so (**Figure 2A**), indicating that ATP is essential for the recruitment of these myeloid cell types in the tumor bed. Tumors developing in mice that lack the metabotropic purinergic receptor P2Y2 (which mediates the chemotaxis of monocytes towards apoptotic cells) (Chekeni et al., 2010; Elliott et al., 2009) also failed to accumulate CD11c⁺CD86⁺, F4/80⁺CD169⁺ and CD11b⁺Ly6G⁺ cells following the administration of MTX (**Figure 2B**), while mice lacking the ionotropic purinergic receptor P2RX7 exhibited a selective defect in CD11c⁺CD86⁺ recruitment accompanied by accrued macrophage infiltration (**Figure S3**). Suramin, a non-toxic broad-spectrum inhibitor of purinergic receptors (Elliott et al., 2009), prevented the recruitment of both CD11c⁺CD86⁺ and CD11b⁺Ly6G⁺ cells yet failed to affect the frequency, polarization and function of F4/80⁺CD169⁺ macrophages (**Figure 2C and Figure S4**). The local overexpression of CD39 (**Figure 2D**) and the administration of suramin (**Figure 2E**) abolished the growth-inhibitory effects of systemic MTX-based chemotherapy in a similar fashion, underscoring the functional importance of ATP and purinergic receptors for the therapeutic efficacy of anthracyclines.

Identification of APCs among tumor-infiltrating myeloid cells. We observed that the ablation of tumor-draining lymph nodes shortly after chemotherapy or even before tumor implantation failed to reduce the efficacy of anthracycline-based chemotherapy (**Figure S5A**). Similar results

were obtained upon the injection of a lymphotoxin β receptor-Fc fusion protein (LT β R-Fc), serving as a decoy for LT β (**Figure S5B**), as well as following the simultaneous neutralization of IL-7 and IL-7R (**Figure S5C**), two measures that abolish the formation of tertiary lymphoid structures (Grabner et al., 2009; Meier et al., 2007). Moreover, anthracycline-based chemotherapy failed to enhance (and actually reduced) the number of TILs exhibiting the surface phenotype of lymphoid tissue inducers (CD45⁺B220⁻CD11c⁻CD3⁻CD4⁺CD127⁺) (**Figure S5D**), yet led to the activation of tumor infiltrating CD8⁺ T cells and adoptively transferred ovalbumin (OVA)-specific OT1 cells against OVA-expressing MCA205 tumors from within the tumor bed (**Figure S5E**). In this model, the proliferation of intratumoral OT1 cells induced by chemotherapy was not reduced by the surgical removal of draining lymph nodes (**Figures S6A, S6B and S6C**). Moreover, chemotherapy did not increase the frequency of CD11c⁺MHC class II⁺ cells detectable in tumor-draining lymph nodes (**Figure S6D**). Altogether, these results suggest that the presentation of tumor antigens relevant to the success of anticancer chemotherapies may take place in the tumor bed itself, even in the absence of draining lymph nodes and tertiary lymphoid structures.

To determine the origin of intratumoral DCs (CD11c⁺MHC class II⁺ cells), we established MCA205 cancers in CD45.1 mice, treated them by vehicle or chemotherapy, transplanted them one day later to isogenic CD45.2 C57Bl/6 recipients, and measured the frequency of tumor-sessile (CD45.1⁺) *versus* freshly recruited (CD45.2⁺) DCs. The ratio of recipient-derived (CD45.2⁺) *versus* donor-derived (CD45.1⁺) CD11c⁺MHC class II⁺ DCs was increased by chemotherapy, supporting the notion that chemotherapy triggers the recruitment of DC precursors rather than a mere *in situ* differentiation of pre-existing myeloid cells (**Figure S7**). To characterize the intratumoral APCs responsible for the chemotherapy-relevant presentation of

tumor antigens, we engineered mouse CT26 colon cancers cells to express EGFP on the inner leaflet of the plasma membrane owing to the addition of a myristoylation motif (**Figure 3A**). Upon the administration of DX, a significant fraction of CD45⁺ TILs, especially among the CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ subset became positive for EGFP (**Figure 3B**). In this context, CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells exhibited a stronger EGFP positivity and higher expression of CD11c than CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁻ cells and CD11b⁺Ly6G⁺ granulocytes. Moreover, CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells clearly manifested the presence of EGFP in the cytoplasm, an indication of the uptake of antigen from tumor cells. Of note, the frequency of CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁻ cells, which also engulfed tumor antigens, did not increase in response to chemotherapy (**Figures 3C and 3D**).

The accumulation of CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells in the tumor bed post-chemotherapy required ATP (**Figure S8**). These cells mostly exhibited DC markers (CD11c⁺MHC class II^{int}F4/80^{low}), stained positive for 7/4, CD103, CD172a, CCR2 and CX3CR1, but lacked CD205 expression (**Figure S9**), and their frequency increased much more in the tumor bed than in lymphoid organs (**Figure S10**). Next, we treated palpable OVA-expressing MCA205 fibrosarcomas with anthracyclines, followed by the cytofluorometric purification of the Ly6C^{high}Ly6G⁻, Ly6C^{low}Ly6G⁻ and Ly6G⁺ subsets of CD11b⁺ TILs. The frequency of Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells increased following chemotherapy, and these cells turned out to be particularly efficient in stimulating the production of IFN γ by MHC class I-restricted OVA-specific OT1 cells *in vitro*. Moreover, Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells recovered from DX-treated OVA-expressing tumors were much more efficient than their Ly6C^{low}Ly6G⁻ counterparts as well as than Ly6G⁺ cells in stimulating the secretion of IL-2 by MHC class I-restricted OVA-specific B3Z hybridomas (**Figure 3E**). This effect was antigen-specific (as shown by the fact that Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells recovered from OVA-

negative tumors failed to stimulate B3Z cells) and required MHC molecules. Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs recovered from *H2K^bD^b* homozygous knockout hosts (Perarnau et al., 1999) failed indeed to elicit IL-2 production by B3Z cells. Noteworthy, tumor or stromal cells (namely, the CD45⁻ cell subset harvested from anthracycline-treated OVA-expressing MCA205 tumors) failed to directly activate OT1 or B3Z *ex vivo* (**Figure 3E**).

In a subsequent round of experiments, we purified Ly6C^{high}Ly6G⁻, Ly6C^{low}Ly6G⁻ and Ly6G⁺ TILs (all sharing the surface phenotype CD45⁺B220⁻CD3⁻CD11b⁺) from vehicle-treated or DX-treated OVA-expressing MCA205 tumors, and adoptively transferred them into naïve mice that were challenged 10 days later with living OVA-expressing MCA205 cells. Importantly, only Ly6C^{high}Ly6G⁻ (but neither Ly6C^{low}Ly6G⁻ nor Ly6G⁺) TILs harvested from anthracycline-treated tumors were capable of reducing the incidence and growth of tumors (**Figure 3F**), indicating that this population indeed contains functionally competent APCs. Accordingly, purified Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs exhibited a significant increase in the expression of genes relevant to MHC class I or II-restricted antigen presentation following DX-based chemotherapy, *in vivo*. The administration of DX did not polarize Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs toward M1- or M2-type macrophages (Movahedi et al., 2010), as determined by the expression profile of M1- and M2-associated genes, yet increased the abundance of mRNAs transcribed from *Il1β*, *Tnf*, *Il10* and *Il12a* genes (**Figure S11**). Altogether, these results identify CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs as the cells that accumulate in the tumor bed to exert APC functions in response to anthracycline treatment.

ATP-dependent differentiation of myeloid precursors into dendritic cells. Chemotherapy with anthracyclines induced the accumulation of CD34⁺c-Kit⁺Sca-1⁺CD11b^{int}CD16/32^{+/-} multipotent progenitors (MPPs) and CD34⁺c-Kit⁺Sca-1⁻CD11b^{int}CD16/32^{high/low} myeloid precursors (MPs) in tumors (data not shown). A more detailed characterization of myeloid TILs

(CD45⁺B220⁻CD3⁻CD11b⁺) revealed that several cell subsets, including Ly6C^{high}Ly6G⁻, Ly6C^{low}Ly6G⁻ and Ly6G⁺ cells, contained a significant fraction of cells with a common myeloid progenitor (CMP) or granulocyte-monocyte progenitor (GMP) phenotype (CD34⁺c-Kit⁺Sca1⁻CD16/32⁺), and more so after chemotherapy. Of note, the frequency of such CMP or GMP-like cells among Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs was reduced by the presence of the ecto-ATPase CD39 on the surface of tumor cells (**Figure 4A**). Quantitative RT-PCR analyses confirmed that transcription factors and regulators associated with the monocytic lineage (*i.e.*, PU.1, Nab2) (Auffray et al., 2009; Laslo et al., 2006) are upregulated, in particular among Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs, following DX-based chemotherapy, and that this increase is abolished by the expression of CD39 (**Figure 4B**). The expression of transcription factors relevant for the differentiation of granulocytes (*i.e.*, Gfi1) (de la Luz Sierra et al., 2010; Laslo et al., 2006) or the megakaryocytic/erythrocytic lineage (*i.e.*, Gfi1b and Gata1) (Yu et al., 2009) was increased in response to DX, yet predominantly among Ly6G⁺ cells and independently of CD39 (**Figure 4B**). In line with these observations, Ly6C^{high}Ly6G⁻ (but not Ly6G⁺) TILs recovered from tumors and propagated in dedicated methylcellulose cloning conditions could form colonies that were highly proliferative (**Figures 4C, 4D and 4E**). These proliferating cells retained GMP markers and acquired the morphology and phenotype of monocytes (**Figure 4F and Figure S12**). Anthracycline-based chemotherapy dramatically increased the frequency of colony-forming units among Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs, an effect that was precluded by the expression of CD39 by tumor cells (**Figure 4C**). Thus, chemotherapy appears to induce the recruitment of GMPs with monocytic differentiation potential at the tumor site, in an ATP-dependent manner.

In a further round of experiments, we characterized the impact of the intratumoral milieu on the differentiation of Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs into *bona fide* DCs, placing special emphasis on ATP. To

this aim, Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs were recovered from tumors established in CD45.2 C57Bl/6 mice and treated with anthracyclines, and then adoptively transferred into MCA205 tumors growing in congenic CD45.1 mice that were treated with either vehicle (PBS) or DX. Upon transfer into tumors that did not receive chemotherapy, the initial CD45.2⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ cell population mostly differentiated into CD45.2⁺Ly6G⁺ granulocytes. In contrast, upon transfer into anthracycline-treated tumors, a fraction of Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs maintained the Ly6C^{high}Ly6G⁻ phenotype and acquired surface markers of DCs (namely CD11c and MHC class II molecules) (**Figures 5A, 5B and 5C**). Similar results were obtained in a syngeneic (CD45.2) system in which Ly6C^{high}Ly6G⁻ or Ly6G⁺ TILs recovered from anthracycline-treated tumors were labeled with CFSE and then transferred into anthracycline-treated MCA205 tumors. A significant fraction of such Ly6C^{high}Ly6G⁻CFSE⁺ cells acquired the expression of CD11c and CD86 (**Figures 5D and 5E**). Failure to provide chemotherapy as well as transfer into CD39-expressing tumors reduced the frequency of the adoptively transferred cells that could be recovered from the tumor bed (**Figure 5E and 5F**). As a control, the Ly6G⁺ population, which did not contain significant numbers of precursor cells (**Figure 4C**), failed to generate CD11c⁺CD86⁺ cells upon adoptive transfer into anthracycline-treated tumors (**Figure 5E**). Altogether, these results suggest that chemotherapy-elicited ATP release within the tumor bed can skew the differentiation of CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs towards a CD11c⁺ DC-like phenotype, hence subverting their default pathway leading to the generation of Ly6G⁺ granulocytes, which we observed within PBS-treated tumors (**Figure 5C**).

To get further insights into this issue, we co-cultured control or CD39⁺ MCA205 cells that were optionally treated with anthracyclines *in vitro* (please note that CD39 expression abolished the anthracycline-driven accumulation of extracellular ATP, **Figure 5G**) with bone marrow-derived

CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells, a substantial part (around 30-40%) of which showed a GMP phenotype. Only anthracycline-treated CD39⁻ (but not CD39⁺) tumor cells stimulated such a subset to express the monocyte-relevant transcription factor PU.1 (**Figure S13**). Along similar lines, only CD39⁻ cells treated with anthracyclines (but neither anthracycline-treated CD39⁺ cells nor untreated CD39⁻ cells) enhanced the differentiation of CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ bone marrow cells into CD11b⁺Ly6C⁺ monocytes (*de facto* limiting granulocytic differentiation) and allowed for the generation of a significant number of CD11c⁺ MHC class II⁺ DC-like cells (**Figures 5H and 5I**). This skew in differentiation from Ly6G⁺ granulocytes to cells with a CD11b⁺CD11c⁺ DC phenotype was reduced by the pannexin 1 inhibitor DIDS (which limits ATP release from dying cells) and by several purinergic receptor antagonists including oxidized ATP and suramin, but neither by recombinant IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) nor by the TNF α antagonist etanercept (**Figures 5J and 5K**). These results underscore the importance of extracellular ATP and purinergic receptors for the generation of DCs in response to anthracyclin-based chemotherapy.

Identification of the DC subset underlying chemotherapy-induced anticancer immune responses. On theoretical grounds, multiple distinct DC subsets might contribute to the presentation of dead cell antigens to T cells. To identify the specific DC population that is relevant to anticancer chemotherapy, we first injected a PDCA-1-specific antibody into tumor-bearing mice that had received anthracyclin-based chemotherapy. Although the anti-PDCA-1 antibody effectively depleted plasmacytoid DCs (**Figure S14**), this treatment neither suppressed the chemotherapy-induced accumulation of CD11b⁺CD11c-GFP⁺ TILs (in mice that express GFP under the control of the CD11c promoter) (**Figure 6A**) nor reduced the efficacy of anthracycline- and oxaliplatin-based chemotherapy (**Figures 6B and 6C**). Along similar lines, the knockout of

the transcription factor *Batf3*, which is essential for the generation of $CD8\alpha^+CD103^+Langerin^+$ DCs (Hildner et al., 2008), failed to reduce MTX-induced tumor infiltration by $CD11b^+CD11c^+$ TILs (**Figure 6D**), and tumors implanted in wild-type and *Batf3*^{-/-} mice responded to chemotherapy in an undistinguishable fashion (**Figure 6E**). In sharp contrast, the injection of a CD11b-blocking antibody strongly reduced the frequency of $CD11b^+Ly6C^{high}$ cells in the peripheral blood (**Figure 6F**), as well as of $CD11b^+CD11c-GFP^+$ cells infiltrating MTX-treated tumors (**Fig. 6G**). In accord with the finding that $CD11b^+CD11c^+$ TILs are responsible for chemotherapy-related antigen presentation and antitumor protection *in vivo* (**Figure 3**), neutralization of CD11b abolished the anticancer effect of anthracyclines in four different tumor models, namely MCA205 fibrosarcomas and AT3 mammary cancers (**Figures 6H and 6I**), both of which grow in C57Bl/6 mice, F244 sarcomas (**Figure 6J**), which grow in 129/Sv mice, and H2N100 mammary cancers (**Figure 6K**), developing in BALB/c mice. In contrast, the depletion of macrophages (with clodronate-containing liposomes) or neutrophils (with the 1A8 antibody) had no or only minor effects, respectively, on the efficacy of chemotherapy (**Figures S15 and S16**). Altogether, these results underscore the fundamental importance of inflammatory DC-like $CD11b^+CD11c^+$ cells for the efficacy of anticancer chemotherapy.

Discussion

Taken together, our findings provide at least three lines of evidence indicating that a peculiar subtype of TILs, namely CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} cells, which share some of the characteristics of inflammatory DCs (Cheong et al., 2010), is particularly important for the induction of anticancer immune responses by anthracyclines. First, CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} cells were recruited into the tumor bed as early as 12 hours after chemotherapy. Second, manipulations aimed at preventing the intratumoral accumulation of such cells, including (i) the local overexpression of the ATP-degrading enzyme CD39, (ii) the pharmacological blockade of purinergic receptors, and (iii) the neutralization of CD11b with a specific antibody, abolished the immune-dependent anticancer effects of anthracyclines. Third, functional experiments revealed that CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} TILs are particularly efficient in capturing and presenting tumor cell antigens and that such cells - once adoptively transferred into naïve mice - can confer protection against a challenge with living tumor cells.

ATP appears to be particularly important for the infiltration of myeloid TILs into the tumor bed upon anthracycline-based chemotherapy. Indeed, palpable tumors generated from cancer cells manipulated to overexpress the ecto-ATPase CD39 failed to recruit TILs of various types, including cells with a DC-like, macrophage-like or granulocyte surface phenotype in response to anthracyclines. In line with recent results (Chen et al., 2006), P2Y2 turned out to be essential for the chemotherapy-induced recruitment of TILs to the tumor bed. In contrast, pharmacological inhibition of purinergic receptors with suramin was more efficient in blocking the chemotherapy-elicited infiltration of tumors by DCs and granulocytes than that by macrophages. The knockout of *P2rx7* only affected infiltration by DCs, but not that by macrophages and granulocytes,

underscoring a cell type-specific contribution of distinct purinergic receptors to the recruitment and function of the immune infiltrate.

Lymphadenectomy failed to affect the therapeutic response of mice to anthracyclines, nor did so the administration neutralization/blockade of the $LT\beta/LT\beta R$ and $IL-7/IL-7R$ systems. These findings suggest that TILs accumulating in the tumor upon chemotherapy can mediate anticancer immune responses without the need to migrate into lymph nodes nor to form tertiary lymphoid structures. It appears therefore plausible that $CD11c^+CD11b^+Ly6C^{high}$ TILs may efficiently process and present tumor cell antigens (which they readily take up *in vivo*, as indicated by the transfer of cancer cell-derived EGFP into their cytoplasm) locally, within the tumor bed.

ATP can be released from dying cells in response to physiological cell death inducers (such as glucocorticoids acting on thymocytes) (Chekeni et al., 2010; Elliott et al., 2009) or therapeutic interventions including radiotherapy and chemotherapy (Martins et al., 2009). Within tissues, the concentration of extracellular ATP ($[ATP]_e$) in the proximity of stressed and dying cells is believed to decrease along a steep gradient, owing to the presence of ecto-ATPases that are expressed by a variety of cell types (including $FOXP3^+$ Treg and Th17 cells) (Borsellino et al., 2007; Chalmin et al., 2012; Schreiber et al., 2011) as well as of soluble, plasmatic ATPases (Yegutkin et al., 2003). Such a pattern of $[ATP]_e$ may facilitate the migration of myeloid cells towards dying cells. Our results are compatible with the notion that ATP acts as a specific chemotactic (and perhaps chemotropic) signal that emanates from dying cells. Indeed, $CD11c^+CD11b^+Ly6C^{high}$ TILs, as well as other myeloid populations, were found within nests of dying cells, and - more precisely - in close proximity of cells that manifested apoptotic caspase-3 activation (Kroemer et al., 2007). Moreover, ATP may affect the differentiation of pluripotent myeloid cell populations recruited into the tumor bed, in line with its previously reported capacity

to promote the differentiation of hematopoietic stem cells (Barbosa et al., 2011) and the cardinal importance of purinergic receptors for DC differentiation *in vitro* (Wilkin et al., 2001). CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs were found to contain a subset of GMPs that is particularly enriched after chemotherapy, provided that CD39 is not expressed by cancer cells. In the absence of dying tumor cell-derived ATP, CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs (as well as their bone marrow-derived counterparts) preferentially differentiated into granulocytes. The capacity of anthracycline-treated cancer cells to skew the differentiation of CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ TILs towards an inflammatory DC-like phenotype depended on ATP and purinergic receptors, both *in vitro* and *in vivo*. Altogether, these observations suggest a dual role for ATP in the tumor microenvironment. First, ATP would be essential for the recruitment of myeloid cells into the proximity of dying cells and, second, ATP would facilitate the local differentiation and maintenance of cells with the phenotype of inflammatory DCs.

Multiple distinct DC subsets have been involved in anticancer immunosurveillance (Palucka and Banchereau, 2012), and advanced tumors can actually convert tumor-infiltrating DCs into immunosuppressive cells (Gabrilovich et al., 2012). In the specific context of anthracycline-based chemotherapy, however, only inflammatory DC-like CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} cells were found to be essential for optimal immune system-mediated anticancer responses. Indeed, several distinct manipulations suppressing the accumulation of such inflammatory DC-like cells in the tumor bed also abolished the antitumor activity of anthracycline-based chemotherapy. In sharp contrast, the depletion of pDCs, neutrophils or macrophages with antibodies targeting PDCA-1 and Ly6G or clodronate-containing liposomes, as well as the elimination of Batf3-dependent DCs had no major impact on chemotherapeutic responses. Intriguingly, inflammatory DCs, which are particularly important for chemotherapy-elicited immunosurveillance, can differentiate in

response to HMGB1 (Han et al., 2008), suggesting that HMGB1 released from dying cancer cells may further contribute to the maturation/differentiation TILs toward such phenotype. Irrespective of these possibilities, our results unravel the essential contribution of one particular DC-like subset, namely the CD11c⁺CD11b⁺Ly6C^{high} population, to the therapeutic anticancer immune response elicited by anthracyclines.

The question as to whether chemotherapy elicits *de novo* T cell priming and/or reactivates local effector/memory T cells remains elusive. As recently outlined by De Visser and colleagues (Ciampricotti et al., 2012), oncogene-addicted non-immunogenic breast tumors fail to prime a significant T-cell response when they are treated with anthracyclines. However, we speculate that chemotherapy-induced immunogenic cell death may at least reboot antigen-specific T-cell responses that have been initiated prior to chemotherapy. Our findings indicate that (i) draining lymph nodes are dispensable for the immune system-mediated antitumor effects of anthracyclines, (ii) inflammatory DCs accumulate within neoplastic lesions in response to anthracyclins, and these cells function as efficient APCs when extracted from tumor beds, and (iii) no significant CD8⁺ T-cell (OT1) priming against the immunodominant epitopes of OVA is detectable in the spleen and lungs by day 7 after chemotherapy (not shown), although such response occurs within the tumor. Moreover, by targeting IL-10R β -expressing TILs, pegylated IL-10-based therapy has been shown to reactivate intratumoral cancer-specific cytotoxic CD8⁺ TILs, to restore the *in situ* expression of Th1 cytokines, granzymes and antigen presentation molecules, and to culminate in the control of tumor growth, even in the absence of draining lymph nodes (Mumm et al., 2011). Further supporting this view, our data show that anthracyclines fail to significantly modulate the tumor microenvironment and do not interfere with the M1/M2 macrophage polarization. Instead, anthracyclines promoted a crucial ATP-

dependent pathway whereby the intratumoral accumulation of GMPs and inflammatory monocytes *in fine* facilitate the local differentiation of inflammatory DCs and the activation of T cells against cancer.

Experimental procedures

Tumor chemotherapy models. For the establishment of syngenic solid tumors, CB57Bl/6 mice received *s.c.* 5×10^5 EL-4, AT3, WT MCA205 or OVA-expressing MCA205 cells, BALB/c mice were inoculated *s.c.* with 5×10^5 H2N100, WT CT26 or MyrPalm-mEGFP-expressing CT26 cells, while WT or *Batf3*^{-/-} 129/Sv mice were engrafted *s.c.* with 1×10^6 F244 cells. Tumor growth was then monitored routinely by means of a common caliper, and when its surface reached 25-45 mm² (day 0), mice received either 2.9 mg/Kg DX *i.t.* (in 50 μ L PBS), either 5.2 mg/Kg MTX *i.p.* (in 200 μ L PBS), either 5 mg/Kg oxaliplatin (OX, in 200 μ L PBS) *i.p.*, or equivalent volumes of solvent. When appropriate, mice received 100 mg/Kg intravenous suramin (in 40 μ L PBS), or an equivalent volume of solvent, on the same day of chemotherapy. Alternatively, mice received on days -1, 0 and weekly thereafter until the end of the experiment, 10 mg/Kg anti-CD11b antibodies (clone 5C6), anti-PDCA-1 antibodies (clone JF05-1C2.4.1, from Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) or anti-Ly6G (clone 1A8, from BioXCell, West Lebanon, NH, USA). In some protocols, tumor-bearing mice received on day -1, 1 and twice weekly thereafter until the end of the experiment, 25 mg/Kg anti-IL-7 antibodies (clone M25) and anti-IL-7R antibodies (clone A7R34), all from BioXCell, West Lebanon, NH, USA, or 25 mg/Kg LT β R-Fc fusion proteins (kindly provided by Pr Yang-Xin Fu, University of Chicago, Chicago, IL, USA). Alternatively, tumor-bearing mice received (on day -1 and 2) liposomes loaded with PBS or clodronate (from Dr. Nico van Rooijen, Foundation Clodronate Liposomes, The Netherlands), as a 100 μ L *s.c.* injection near the tumor plus 100 μ L *i.p.* injection.

The complete set of Experimental Procedures is available as Supplemental Material online at www.cell.com/immunity

Acknowledgments: We thank Philippe Rameau, Yann Lécluse for assistance with FACS experiments, Thierry Tordjmann and Jean-Luc Villeval for fruitful discussion, as well as colleagues from the animal facility of the IGR. We acknowledge Robert Schreiber for providing F244 tumor cells, Andrew D. Weinberg for OVA-expressing MCA205 cells and Kenneth Murphy for *Batf3*^{-/-} mice. GK and LZ are supported by the Ligue Nationale contre le Cancer (Equipes labellisées), AXA Chair for Longevity Research, Agence Nationale pour la Recherche (ANR AUTOPH, ANR Emergence), European Commission (Active p53, Apo-Sys, ChemoRes, ApopTrain), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Institut National du Cancer (INCa), Fondation de France, Cancéropôle Ile-de-France, Fondation Bettencourt-Schueller and the LabEx Immuno-Oncology. YM and HY are supported by China Scholarship Council (CSC). SA and IM are supported by the Ligue Nationale contre le Cancer. JPPC is supported by Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil). DH was supported by ARC. MJS was supported by a National Health and Medical Research Council (NH&MRC) Australia Fellowship and Program Grant and a grant from the Victorian Cancer Agency.

Author contributions: YM, SA, SM, TY, LA, HY, JPPC, DH, HD, KS, IM, FS, MM, OK, AQS, LM, EV and ND performed experiments. YM, MS, RK, ES, SG, PT, LZ and GK conceived the study. YM, SA, LG, LZ and GK wrote the paper.

Author information: The authors declare no conflicts of interest. Correspondence and requests for materials should be addressed to G.K. (kroemer@orange.fr) or L.Z. (zitvogel@igr.fr).

Supplemental Material is linked to the online version of the paper at www.cell.com/immunity

References

Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.

Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., *et al.* (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13, 1050-1059.

Auffray, C., Sieweke, M.H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27, 669-692.

Barbosa, C.M., Leon, C.M., Nogueira-Pedro, A., Wasinsk, F., Araujo, R.C., Miranda, A., Ferreira, A.T., and Paredes-Gamero, E.J. (2011). Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. *Cell Death Dis* 2, e165.

Borsellino, G., Kleinewietfeld, M., Di Mitri, D., Sternjak, A., Diamantini, A., Giometto, R., Hopner, S., Centonze, D., Bernardi, G., Dell'Acqua, M.L., *et al.* (2007). Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood* 110, 1225-1232.

Casares, N., Pequignot, M.O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., *et al.* (2005). Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *J Exp Med* 202, 1691-1701.

Chalmin, F., Mignot, G., Bruchard, M., Chevriaux, A., Vegran, F., Hichami, A., Ladoire, S., Derangere, V., Vincent, J., Masson, D., *et al.* (2012). Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* 36, 362-373.

Chekeni, F.B., Elliott, M.R., Sandilos, J.K., Walk, S.F., Kinchen, J.M., Lazarowski, E.R., Armstrong, A.J., Penuela, S., Laird, D.W., Salvesen, G.S., *et al.* (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* 467, 863-867.

Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., and Junger, W.G. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 314, 1792-1795.

Cheong, C., Matos, I., Choi, J.H., Dandamudi, D.B., Shrestha, E., Longhi, M.P., Jeffrey, K.L., Anthony, R.M., Kluger, C., Nchinda, G., *et al.* (2010). Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209(+) dendritic cells for immune T cell areas. *Cell* 143, 416-429.

Chow, A., Brown, B.D., and Merad, M. (2011). Studying the mononuclear phagocyte system in the molecular age. *Nat Rev Immunol* 11, 788-798.

Ciampricotti, M., Hau, C.S., Doornebal, C.W., Jonkers, J., and de Visser, K.E. (2012). Chemotherapy response of spontaneous mammary tumors is independent of the adaptive immune system. *Nat Med* 18, 344-346; author reply 346.

de la Luz Sierra, M., Sakakibara, S., Gasperini, P., Salvucci, O., Jiang, K., McCormick, P.J., Segarra, M., Stone, J., Maric, D., Zhu, J., *et al.* (2010). The transcription factor Gfi1 regulates G-CSF signaling and neutrophil development through the Ras activator RasGRP1. *Blood* 115, 3970-3979.

Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C., *et al.* (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 28, 105-113.

Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., *et al.* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* 461, 282-286.

Gabrivovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nat Rev Immunol* 12, 253-268.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., *et al.* (2012). Molecular definitions of

cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 19, 107-120.

Gardai, S.J., McPhillips, K.A., Frasch, S.C., Janssen, W.J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J.E., Bratton, D.L., Oldenborg, P.A., Michalak, M., and Henson, P.M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 123, 321-334.

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-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15, 1170-1178.

Grabner, R., Lotzer, K., Dopping, S., Hildner, M., Radke, D., Beer, M., Spanbroek, R., Lippert, B., Reardon, C.A., Getz, G.S., *et al.* (2009). Lymphotoxin beta receptor signaling promotes tertiary lymphoid organogenesis in the aorta adventitia of aged ApoE^{-/-} mice. *J Exp Med* 206, 233-248.

Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol* 9, 353-363.

Han, J., Zhong, J., Wei, W., Wang, Y., Huang, Y., Yang, P., Purohit, S., Dong, Z., Wang, M.H., She, J.X., *et al.* (2008). Extracellular high-mobility group box 1 acts as an innate immune mediator to enhance autoimmune progression and diabetes onset in NOD mice. *Diabetes* 57, 2118-2127.

Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., *et al.* (2008). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha⁺ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science* 322, 1097-1100.

Kool, M., Soullie, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H., and Lambrecht, B.N. (2008). Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells. *J Exp Med* 205, 869-882.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 87, 99-163.

Ladoire, S., Mignot, G., Dabakuyo, S., Arnould, L., Apetoh, L., Rebe, C., Coudert, B., Martin, F., Bizollon, M.H., Vanoli, A., *et al.* (2011). In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. *J Pathol* 224, 389-400.

Laslo, P., Spooner, C.J., Warmflash, A., Lancki, D.W., Lee, H.J., Sciammas, R., Gantner, B.N., Dinner, A.R., and Singh, H. (2006). Multilineage transcriptional priming and determination of alternate hematopoietic cell fates. *Cell* 126, 755-766.

Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Mattarollo, S.R., Delahaye, N.F., Pereira, P., Boucontet, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Casares, N., *et al.* (2011). Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *J Exp Med* 208, 491-503.

Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., Seror, C., Metivier, D., Perfettini, J.L., Zitvogel, L., *et al.* (2009). Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* 8, 3723-3728.

Matta, B.M., Castellaneta, A., and Thomson, A.W. (2010). Tolerogenic plasmacytoid DC. *European journal of immunology* 40, 2667-2676.

Meier, D., Bornmann, C., Chappaz, S., Schmutz, S., Otten, L.A., Ceredig, R., Acha-Orbea, H., and Finke, D. (2007). Ectopic lymphoid-organ development occurs through interleukin 7-mediated enhanced survival of lymphoid-tissue-inducer cells. *Immunity* 26, 643-654.

Mellman, I., Coukos, G., and Dranoff, G. (2011). Cancer immunotherapy comes of age. *Nature* 480, 480-489.

Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., *et al.* (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334, 1573-1577.

Movahedi, K., Laoui, D., Gysemans, C., Baeten, M., Stange, G., Van den Bossche, J., Mack, M., Pipeleers, D., In't Veld, P., De Baetselier, P., *et al.* (2010). Different tumor microenvironments

contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer research* 70, 5728-5739.

Mumm, J.B., Emmerich, J., Zhang, X., Chan, I., Wu, L., Mauze, S., Blaisdell, S., Basham, B., Dai, J., Grein, J., *et al.* (2011). IL-10 elicits IFN γ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell* 20, 781-796.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13, 54-61.

Palucka, K., and Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews Cancer* 12, 265-277.

Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A.C., Chapman, D.C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., *et al.* (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal* 28, 578-590.

Perarnau, B., Saron, M.F., Reina San Martin, B., Bervas, N., Ong, H., Soloski, M.J., Smith, A.G., Ure, J.M., Gairin, J.E., and Lemonnier, F.A. (1999). Single H2Kb, H2Db and double H2KbDb knockout mice: peripheral CD8⁺ T cell repertoire and anti-lymphocytic choriomeningitis virus cytolytic responses. *European journal of immunology* 29, 1243-1252.

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.

Stagg, J., and Smyth, M.J. (2010). Extracellular adenosine triphosphate and adenosine in cancer. *Oncogene* 29, 5346-5358.

Wilkin, F., Duhant, X., Bruyns, C., Suarez-Huerta, N., Boeynaems, J.M., and Robaye, B. (2001). The P2Y₁₁ receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 166, 7172-7177.

Yegutkin, G.G., Samburski, S.S., and Jalkanen, S. (2003). Soluble purine-converting enzymes circulate in human blood and regulate extracellular ATP level via counteracting pyrophosphatase

and phosphotransfer reactions. *FASEB journal* : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology *17*, 1328-1330.

Yu, M., Riva, L., Xie, H., Schindler, Y., Moran, T.B., Cheng, Y., Yu, D., Hardison, R., Weiss, M.J., Orkin, S.H., *et al.* (2009). Insights into GATA-1-mediated gene activation versus repression via genome-wide chromatin occupancy analysis. *Mol Cell* *36*, 682-695.

Zappasodi, R., Pupa, S.M., Ghedini, G.C., Bongarzone, I., Magni, M., Cabras, A.D., Colombo, M.P., Carlo-Stella, C., Gianni, A.M., and Di Nicola, M. (2010). Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death. *Cancer research* *70*, 9062-9072.

Legends to Figures

Figure 1. Chemotherapy induces the accumulation of myeloid cells in close proximity of dying cells. (A-F) Wild-type C57Bl/6 mice bearing MCA205 fibrosarcomas were treated with mitoxantrone (MTX) *i.p.* (A-D), doxorubicin (DX) *i.t.* (E,F), or with an equivalent volume of PBS, as a single injection. At the indicated time points (48 h where not indicated), tumors were harvested and processed for the detection of the indicated proteins by immunofluorescence microscopy (A-D) or for cytofluorometric determinations (E,F). Hoechst 33342 was employed as nuclear counterstaining. In panel A, representative images are reported (scale bar = 25 μm). In panel B, quantitative data on the frequency of the indicated cell populations are shown (in 10 viewfields for at least $n = 10$ distinct tumors). In panel C, the indicated myeloid cell populations are quantitatively characterized for intracellular distance with tumor cells displaying (+) or not (-) activated caspase 3 (Casp3a) (left panel), cell surface (middle panel) and the length/width ratio (right panel), as determined by morphometric methods. Boxplots report the lower and upper quartile plus the median value. Whiskers indicate min and max values. Panel D illustrates a CD11c⁺CD86⁺ dendritic cell (DC) in the close proximity of a dying tumor cell (scale bar = 10 μm). In panel E, representative dot plots of cells from PBS-treated and DX-treated tumors are depicted, including dead cells that incorporate the exclusion dye vivid yellow and living CD11b⁺ CD45⁺ tumor-infiltrating leucocytes. Numbers indicate the percentage of cells found within the corresponding gate. The corresponding quantitative data are reported in panel F. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student's *t* test).

Figure 2. Obligate contribution of ATP and purinergic receptors to anthracycline-induced accumulation of myeloid cells and chemotherapeutic outcome. (A-C) Wild-type (WT) or *P2y2*^{-/-} C57Bl/6 mice bearing WT or CD39-expressing (CD39) MCA205 fibrosarcomas received

mitoxantrone (MTX) *i.p.* or an equivalent volume of PBS, either alone or combined with suramine *i.v.*, and tumor-infiltrating leucocytes of the indicated phenotypes were quantified 48 h later by immunofluorescence microscopy. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns = non significant (unpaired, two-tailed Student's *t* test). **(D,E)** WT C57Bl/6 mice were inoculated *s.c.* with WT or CD39 MCA205 cells and tumor size was routinely assessed. When tumor became palpable (surface area = 25 mm²), mice received MTX *i.p.* or an equivalent volume of PBS, either alone or combined with suramine *i.v.*. * $p < 0.05$ (Log-rank test).

Figure 3. Chemotherapy promotes the uptake and presentation of tumor antigens by CD11c⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ tumor-infiltrating leucocytes. **(A-D)** BALB/c mice bearing MyrPalm-EGFP-expressing CT26 tumors were treated with DX *i.t.* or with an equivalent volume of PBS. At the indicated time points (38 h, where not indicated), tumors were harvested and processed for immunofluorescence studies **(A,C)** or cytofluorometric determinations **(B,D)**. Panel **A** depicts MyrPalm-mEGFP-expressing mouse colon carcinoma CT26 cells, exhibiting a plasma membrane-restricted distribution of EGFP (scale bar = 7.5 μ m). In panel **B**, representative dot plots of EGFP⁺CD45⁺ tumor-infiltrating leucocytes (TILs) stained for CD11b, Ly6C and Ly6G are illustrated on the left, while quantitative data are reported on the right. Panel **C** illustrates the uptake of tumor antigens (as exemplified by EGFP) by myeloid cells of the indicate phenotype (upper panels, scale bar = 2.5 μ m) and report quantitative kinetic data (lower panels). In panel **D**, representative cytofluorometric distribution of EGFP and CD11c mean fluorescence intensity for the indicated myeloid cell populations are reported. In panels **A** and **C**, Hoechst 33342 was employed as nuclear counterstaining. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student's *t* test). **(E)** WT or *H2K^bD^b* C57Bl/6 mice bearing OVA-expressing (OVA) MCA205 fibrosarcomas were treated as in **A-D** and CD11b⁺ TILs were purified by cytofluorometry 38 h

after chemotherapy upon staining with anti-Ly6C and anti-Ly6G antibodies (gating exemplified on the left). Sorted cells were co-cultured with OT1 cells for 72 h or with OVA-specific T-cell hybridoma B3Z cells for 36 h and supernatants were assessed for interferon γ (IFN γ , mid panels) and interleukin-2 (IL-2, right panels) levels. Numbers indicate the percentage of cells found within the corresponding gate. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student's t test). **(F)** Alternatively, PBS (negative control) or myeloid cells sorted as in **E** from PBS- (left panels) or DX-treated (right panels) tumors were inoculated in the footpad of naïve WT C57Bl/6 mice, which were re-challenged 10 days later with living OVA MCA205 tumor cells. Tumor incidence and growth were then routinely assessed. Results from one representative experiment out of three independent ones involving 10 mice/group is depicted. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (Log-rank test).

Figure 4. Chemotherapy-induced and ATP-dependent enrichment of granulocyte monocyte progenitors in tumor-infiltrating leucocytes. **(A-F)** C57Bl/6 mice bearing wild-type (WT) or CD39-expressing (CD39) MCA205 fibrosarcomas were treated doxorubicin (DX) *i.t.*, or with an equivalent volume of PBS. Twenty-four h later, tumors were harvested and the expression of hematopoietic progenitor markers (CD34, c-Kit, Sca-1 and CD16/32) on CD45⁺CD3⁻B220⁻CD11b⁺ (Ly6C^{high}, Ly6C^{low} or Ly6G⁺) tumor-infiltrating cells was analyzed by flow cytometry **(A)**. Numbers indicate the percentage of cells found within the corresponding gate. Please note that the CD34⁺c-Kit⁺Sca-1⁻CD16/32⁺ phenotype marks common myeloid progenitors (CMPs) as well as granulocyte-monocyte progenitor (GMPs). Alternatively, tumors were harvested at the indicated time points (24 h, where not indicated), and CD11b⁺Ly6C^{high} and CD11b⁺Ly6G⁺ tumor-infiltrating cells were characterized by RT-PCR for the expression of transcriptional regulators (the monocytic factors PU.1 and Nab-2, the granulopoietic factor Gfi-1, and the erythroid and megakaryocytic factors Gata-1 and Gfi1b) **(B)** or used in clonogenic assays in

methylcellulose-based medium (C-F). Panel C reports quantitative data (numbers of colony). Panels D-F illustrate the morphology of colonies generated from CD11b⁺Ly6C^{high} TILs (scale bar = 50 μm) (D), the presence of Ki-67⁺ dots in the nucleus of cells, as assessed by immunofluorescence microscopy upon Hoechst 33342 counterstaining (scale bar = 10 μm) (E), and a May-Grünwald-Giemsa staining of a cytospin prepared from these cells (scale bar = 5 μm, original magnification = 400X) (F). ***p*<0.01, ****p*<0.001 (unpaired, two-tailed Student's *t* test).

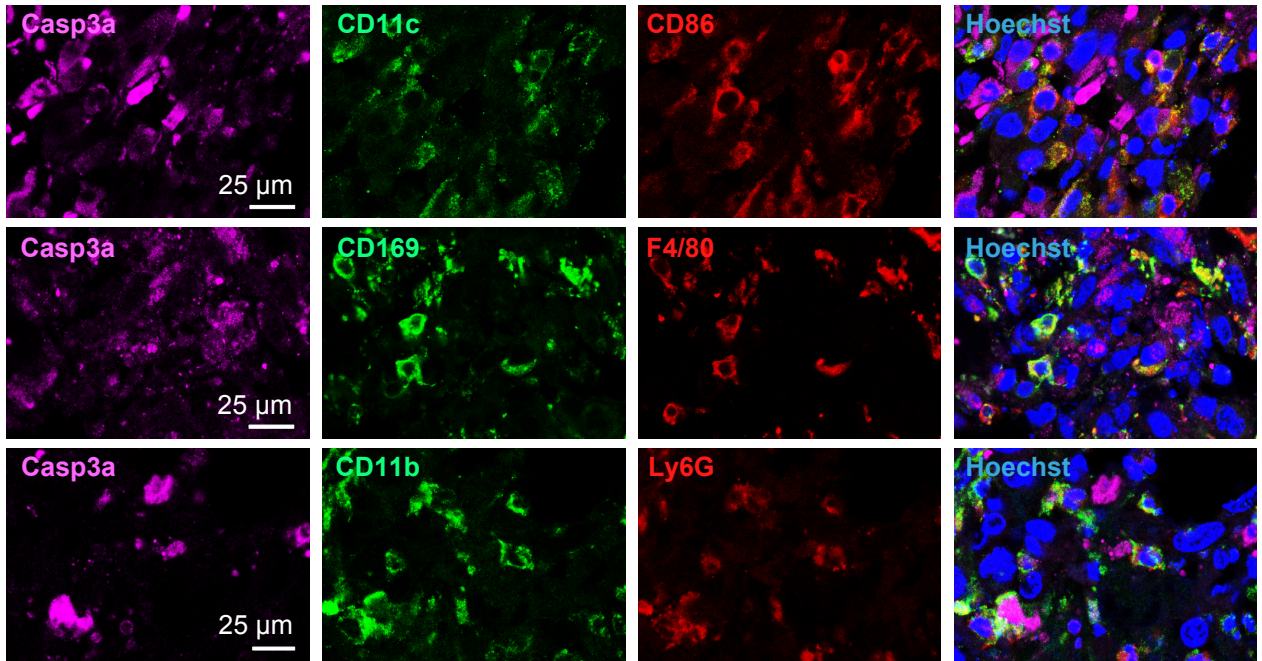
Figure 5. Chemotherapy-induced and ATP-dependent differentiation of CD11bLy6C^{high+} tumor-infiltrating leucocytes into inflammatory DC-like cells. (A-C) CD11b⁺Ly6C^{high} cells purified from doxorubicin (DX)-treated tumors from C57Bl/6 CD45.2 mice were injected into MCA205 tumors implanted in C57Bl/6 CD45.1 mice that had been pretreated with DX *i.t.* or with an equivalent volume of PBS. After 48 h, tumors were collected and the phenotype of transferred CD45.2⁺ cells was analyzed by flow cytometry. Panel A illustrates representative dot plots (numbers indicate the percentage of cells found within the corresponding gate), while in panels B and C quantitative data on the percentage of recovered CD45.2⁺ cells and on their differentiation into CD11b⁺Ly6C⁺Ly6G⁻, CD11b⁺Ly6G⁺ or CD11c⁺MHCII⁺ cells are reported. (D-F) CD11b⁺Ly6C^{high} or Ly6G⁺ cells sorted from MCA205 fibrosarcomas treated with DX were labeled with CFSE and inoculated into wild-type (WT) or CD39-expressing (CD39) MCA205 fibrosarcomas that had been pretreated 48 h earlier with mitoxantrone (MTX) *i.p.* or with an equivalent volume of PBS. Forty-eight h later, tumors from recipient mice were harvested and processed for immunofluorescence microscopy-assisted determinations. Representative images are depicted in panel D (scale bar = 10 μm), while quantitative data are reported in panels E (percentage of CD11c⁺ and CD86⁺ cells) and F (number of CFSE⁺ cells/tumor). Data are reported as means ± SEM (n = 2 independent experiments with 3-5 mice/group). (G-K) WT and CD39

MCA205 tumor cells were treated with PBS or 25 μ M DX for 20 h, followed by the quantification of extracellular ATP by a luciferase-based assay (**G**) or the co-culture with bone marrow-derived (BM) Ly6C^{high}Ly6G⁻ cells for 5 days in the presence of 5 ng/mL GM-CSF and 5 ng/mL IL-4, alone or combined with 10 μ M 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DiDS), 500 μ M oxidized ATP (oATP), 2 mM suramin, 20 μ g/mL interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA) or 20 μ g/mL etanercept (**H-K**). Panels **H** and **I** depict dot plots representative of the commitment towards the monocytic (Ly6C⁺Ly6G⁻) or granulocytic (Ly6G⁺) lineage, and toward a DC-like phenotype (CD11c⁺MHCII⁺), respectively. Numbers indicate the percentage of cells found within the corresponding gate. Panels **J** and **K** summarize quantitative data. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student's t test).

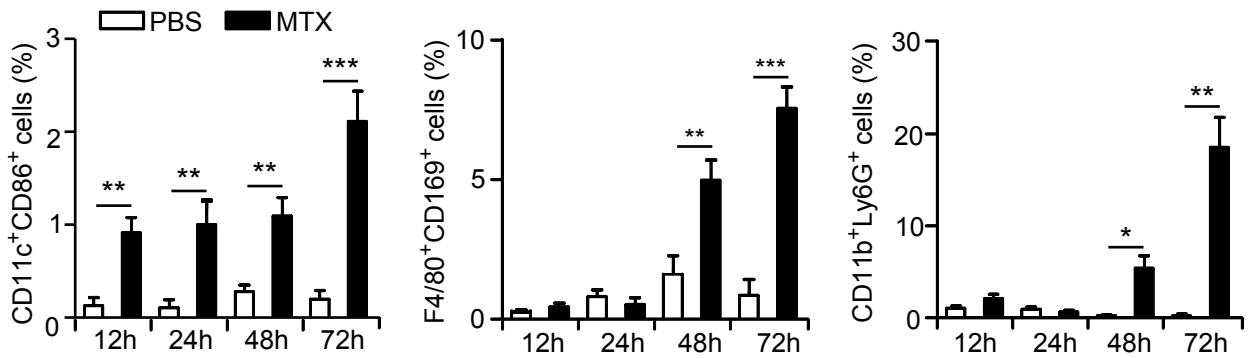
Figure 6. The therapeutic efficacy of anthracyclines relies on CD11b⁺ myeloid DCs but neither on plasmacytoid DCs nor on Batf3-dependent DCs. (**A**) CD11c-DTR/GFP mice bearing wild-type (WT) MCA205 fibrosarcomas were treated with mitoxantrone (MTX) *i.p.*, combined with either anti-PDCA-1 or isotype control antibodies (IgGs). Nine days later, the percentage of CD11c⁺CD11b-GFP⁺ tumor-infiltrating cells was determined by immunofluorescence microscopy. ns = non significant (unpaired, two-tailed Student's t test). (**B,C**) C57Bl/6 mice were inoculated with WT MCA205 fibrosarcoma (**B**) or EL-4 lymphoma (**C**) cells (day -7) and, on day 0, they were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* (**B**) or oxaliplatin (OX) *i.p.* (**C**), combined with either anti-PDCA-1 antibodies or isotype control IgGs on days -1, 1 and 2. Tumor growth was routinely assessed throughout the experiment (n = 5-8 mice/group). ns = non significant, ** $p < 0.01$ (Log-rank test). (**D**) WT or *Batf3*^{-/-} mice bearing F244 sarcomas were treated with MTX *i.p.* or an equivalent volume of PBS. Two days later, tumors were harvested and processed for the immunofluorescence microscopy-assisted detection of CD11b⁺CD11c⁺ DCs within the

tumor bed (n = 4-5 mice/group). ns = non significant (unpaired, two-tailed Student's *t* test). **(E)** WT or *Batf3*^{-/-} 129/Sv mice were inoculated with WT F244 sarcoma cells (day -7) and, on day 0, they were treated with DX *i.t.* or an equivalent volume of PBS. Tumor growth was routinely assessed throughout the experiment (n = 5-8 mice/group). ns = non significant, ***p*<0.01 (Log-rank test). **(F,G)** CD11c-DTR/GFP mice bearing WT MCA205 fibrosarcomas were treated with MTX *i.p.*, DX *i.t.* or with an equivalent volume of PBS, either anti-CD11b antibodies or isotype control IgGs, which were administered one day before and on the same day than chemotherapy. Twenty and thirty-eight h later, blood **(F)** and tumor **(G)** samples were collected and analyzed by flow cytometry and immunofluorescence microscopy, respectively, for the abundance of CD11b⁺Ly6C^{high} and CD11c⁺CD11b-GFP⁺ cells, respectively. ***p*<0.01, ****p*<0.001 (unpaired, two-tailed Student's *t* test). **(H-K)** C57Bl/6 **(H,I)**, 129/Sv **(J)** or BALB/c **(K)** mice were inoculated with WT MCA205 **(H)**, AT3 **(I)**, F244 **(J)** and H2N100 **(K)** cells (day = -7) and, on day 0, they were treated DX *i.t.* or an equivalent volume of PBS, combined with either anti-CD11b antibodies or isotype control IgGs (n > 5 mice/group). ns = non significant, ***p*<0.01, ****p*<0.001 (Log-rank test).

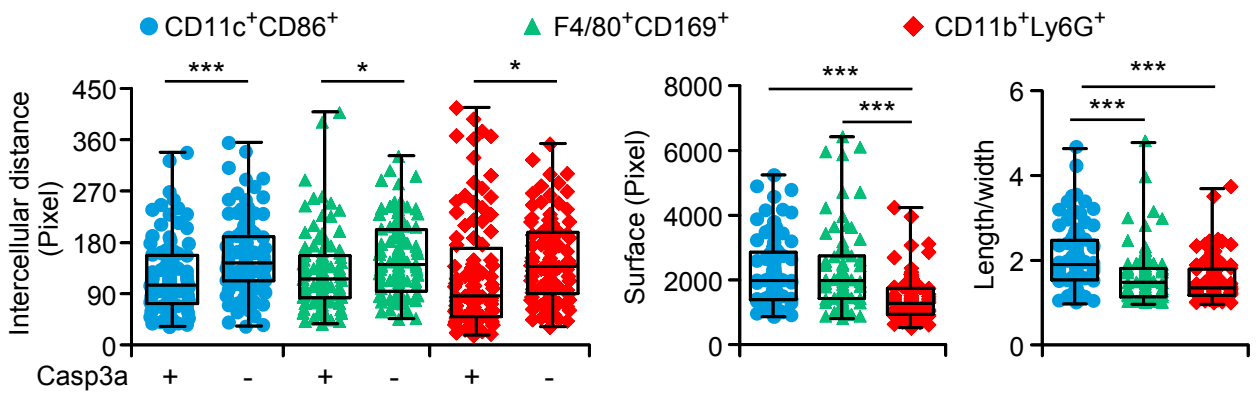
A



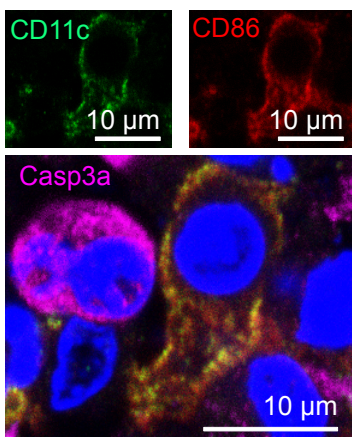
B



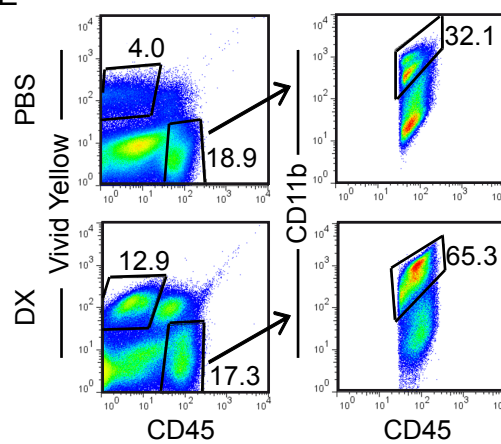
C



D



E



F

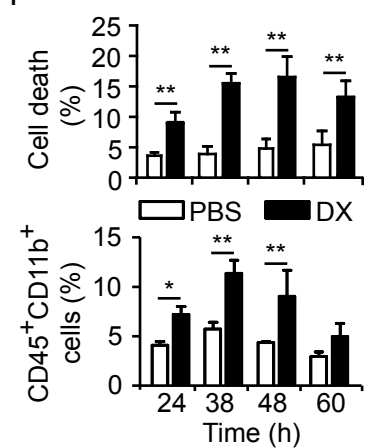


Figure 1

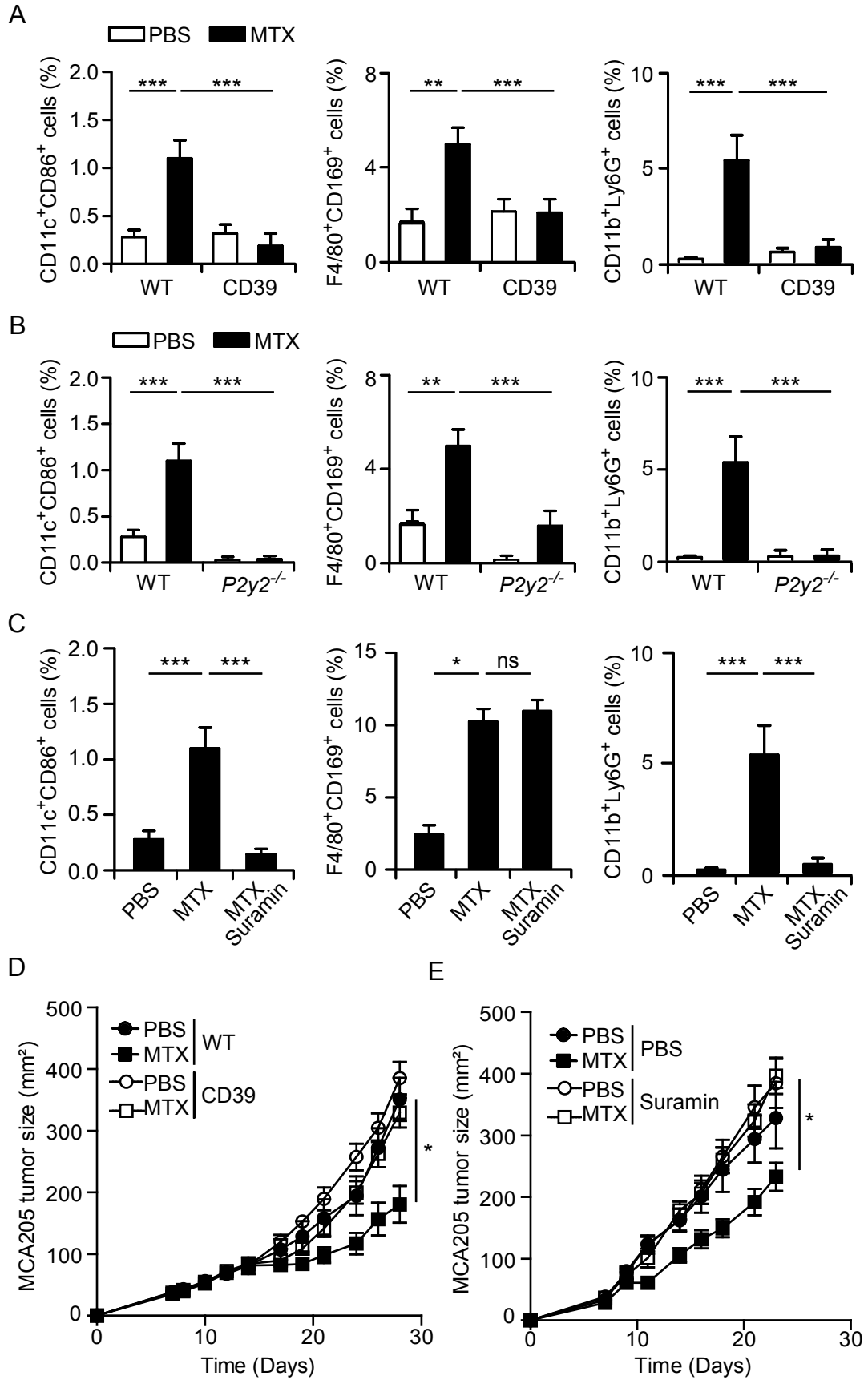


Figure 2

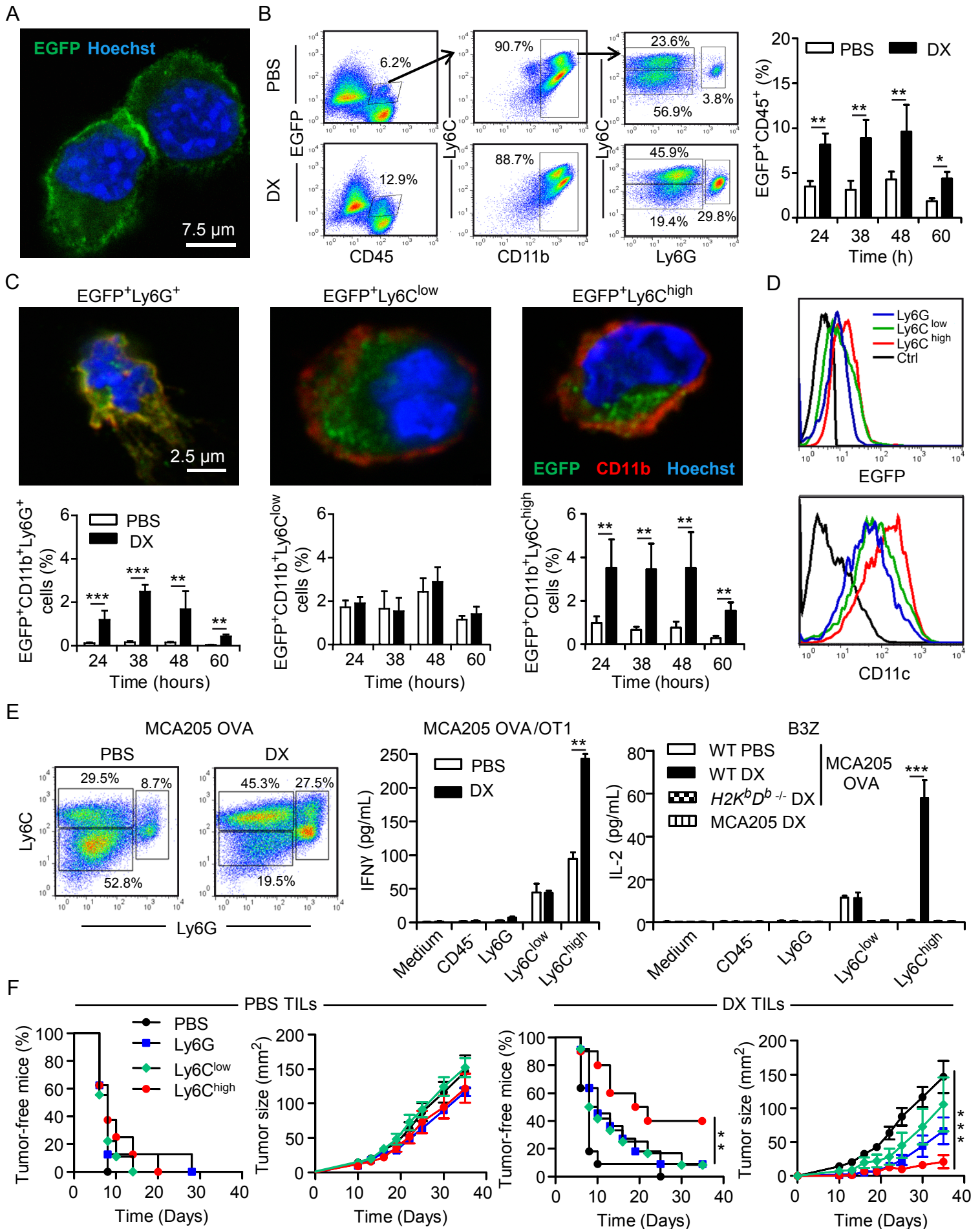


Figure 3

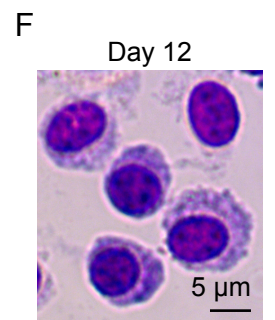
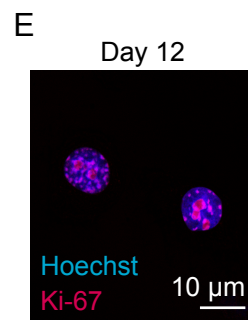
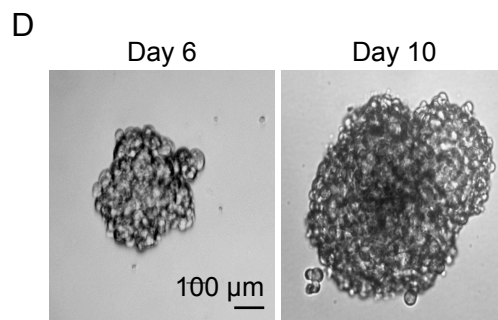
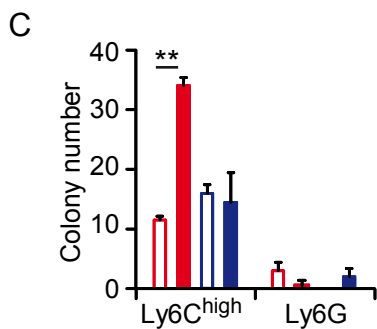
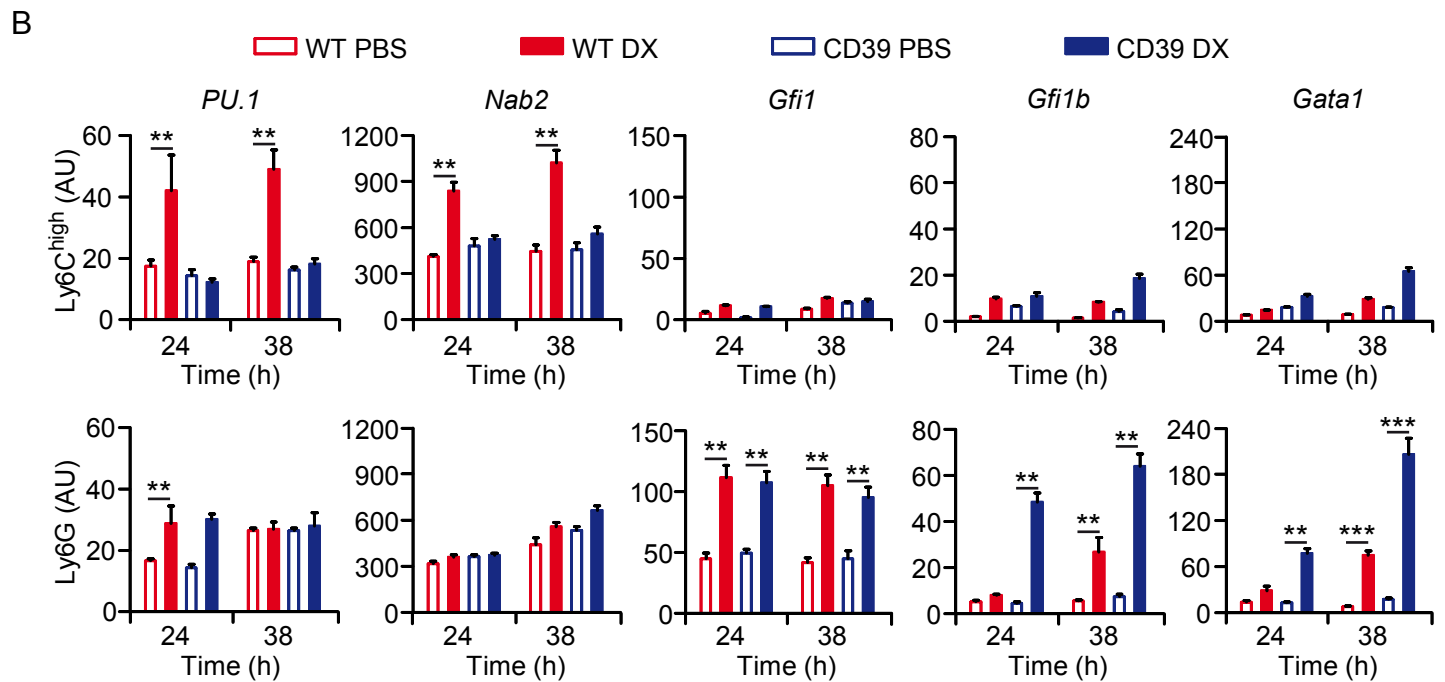
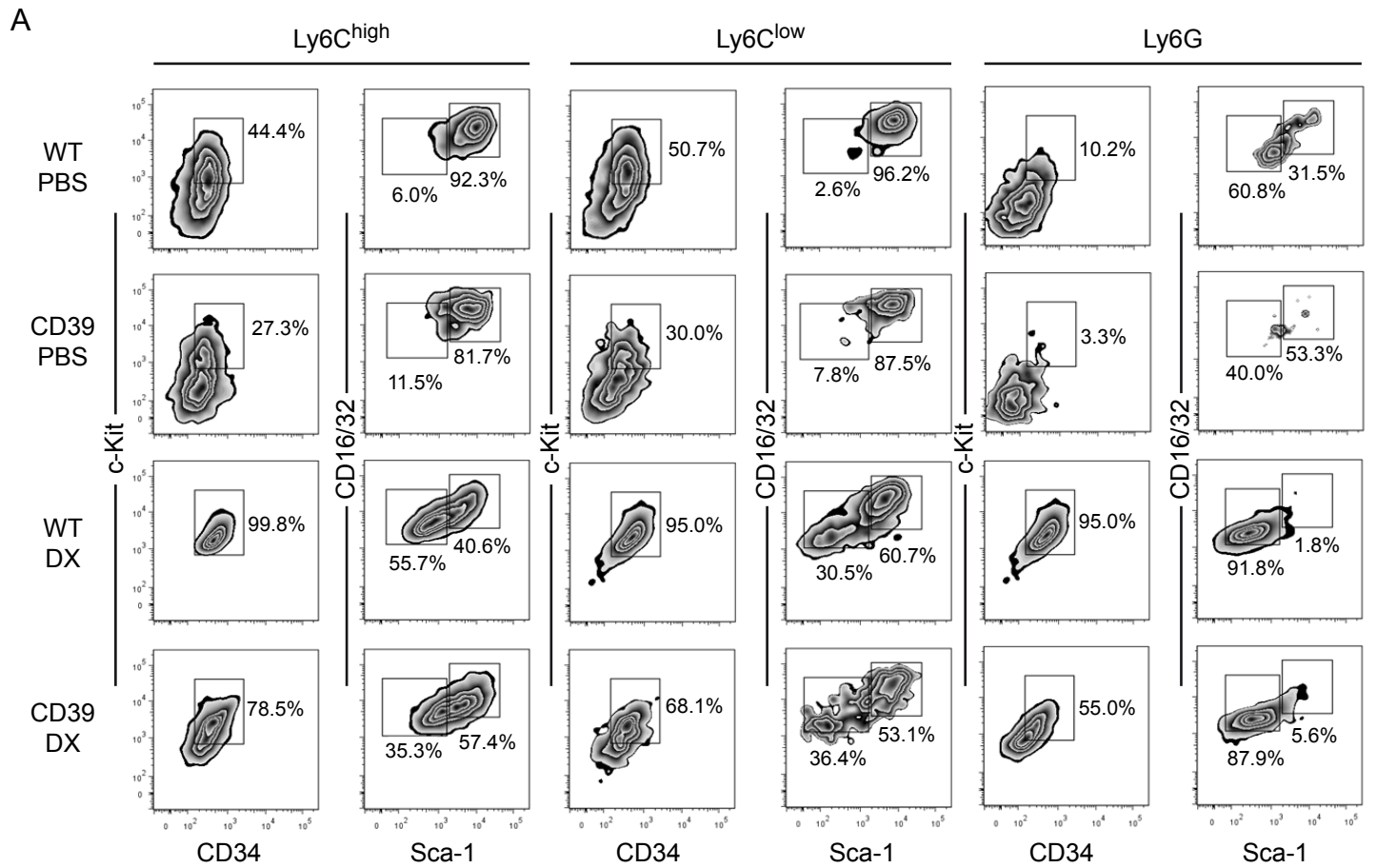


Figure 4

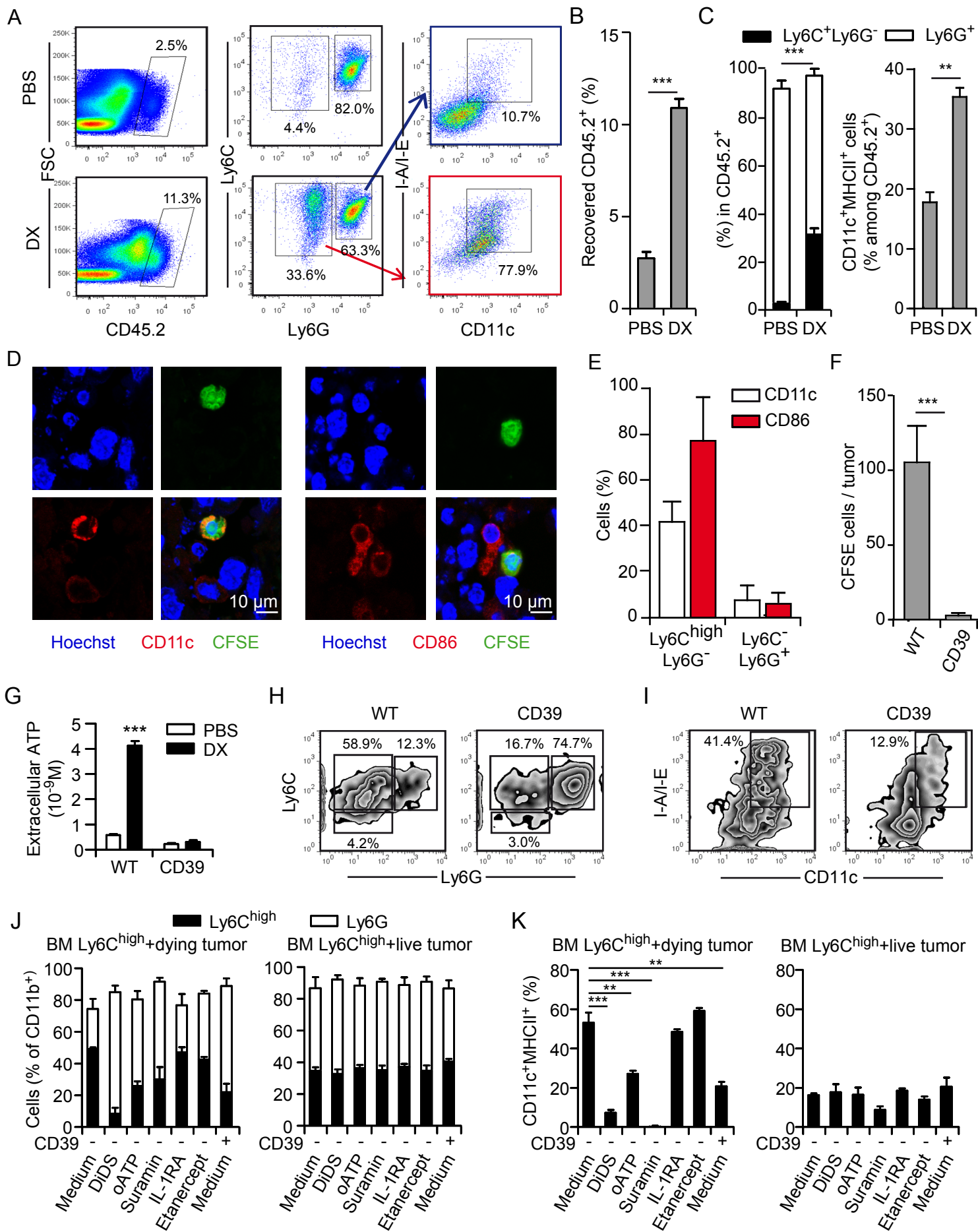


Figure 5

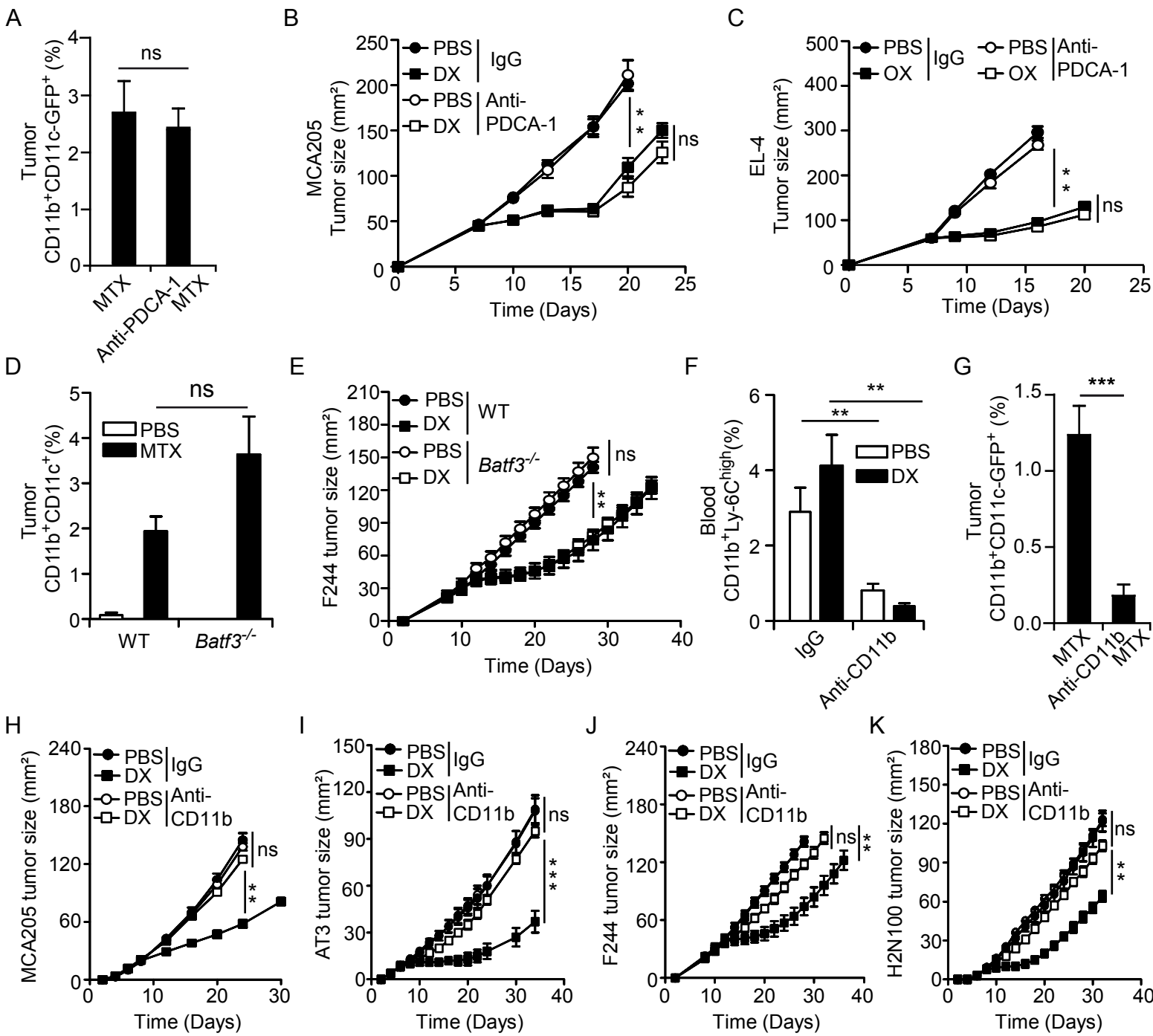


Figure 6

Experimental procedures

Unless otherwise indicated, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and cell culture products from Gibco-Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

Cell lines. Wild-type (WT) and OVA-expressing mouse fibrosarcoma MCA205 cells (H2^b) (a generous gift from Dr Andrew D. Weinberg, Portland Providence Medical Center, Portland, OR, USA), thymoma EL4 cells (H2^b), colon carcinoma CT26 cells (H2^d), H2N100 (H2^d) and AT3 (H2^b) mammary carcinoma tumor cells, and sarcoma F244 cells (derived from 129/Sv mice) (Matsushita et al., 2012; Stagg et al., 2010) were maintained in RPMI Medium 1640-GlutaMAX™-I supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM sodium pyruvate, 10 mM HEPES buffer, 100 units/mL penicillin G sodium and 100 µg/mL streptomycin sulfate. OVA-specific T-cell hybridoma B3Z cells were kindly provided by Dr. Eric Tartour (Hôpital Européen George Pompidou, Paris, France) and cultured in complete medium, as above, further supplemented with 50 µM 2-mercaptoethanol. CT26 cells were transfected with a plasmid coding for the plasma membrane marker MyrPalm-mEGFP (Steigemann et al., 2009) by means of the Lipofectamine™ 2000 transfection reagent (Invitrogen, Eugene, CA, USA), following the manufacturer's instructions. Transfected cells were selected in complete medium (as above) further supplemented with 1 mg/mL geneticin (Invitrogen), and MyrPalm-mEGFP-expressing (as well a control) clones were isolated by FACS-assisted sorting. CD39-expressing MCA205 cells were generated as previously described (Michaud et al., 2011), and selected in complete medium (as above) further supplemented with 10 µg/mL blasticidin S (InvivoGen, San Diego, CA, USA).

Animal experiments. Mice were maintained in controlled, pathogen-free conditions at either the Institut Gustave Roussy (IGR, Villejuif, France) or at the Peter MacCallum Cancer Center (East Melbourne, Australia). All experiments were performed in accordance with the Federation of European Laboratory Animal Science Association (FELASA) guidelines and were approved either

by the IGR Ethics Committee (CEEA IRCIV/IGR n°26, registered with the French Ministry of Research) or by the Peter MacCallum Animal Experimentation Ethics Committee. Female C57Bl/6 (H2^b), BALB/c (H2^d) (aged between 6 and 8 weeks) mice were obtained from Janvier (Le Genest St Isle, France), OVA²⁵⁷⁻²⁶⁴-specific TCR transgenic OT1 mice (H2^b) from Charles River (L'Arbresles, France), and *Batf3*^{-/-} mice (129/Sv background) were kindly provided by Kenneth Murphy (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA). CD11c-DTR/GFP mice (H2^b), which express GFP under the control of the *Cd11c* promoter were, obtained from the European Mouse Mutant Archive (Munich, Germany) and bred at the CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal, Orléans, France). Mice were maintained under controlled light cycle (12 h lights ON, 12 h lights OFF), allowed food and water *ad libitum*, and were invariably used for experiments between 7 and 14 weeks of age.

Lymphadenectomy. For lymph node removal, mice were anesthetized under continuous isoflurane flow and subjected to skin decontamination with 10% povidone-iodine (commercial Betadine® solution). Thereafter, a narrow incision (3 mm) was made and the inguinal lymph node was removed using dissecting forceps. Finally, the incision was closed with sterile skin closure clips. Sham-operated mice (without lymph node resection) were treated similarly, and the duration of surgery was standardized between the two groups. For facilitating recovery, mice were placed on a heater plate set at 37°C until awakening.

Tumor chemotherapy models. For the establishment of syngenic solid tumors, C57Bl/6 mice received *s.c.* 5×10⁵ EL-4, AT3, WT MCA205 or OVA-expressing MCA205 cells, BALB/c mice were inoculated *s.c.* with 5×10⁵ H2N100, WT CT26 or MyrPalm-mEGFP-expressing CT26 cells, while WT or *Batf3*^{-/-} 129/Sv mice were engrafted *s.c.* with 1×10⁶ F244 cells. Tumor growth was then monitored routinely by means of a common caliper, and when its surface reached 25-45 mm² (day 0), mice received either 2.9 mg/Kg doxorubicin (DX) *i.t.* (in 50 µL PBS), either 5.2 mg/Kg mitoxantrone (MTX) *i.p.* (in 200 µL PBS), either 5 mg/Kg oxaliplatin (OX, in 200 µL PBS) *i.p.*, or

equivalent volumes of solvent. When appropriate, mice received 100 mg/Kg intravenous suramin (in 40 μ L PBS), or an equivalent volume of solvent, on the same day of chemotherapy. Alternatively, mice received on days -1, 0 and weekly thereafter until the end of the experiment, 10 mg/Kg anti-CD11b antibodies (clone 5C6), anti-PDCA-1 antibodies (clone JF05-1C2.4.1, from Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) or anti-Ly6G (clone 1A8, from BioXCell, West Lebanon, NH, USA). In some protocols, tumor-bearing mice received on day -1, 1 and twice weekly thereafter until the end of the experiment, 25 mg/Kg anti-IL-7 antibodies (clone M25) and anti-IL-7R antibodies (clone A7R34), all from BioXCell, West Lebanon, NH, USA, or 25 mg/Kg LT β R-Fc fusion proteins (kindly provided by Pr Yang-Xin Fu, University of Chicago, Chicago, IL, USA). Alternatively, tumor-bearing mice received (on day -1 and 2) liposomes loaded with PBS or clodronate (from Dr. Nico van Rooijen, Foundation Clodronate Liposomes, The Netherlands), as a 100 μ L *s.c.* injection near the tumor plus 100 μ L *i.p.* injection.

Transplantation of established tumors. For transplantation, a small incision was made on the skin near the thigh of CD45.2 mice and MCA205 fibrosarcomas (size ~25-45 mm²) harvested freshly from CD45.1 mice were implanted *s.c.* with grooved probes and forceps. The skin was then closed with surgical staples.

Tissue recovery and processing for flow cytometry. Freshly recovered tumors or spleens were cut into small pieces in digestion buffer (serum-free RPMI Medium 1640-GlutaMAX™-I containing 0.4 Wünsch units/mL Liberase TL, from Roche, Mannheim, Germany, and 200 U/mL DNase I, from Calbiochem, San Diego, CA, USA), and then transferred to C Tubes for gentleMACS™ dissociation (Miltenyi Biotec). This was performed following the proprietary programs m_impTumor_02 and m_impTumor_03, or m_spleen_02 and m_spleen_03, with 30 min incubation at 37 °C in between. Finally, single-cell suspensions in PBS were obtained by filtering through a 70 μ m cell strainer. Bone marrow cells were recovered by repeatedly flushing the femoral or tibial bone marrow cavities with PBS, using 26G needles. Lymph nodes were gently squeezed with

dissecting forceps in digestion buffer to obtain single-cell suspensions. Peripheral blood was harvested from the inner canthus of the eye by means of heparin-coated Pasteur pipettes, and red blood cells were removed with the RBC Lysis Buffer (BioLegend, San Diego, CA, USA), employed following the manufacturer's instructions.

Flow cytometry and sorting. For surface immunostaining, primary antibodies targeting the following proteins were employed (at 2 µg/mL, staining at 4 °C for 25 min): CD34 (RAM34), CD45.1 (A20), CD45.2 (104), CD117 (2B8), F4/80 (BM8), Ki-67 (SolA15), Sca-1 (D7), SiglecH (eBio440c), CD115 (AFS98), CX3CR1 (polyclonal), TCR Vβ 5.1/5.2 (MR9-4), Foxp3 (FJK-16s) all from eBioscience (San Diego, CA, USA); CD11b (M1/70), CD11c (N418), CD16/32 (2.4G2), Ly6C (AL-21), CD172a (P84), IL-17 (TC11-18H10) all from BD Pharmingen (San José, CA, USA); B220 (RA3-6B2), I-A/I-E (M5/114.15.2), Ly6G (1A8), CD103 (2E7), CD205 (NLDC-145), CD3 (17A2), CD8 (53-6.7), CD4 (GK1.5) from BioLegend, Ly-6B.2 (7/4) from AbD Serotec (Kidlington, UK), and CCR2 (ML-21), a generous gift from Dr Matthias Mack (Department of Internal Medicine, University of Regensburg, Germany). The Foxp3 Staining Buffer Set was purchased from eBioscience, while the LIVE/DEAD Fixable Yellow Dead Cell Stain Kit was obtained from Molecular Probes-Invitrogen. Cytofluorometric assessments were performed on a BD™ LSR II Flow Cytometer and analyzed by software FlowJo (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA) upon gating on events characterized by normal light scattering parameters. Tumor single-cell suspensions obtained as described above were then sorted with a MoFlo™ XDP (Beckman-Coulter, Miami, FL, USA) or a FACSAria™ (Becton Dickinson, San José, CA, USA) cell sorter. When appropriate, single cell suspension were pre-enriched for TILs with mouse CD45 microbeads (Miltenyi Biotec),

Vaccination, antigen presentation and T-cell proliferation assays. For *in vivo* vaccination assays, 2×10^4 (CD11b⁺Ly6C^{high}, CD11b⁺Ly6C^{low} or CD11b⁺Ly6G⁺) myeloid cells FACS-sorted from freshly collected OVA-expressing MCA205 fibrosarcomas were injected (in 50 µL sterile

PBS) into the footpad of naïve female C57BL/6 mice. Ten days later, mice received 5×10^4 OVA-expressing MCA205 tumor cells as a subcutaneous inoculation on the ipsilateral hind leg.

For antigen presentation assays, 2×10^4 myeloid cells sorted from OVA-expressing MCA205 fibrosarcomas were co-cultured with 5×10^4 untreated splenic OT1 cells, as obtained with the mouse CD8 α^+ T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) from OT1 TCR transgenic mice, or with an equal amount of B3Z cells, in 200 μ L complete medium in U-bottom-96 well plates for 72 or 36 h, respectively. Supernatants from co-cultures were collected and assessed for the concentration of IFN γ and IL-2 using ELISA-based commercial kits for the specific detection of mouse IFN γ (AN-18) and IL-2 (OptEIATM), both from BD Pharmingen (San José, CA, USA).

For testing antigen specific T-cell proliferation *in situ*, splenic OT1 cells were stained with 5 μ M CFSE for 10 min, followed by quenching of the extra dye with 20% FBS in PBS. These cells were then infused *i.v.* into OVA-expressing tumor-bearing mice (7×10^6 cells/mouse), 4 days after tumor-cell inoculation (day 0). Chemotherapy was administered on day 9 and mice were subjected to lymphadenectomy or sham surgery on day 10. OT1 cell proliferation in tumors was assessed by CFSE dilution on day 12.

Immunofluorescence staining. Freshly harvested tumors were quickly rinsed in PBS and fixed with 10% neutral buffered formalin (CellStorTM pots, from CellPath, Newtown, UK) for 4 h. Tumors were cryoprotected with 30% saccharose in PBS at 4°C until sinking (usually within 24 h) and then embedded in Tissue-Tek® O.C.T. Compound (Sakura, Villeneuve d'Ascq, France) before freezing on dry ice. Five μ m-thick tissue sections were obtained with a HM 500 cryostat (Micom-Thermo Fischer, Hampton, NH, USA) and adhered to poly-L-lysine-coated slides. For staining, slides were washed once with PBS before blockage of non-specific binding sites with 10% FBS in PBS for 45 min. Sections were then incubated - within a humidified chamber, for 1 h in 10% FBS - with primary antibodies specific for: CD11b-AlexaFluor® 647 (M1/70, from eBioscience), CD11b-

FITC (M1/70, from BioLegend respectively), CD11c (223H7, from MBL International, Woburn, MA, USA), CD86-AlexaFluor[®] 647 (GL-1, from BioLegend), CD169/sialoadhesin (3D6.112, from Abcam), cleaved Caspase-3 (Asp175, from Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), F4/80-AlexaFluor[®] 647 (CI:A3-1, from BioLegend) and Ly-6G-PE (1A8, from BioLegend). When required (*i.e.*, for unconjugated primary antibodies, after 3 washes with 10% FBS, sections were stained with appropriate secondary AlexaFluor[®] conjugates (Molecular Probes-Invitrogen) for 30 min. Finally, slides were washed in PBS, counterstained with 10 μ M Hoechst 33342 for 5 min, and coverslips were mounted with the Fluoromount-G[™] mounting medium (Southern Biotechnologies, Birmingham, AL, USA). For each tumor, 10 view-fields were acquired using a confocal SPE microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and analyzed with the software Image J (freely available from the National Institute of Health, Bethesda, MD, USA at the address <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) or Photoshop CS3 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA) to measure the nucleus-to-nucleus distance, as well as cellular size. Cell surface was calculated by elliptical approximation, according to the formula: $(\pi/4) \times \text{length} \times \text{width}$.

Tumor infiltrating myeloid subpopulations sorted from MyrPalm-mEGFP-expressing CT26 tumors were fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 and then subjected to the blocking of non-specific binding sites with 10% FBS. Thereafter, cells were stained with AlexaFluor[®] 647-conjugated anti-CD11b antibodies, AlexaFluor[®] 488-conjugated anti-GFP antibodies (A21311, from Molecular Probes-Invitrogen) and 10 μ M Hoechst 33342. After 2-3 washes in PBS, cells were resuspended at the concentration of 5×10^5 cell/mL (in PBS) and cytopun to poly-L-lysine-coated slides by centrifugation at $50 \times g$ for 3 min, then mounted with Fluoromount-G[™] (Southern Biotechnologies) before examination by confocal microscopy.

Quantitative RT-PCR. Total RNA extraction and on-columns genomic DNA digestion were performed with the RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. 2 μ g total RNA from each sample was then reverse transcribed into cDNA with the

SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), random primers (Promega, Madison, WI, USA) and the Deoxynucleoside Triphosphate Set, PCR grade (Roche), in the presence of RNaseOUT™ recombinant ribonuclease inhibitor (Invitrogen). Expression of M1 or M2 macrophage polarization-related genes and genes involved in MHC class I or class II antigen presentation was analyzed with TaqMan® Gene Expression Assays using the Universal Master Mix II (with UNG) (both from Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Hematopoietic transcription factor and cytokine expression was tested with commercial (Applied Biosystems) or custom-designed primers (listed in **Table S1**) and the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Quantitative RT-PCR data were invariably normalized to the expression levels of the housekeeping gene peptidylprolyl isomerase A (*Ppia*).

Colony forming assays. Myeloid subpopulations sorted from tumors were carefully resuspended at 2×10^4 cell/mL in MethoCult GF M3434 medium (Stemcell Technologies, Durham, NC, USA) with 18G needle-equipped syringes and 1 mL cell suspension was dispensed into 35 mm Petri dishes with vents (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) when bubbles dissipated. An uncovered 35 mm Petri dish containing 4 mL of sterile water was placed together with the methylcellulose culture medium in a larger 100 mm Petri dish to help maintain humidity. Cultures were then incubated for 7-14 days in standard conditions.

***In vitro* and *in vivo* differentiation assays.** For *in vitro* differentiation assays, 4×10^4 bone marrow CD11b⁺Ly6C^{high} cells were co-cultured with 2×10^4 (WT or CD39-expressing) MCA205 cells that had been exposed to 25 μ M DX for 20 h or with 2.5×10^3 living (WT or CD39-expressing) MCA205 cells in the presence of 5 ng/mL murine GM-CSF + 5 ng/mL murine IL-4 (both from Peprotech, Princeton, NJ, USA), in 24-well plates. When appropriate, the following chemical were included: 10 μ M 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DiDS), 500 μ M oxidized ATP (oATP), 2 mM suramin, 20 μ g/mL IL-1RA (also known as anakinra or Kineret®) or 20 μ g/mL etanercept

(Enbrel[®]) (both from Amgen, Thousand Oaks, CA, USA). Three days later, the phenotype of CD11b⁺ cells was evaluated by flow cytometry.

For *in vivo* differentiation assays, C57BL/6 (H2^b, CD45.2) mice bearing MCA205 fibrosarcomas were treated with 2.9 mg/kg DX *i.t.* (in 50 μ L PBS), and tumor-infiltrating myeloid cells were FACS-sorted 24-38 h after treatment. Two-hundred thousand sorted cells were resuspended in 50 μ L sterile PBS and then transferred *i.t.* into B6.SJL mice (H2^b, CD45.1) bearing MC205 fibrosarcomas that had been pre-treated with either 2.9 mg/kg DX *i.t.* (in 50 μ L PBS) or an equivalent volume of PBS. Alternatively, sorted cells were stained with 5 μ M CFSE for 8 min, followed by quenching of the extra dye with 20% FBS in PBS. CFSE-labeled cells were then repeatedly washed and injected into WT or CD39-expressing MCA205 fibrosarcomas established in C57BL/6 mice and pretreated with 5.2 mg/kg MTX *i.p.* (in 200 μ L PBS) or an equivalent volume of PBS. Tumors were harvested from recipient mice and processed for immunofluorescence microscopy 48 h later.

May-Grünwald-Giemsa staining. Colonies from methylcellulose culture medium were collected and washed twice with serum-free IMDM. Colonies were dispersed with pipette tips and cytospun to poly-L-lysine-coated slides by centrifugation at 50 \times g for 3 min. May-Grünwald-Giemsa staining was performed with the RAL555 Fast Staining Kit (RAL Diagnostics, Bordeaux, France) following the manufacturer's instructions. Images were acquired with a Primo Star microscope (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) and analyzed with the proprietary software AxioVision.

ATP quantification. Thirty thousand WT or CD39-expressing MCA205 fibrosarcoma cells were seeded in 24-well plates, let adapt for 24 h and then treated with PBS or 25 μ M DX. When appropriate, supernatants were collected and immediately characterized for ATP concentrations by means of the luciferin-based ENLITEN[®] ATP Assay Kit (Promega). ATP-driven chemoluminescence was recorded by a Fluostar multi-well plate reader (BMG Labtech, Offenburg, Germany).

Statistical analyses. Unless otherwise indicated, results are expressed as means \pm SEM of $n = 3$ parallel assessments. All experiments were repeated at least twice, yielding similar results. Normal distributions were compared by unpaired, two-tailed Student's *t* tests. Kaplan-Meier survival curves were analyzed with the Log-rank test. Statistical analyses were performed by means of the software Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA) or Excel 2007 (Microsoft, Rockville, MD, USA). *p* values < 0.05 were considered as statistically significant.

Supplemental References

Matsushita, H., Vesely, M.D., Koboldt, D.C., Rickert, C.G., Uppaluri, R., Magrini, V.J., Arthur, C.D., White, J.M., Chen, Y.S., Shea, L.K., *et al.* (2012). Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature* 482, 400-404.

Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A.Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., *et al.* (2011). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334, 1573-1577.

Stagg, J., Divisekera, U., McLaughlin, N., Sharkey, J., Pommey, S., Denoyer, D., Dwyer, K.M., and Smyth, M.J. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 1547-1552.

Steigemann, P., Wurzenberger, C., Schmitz, M.H., Held, M., Guizetti, J., Maar, S., and Gerlich, D.W. (2009). Aurora B-mediated abscission checkpoint protects against tetraploidization. *Cell* 136, 473-484.

Legends to Supplementary Figures

Figure S1. Phenotype of dendritic cells infiltrating of doxorubicin-treated tumors. (A, B) MCA205 fibrosarcomas developing on C57Bl/6 mice were injected *i.t.* with doxorubicin (DX) or with an equivalent volume of solvent (PBS). The gating strategy leading to the identification of intratumoral dendritic cells (CD11c⁺MHC class II⁺ cells) is shown in panel A. Panels B depicts representative histograms detailing the phenotype of such cells. These experiments have been performed three times, yielding similar results. Iso, isotype control.

Figure S2. Effect of chemotherapy on tumor-infiltrating leukocytes. (A-C) MCA205 fibrosarcomas developing on C57Bl/6 mice were injected with PBS *i.t.*, mitoxantrone (MTX) *i.p.*, or doxorubicin (DX) *i.t.*. Then, the frequency of intratumoral dendritic cells (CD11c⁺I-A/I-E⁺), regulatory T cells (CD3⁺CD4⁺FOXP3⁺) and Th17 cells (CD3⁺CD4⁺IL17⁺) was determined by immunofluorescence microscopy and cytofluorometry, after either 2 (A, B) or 7 days (C). Representative pictograms are shown in A and quantitative data (means ± SEM, n = 4 mice/group) are shown in B and C. **p*<0.05, ***p*<0.01, ns, not significant (unpaired, two-tailed Student's *t* test).

Figure S3. Contribution of P2rx7 to the chemotherapy-induced accumulation of myeloid tumor-infiltrating leukocytes. Wild-type (WT) or *P2rx7*^{-/-} C57Bl/6 mice bearing MCA205 fibrosarcomas received mitoxantrone (MTX) or an equal volume of solvent (PBS) *i.p.*, and 48 h later the number of tumor-infiltrating cells was determined by *in situ* immunofluorescence as in **Figure 1**. Results are shown as means ± SEM (n = 5 mice/group). **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001 (unpaired, two-tailed Student's *t* test). This experiment has been performed twice, yielding comparable results.

Figure S4. Impact of mitoxantrone and suramin on the polarization and function of intratumoral macrophages. (A) Wild-type C57Bl/6 mice bearing MCA205 fibrosarcomas were injected with mitoxantrone (MTX) *i.p.* and/or suramin *i.v.*. Two days later, tumors were dissociated and

macrophages (CD169⁺F4/80⁺ cells) were FACS-purified and subjected to quantitative RT-PCR analyses (means \pm SEM, n = 3 mice group) for the expression of the indicated genes. Results are expressed in arbitrary units (AUs) upon normalization to the expression levels of *Ppia*. **(B)** Alternatively, wild-type C57Bl/6 mice carrying MCA205 fibrosarcomas expressing the plasma membrane marker MyrPalm-mEGFP were treated with MTX *i.p.*, alone or combined with suramin *i.v.*, and the capacity of the macrophages (CD169⁺F4/80⁺) to incorporate GFP was determined by cytofluorometry. Results from one representative experiment involving 3 mice/group are reported.

Figure S5. Role of lymphoid organs in anthracycline-based chemotherapy. **(A)** Wild-type (WT) C57Bl/6 mice were inoculated with WT MCA205 tumor cells (day -7) and, on day 0, they were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, followed (on day 1) by the surgical resection of inguinal draining lymph nodes (DLNs) or sham surgery (as a control condition) (left panel). Alternatively, mice underwent DLN removal or sham surgery on day -10, followed by tumor inoculation and treatment as above (on day -7 and 0, respectively) (right panel) (n = 5 mice/group). **(B, C)** WT C57Bl/6 mice bearing WT MCA205 fibrosarcomas received DX *i.t.*, or an equivalent volume of PBS, alone or combined with LT β R-Fc **(B)** or anti-IL7 + anti-IL7R antibodies **(C)** (n = 5 mice/group). In all cases, tumor growth was routinely assessed throughout the experiment. **p*<0.05, ***p*<0.01 (Log-rank test). In panel **B**, on the right, the perturbation of the splenic architecture resulting from the administration of LT β R-Fc alone is depicted (scale bar = 100 μ m). **(D)** MCA205 fibrosarcomas established in C57Bl/6 mice were treated as in **(B, C)** and harvested at the indicated time points for the cytofluorometric quantification of live CD45⁺B220⁻CD11c⁻CD3⁻CD4⁺CD127⁺ lymphoid tissue-inducer (LTi) cells. **(E)** CD45.2⁺ OT1 cells purified from naïve mice were intravenously injected into CD45.1 C57Bl/6 mice. Forty-eight h later, recipient mice were inoculated *s.c.* with OVA-expressing MCA205 cells, and, on day 7, they received DX or PBS *i.t.* as in **A**. At the indicated time points, tumors were harvested and processed

for the cytofluorometric detection activated (CD69⁺) cells among CD8⁺ (left panel) and OT1 (right panel) cells. ** $p < 0.01$ (unpaired, two-tailed Student's t test).

Figure S6. Impact of chemotherapy on the tumor and tumor-draining lymph nodes. (A-C) Wild-type C57Bl/6 mice were inoculated with OVA-expressing MCA205 cells *s.c.* (on day -9), and then (on day -5) received OVA-specific, CFSE-labeled OT1 cells *i.v.*. On day 0, mice were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single injection, followed (on day 1) by the surgical resection of inguinal draining lymph nodes (DLNs) or sham surgery (as a control condition) (left panel). On day 3, tumors were harvested and dissociated to determine the proliferation (CFSE dilution) of OT1 cells. The gating strategy is shown in **B** and representative histograms of CFSE staining are depicted in **C**. (D) Impact of chemotherapy on the frequency of tumor-infiltrating and draining lymph node (DLN) dendritic cells (DCs). The frequency of DCs (CD11c⁺MHC class II⁺ cells) was determined by cytofluorometry. Results are shown as means \pm SEM (n = 5 mice/group). ** $p < 0.01$, ns = non significant (unpaired, two-tailed Student's t test).

Figure S7. Origin of tumor-infiltrating dendritic cells. (A-C) MCA205 fibrosarcomas were established in histocompatible CD45.1 mice, which - when tumors reached a surface of 25-40 mm² - and received doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single injection. One day later, tumors were transplanted *s.c.* to isogenic CD45.2 C57Bl/6 recipients. The frequency of tumor-sessile (CD45.1⁺) and freshly recruited (CD45.2⁺) leukocytes and more specifically CD11c⁺MHC class II⁺ cells (among live cells) was determined by cytofluorometry at the indicated days post-transplantation. Representative cytofluorometric results are shown in **A** and quantitative data (means \pm SEM, n = 2 mice/group) are shown in **B** and **C**. * $p < 0.05$, ns = non significant (unpaired, two-tailed Student's t test).

Figure S8. Contribution of ATP to the chemotherapy-induced accumulation of myeloid tumor-infiltrating leukocytes. Wild-type C57Bl/6 mice bearing WT or CD39-expressing (CD39) MCA205 fibrosarcomas were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single

injection. At the indicated time points, tumors were harvested and processed for the cytofluorometric quantification of tumor-infiltrating leukocytes (TILs) of the indicated surface phenotype. Results are shown as means \pm SEM (n=5 mice/group). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 (unpaired, two-tailed Student's t test). This experiment has been repeated twice, yielding similar results.

Figure S9. Phenotypic characterization of intratumoral CD11b⁺Ly6C^{high} cells. (A, B) Wild-type C57Bl/6 mice bearing MCA205 fibrosarcomas were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single injection. Two days later, tumor-infiltrating CD11b⁺Ly6C^{high} cells were subjected to immunophenotyping for the indicated markers. The gating strategy and representative profiles comparing CD11b⁺Ly6C^{high} cells stained with the indicated antibodies are shown in A and B, respectively. Results are representative of at least two determinations involving n = 4 mice/group. Iso, isotype control.

Figure S10. Influence of chemotherapy on myeloid cells in distinct lymphoid organs. (A, B) Wild-type C57Bl/6 mice bearing MCA205 tumors were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single injection. Two days later, the indicated lymphoid organs or tumors were harvested, dissociated and subjected to immunophenotyping for the indicated markers. Quantitative results are shown in A (percentages refer to the fraction of marker-positive cells among the whole viable population), and representative phenotypic profiles of CD11b⁺Ly6C^{high} cells are reported in B. Results are representative of at least two determinations involving n = 4-5 mice/group.

Figure S11. Effects of anthracycline-based chemotherapy on gene expression in tumor-infiltrating CD11b⁺Ly6C^{high} cells. (A-C) Wild-type (WT) C57Bl/6 mice bearing MCA205 fibrosarcomas were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single injection. Thirty-eight h later, CD11b⁺Ly6C^{high} tumor-infiltrating leukocytes were purified and processed for the RT-PCR-assisted quantification of the expression profile of genes involved either

in MHC class I and class II presentation (**A**), M1/M2 macrophage polarization (**B**), or cytokine secretion (**C**). Results are expressed in arbitrary units (AUs) upon normalization to the expression levels of *Ppia*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ (unpaired, two-tailed Student's *t* test).

Figure S12. Characterization of colonies generated by tumor-infiltrating $Ly6C^{high}$ cells. Wild-type (WT) C57Bl/6 mice bearing MCA205 fibrosarcomas were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single injection. Twenty-four h later, tumors were harvested and tumor-infiltrating $Ly6C^{high}$ cells were used in clonogenic assays with methylcellulose-based medium. Twelve days later, single-cell suspension were generated and immunophenotyped by flow cytometry for the cell surface expression of CD34, c-Kit, CD11b, Sca-1, CD16/32, Ly6C and Ly6G. MCA205 fibrosarcoma cells cultured in the same conditions were used as a negative control. Representative dot plots and the percentage of cells found in the indicated gate are shown.

Figure S13. Bone marrow-derived $Ly6C^{high}CD11b^{+}$ cells contain granulomonocytic progenitors and their differentiation is modulated by ATP. (**A**) Bone marrows were collected from wild-type (WT) C57Bl/6 mice, subjected to red blood cell lysis and immunophenotyped by flow cytometry for the indicated markers. In particular, the surface expression of CD11b, Ly6C and Ly6G was analyzed among $CD34^{+}c\text{-Kit}^{+}Sca\text{-1}^{-}CD16/32^{int}$ granulocyte-monocyte progenitors (GMPs) (upper panel), and, *vice versa*, the expression of GMP markers ($CD34^{+}, c\text{-Kit}^{+}, Sca\text{-1}^{-}, CD16/32^{int}$) was analyzed among $CD11b^{+}Ly6C^{high}$ and $CD11b^{+}Ly6G^{+}$ cells (lower panel). (**B**) Bone marrow-purified $CD11b^{+}Ly6C^{high}$ cells were mixed with WT or CD39-expressing (CD39) CT26 colon carcinoma cells that had been pretreated with 25 μM doxorubicin (DX) for 20 h, in the presence of 5 ng/mL granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and 5 ng/mL interleukin-4 (IL-4). At the indicated time points, co-cultures were processed for the RT-PCR-assisted quantification of the expression profile of transcription factors involved in lineage commitment (which are exclusively expressed by $CD11b^{+}$, but not tumor cells, not shown). Results are expressed

in arbitrary units (AUs) upon normalization to the expression levels of *Ppia*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (unpaired, two-tailed Student's *t* test).

Figure S14. Depletion of plasmacytoid dendritic cells by an anti-PDCA-1 antibody. Tumor-draining lymph nodes and spleens were collected after two intravenous injections of 12.5 mg/Kg anti-PDCA-1 antibody or the same dose of isotype control antibody (IgG), and processed for the cytofluorometric detection of CD11b⁺ and Siglec-H⁺ cells. Representative dot plots are shown. The percentage of cells found in the indicated gate is shown.

Figure S15. The depletion of macrophages does not affect the chemotherapeutic response of murine fibrosarcomas to anthracyclines. (A, B) Wild-type C57Bl/6 mice bearing MCA205 fibrosarcomas were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single injection, 7 days after tumor-cell inoculation. In addition, mice received PBS- (PBS-L) or clodronate-loaded liposomes (CLO-L), both *i.p.* and *s.c.* (in the tumor proximity) on days 6 and 9 post-inoculation. On day 9, peritoneal and splenic macrophages were quantified by cytofluorometry (A), and tumor growth was routinely assessed throughout the experiment (B). Results are shown as means \pm SEM (n=5 mice/group). This experiment has been performed twice, yielding comparable results. ns = non significant (Log-rank test).

Figure S16. The depletion of neutrophil granulocytes affects only marginally the chemotherapeutic response of murine fibrosarcomas to anthracyclines. (A-D) Wild-type (WT) C57Bl/6 mice bearing MCA205 fibrosarcomas (A, B), WT C57Bl/6 mice bearing AT mammary carcinomas (C) and WT BALB/c mice bearing H2N100 mammary carcinomas (D) were treated with doxorubicin (DX) *i.t.* or an equivalent volume of PBS, as a single injection, 7 days after tumor-cell inoculation. In addition, mice received the 1A8 antibody or an isotype control (IgG) *s.c.* on days 6, 8, 11, 14 and 17 post-inoculation. On day 9, intratumoral granulocytes were quantified by cytofluorometry (A), and tumor growth was routinely assessed throughout the experiment (C-D).

Results are shown as means \pm SEM (n=5 mice/group). This experiment has been performed twice, yielding comparable results. * p <0.05 (Log-rank test).

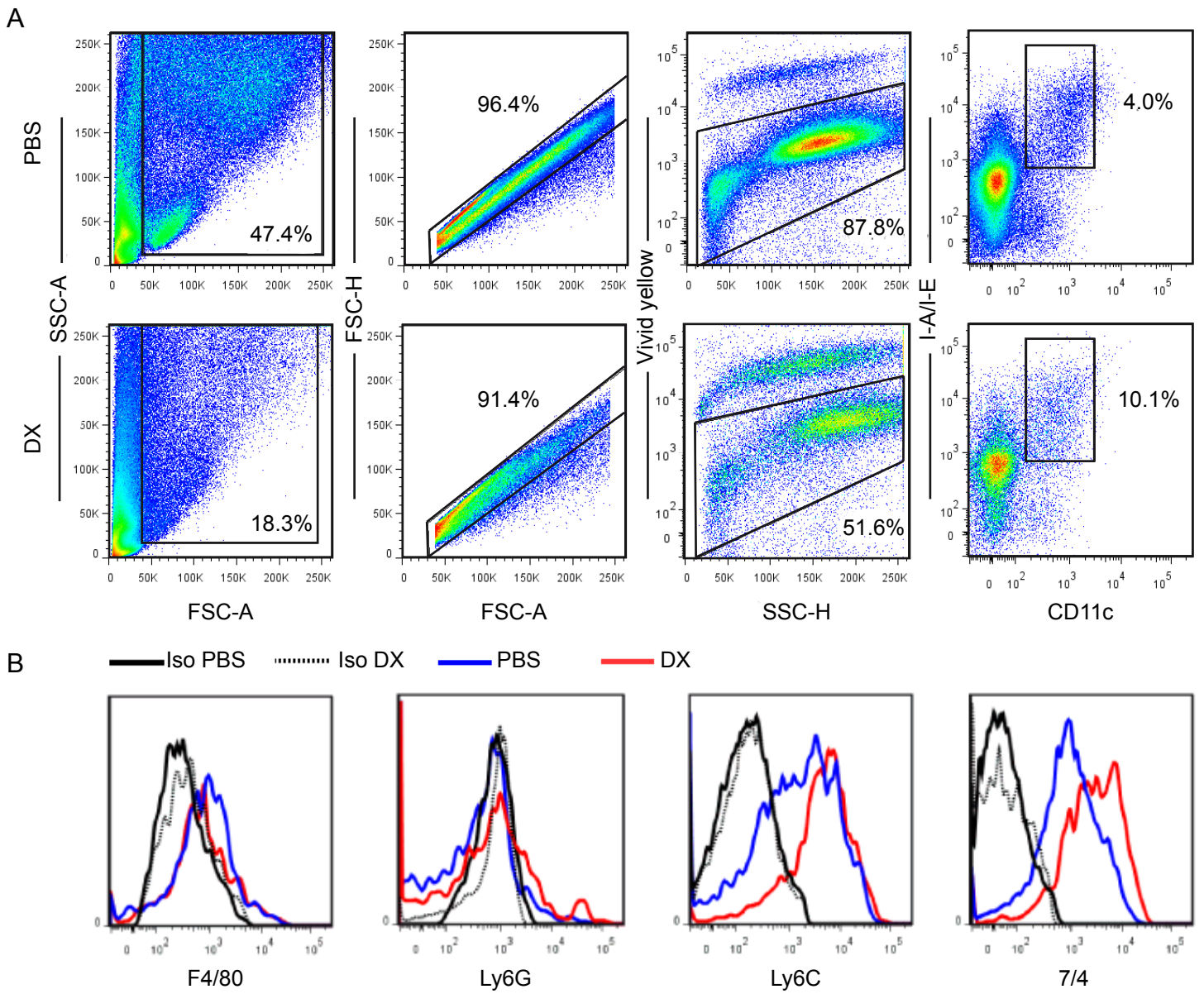
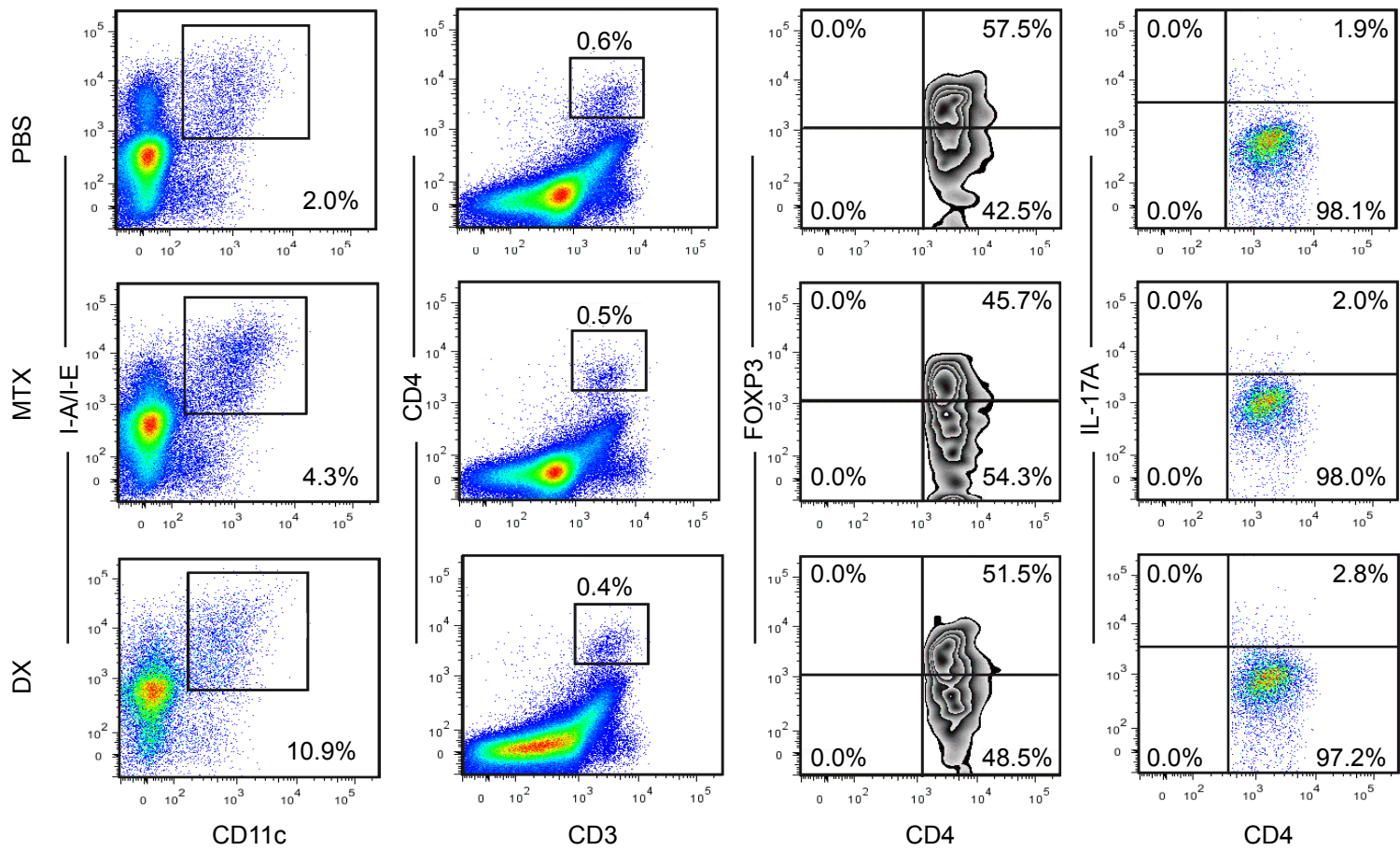
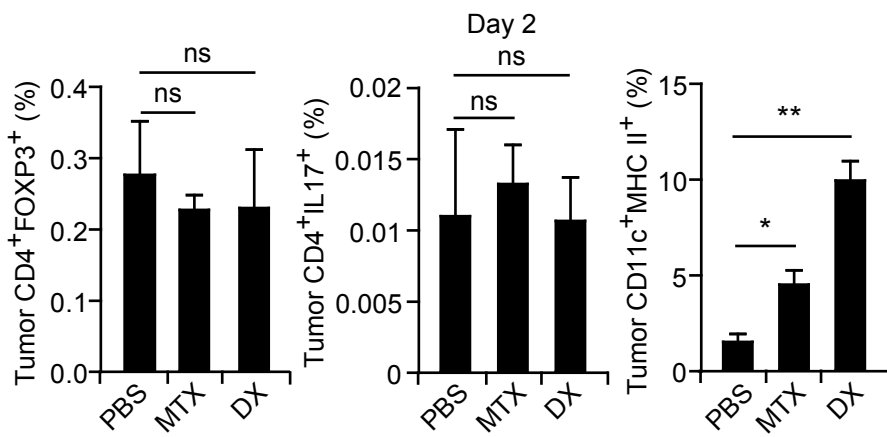


Figure S1

A



B



C

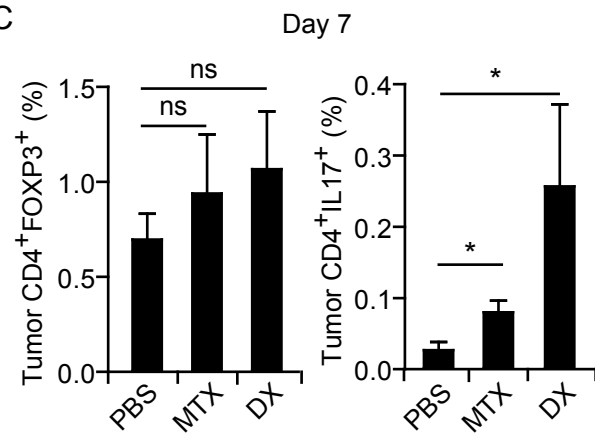


Figure S2

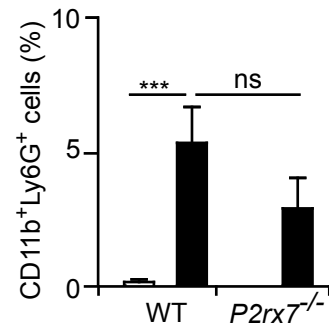
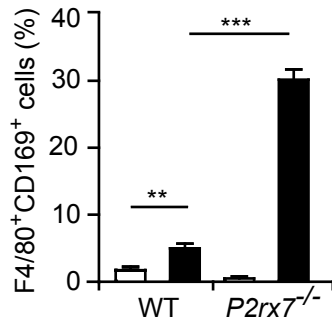
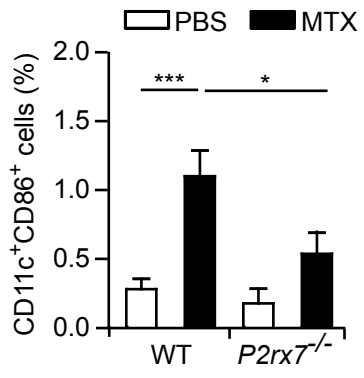


Figure S3

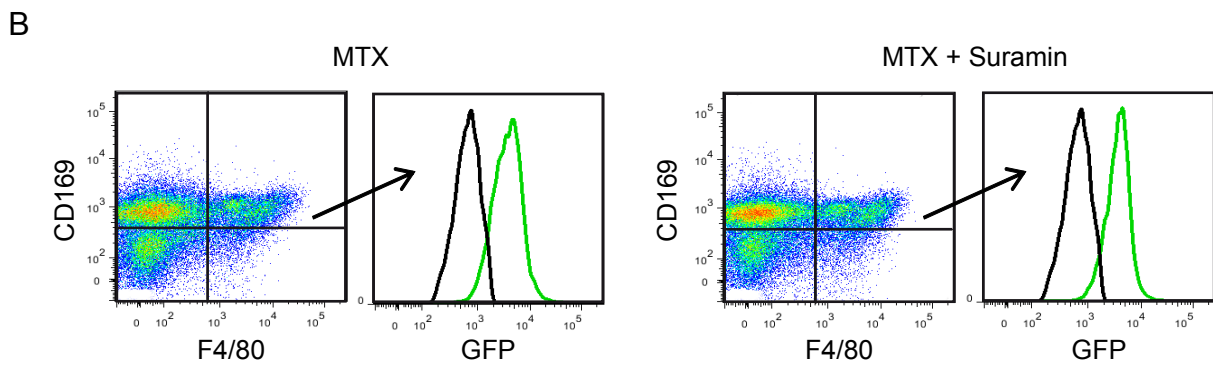
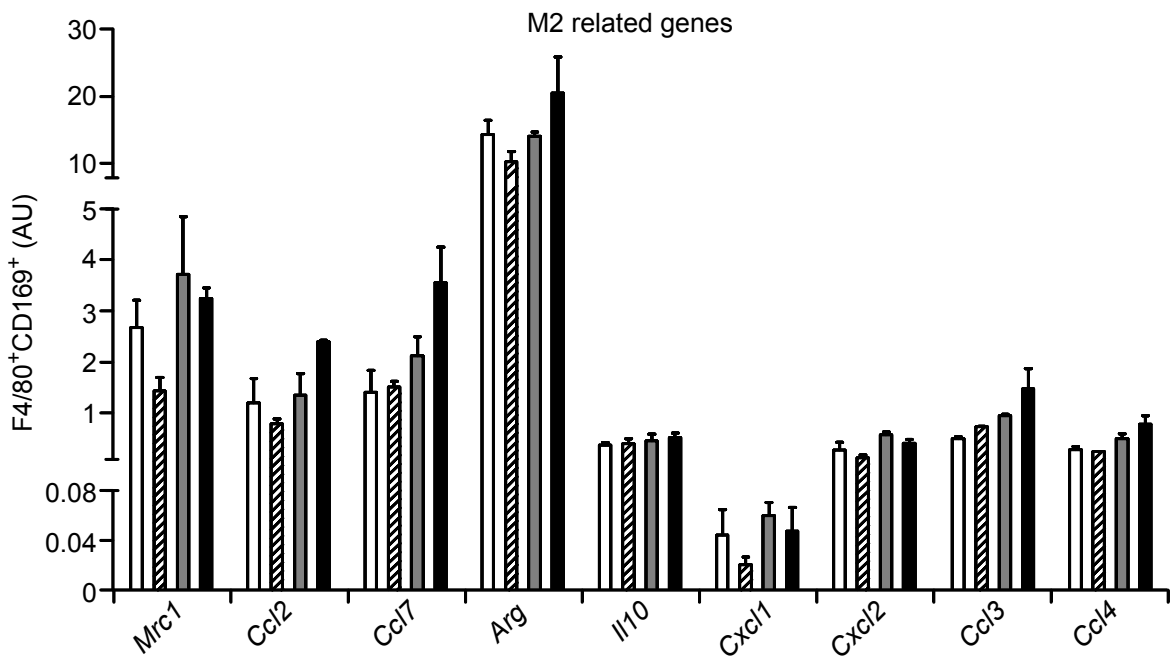
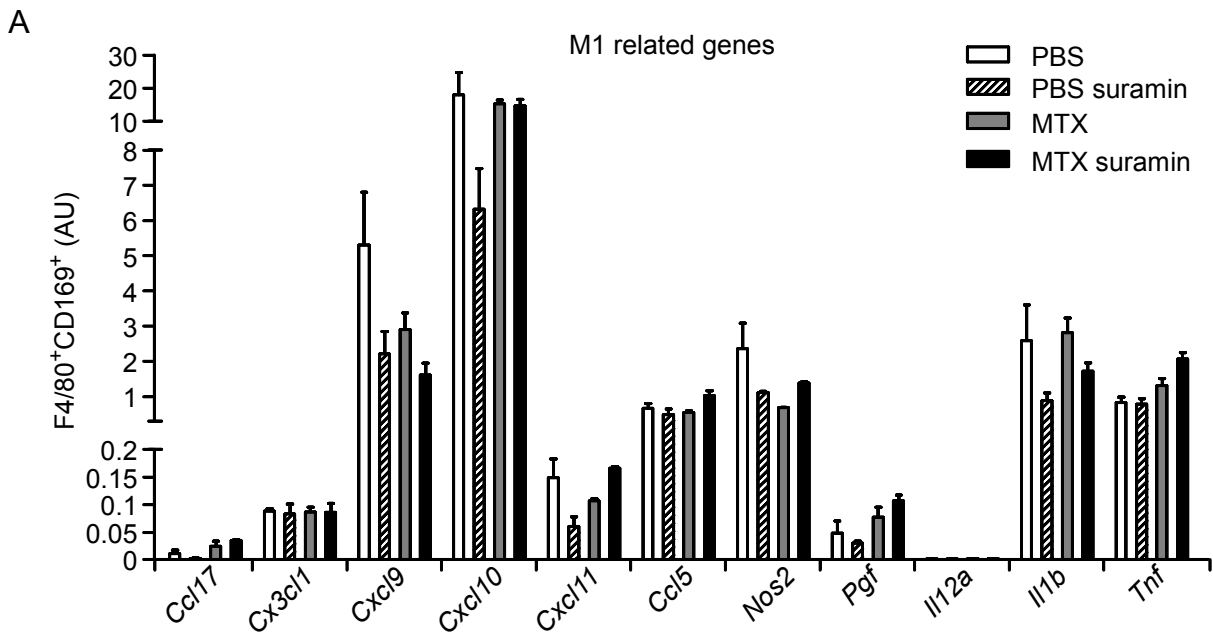


Figure S4

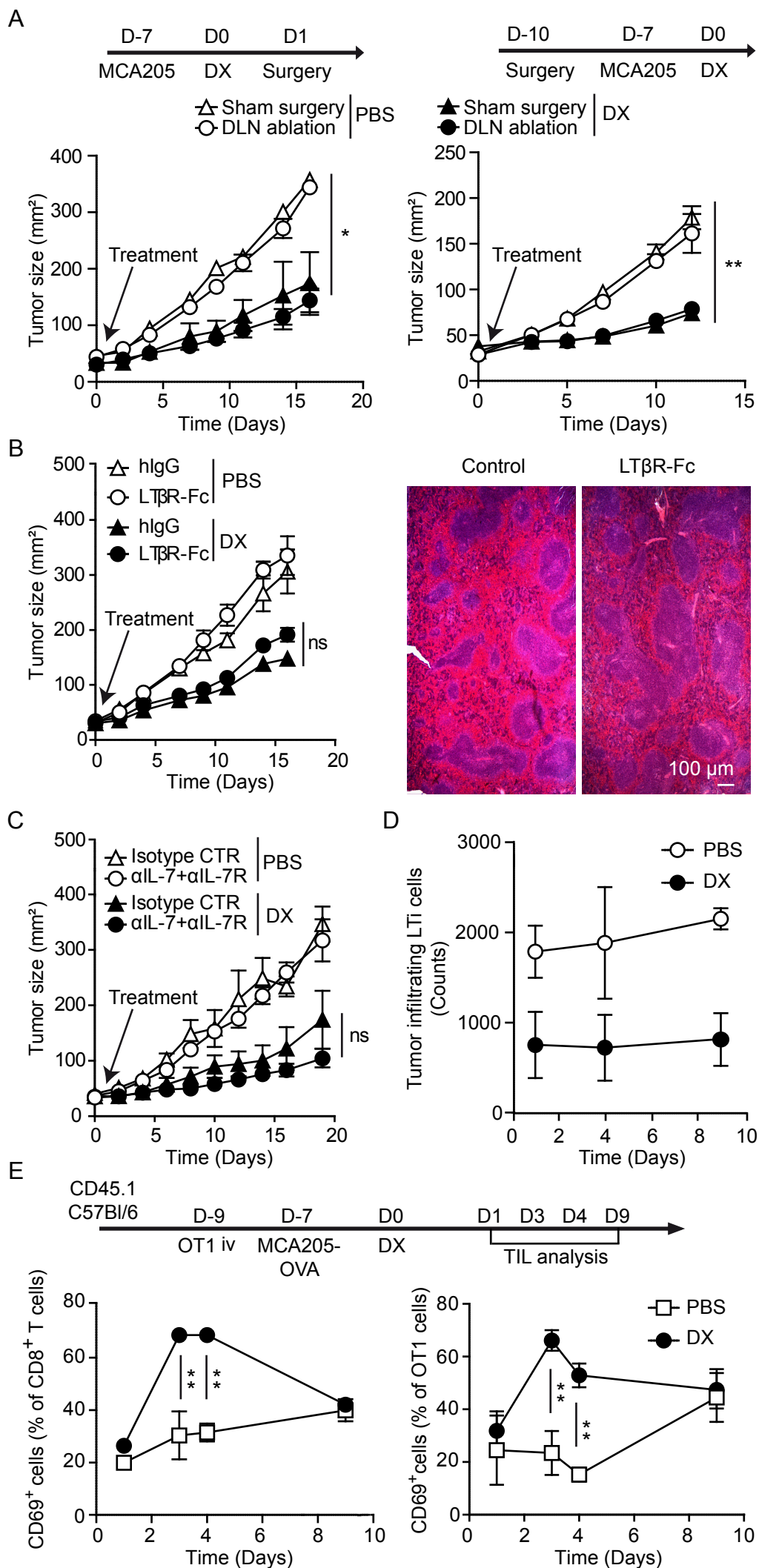
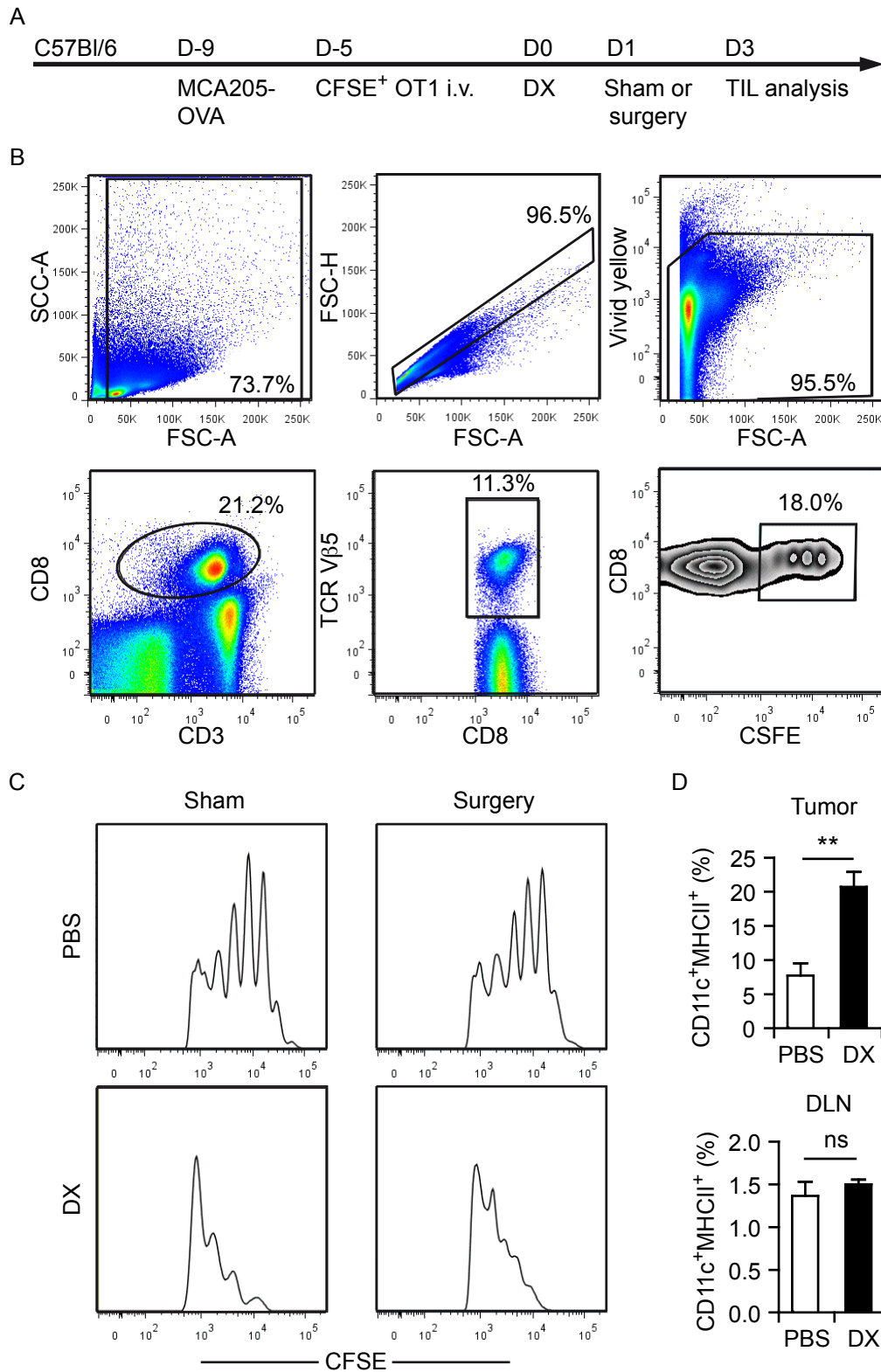


Figure S5



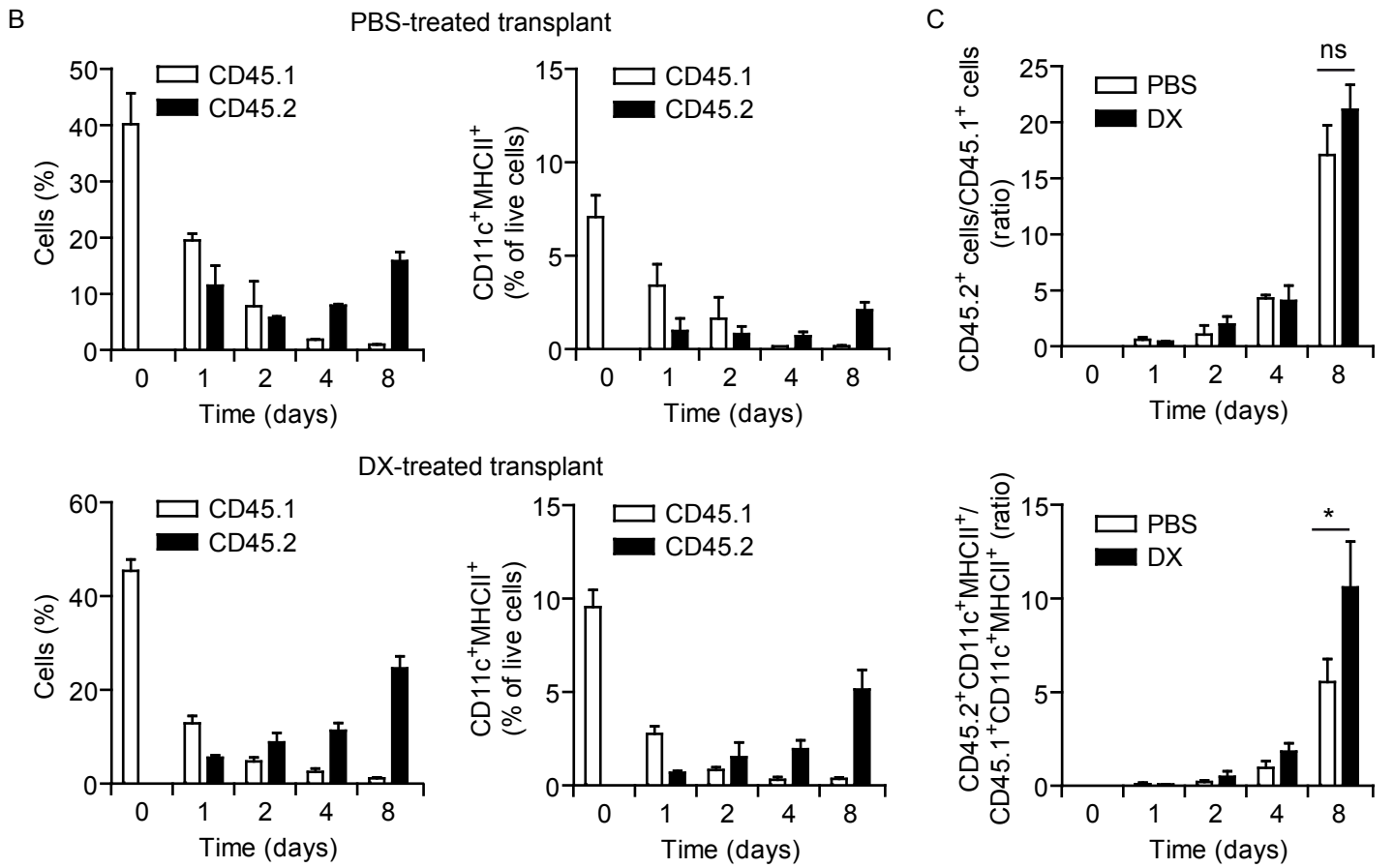
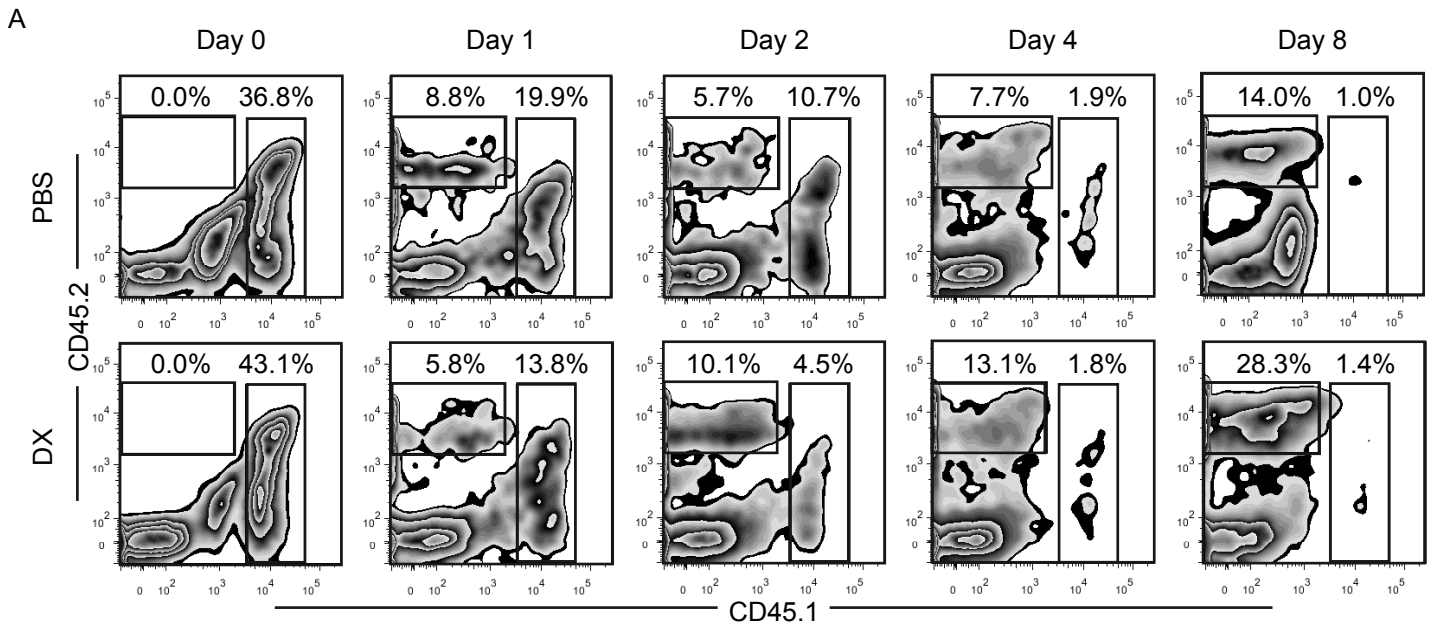


Figure S7

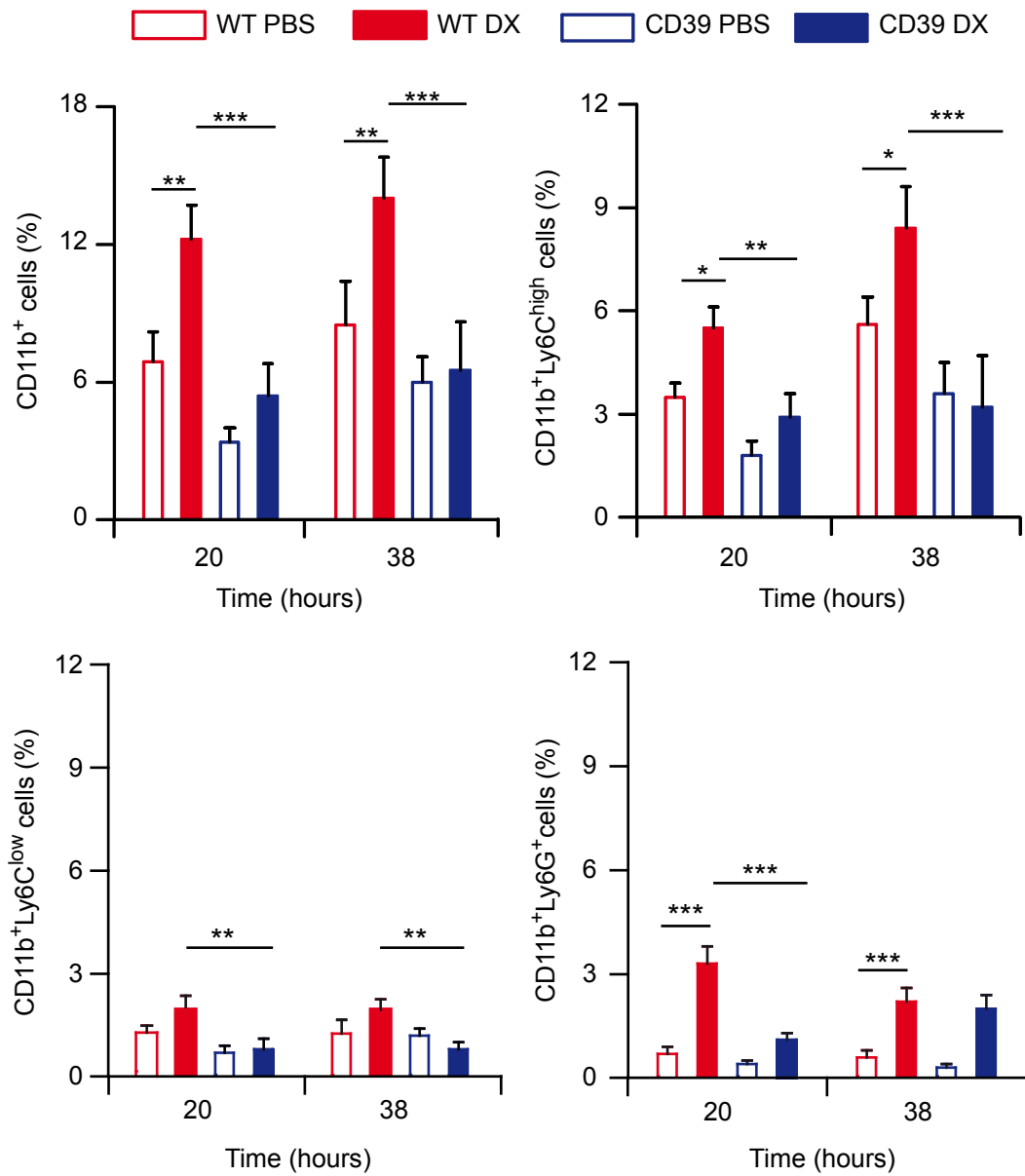
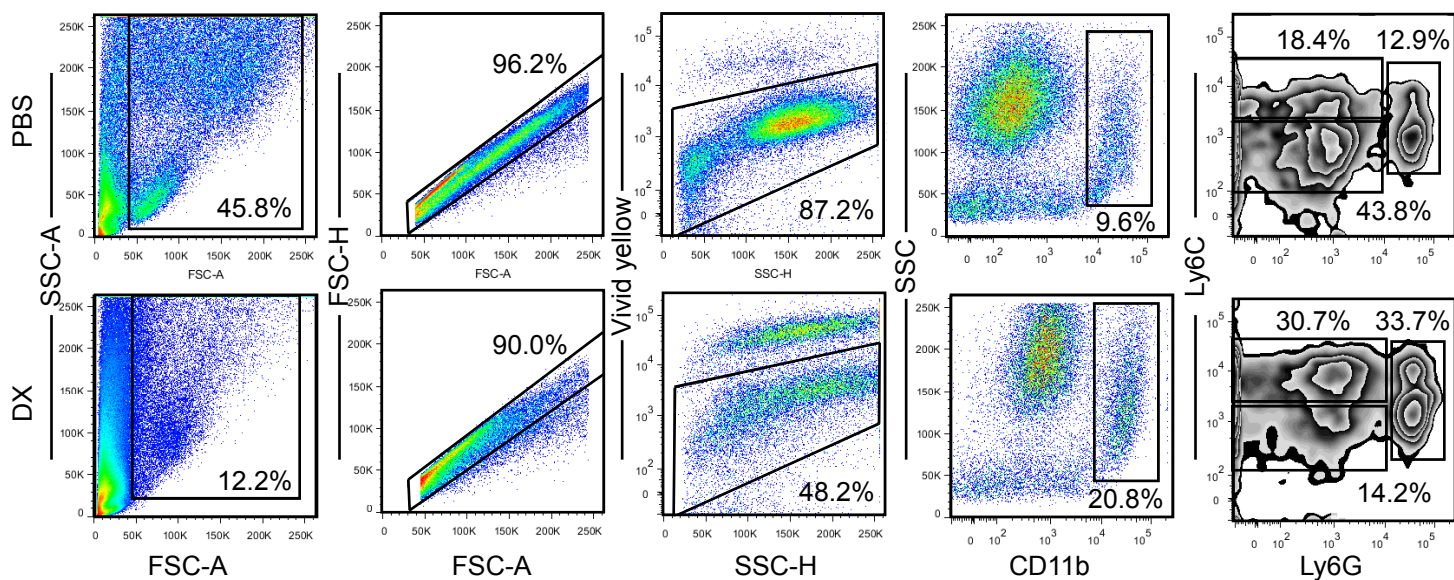


Figure S8

A



B

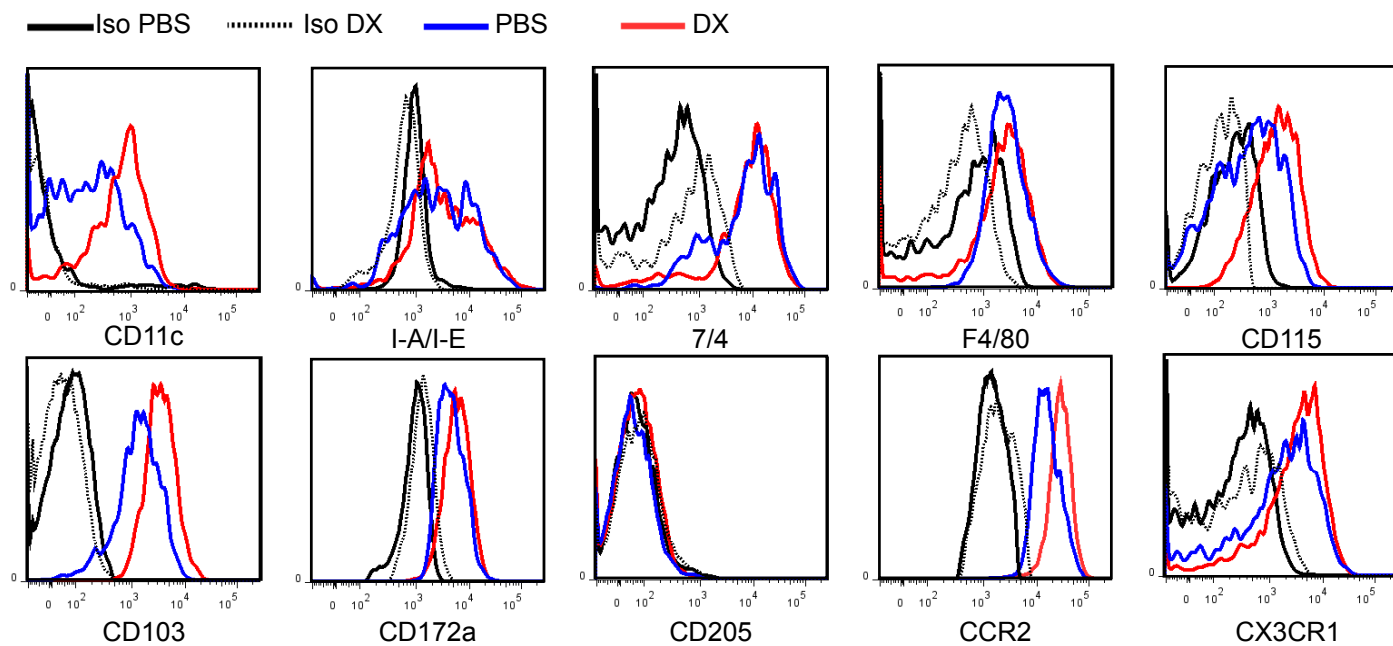
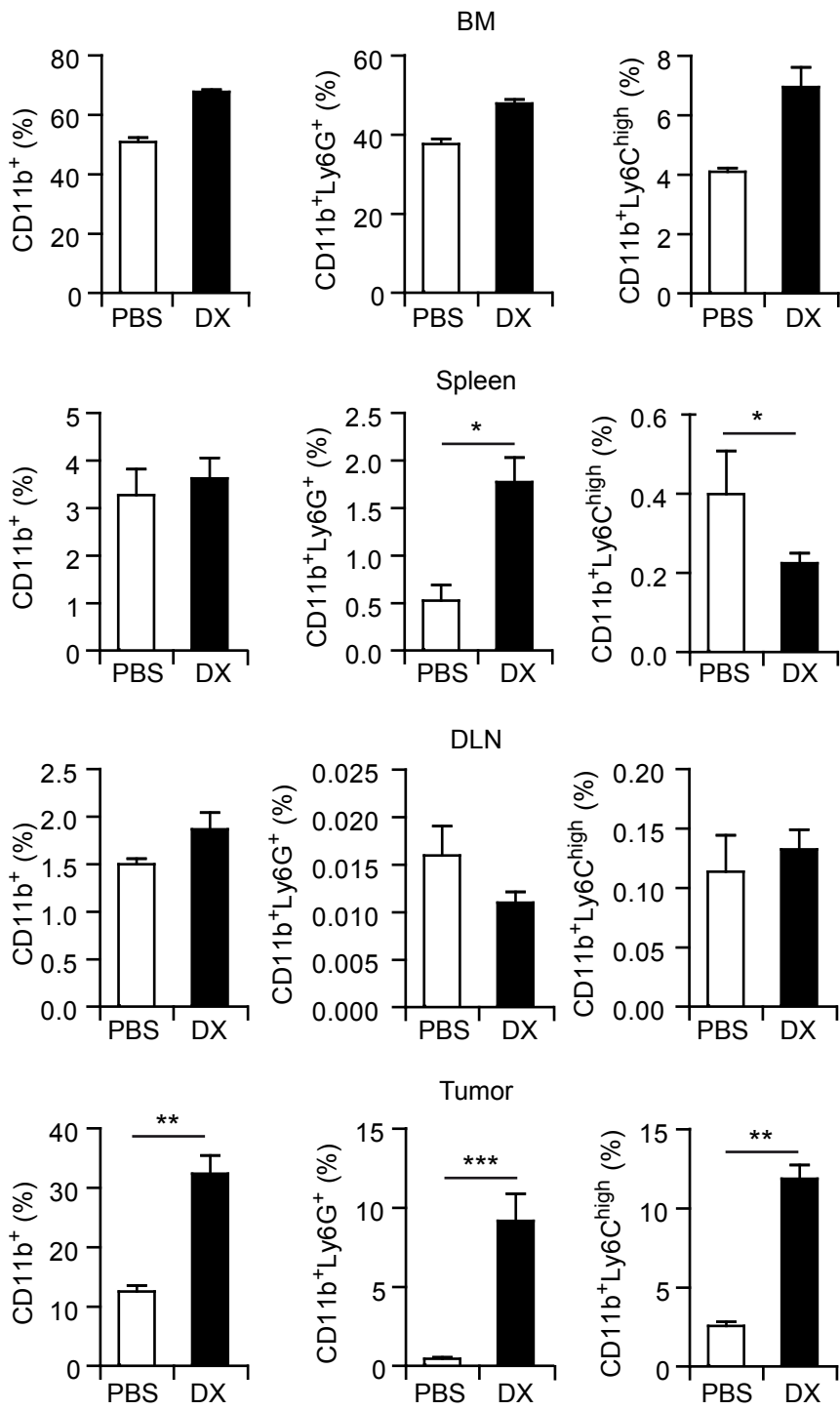
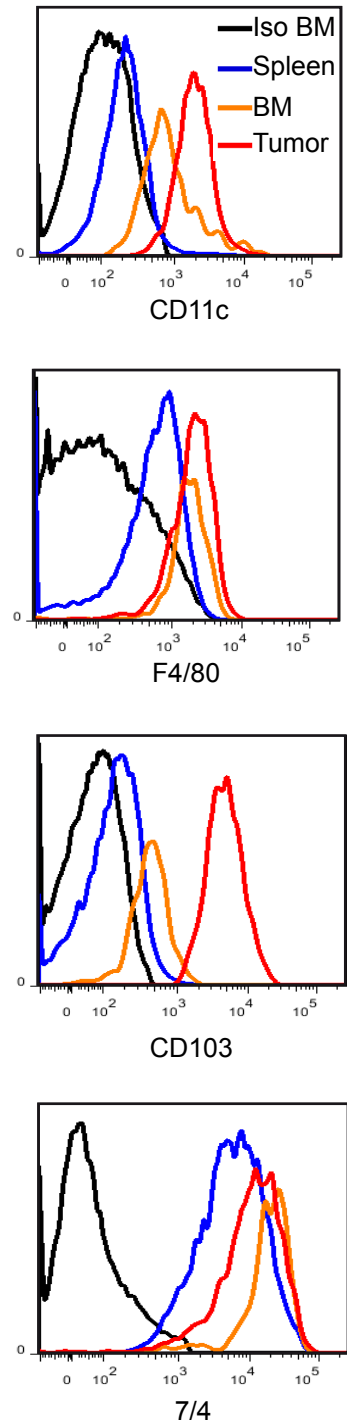


Figure S9

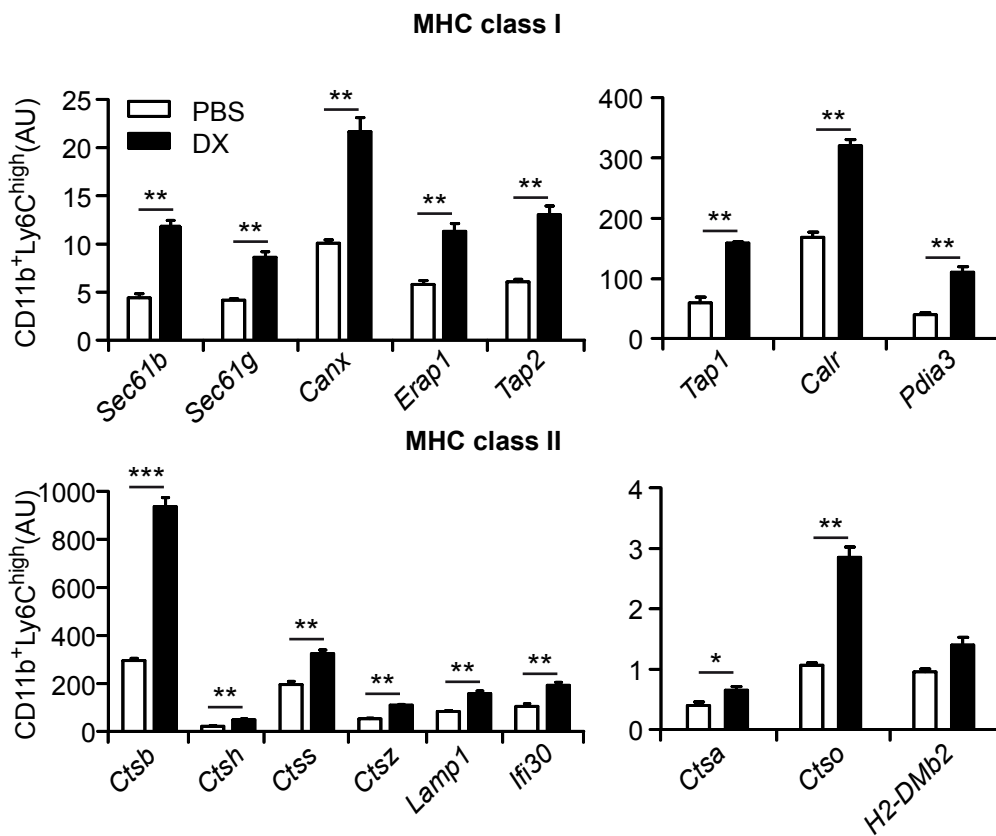
A



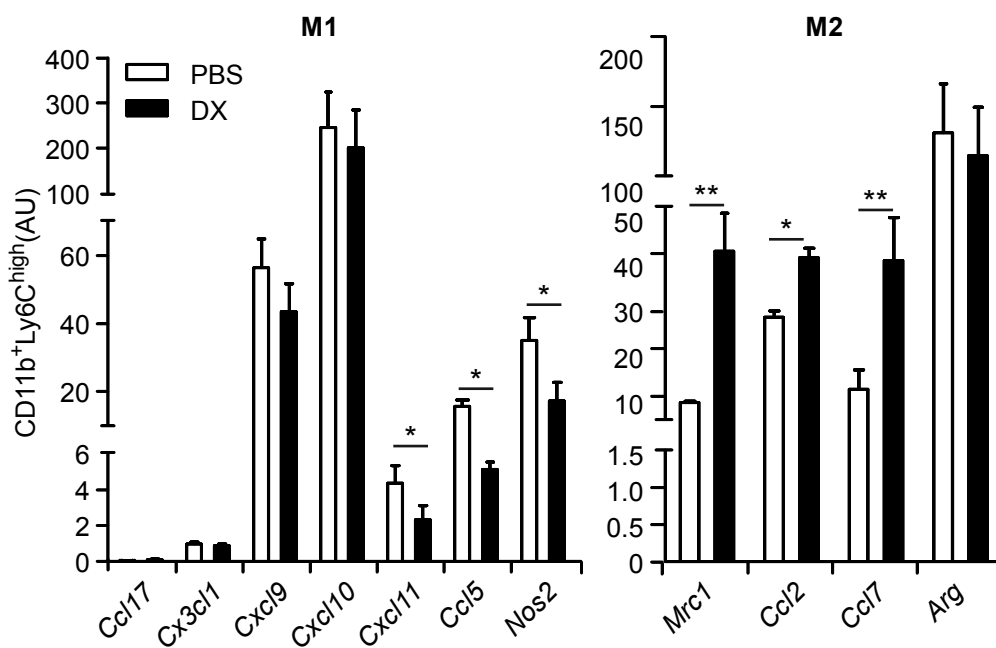
B

7/4
Figure S10

A



B



C

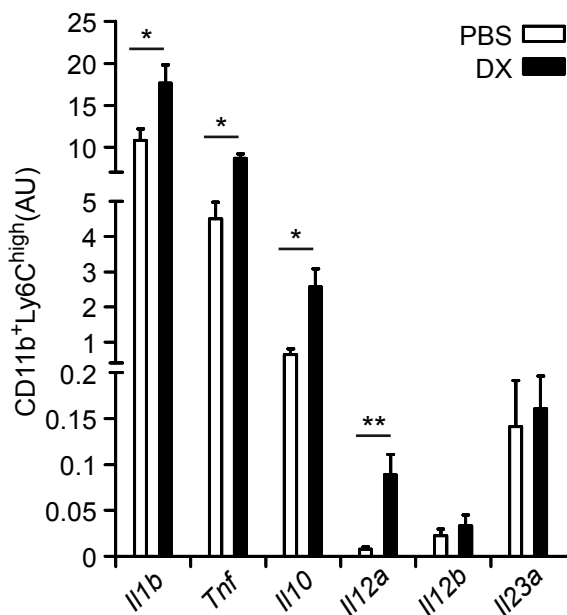


Figure S11

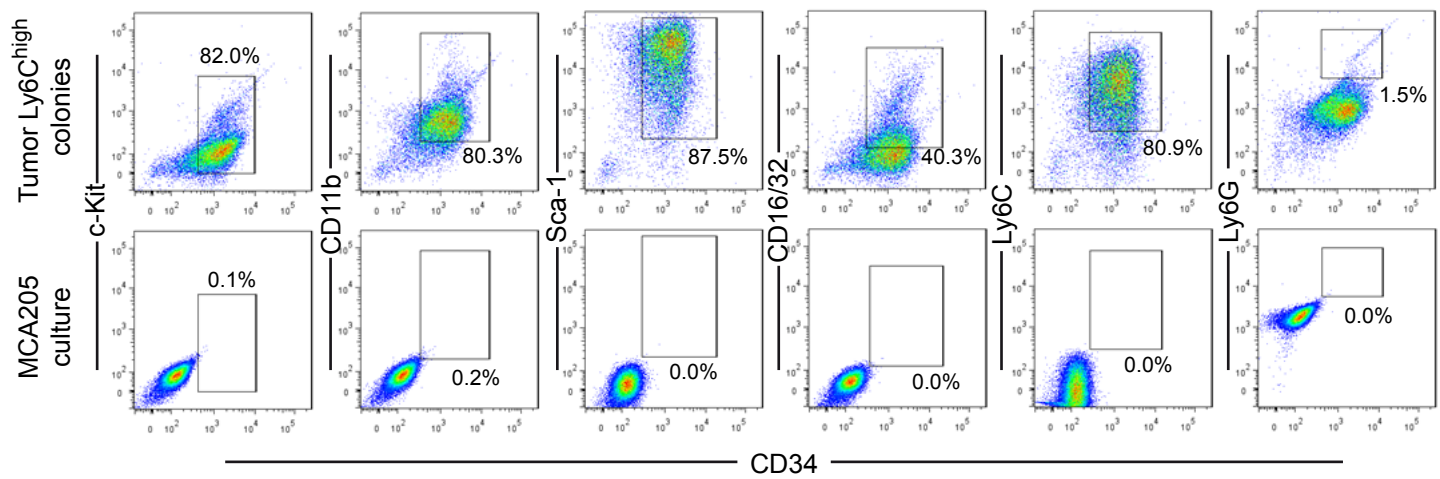


Figure S12

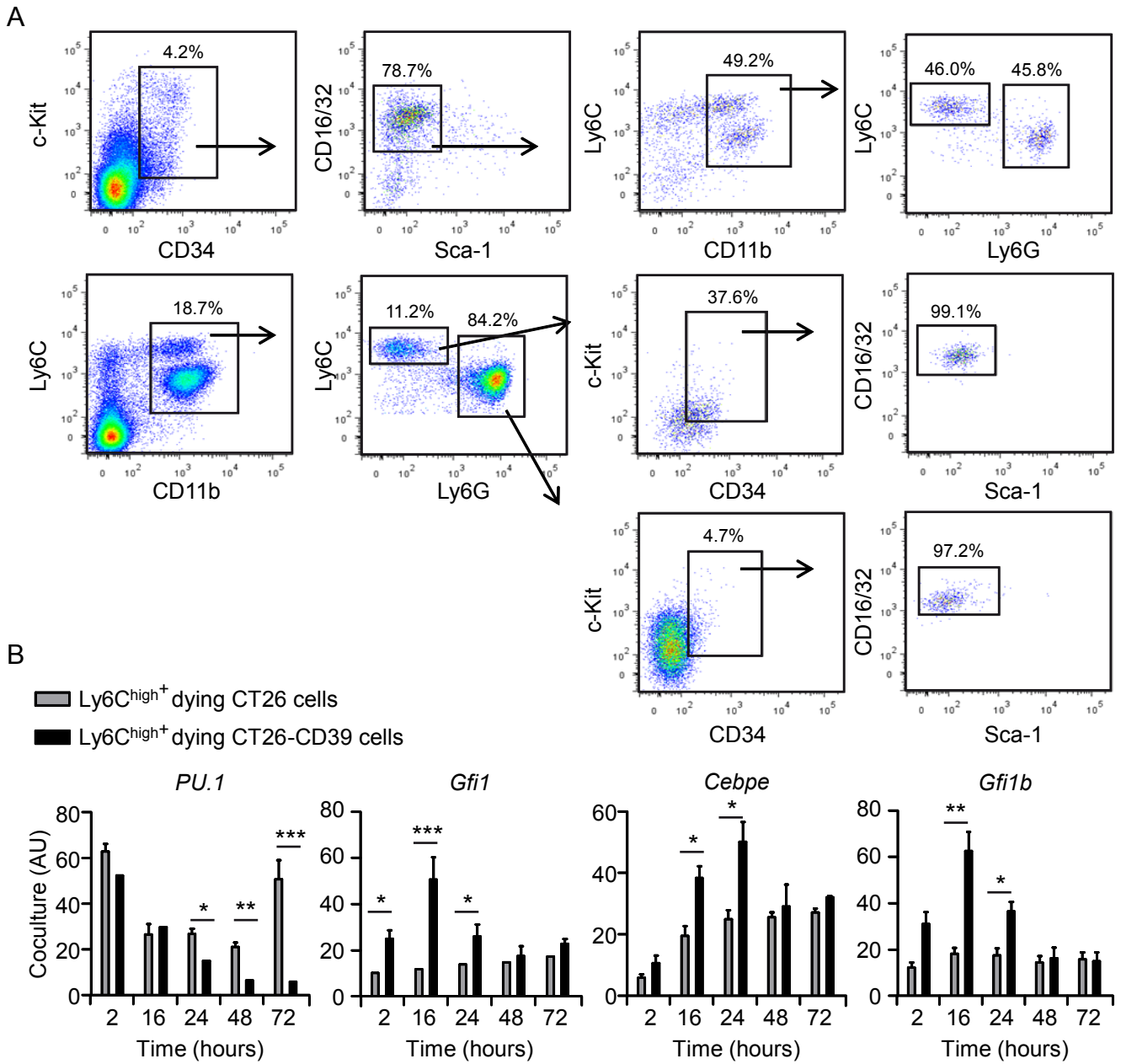


Figure S13

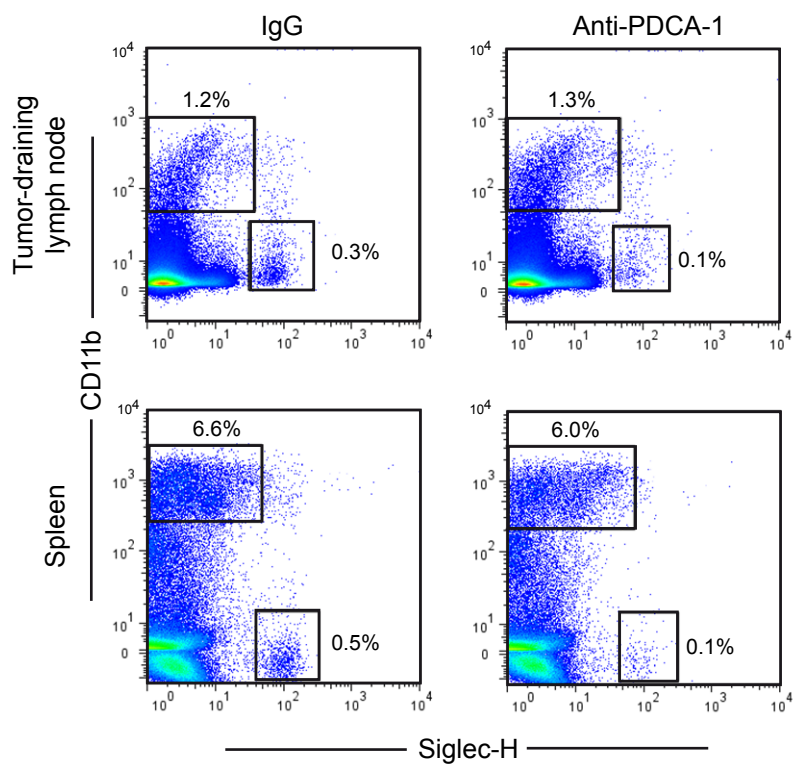
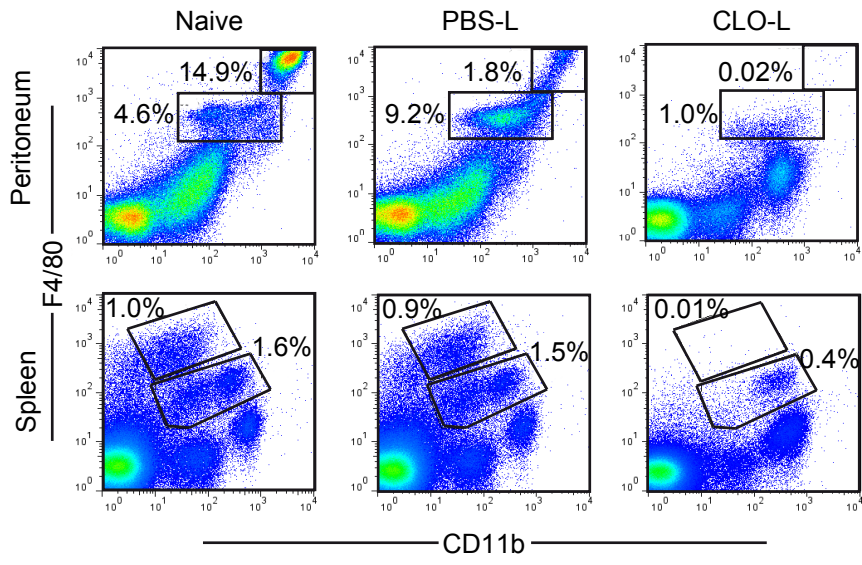
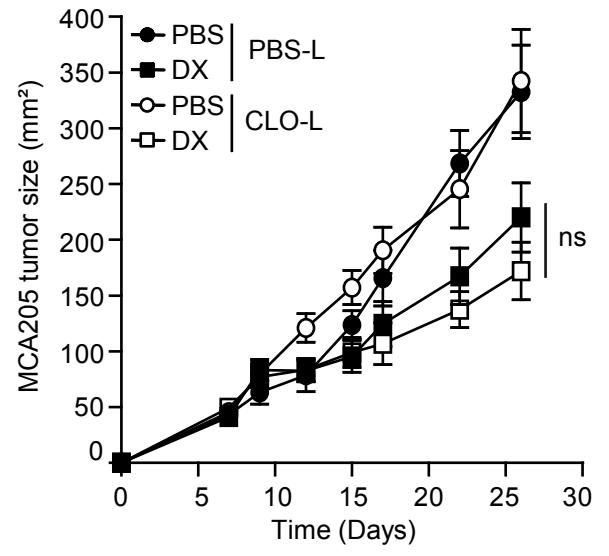


Figure S14

A**B****Figure S15**

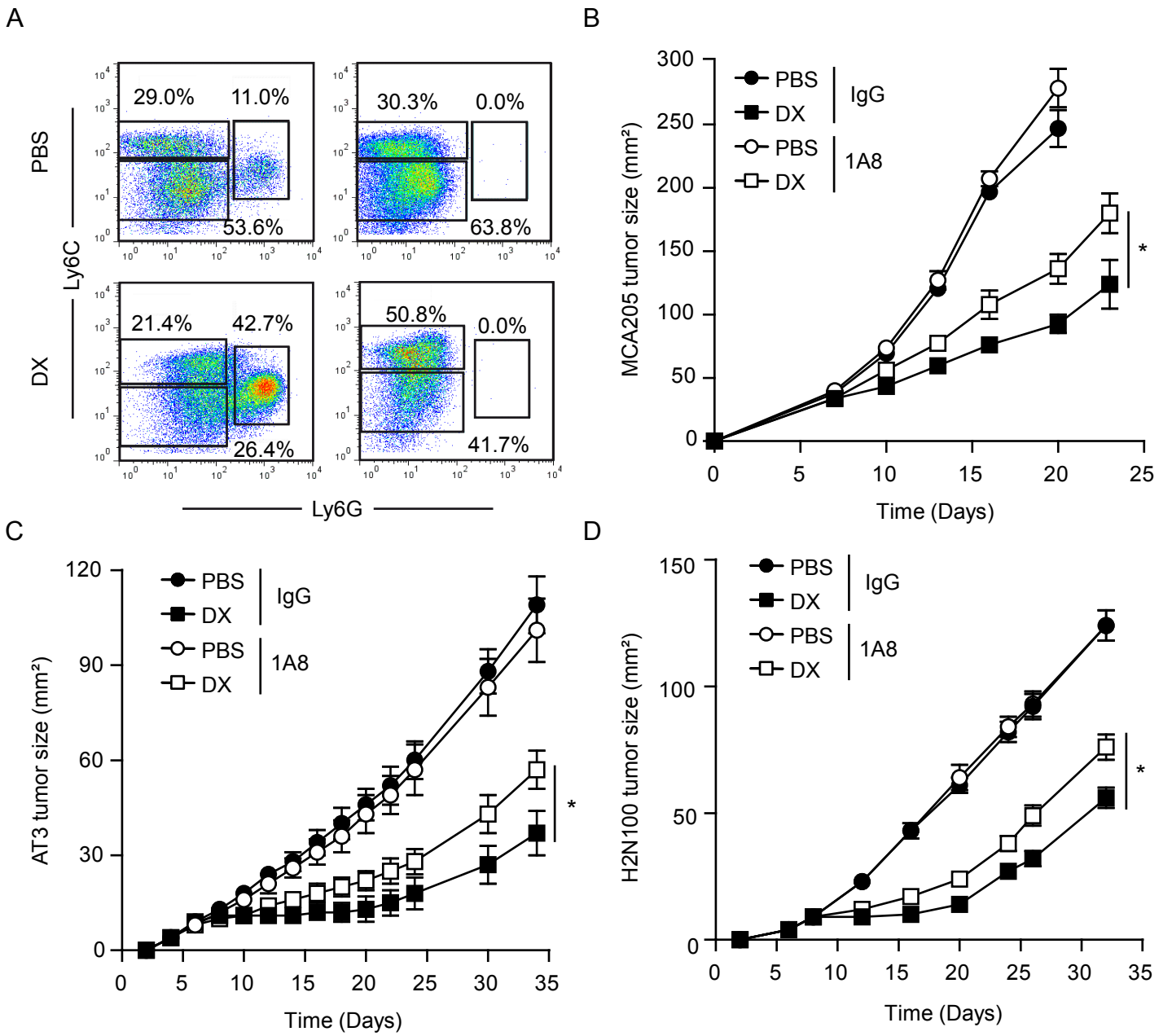


Figure S16

DISCUSSION

1. Rôle de l'autophagie dans la mort cellulaire immunogène

L'autophagie peut être dérégulée dans le cancer, une augmentation de ce processus de dégradation ayant été observée dans le cancer du pancréas métastatique ou le mélanome, et corrèle avec un mauvais taux de survie chez les patients atteints de mélanomes (Yang et al., 2011), (Ma et al., 2011a), (Lazova et al., 2012). Cependant une diminution de l'autophagie liée à une délétion monoallélique de Beclin1 est aussi décrite dans plusieurs cancers des ovaires, du sein et de la prostate, laissant penser que l'autophagie joue un rôle dans la tumorigenèse (Qu et al., 2003), (Karantza-Wadsworth and White, 2007).

Dans ce travail, nous avons montré que des cellules déficientes pour le processus d'autophagie ne permettent pas d'induire une réponse immunitaire anti-tumorale nécessaire pour le succès des chimiothérapies immunogènes. Ceci s'est expliqué par une incapacité des cellules déficientes pour l'autophagie à libérer l'ATP, dont nous avons montré l'aptitude à induire le recrutement des cellules dendritiques dans les tumeurs. Ces résultats sont en opposition avec des données pré-cliniques montrant que l'inhibition de l'autophagie par l'hydroxychloroquine (HCQ) peut améliorer l'efficacité de la chimiothérapie. Des essais cliniques sont en cours avec cet inhibiteur d'autophagie, et certains résultats préliminaires sont encourageant (Amaravadi et al., 2011). Cependant ces résultats peuvent être expliqués par le fait que les tumeurs traitées utilisent le processus d'autophagie comme un mécanisme de survie. De plus, l'efficacité de ce traitement à l'HCQ ne repose sûrement pas sur l'intervention du système immunitaire car il a été montré que l'utilisation de cet inhibiteur de l'autophagie affaiblit les réponses immunitaires. En effet, l'autophagie est requise par les cellules dendritiques pour l'apprêtement et la présentation des antigènes (Chemali et al., 2011), (Schmid et al., 2007), (Lee et al., 2010), et par toutes les cellules du système immunitaire pour la génération de métabolites nécessaires pour la survie (Lum et al., 2005). L'HCQ est un composé immunosuppresseur qui inhibe la présentation de l'antigène (Ziegler and Unanue, 1982) et la signalisation du calcium dans les lymphocytes T (Goldman et al., 2000).

L'absence d'autophagie dans les cellules a interféré avec la libération d'ATP, sans pour autant réduire leur capacité à exposer la calréticuline ou libérer HMGB1. Les cellules déficientes pour l'autophagie et mourant sous l'action des chimiothérapies immunogènes

n'ont pas permis d'induire une réponse immunitaire. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études du laboratoire montrant qu'un seul défaut dans l'émission des trois signaux actuellement identifiés de la mort cellulaire immunogène empêche la mise en place efficace d'une réponse immunitaire (Martins et al., 2011).

2. Modulation de la concentration d'ATP extracellulaire

Nous avons pu moduler la concentration d'ATP extracellulaire dans les tumeurs. En exprimant l'ecto-ATPase CD39 à la surface des cellules tumorales. Cette enzyme, qui est normalement exprimée par certaines populations cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules T_{regs} , dégrade l'ATP extracellulaire en ADP et AMP (Michaud et al., 2012). Ceci induit donc une diminution de la concentration d'ATP au niveau des tumeurs et nous a permis d'évaluer son importance dans le recrutement des cellules présentatrices d'antigène. Les cellules $CD39^+$ traitées à la MTX et injectées dans des souris immunocompétentes n'ont pas permis de vacciner contre une deuxième injection de cellules vivantes, contrairement aux cellules contrôles. De plus, lors du traitement à la MTX des tumeurs $CD39^+$ établies dans des souris immunocompétentes, nous n'avons pas de ralentissement de la croissance tumorale comme celui observé avec des tumeurs contrôles. L'expression de CD39 dans les tumeurs est donc suffisante pour inhiber l'efficacité du traitement à la MTX, celui-ci reposant sur l'intervention du système immunitaire, car nous observons une absence de réponse dans les souris immunodéficientes. La dégradation de l'ATP extracellulaire par CD39 est à l'origine de cet effet immunosuppresseur car l'utilisation de l'inhibiteur d'apyrases ARL67156 permet de rétablir l'efficacité de la MTX dans les souris immunocompétentes. Ces résultats corrélaient avec des études montrant une augmentation de cellules T_{regs} exprimant CD39 chez les patients atteints de cancer de la tête et du cou, et pour lesquels l'activité d'ectonucléotidase est impliquée dans l'immunosuppression induite par les T_{regs} (Mandapathil et al., 2009). Ces résultats sont très prometteurs et pourraient permettre le développement de nouvelles stratégies permettant d'améliorer l'efficacité des thérapies reposant sur l'intervention du système immunitaire. Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de CD39, la concentration d'ATP pourrait être rétablie et améliorer la réponse immunitaire anti-tumorale (Sun et al., 2010), (Michaud et al., 2012).

3. Rôle de l'ATP dans le recrutement et la différenciation des cellules présentatrices d'antigène

Nous avons évalué le rôle de l'ATP dans le recrutement de différents types cellulaires grâce à plusieurs stratégies. Tout d'abord, avec l'utilisation des cellules MCA205 exprimant à leur surface CD39, nous avons réussi à bloquer toute infiltration dans ces tumeurs de cellules ayant le phénotype de macrophages, cellules dendritiques ou neutrophiles. Nous avons observé le même résultat avec des souris déficientes pour le récepteur P2Y2, et ceci est en accord avec des études montrant que ce récepteur de l'ATP est impliqué dans la chimiotaxie des neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques et éosinophiles (Chen et al., 2006), (Muller et al., 2010), (Elliott et al., 2009), (Kronlage et al., 2010). Dans les tumeurs établies sur des souris déficientes pour le récepteur P2RX7, nous avons remarqué une absence de cellules dendritiques, alors que les macrophages et neutrophiles étaient présents, suggérant que différents récepteurs purinergiques sont impliqués dans le recrutement de chaque type cellulaire. En effet, les cellules du système immunitaire expriment plusieurs récepteurs purinergiques, dont certains sont impliqués dans leur migration. Ainsi, en accord avec le fait que la libération d'ATP et les récepteurs P2Y2 sont impliqués dans la chimiotaxie des macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques, nous ne retrouvons pas ces cellules dans les tumeurs après traitement aux anthracyclines dans les souris déficientes pour le récepteur P2Y2. Ce récepteur est donc essentiel pour la migration de ces cellules, et donc l'absence du récepteur P2RX7 n'influence pas la présence des macrophages et neutrophiles, dont la chimiotaxie se fait grâce au récepteur P2Y2. Les récepteurs P2RX7 et P2Y2 semblent par ailleurs tous deux importants pour la chimiotaxie des cellules dendritiques, car ces cellules ne sont pas retrouvées dans les tumeurs se développant dans des souris P2Y2^{-/-} ou P2RX7^{-/-}.

Dans notre étude, ces cellules recrutées à la tumeur sont localisées en proximité des cellules mourantes présentant une activation de la caspase 3, caractéristique de l'apoptose (Kroemer et al., 2007). Or, les cellules mourantes par apoptose libèrent de l'ATP qui permet le recrutement de divers types cellulaires (Chekeni et al., 2010), (Elliott et al., 2009). Nos résultats concordent donc avec le fait que l'ATP est un signal chimiotaxique libéré par les cellules mourantes.

L'ATP est impliqué dans la différenciation des cellules hématopoïétiques et des populations myéloïdes précurseurs (GMP granulocyte-macrophage progenitor, CMP common myeloid progenitor) en cellules myéloïdes matures (Barbosa et al., 2011). De plus, l'ATP

extracellulaire apparaît important pour la maturation des DCs et pour induire une réponse Th1 (Schnurr et al., 2000), et ceci est dépendant des récepteurs purinergiques, notamment de P2Y11 (Wilkin et al., 2001). Dans notre travail, après traitement aux anthracyclines, nous avons constaté une augmentation de cellules ayant un phénotype de GMP, seulement dans les tumeurs n'exprimant pas CD39. Nous avons par ailleurs observé qu'en présence d'ATP et avec des récepteurs purinergiques fonctionnels, les cellules $CD11b^+Ly6C^{high}Ly6G^-$ se différencient en cellules ayant le phénotype de DCs inflammatoires. En revanche, ces cellules se différencient préférentiellement en granulocytes en l'absence d'ATP. Ces résultats suggèrent que l'ATP libéré par les cellules mourantes suite au traitement par les anthracyclines permet le recrutement et la différenciation des cellules myéloïdes dans les tumeurs. L'ATP est un facteur essentiel pour orienter la différenciation des cellules $CD11b^+Ly6C^{high}Ly6G^-$ en DCs inflammatoires, permettant ainsi la mise en place d'une réponse immunitaire spécifique.

4. Phénotype des cellules myéloïdes recrutées à la tumeur

Nous avons retrouvé plusieurs types de cellules myéloïdes, caractérisées par l'expression du marqueur CD11b dans les tumeurs après traitement aux anthracyclines. Les cellules étudiées présentaient toutes le phénotype $CD45^+B220^-CD3^-CD11b^+$, c'est-à-dire exprimant le marqueur commun des leucocytes (CD45, Leukocyte common antigen), mais négatives pour les marqueurs de lymphocytes B (B220) ou lymphocytes T (CD3). Parmi ces cellules, nous avons pu distinguer trois populations, des cellules ayant le phénotype de granulocytes $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^+$, de monocytes résidents $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^-$, et de monocytes inflammatoires $CD11b^+Ly6C^{high}Ly6G^-$, comme décrits dans la littérature (Gabrilovich et al., 2012). Ces trois types cellulaires, retrouvés dans les tumeurs après chimiothérapie, contiennent une fraction de cellules ayant le phénotype CMP ou GMP $CD34^+c-Kit^+Sca1^-CD16/32^+$, et ces précurseurs ont la capacité de se différencier en monocytes.

Les monocytes inflammatoires $Ly6C^{high}$ (mais pas les $Ly6C^{low}$) circulent dans le sang et sont recrutés aux sites d'inflammation aiguës (Sunderkotter et al., 2004). En l'absence d'inflammation, les cellules $Ly6C^{high}$ retournent dans la moëlle, où elles se différencient en $Ly6C^{low}$ (Sunderkotter et al., 2004). Ceci peut expliquer qu'en absence de traitement, nous observons une grande proportion de cellules $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^-$ dans les tumeurs, alors que le traitement aux anthracyclines induisant la libération de signaux de danger permet le recrutement de cellules $CD11b^+Ly6C^{high}Ly6G^-$ et $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^+$. De plus, une étude montre que les cellules $Ly6C^{low}$ sont recrutées aux sites d'infection plus tôt (1 ou 2h après

l'infection à *Listeria monocytogenes*) que les monocytes inflammatoires Ly6C^{high} et peuvent participer à la réponse inflammatoire en sécrétant du TNF et des chimiokines (Auffray et al., 2007). Ces données pourraient aussi expliquer nos résultats, étant donné que dans nos tumeurs, en l'absence de traitement, il y a déjà des cellules telles que les macrophages, ou monocytes Ly6C^{low}, mais dans notre étude, la réponse au traitement n'est pas dépendante de la présence de ces cellules. En effet, les cellules Ly6C^{low} ne sont pas suffisantes pour induire une réponse immunitaire complète menant à un ralentissement de la croissance tumorale (**Fig. 3F** de l'article à Immunity).

Des études récentes suggèrent que la plupart des cellules immunosuppressives MDSCs sont identiques aux monocytes inflammatoires. Il est en effet difficile de caractériser les MDSCs qui représentent un ensemble de cellules myéloïdes immatures à des stades de différenciations différents et indistinctement définies comme CD11b⁺Gr-1⁺. Certains travaux ont partagé ces cellules en MDSCs monocytaires CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ ou granulocytaires CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺, dont le phénotype correspond aux cellules infiltrant les tumeurs dans notre étude (Movahedi et al., 2008), (Youn et al., 2008). Cependant, dans ces travaux, la présence de cellules MDSCs monocytaires et granulocytaires dans les tumeurs résulte de la tumorigenèse propre, alors que dans notre travail, l'infiltration des tumeurs par ces cellules CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ et CD11b⁺Ly6C^{low}Ly6G⁺ se produit en réponse au traitement aux anthracyclines.

De plus, il a été montré que ces cellules MDSCs monocytaires ont la capacité de supprimer les réponses faisant intervenir les lymphocytes T, à travers leur potentiel à se différencier en macrophage. En opposition, nous avons montré que nos cellules CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ peuvent se différencier en cellules dendritiques exprimant les marqueurs caractéristiques CD11c et MHCII, et qu'elles peuvent stimuler une réponse aux lymphocytes T. Ceci montre la complexité à définir les populations myéloïdes, suggérant que cette caractérisation devrait prendre en compte l'activité en plus du phénotype des cellules.

Nous avons caractérisé plus en détail la population CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ et avons trouvé que ces cellules expriment CCR2, un récepteur impliqué dans le recrutement des monocytes Ly6C^{high} via son ligand CCL2 (aussi connu sous le nom de MCP1) (Tsou et al., 2007). La plupart des études indiquent que les monocytes inflammatoires CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ expriment CCR2 alors que les monocytes résidents Ly6C^{low} expriment CX₃CR1 (Shi and Pamer, 2011), (Tacke and Randolph, 2006), (Gordon and Taylor,

2005), (Sunderkotter et al., 2004), (Geissmann et al., 2003). Ce dernier est le récepteur de la chimiokine transmembranaire CX₃CL1 (aussi connu sous le nom de fractalkine) qui est impliquée dans le recrutement des cellules Ly6C^{low}. Nos cellules expriment aussi CX₃CR1, mais nous n'avons pas comparé l'expression de ce récepteur dans les cellules Ly6C^{high} et Ly6C^{low}. Nous ne pouvons donc pas déterminer si les cellules Ly6C^{high} expriment CX₃CR1^{low} ou ^{high}. Une étude montre cependant que la délétion de CX₃CR1 diminue le recrutement des cellules Ly6C^{high} dans la rate suite à une infection bactérienne. Cela indique donc que les cellules Ly6C^{high} peuvent aussi être recrutées via CX₃CR1 (Auffray et al., 2009). Une étude sur l'athérosclérose montre d'ailleurs l'implication de monocytes Ly6C^{high}CCR2⁺CX3CR1⁺ dans ce contexte (Tacke et al., 2007).

Autre fait à noter, nos cellules Ly6C^{high} expriment CD103, une intégrine impliquée dans l'adhésion cellulaire. Nous avons remarqué une augmentation de l'expression de cette protéine dans plusieurs conditions. Tout d'abord, après traitement aux anthracyclines, en comparaison au traitement PBS ou au traitement avec des chimiothérapies non immunogènes telles que la cisplatine ou la mitomycine C. Ensuite, les cellules Ly6C^{high} présentes dans les tumeurs expriment plus fortement cette intégrine en comparaison aux cellules Ly6C^{high} de la rate ou des ganglions lymphatiques. CD103 est normalement exprimé par une population de cellules dendritiques présente dans les poumons et les intestins ainsi que dans certains lymphocytes T (Leithauser et al., 2006), (Uss et al., 2006), (Jaensson et al., 2008), (Jakubzick et al., 2008). Plutôt qu'un marqueur définissant une population, l'expression de CD103 sur nos cellules pourrait plutôt être liée à la fonction de CD103. En effet, cette intégrine est impliquée dans la mobilité des cellules et leur rétention dans les tissus (Schlickum et al., 2008). Les cellules CD11b⁺CD103⁺ ne sont pas dépendantes du facteur de transcription Batf3, contrairement aux cellules CD11b⁻CD103⁺, et l'utilisation de souris *Batf3*^{-/-} ne permet pas la déplétion de ces cellules CD11b⁺CD103⁺ (Edelson et al., 2010). Nous avons utilisé les souris *Batf3*^{-/-} pour voir si les cellules dendritiques dépendantes de Batf3 étaient indispensables à la réussite de la chimiothérapie. Après avoir vérifié la présence des cellules CD11b⁺CD11c⁺ dans nos tumeurs, nous avons observé que la déplétion des cellules CD11b⁻CD103⁺ et CD8α⁺ n'avait pas d'influence sur l'efficacité de la chimiothérapie.

Nous avons donc mis en évidence la présence de plusieurs types cellulaires après traitement aux anthracyclines parmi lesquels des précurseurs GMP, des monocytes inflammatoires et résidents, ainsi que des granulocytes.

5. Propriétés des cellules $CD11b^+Ly6C^{high}Ly6G^-$

Les cellules $CD11b^+Ly6C^{high}Ly6G^-$ que nous avons retrouvé dans les tumeurs traitées aux anthracyclines se sont avérées être indispensables pour le succès de la chimiothérapie. En effet, lorsque nous avons bloqué leur accumulation dans les tumeurs, nous avons observé une suppression de l'efficacité du traitement. Cependant, les autres populations de cellules dendritiques telles que les pDCs et les DCs dépendant du facteur de transcription Batf3 ne sont pas indispensables car leur déplétion n'a aucun impact sur la réussite de la chimiothérapie. De plus, parmi les cellules $CD11b^+Ly6C^{high}Ly6G^-$, $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^-$ et $CD11b^+Ly6C^{low}Ly6G^+$, les monocytes inflammatoires $Ly6C^{high}$ sont ceux ayant montré la plus grande capacité à capter les antigènes et à les présenter aux lymphocytes T. En effet, ces cellules ont permis l'activation de lymphocytes T spécifiques, et le transfert adoptif de ces cellules a permis de vacciner les souris contre des cellules tumorales vivantes injectées sept jours plus tard. Il a été montré que les monocytes $CD11b^+Ly6C^+$ se différencient en macrophages ou DCs inflammatoires, qui lors de leur maturation peuvent acquérir l'expression de CD80, CD86, MHCI et MHCII. Ces cellules sont alors capable de présenter les antigènes (Geissmann et al., 2003), (Guilliams et al., 2009).

Un travail sur les cellules dendritiques intervenant après une infection aigüe de l'encéphale a montré l'implication de plusieurs populations de cellules dendritiques, parmi lesquelles une population qui montre un phénotype similaire au notre. En effet, ces cellules sont $CD11c^+CD11b^+CD103^+Ly6C^{high}MHCII^+$ et ont permis l'induction d'une réponse impliquant les LT $CD8^+$ ainsi que les Th1 (D'Agostino et al., 2012).

Un point controversé de notre étude vient du fait que l'efficacité du traitement aux anthracyclines n'a pas été abolit après l'ablation des ganglions lymphatiques. Des résultats similaires ont été obtenus avec la neutralisation du récepteur à la lymphotoxin- β , impliqué dans la formation des organes lymphoïdes périphériques (Tumanov et al., 2003), ainsi que l'utilisation d'anticorps anti IL-7 et dirigés contre le récepteur de l'IL-7. Ces résultats sont en contradiction avec la littérature qui décrit que les cellules dendritiques présentent les antigènes aux lymphocytes T dans les ganglions lymphatiques (Itano and Jenkins, 2003). Dans notre étude, ceux-ci ne sont pas indispensables à l'efficacité de la chimiothérapie qui repose sur l'intervention des lymphocytes T $CD8^+$ sécrétant de l'IFN- γ . De plus amples études sont nécessaire afin de savoir si les cellules dendritiques peuvent présenter les antigènes dans la tumeur ou ailleurs en l'absence de ganglions.

CONCLUSION

Nous avons montré que l'autophagie était indispensable pour la libération d'ATP, et pour permettre l'efficacité des chimiothérapies reposant sur l'activation du système immunitaire. En effet, en l'absence d'autophagie, la libération d'ATP après traitement aux anthracyclines est amoindrie, alors que la libération d'HMGB1 et l'exposition de la calréticuline ont toujours lieu. L'absence d'autophagie ne permet pas d'induire une mort cellulaire immunogène et abolit l'efficacité des anthracyclines.

Nous avons de plus montré que l'ATP libéré va permettre de recruter dans les tumeurs des cellules $CD11c^+CD11b^+Ly6C^{high}$, qui semblent avoir des caractéristiques similaires aux cellules dendritiques inflammatoires et apparaissent importantes pour induire une réponse immunitaire après traitement aux anthracyclines. En effet, nous avons pu montrer que ces cellules sont capable d'agir comme cellules présentatrices d'antigène et de stimuler les lymphocytes T $CD8^+$ (**Fig. 17**).

Dans notre étude, l'implantation de cellules tumorales en sous-cutanée est un modèle éloigné de la réalité, et il faudrait désormais considérer l'utilisation de modèles de tumeurs induites par des carcinogènes.

Cependant, l'étude de la mort cellulaire immunogène est d'une importance primordiale car l'induction d'une mort cellulaire permettant de stimuler une réponse immunitaire et de mettre ainsi en place une mémoire immunitaire permet de lutter efficacement contre les cellules cancéreuses résiduelles.

Cette approche a d'ailleurs été validée chez l'Homme avec une étude sur des patients atteints de lymphomes non-Hodgkiniens. Les cellules tumorales du patient succombant à la mort cellulaire immunogène ont été utilisées pour pulser *ex vivo* des cellules dendritiques. Ces dernières ont été utilisées comme vaccin et ont permis d'observer un effet clinique positif (Di Nicola et al., 2009), (Zappasodi et al., 2010).

Ces résultats doivent encourager l'utilisation de chimiothérapies immunogènes pour le traitement des patients au vu de leur potentiel bénéfique sur le système immunitaire.

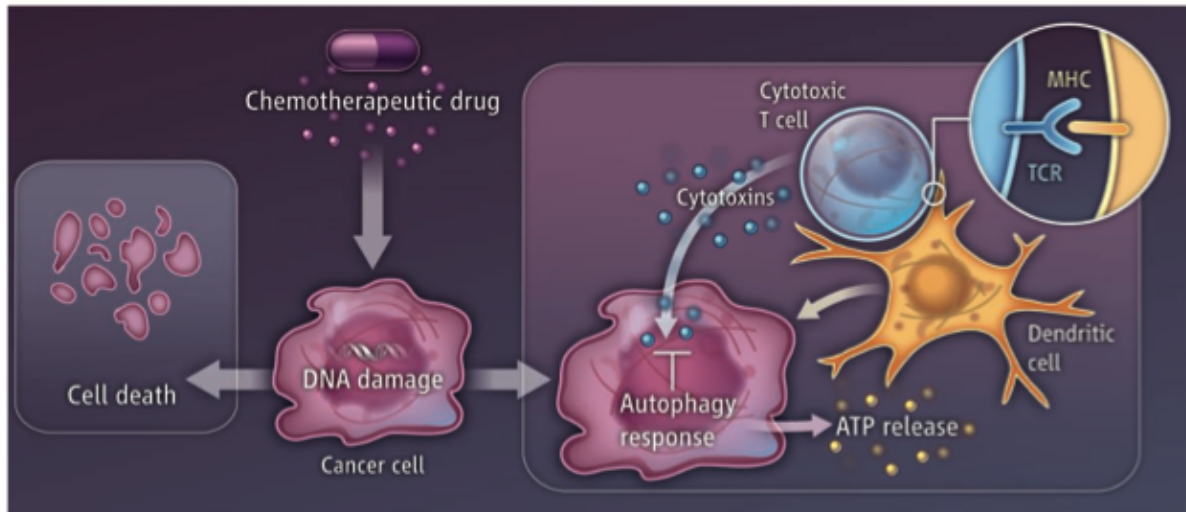


Fig. 17. Importance de l'autophagie lors de la mort cellulaire immunogène. Nous avons montré que l'autophagie était indispensable pour la libération d'ATP. L'ATP permet ensuite le recrutement de cellules dendritiques inflammatoires ainsi que de leurs précurseurs et active les lymphocytes T (Amaravadi, 2011).

REFERENCES

- Adams, J.M., and Cory, S. (2007a). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324-1337.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007b). Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Current opinion in immunology* 19, 488-496.
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 188, 1359-1368.
- Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2008). The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunological reviews* 222, 155-161.
- Almand, B., Clark, J.I., Nikitina, E., van Beynen, J., English, N.R., Knight, S.C., Carbone, D.P., and Gabrilovich, D.I. (2001). Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* 166, 678-689.
- Amaravadi, R.K. (2011). Cancer. Autophagy in tumor immunity. *Science* 334, 1501-1502.
- Amaravadi, R.K., Lippincott-Schwartz, J., Yin, X.M., Weiss, W.A., Takebe, N., Timmer, W., DiPaola, R.S., Lotze, M.T., and White, E. (2011). Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 654-666.
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M.C., Ullrich, E., Saulnier, P., *et al.* (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine* 13, 1050-1059.
- Asea, A., Rehli, M., Kabingu, E., Boch, J.A., Bare, O., Auron, P.E., Stevenson, M.A., and Calderwood, S.K. (2002). Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *The Journal of biological chemistry* 277, 15028-15034.
- Auffray, C., Fogg, D., Garfa, M., Elain, G., Join-Lambert, O., Kayal, S., Sarnacki, S., Cumano, A., Lauvau, G., and Geissmann, F. (2007). Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317, 666-670.
- Auffray, C., Fogg, D.K., Narni-Mancinelli, E., Senechal, B., Trouillet, C., Saederup, N., Leemput, J., Bigot, K., Campisi, L., Abitbol, M., *et al.* (2009). CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *The Journal of experimental medicine* 206, 595-606.
- Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology* 18, 767-811.
- Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Barbosa, C.M., Leon, C.M., Nogueira-Pedro, A., Wasinsk, F., Araujo, R.C., Miranda, A., Ferreira, A.T., and Paredes-Gamero, E.J. (2011). Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. *Cell death & disease* 2, e165.

Basu, S., Binder, R.J., Ramalingam, T., and Srivastava, P.K. (2001). CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* *14*, 303-313.

Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2006). On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nature immunology* *7*, 1029-1035.

Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., and Howard, J.C. (1997). Cellular responses to interferon-gamma. *Annual review of immunology* *15*, 749-795.

Bouabe, H. (2012). Cytokine reporter mice: the special case of IL-10. *Scandinavian journal of immunology* *75*, 553-567.

Burnstock, G. (2012). Purinergic signalling: Its unpopular beginning, its acceptance and its exciting future. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *34*, 218-225.

Burnstock, G., and Knight, G.E. (2004). Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International review of cytology* *240*, 31-304.

Calderwood, S.K., Mambula, S.S., and Gray, P.J., Jr. (2007). Extracellular heat shock proteins in cell signaling and immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1113*, 28-39.

Cao, X., Cai, S.F., Fehniger, T.A., Song, J., Collins, L.I., Piwnica-Worms, D.R., and Ley, T.J. (2007). Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* *27*, 635-646.

Casares, N., Pequignot, M.O., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Roux, S., Chaput, N., Schmitt, E., Hamai, A., Hervas-Stubbs, S., Obeid, M., *et al.* (2005). Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of experimental medicine* *202*, 1691-1701.

Chekeni, F.B., Elliott, M.R., Sandilos, J.K., Walk, S.F., Kinchen, J.M., Lazarowski, E.R., Armstrong, A.J., Penuela, S., Laird, D.W., Salvesen, G.S., *et al.* (2010). Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature* *467*, 863-867.

Chemali, M., Radtke, K., Desjardins, M., and English, L. (2011). Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* *68*, 1533-1541.

Chen, L., Willis, S.N., Wei, A., Smith, B.J., Fletcher, J.I., Hinds, M.G., Colman, P.M., Day, C.L., Adams, J.M., and Huang, D.C. (2005). Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Molecular cell* *17*, 393-403.

Chen, Y., Corriden, R., Inoue, Y., Yip, L., Hashiguchi, N., Zinkernagel, A., Nizet, V., Insel, P.A., and Junger, W.G. (2006). ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* *314*, 1792-1795.

Chomarat, P., Banchereau, J., Davoust, J., and Palucka, A.K. (2000). IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nature immunology* *1*, 510-514.

Chow, M.T., Moller, A., and Smyth, M.J. (2012). Inflammation and immune surveillance in cancer. *Seminars in cancer biology* *22*, 23-32.

Ciechomska, I.A., Gabrusiewicz, K., Szczepankiewicz, A.A., and Kaminska, B. (2012). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy in malignant glioma cells undergoing cyclosporine A-induced cell death. *Oncogene*.

Coffelt, S.B., Lewis, C.E., Naldini, L., Brown, J.M., Ferrara, N., and De Palma, M. (2010). Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors. *The American journal of pathology* *176*, 1564-1576.

Collison, L.W., Pillai, M.R., Chaturvedi, V., and Vignali, D.A. (2009). Regulatory T cell suppression is potentiated by target T cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol* *182*, 6121-6128.

Cory, S., Huang, D.C., and Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* *22*, 8590-8607.

Cotter, T.G. (2009). Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nature reviews. Cancer* *9*, 501-507.

Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J.J., and Smyth, M.J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* *168*, 1356-1361.

D'Agostino, P.M., Kwak, C., Vecchiarelli, H.A., Toth, J.G., Miller, J.M., Masheeb, Z., McEwen, B.S., and Bulloch, K. (2012). Viral-induced encephalitis initiates distinct and functional CD103+ CD11b+ brain dendritic cell populations within the olfactory bulb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, 6175-6180.

D'Amico, A., and Wu, L. (2003). The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3. *The Journal of experimental medicine* *198*, 293-303.

Di Nicola, M., Zappasodi, R., Carlo-Stella, C., Mortarini, R., Pupa, S.M., Magni, M., Devizzi, L., Matteucci, P., Baldassari, P., Ravagnani, F., *et al.* (2009). Vaccination with autologous tumor-loaded dendritic cells induces clinical and immunologic responses in indolent B-cell lymphoma patients with relapsed and measurable disease: a pilot study. *Blood* *113*, 18-27.

Diaz-Montero, C.M., Salem, M.L., Nishimura, M.I., Garrett-Mayer, E., Cole, D.J., and Montero, A.J. (2009). Increased circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical cancer stage, metastatic tumor burden, and doxorubicin-cyclophosphamide chemotherapy. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *58*, 49-59.

Diefenbach, A., and Raulet, D.H. (2002). The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunological reviews* *188*, 9-21.

Dighe, A.S., Richards, E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* *1*, 447-456.

Dinarello, C.A. (2006). Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *The American journal of clinical nutrition* *83*, 447S-455S.

Dinarello, C.A. (2009). Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* *27*, 519-550.

Doherty, T.M., Kastelein, R., Menon, S., Andrade, S., and Coffman, R.L. (1993). Modulation of murine macrophage function by IL-13. *J Immunol* *151*, 7151-7160.

Doherty, T.M., Seder, R.A., and Sher, A. (1996). Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. *J Immunol* *156*, 735-741.

Dranoff, G. (2004). Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nature reviews. Cancer* *4*, 11-22.

Duell, B.L., Tan, C.K., Carey, A.J., Wu, F., Cripps, A.W., and Ulett, G.C. (2012). Recent insights into microbial triggers of interleukin-10 production in the host and the impact on infectious disease pathogenesis. *FEMS immunology and medical microbiology* *64*, 295-313.

Edelson, B.T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L.A., Klekotka, P.A., Moon, C., Albring, J.C., Ise, W., Michael, D.G., *et al.* (2010). Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* *207*, 823-836.

Eissner, G., Kolch, W., and Scheurich, P. (2004). Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine & growth factor reviews* *15*, 353-366.

Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., *et al.* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* *461*, 282-286.

Engel, A.M., Svane, I.M., Rygaard, J., and Werdelin, O. (1997). MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scandinavian journal of immunology* *45*, 463-470.

Fancke, B., Suter, M., Hochrein, H., and O'Keeffe, M. (2008). M-CSF: a novel plasmacytoid and conventional dendritic cell poietin. *Blood* *111*, 150-159.

Feldmeyer, L., Werner, S., French, L.E., and Beer, H.D. (2010). Interleukin-1, inflammasomes and the skin. *European journal of cell biology* *89*, 638-644.

Fiorentino, D.F., Bond, M.W., and Mosmann, T.R. (1989). Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of experimental medicine* *170*, 2081-2095.

Fridlender, Z.G., and Albelda, S.M. (2012). Tumor-associated neutrophils: friend or foe? *Carcinogenesis* *33*, 949-955.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. *Cancer cell* *16*, 183-194.

Fridman, W.H., Galon, J., Pages, F., Tartour, E., Sautes-Fridman, C., and Kroemer, G. (2011). Prognostic and predictive impact of intra- and peritumoral immune infiltrates. *Cancer research* *71*, 5601-5605.

Gabay, C., Lamacchia, C., and Palmer, G. (2010). IL-1 pathways in inflammation and human diseases. *Nature reviews. Rheumatology* *6*, 232-241.

Gabrivovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., and Bronte, V. (2012). Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. *Nature reviews. Immunology* *12*, 253-268.

Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M.P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., *et al.* (2006). Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *The Journal of clinical investigation* *116*, 2777-2790.

Galluzzi, L., Blomgren, K., and Kroemer, G. (2009). Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nature reviews. Neuroscience* *10*, 481-494.

Galluzzi, L., Senovilla, L., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012a). The secret ally: immunostimulation by anticancer drugs. *Nature reviews. Drug discovery* *11*, 215-233.

Galluzzi, L., Vitale, I., Abrams, J.M., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., Dawson, T.M., Dawson, V.L., El-Deiry, W.S., Fulda, S., *et al.* (2012b). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* *19*, 107-120.

Garrido, C., and Kroemer, G. (2004). Life's smile, death's grin: vital functions of apoptosis-executing proteins. *Current opinion in cell biology* *16*, 639-646.

Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71-82.

Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656-661.

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-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature medicine* *15*, 1170-1178.

Girardi, M., Glusac, E., Filler, R.B., Roberts, S.J., Propperova, I., Lewis, J., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2003). The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR) $\gamma\delta$ + and TCR $\alpha\beta$ + T cells to different stages of chemically induced skin cancer. *The Journal of experimental medicine* *198*, 747-755.

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 $\gamma\delta$ T cells. *Science* *294*, 605-609.

Goldman, F.D., Gilman, A.L., Hollenback, C., Kato, R.M., Premack, B.A., and Rawlings, D.J. (2000). Hydroxychloroquine inhibits calcium signals in T cells: a new mechanism to explain its immunomodulatory properties. *Blood* *95*, 3460-3466.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature reviews. Immunology* *5*, 953-964.

Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature reviews. Immunology* *9*, 353-363.

Grivennikov, S.I., Greten, F.R., and Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* *140*, 883-899.

Guilliams, M., Movahedi, K., Bosschaerts, T., VandenDriessche, T., Chuah, M.K., Herin, M., Acosta-Sanchez, A., Ma, L., Moser, M., Van Ginderachter, J.A., *et al.* (2009). IL-10 dampens TNF/inducible nitric oxide synthase-producing dendritic cell-mediated pathogenicity during parasitic infection. *J Immunol* *182*, 1107-1118.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* *21*, 309-322.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.

Hinrichs, C.S., Kaiser, A., Paulos, C.M., Cassard, L., Sanchez-Perez, L., Heemskerk, B., Wrzesinski, C., Borman, Z.A., Muranski, P., and Restifo, N.P. (2009). Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity. *Blood* *114*, 596-599.

Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., Tsukamoto, H., and Shimoda, T. (2010). Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* *49*, 1215-1228.

Ichikawa, E., Hida, S., Omatsu, Y., Shimoyama, S., Takahara, K., Miyagawa, S., Inaba, K., and Taki, S. (2004). Defective development of splenic and epidermal CD4+ dendritic cells in mice deficient for IFN regulatory factor-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 3909-3914.

InVs, I. (2011). Projections de l'incidence et de la mortalité par cancer en France en 2011. . *Rapport technique 2011*, 78 p.

Itano, A.A., and Jenkins, M.K. (2003). Antigen presentation to naive CD4 T cells in the lymph node. *Nature immunology* *4*, 733-739.

Jaensson, E., Uronen-Hansson, H., Pabst, O., Eksteen, B., Tian, J., Coombes, J.L., Berg, P.L., Davidsson, T., Powrie, F., Johansson-Lindbom, B., *et al.* (2008). Small intestinal CD103+ dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *The Journal of experimental medicine* *205*, 2139-2149.

Jakubzick, C., Tacke, F., Ginhoux, F., Wagers, A.J., van Rooijen, N., Mack, M., Merad, M., and Randolph, G.J. (2008). Blood monocyte subsets differentially give rise to CD103+ and CD103- pulmonary dendritic cell populations. *J Immunol* *180*, 3019-3027.

Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S., and Kurzrock, R. (2011). Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nature reviews. Clinical oncology* 8, 528-539.

Joly, A.L., Wettstein, G., Mignot, G., Ghiringhelli, F., and Garrido, C. (2010). Dual role of heat shock proteins as regulators of apoptosis and innate immunity. *Journal of innate immunity* 2, 238-247.

Kabashima, K., Banks, T.A., Ansel, K.M., Lu, T.T., Ware, C.F., and Cyster, J.G. (2005). Intrinsic lymphotoxin-beta receptor requirement for homeostasis of lymphoid tissue dendritic cells. *Immunity* 22, 439-450.

Kang, R., Livesey, K.M., Zeh, H.J., 3rd, Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). HMGB1 as an autophagy sensor in oxidative stress. *Autophagy* 7, 904-906.

Kang, R., Tang, D., Schapiro, N.E., Livesey, K.M., Farkas, A., Loughran, P., Bierhaus, A., Lotze, M.T., and Zeh, H.J. (2010). The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell death and differentiation* 17, 666-676.

Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 7556-7561.

Karantza-Wadsworth, V., and White, E. (2007). Role of autophagy in breast cancer. *Autophagy* 3, 610-613.

Karre, K. (2002). NK cells, MHC class I molecules and the missing self. *Scandinavian journal of immunology* 55, 221-228.

Kastelein, R.A., Hunter, C.A., and Cua, D.J. (2007). Discovery and biology of IL-23 and IL-27: related but functionally distinct regulators of inflammation. *Annual review of immunology* 25, 221-242.

Kepp, O., Galluzzi, L., Giordanetto, F., Tesniere, A., Vitale, I., Martins, I., Schlemmer, F., Adjemian, S., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2009). Disruption of the PP1/GADD34 complex induces calreticulin exposure. *Cell Cycle* 8, 3971-3977.

Kerr, J.F., Wyllie, A.H., and Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239-257.

Kishimoto, T. (2005). Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annual review of immunology* 23, 1-21.

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.

Kroemer, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., *et al.* (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation* 12 *Suppl* 2, 1463-1467.

Kroemer, G., Galluzzi, L., and Brenner, C. (2007). Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews* 87, 99-163.

Kroemer, G., Galluzzi, L., Vandenabeele, P., Abrams, J., Alnemri, E.S., Baehrecke, E.H., Blagosklonny, M.V., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Green, D.R., *et al.* (2009). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation* 16, 3-11.

Kroemer, G., and Levine, B. (2008). Autophagic cell death: the story of a misnomer. *Nature reviews. Molecular cell biology* 9, 1004-1010.

Kroemer, G., and Pouyssegur, J. (2008). Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell* 13, 472-482.

Kronlage, M., Song, J., Sorokin, L., Isfort, K., Schwerdtle, T., Leipziger, J., Robaye, B., Conley, P.B., Kim, H.C., Sargin, S., *et al.* (2010). Autocrine purinergic receptor signaling is essential for macrophage chemotaxis. *Science signaling* 3, ra55.

Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T.H., *et al.* (2009). Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 114, 1141-1149.

Lancet, J.E., Gojo, I., Burton, M., Quinn, M., Tighe, S.M., Kersey, K., Zhong, Z., Albitar, M.X., Bhalla, K., Hannah, A.L., *et al.* (2010). Phase I study of the heat shock protein 90 inhibitor alvespimycin (KOS-1022, 17-DMAG) administered intravenously twice weekly to patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 24, 699-705.

Laouar, Y., Welte, T., Fu, X.Y., and Flavell, R.A. (2003). STAT3 is required for Flt3L-dependent dendritic cell differentiation. *Immunity* 19, 903-912.

Lazova, R., Camp, R.L., Klump, V., Siddiqui, S.F., Amaravadi, R.K., and Pawelek, J.M. (2012). Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 18, 370-379.

Lechner, M.G., Russell, S.M., Bass, R.S., and Epstein, A.L. (2011). Chemokines, costimulatory molecules and fusion proteins for the immunotherapy of solid tumors. *Immunotherapy* 3, 1317-1340.

Lee, H.K., Mattei, L.M., Steinberg, B.E., Alberts, P., Lee, Y.H., Chervonsky, A., Mizushima, N., Grinstein, S., and Iwasaki, A. (2010). In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* 32, 227-239.

Leithauser, F., Meinhardt-Krajina, T., Fink, K., Wotschke, B., Moller, P., and Reimann, J. (2006). Foxp3-expressing CD103+ regulatory T cells accumulate in dendritic cell aggregates of the colonic mucosa in murine transfer colitis. *The American journal of pathology* 168, 1898-1909.

Lessene, G., Czabotar, P.E., and Colman, P.M. (2008). BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 7, 989-1000.

Letterio, J.J., and Roberts, A.B. (1998). Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annual review of immunology* 16, 137-161.

Liao, W., Lin, J.X., and Leonard, W.J. (2011). IL-2 family cytokines: new insights into the complex roles of IL-2 as a broad regulator of T helper cell differentiation. *Current opinion in immunology* 23, 598-604.

Liu, Y.J. (2001). Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106, 259-262.

Locher, C., Conforti, R., Aymeric, L., Ma, Y., Yamazaki, T., Rusakiewicz, S., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Morel, Y., *et al.* (2010). Desirable cell death during anticancer chemotherapy. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1209, 99-108.

Lum, J.J., Bauer, D.E., Kong, M., Harris, M.H., Li, C., Lindsten, T., and Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120, 237-248.

Lustig, K.D., Shiau, A.K., Brake, A.J., and Julius, D. (1993). Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 5113-5117.

Ma, X.H., Piao, S., Wang, D., McAfee, Q.W., Nathanson, K.L., Lum, J.J., Li, L.Z., and Amaravadi, R.K. (2011a). Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness,

resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *17*, 3478-3489.

Ma, Y., Aymeric, L., Locher, C., Mattarollo, S.R., Delahaye, N.F., Pereira, P., Boucontet, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Casares, N., *et al.* (2011b). Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy. *The Journal of experimental medicine* *208*, 491-503.

Maiuri, M.C., Zalckvar, E., Kimchi, A., and Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* *8*, 741-752.

Mandapathil, M., Szczepanski, M.J., Szajnik, M., Ren, J., Lenzner, D.E., Jackson, E.K., Gorelik, E., Lang, S., Johnson, J.T., and Whiteside, T.L. (2009). Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *15*, 6348-6357.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. *Nature* *454*, 436-444.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* *25*, 677-686.

Martin, C.A., and Dorf, M.E. (1991). Differential regulation of interleukin-6, macrophage inflammatory protein-1, and JE/MCP-1 cytokine expression in macrophage cell lines. *Cellular immunology* *135*, 245-258.

Martin, S.J., and Green, D.R. (1995). Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Critical reviews in oncology/hematology* *18*, 137-153.

Martins, I., Kepp, O., Schlemmer, F., Adjemian, S., Tailleur, M., Shen, S., Michaud, M., Menger, L., Gdoura, A., Tajeddine, N., *et al.* (2011). Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress. *Oncogene* *30*, 1147-1158.

Martins, I., Tesniere, A., Kepp, O., Michaud, M., Schlemmer, F., Senovilla, L., Seror, C., Metivier, D., Perfettini, J.L., Zitvogel, L., *et al.* (2009). Chemotherapy induces ATP release from tumor cells. *Cell Cycle* *8*, 3723-3728.

Mathew, R., Karp, C.M., Beaudoin, B., Vuong, N., Chen, G., Chen, H.Y., Bray, K., Reddy, A., Bhanot, G., Gelin, C., *et al.* (2009). Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* *137*, 1062-1075.

Mellman, I., and Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* *106*, 255-258.

Michaud, M., Sukkurwala, A.Q., Martins, I., Shen, S., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Subversion of the chemotherapy-induced anticancer immune response by the ecto-ATPase CD39. *Oncoimmunology* *1*, 393-395.

Moore, K.W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R.L., and O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology* *19*, 683-765.

Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nature reviews. Immunology* *7*, 610-621.

Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in immunology* *25*, 75-84.

Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* *136*, 2348-2357.

Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R., and Johansson, C.C. (2010). Regulatory T cells in cancer. *Advances in cancer research* 107, 57-117.

Movahedi, K., Williams, M., Van den Bossche, J., Van den Bergh, R., Gysemans, C., Beschin, A., De Baetselier, P., and Van Ginderachter, J.A. (2008). Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T cell-suppressive activity. *Blood* 111, 4233-4244.

Muller, T., Robaye, B., Vieira, R.P., Ferrari, D., Grimm, M., Jakob, T., Martin, S.F., Di Virgilio, F., Boeynaems, J.M., Virchow, J.C., *et al.* (2010). The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 65, 1545-1553.

Munoz-Pinedo, C., El Mjiyad, N., and Ricci, J.E. (2012). Cancer metabolism: current perspectives and future directions. *Cell death & disease* 3, e248.

Muranski, P., Boni, A., Antony, P.A., Cassard, L., Irvine, K.R., Kaiser, A., Paulos, C.M., Palmer, D.C., Touloukian, C.E., Ptak, K., *et al.* (2008). Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* 112, 362-373.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. *Nature reviews. Cancer* 8, 618-631.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology* 11, 723-737.

Nakamura, K., Kitani, A., and Strober, W. (2001). Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *The Journal of experimental medicine* 194, 629-644.

Nishikawa, H., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells in tumor immunity. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 127, 759-767.

O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L.A., Hausmann, G., Adams, J.M., Cory, S., and Huang, D.C. (1998). Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis. *The EMBO journal* 17, 384-395.

Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G.M., Apetoh, L., Perfettini, J.L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., *et al.* (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature medicine* 13, 54-61.

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tanii, I., Yoshinaga, K., *et al.* (2006). Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology* 26, 9220-9231.

Oliphant, C.J., Barlow, J.L., and McKenzie, A.N. (2011). Insights into the initiation of type 2 immune responses. *Immunology* 134, 378-385.

Panaretakis, T., Joza, N., Modjtahedi, N., Tesniere, A., Vitale, I., Durchschlag, M., Fimia, G.M., Kepp, O., Piacentini, M., Froehlich, K.U., *et al.* (2008). The co-translocation of ERp57 and calreticulin determines the immunogenicity of cell death. *Cell death and differentiation* 15, 1499-1509.

Panaretakis, T., Kepp, O., Brockmeier, U., Tesniere, A., Bjorklund, A.C., Chapman, D.C., Durchschlag, M., Joza, N., Pierron, G., van Endert, P., *et al.* (2009). Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *The EMBO journal* 28, 578-590.

Parameswaran, N., and Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor-alpha signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression* 20, 87-103.

Pereira, W.O., and Amarante-Mendes, G.P. (2011). Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? *Scandinavian journal of immunology* 73, 401-407.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., *et al.* (2003). Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *The Journal of clinical investigation* *112*, 1809-1820.

Rabinovich, G.A., Gabrilovich, D., and Sotomayor, E.M. (2007). Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology* *25*, 267-296.

Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., *et al.* (2010). The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *The Journal of clinical investigation* *120*, 127-141.

Rutkowski, D.T., and Kaufman, R.J. (2004). A trip to the ER: coping with stress. *Trends in cell biology* *14*, 20-28.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology* *22*, 531-562.

Sathe, P., and Wu, L. (2011). The network of cytokines, receptors and transcription factors governing the development of dendritic cell subsets. *Protein & cell* *2*, 620-630.

Schiavoni, G., Mattei, F., Sestili, P., Borghi, P., Venditti, M., Morse, H.C., 3rd, Belardelli, F., and Gabriele, L. (2002). ICSBP is essential for the development of mouse type I interferon-producing cells and for the generation and activation of CD8alpha(+) dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* *196*, 1415-1425.

Schlickum, S., Sennefelder, H., Friedrich, M., Harms, G., Lohse, M.J., Kilshaw, P., and Schon, M.P. (2008). Integrin alpha E(CD103)beta 7 influences cellular shape and motility in a ligand-dependent fashion. *Blood* *112*, 619-625.

Schmid, D., Pypaert, M., and Munz, C. (2007). Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* *26*, 79-92.

Schnurr, M., Then, F., Galambos, P., Scholz, C., Siegmund, B., Endres, S., and Eigler, A. (2000). Extracellular ATP and TNF-alpha synergize in the activation and maturation of human dendritic cells. *J Immunol* *165*, 4704-4709.

Schotte, R., Nagasawa, M., Weijer, K., Spits, H., and Blom, B. (2004). The ETS transcription factor Spi-B is required for human plasmacytoid dendritic cell development. *The Journal of experimental medicine* *200*, 1503-1509.

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., Hertzog, P.J., Ravasi, T., and Hume, D.A. (2004). Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* *75*, 163-189.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107-1111.

Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nature reviews. Immunology* *2*, 116-126.

Shi, C., and Pamer, E.G. (2011). Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews. Immunology* *11*, 762-774.

Shiratsuchi, A., Watanabe, I., Takeuchi, O., Akira, S., and Nakanishi, Y. (2004). Inhibitory effect of Toll-like receptor 4 on fusion between phagosomes and endosomes/lysosomes in macrophages. *J Immunol* *172*, 2039-2047.

Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M.G., Rimoldi, M., Biswas, S.K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in cancer biology* 18, 349-355.

Simson, L., Ellyard, J.I., Dent, L.A., Matthaei, K.I., Rothenberg, M.E., Foster, P.S., Smyth, M.J., and Parish, C.R. (2007). Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol* 178, 4222-4229.

Smyth, M.J., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *International immunology* 13, 459-463.

Smyth, M.J., Dunn, G.P., and Schreiber, R.D. (2006). Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Advances in immunology* 90, 1-50.

Smyth, M.J., Taniguchi, M., and Street, S.E. (2000a). The anti-tumor activity of IL-12: mechanisms of innate immunity that are model and dose dependent. *J Immunol* 165, 2665-2670.

Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., MacGregor, D., Godfrey, D.I., and Trapani, J.A. (2000b). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine* 192, 755-760.

Strasser, A., Cory, S., and Adams, J.M. (2011). Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases. *The EMBO journal* 30, 3667-3683.

Street, S.E., Cretney, E., and Smyth, M.J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192-197.

Street, S.E., Trapani, J.A., MacGregor, D., and Smyth, M.J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine* 196, 129-134.

Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183, 534-536.

Sun, X., Wu, Y., Gao, W., Enjyoji, K., Csizmadia, E., Muller, C.E., Murakami, T., and Robson, S.C. (2010). CD39/ENTPD1 expression by CD4+Foxp3+ regulatory T cells promotes hepatic metastatic tumor growth in mice. *Gastroenterology* 139, 1030-1040.

Sunderkotter, C., Nikolic, T., Dillon, M.J., Van Rooijen, N., Stehling, M., Drevets, D.A., and Leenen, P.J. (2004). Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol* 172, 4410-4417.

Suzuki, S., Honma, K., Matsuyama, T., Suzuki, K., Toriyama, K., Akitoyo, I., Yamamoto, K., Suematsu, T., Nakamura, M., Yui, K., *et al.* (2004). Critical roles of interferon regulatory factor 4 in CD11b^{high}CD8 α - dendritic cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 8981-8986.

Swann, J.B., Vesely, M.D., Silva, A., Sharkey, J., Akira, S., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 652-656.

Tacke, F., Alvarez, D., Kaplan, T.J., Jakubzick, C., Spanbroek, R., Llodra, J., Garin, A., Liu, J., Mack, M., van Rooijen, N., *et al.* (2007). Monocyte subsets differentially employ CCR2, CCR5, and CX3CR1 to accumulate within atherosclerotic plaques. *The Journal of clinical investigation* 117, 185-194.

Tacke, F., and Randolph, G.J. (2006). Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. *Immunobiology* 211, 609-618.

Tadokoro, C.E., Shakhar, G., Shen, S., Ding, Y., Lino, A.C., Maraver, A., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2006). Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4⁺ T cells and dendritic cells in vivo. *The Journal of experimental medicine* *203*, 505-511.

Takamura, A., Komatsu, M., Hara, T., Sakamoto, A., Kishi, C., Waguri, S., Eishi, Y., Hino, O., Tanaka, K., and Mizushima, N. (2011). Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes & development* *25*, 795-800.

Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Cheh, C.W., Farkas, A., Loughran, P., Hoppe, G., Bianchi, M.E., Tracey, K.J., Zeh, H.J., 3rd, *et al.* (2010a). Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *The Journal of cell biology* *190*, 881-892.

Tang, D., Kang, R., Livesey, K.M., Zeh, H.J., 3rd, and Lotze, M.T. (2011a). High mobility group box 1 (HMGB1) activates an autophagic response to oxidative stress. *Antioxidants & redox signaling* *15*, 2185-2195.

Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., 3rd, and Lotze, M.T. (2010b). High-mobility group box 1 and cancer. *Biochimica et biophysica acta* *1799*, 131-140.

Tang, D., Kang, R., Zeh, H.J., 3rd, and Lotze, M.T. (2011b). High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxidants & redox signaling* *14*, 1315-1335.

Tang, D., Lotze, M.T., Kang, R., and Zeh, H.J. (2011c). Apoptosis promotes early tumorigenesis. *Oncogene* *30*, 1851-1854.

Teng, M.W., Swann, J.B., Koebel, C.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2008). Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *Journal of leukocyte biology* *84*, 988-993.

Tesniere, A., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Joza, N., Panaretakis, T., Kepp, O., Schlemmer, F., Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2008). Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Current opinion in immunology* *20*, 504-511.

Todorova, J., and Pasheva, E. (2012). High mobility group B1 protein interacts with its receptor RAGE in tumor cells but not in normal tissues. *Oncology letters* *3*, 214-218.

Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature reviews. Immunology* *3*, 133-146.

Tsou, C.L., Peters, W., Si, Y., Slaymaker, S., Aslanian, A.M., Weisberg, S.P., Mack, M., and Charo, I.F. (2007). Critical roles for CCR2 and MCP-3 in monocyte mobilization from bone marrow and recruitment to inflammatory sites. *The Journal of clinical investigation* *117*, 902-909.

Tumanov, A.V., Grivennikov, S.I., Shakhov, A.N., Rybtsov, S.A., Koroleva, E.P., Takeda, J., Nedospasov, S.A., and Kuprash, D.V. (2003). Dissecting the role of lymphotoxin in lymphoid organs by conditional targeting. *Immunological reviews* *195*, 106-116.

Uss, E., Rowshani, A.T., Hooibrink, B., Lardy, N.M., van Lier, R.A., and ten Berge, I.J. (2006). CD103 is a marker for alloantigen-induced regulatory CD8⁺ T cells. *J Immunol* *177*, 2775-2783.

Vacchelli, E., Galluzzi, L., Fridman, W.H., Galon, J., Sautes-Fridman, C., Tartour, E., and Kroemer, G. (2012). Trial watch: Chemotherapy with immunogenic cell death inducers. *Oncoimmunology* *1*, 179-188.

van de Veerdonk, F.L., Netea, M.G., Dinarello, C.A., and Joosten, L.A. (2011). Inflammasome activation and IL-1beta and IL-18 processing during infection. *Trends in immunology* *32*, 110-116.

van Delft, M.F., Wei, A.H., Mason, K.D., Vandenberg, C.J., Chen, L., Czabotar, P.E., Willis, S.N., Scott, C.L., Day, C.L., Cory, S., *et al.* (2006). The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer cell* *10*, 389-399.

Varol, C., Landsman, L., Fogg, D.K., Greenshtein, L., Gildor, B., Margalit, R., Kalchenko, V., Geissmann, F., and Jung, S. (2007). Monocytes give rise to mucosal, but not splenic, conventional dendritic cells. *The Journal of experimental medicine* *204*, 171-180.

Vesely, M.D., Kershaw, M.H., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2011). Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annual review of immunology* *29*, 235-271.

Villamil Giraldo, A.M., Lopez Medus, M., Gonzalez Lebrero, M., Pagano, R.S., Labriola, C.A., Landolfo, L., Delfino, J.M., Parodi, A.J., and Caramelo, J.J. (2010). The structure of calreticulin C-terminal domain is modulated by physiological variations of calcium concentration. *The Journal of biological chemistry* *285*, 4544-4553.

Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature reviews. Immunology* *12*, 239-252.

Ware, C.F. (2005). Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annual review of immunology* *23*, 787-819.

Webb, T.E., Simon, J., Krishek, B.J., Bateson, A.N., Smart, T.G., King, B.F., Burnstock, G., and Barnard, E.A. (1993). Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS letters* *324*, 219-225.

White, E. (2012). Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nature reviews. Cancer* *12*, 401-410.

Wiley, J.S., Sluyter, R., Gu, B.J., Stokes, L., and Fuller, S.J. (2011). The human P2X7 receptor and its role in innate immunity. *Tissue antigens* *78*, 321-332.

Wilkin, F., Duhant, X., Bruyns, C., Suarez-Huerta, N., Boeynaems, J.M., and Robaye, B. (2001). The P2Y11 receptor mediates the ATP-induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* *166*, 7172-7177.

Williams, D.B. (2006). Beyond lectins: the calnexin/calreticulin chaperone system of the endoplasmic reticulum. *Journal of cell science* *119*, 615-623.

Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* *322*, 271-275.

Wolter, K.G., Hsu, Y.T., Smith, C.L., Nechushtan, A., Xi, X.G., and Youle, R.J. (1997). Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis. *The Journal of cell biology* *139*, 1281-1292.

Wu, L., D'Amico, A., Winkel, K.D., Suter, M., Lo, D., and Shortman, K. (1998). RelB is essential for the development of myeloid-related CD8alpha- dendritic cells but not of lymphoid-related CD8alpha+ dendritic cells. *Immunity* *9*, 839-847.

Xu, M., Mizoguchi, I., Morishima, N., Chiba, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T. (2010). Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clinical & developmental immunology* *2010*.

Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'antonio, G., *et al.* (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes & development* *25*, 717-729.

Yona, S., and Jung, S. (2010). Monocytes: subsets, origins, fates and functions. *Current opinion in hematology* *17*, 53-59.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy. *The Journal of biological chemistry* *281*, 30299-30304.

Youn, J.I., Nagaraj, S., Collazo, M., and Gabrilovich, D.I. (2008). Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol* *181*, 5791-5802.

Yu, S.L., Kuan, W.P., Wong, C.K., Li, E.K., and Tam, L.S. (2012). Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. *Clinical & developmental immunology* *2012*, 715190.

Zaidi, M.R., and Merlino, G. (2011). The two faces of interferon-gamma in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6118-6124.

Zappasodi, R., Pupa, S.M., Ghedini, G.C., Bongarzone, I., Magni, M., Cabras, A.D., Colombo, M.P., Carlo-Stella, C., Gianni, A.M., and Di Nicola, M. (2010). Improved clinical outcome in indolent B-cell lymphoma patients vaccinated with autologous tumor cells experiencing immunogenic death. *Cancer research* 70, 9062-9072.

Ziegler, H.K., and Unanue, E.R. (1982). Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 175-178.

Zitvogel, L., Kepp, O., Senovilla, L., Menger, L., Chaput, N., and Kroemer, G. (2010). Immunogenic tumor cell death for optimal anticancer therapy: the calreticulin exposure pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 3100-3104.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127.

Facteurs essentiels pour le succès des chimiothérapies immunogènes

Sandy ADJEMIAN

La plupart des chimiothérapies sont connues pour exercer une immunosuppression en plus de leur effet cytotoxique, car elles ciblent sans distinction les cellules à prolifération rapide telles que les cellules tumorales ainsi que les cellules du système immunitaire. Cependant, la radiothérapie ainsi que certaines chimiothérapies comme les anthracyclines ou l'oxaliplatine ont montré une propriété immunostimulante, grâce à l'induction d'une mort cellulaire dite immunogène. Cette mort cellulaire se caractérise par la libération de signaux de danger par la cellule mourante qui vont activer le système immunitaire. Tout d'abord, l'exposition de la calréticuline à la surface de la cellule va être un signal de phagocytose pour les cellules dendritiques. Les cellules succombant à la mort cellulaire libèrent aussi HMGB1 qui en se liant à TLR4 permet un apprêtement et une présentation des antigènes tumoraux efficace. Ensuite, la libération d'ATP qui agit sur les récepteurs P2RX7 permet l'activation de l'inflammasome NLRP3 et conduit à la sécrétion d'IL-1 β indispensable pour l'activation des lymphocytes T CD8⁺ sécrétant de l'IFN- γ .

L'autophagie est un processus de dégradation permettant de limiter l'instabilité génomique et l'initiation de cancers. L'autophagie, peut être induite après un stress du réticulum endoplasmique, qui est nécessaire à l'exposition de la calréticuline lors de la mort cellulaire immunogène. Nous avons donc cherché à évaluer l'importance de l'autophagie après traitement aux chimiothérapies immunogènes. Nous avons montré que l'autophagie est requise pour induire la libération d'ATP lors de la mort cellulaire immunogène. De plus, nous avons montré que l'ATP libéré par les cellules mourantes après traitement aux chimiothérapies immunogènes permet le recrutement de cellules de type monocyte inflammatoire (CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻) ainsi que de leurs précurseurs. En outre, l'ATP est un facteur important dans la différenciation de ces cellules en cellules dendritiques inflammatoires. Les cellules CD11b⁺Ly6C^{high}Ly6G⁻ ont montré une grande capacité à présenter les antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8⁺ permettant leur activation. Les cellules déficientes pour l'autophagie n'ont quant à elles pas permis le recrutement de cellules dendritiques dans les tumeurs ni l'activation de lymphocytes T CD8⁺.

Ces travaux ont permis de montrer l'importance de l'autophagie pour mettre en place une réponse immunitaire anti-tumorale spécifique lors du traitement avec des chimiothérapies immunogènes. De plus, nous avons montré que l'ATP est impliqué dans le recrutement et la différenciation de cellules avec un phénotype de monocytes inflammatoires. L'ensemble de ces résultats apporte de nouveaux éléments dans la caractérisation du processus de mort cellulaire immunogène.