HAL
open science

Conséquences de l'expression de la synthétase de l'oxyde nitrique de type 2 (NOS2) sur les fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ au cours du développement du mélanome

Laetitia Douguet

▶ **To cite this version:**

Laetitia Douguet. Conséquences de l'expression de la synthétase de l'oxyde nitrique de type 2 (NOS2) sur les fonctions des lymphocytes T $\gamma\delta$ au cours du développement du mélanome. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2015. Français. NNT : 2015USPCB106 . tel-01535979

HAL Id: tel-01535979

https://theses.hal.science/tel-01535979v1

Submitted on 9 Jun 2017

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.

Thèse de doctorat de l'université Paris V – René Descartes
Ecole doctorale BioSPC (Gc2ID)

Doctorat en sciences
Spécialité : **IMMUNOLOGIE**

Présentée par Laetitia Douguet
Pour l'obtention du titre de docteur de l'université Paris V

Conséquences de l'expression de la synthétase de l'oxyde nitrique de type 2 (NOS2) sur les fonctions des lymphocytes T γδ au cours du développement du mélanome

Soutenue publiquement le 26 novembre 2015, devant le jury composé de :

Pr Benoît Van Den Eynde	Rapporteur
Dr Julie Dechanet Merville	Rapporteur
Pr Isabelle Bourgault	Examinateur
Dr Philippe Bousso	Examinateur
Dr Armelle Prévost Blondel	Directrice de thèse

A ma maman …

Remerciements

En préambule, je remercie particulièrement les membres du jury qui ont eu la gentillesse de bien vouloir évaluer mon travail de thèse. Merci pour vos commentaires qui m'ont permis d'améliorer ce manuscrit.

Je remercie sincèrement tous ceux qui m'ont conduite, soutenue et même parfois portée jusqu'ici … Que vous soyez encore à mes cotés aujourd'hui, que nos chemins se soient trop vite séparés, que vous soyez près de moi physiquement ou à 1000, 3000 ou même 18000 km, merci d'avoir su me réconforter quand il le fallait, de m'avoir écoutée inexorablement et d'avoir cru en moi pendant mes moments de doute. Je n'oublie pas non plus les moments qu'on a partagé ou qu'on partage encore et qui colorent la vie … Les coups de gueule qui défoulent, les fous rires mémorables, les moments de délires, les déguisements improbables pour produire des vidéos tout aussi improbables, les chansons, les danses, la musique, les voyages, le kite, les joies de la vie en somme ! Je vous remercie tous du fond du cœur car, sans vous, ces dernières années auraient été beaucoup plus dures et nettement moins drôles !

Pour débuter, évidemment, Matthieu je te remercie avec une infinie tendresse d'avoir été le premier à croire dans mon projet et de m'avoir littéralement accompagnée dans la reprise de mes études et d'en avoir suivi chaque étape … De Bouygues Telecom au CNAM, puis à Orsay, en passant par Cachan, jusqu'au concours de l'école doctorale et enfin les années à Cochin … Merci infiniment de ton soutien sans faille, d'avoir toujours été à mes cotés même dans les pires moments, d'avoir cru en moi, de m'avoir portée, d'avoir été bien plus … Je ne veux pas en dire davantage parce que tout le reste nous appartient mais le cœur y est, et c'est tellement évident. Merci aussi d'être le premier spectateur de mes répétitions et d'avoir supporté mon horrible caractère dans les moments de stress. Enfin, merci d'avoir eu la patience de m'écouter et de me répéter environ 1 million de fois (et j'exagère à peine, hein ?!) « Accroche toi ! ». Je me suis accrochée …

Parce qu'avant de commencer ma thèse, il y a eu un début différent du parcours classique, je tiens à remercier les professeurs du CNAM qui savent redonner confiance aux adultes ayant arrêté prématurément leurs études. Merci particulièrement à Messieurs Potus et Doussot, votre travail m'a permis de tout recommencer du début pour finalement faire une thèse. Je n'oublie pas les enseignants responsables du magistère de Paris XI qui, malgré mon parcours atypique, m'ont permis de recommencer mes études à plein temps dans un cadre qui me correspondait. Merci aux professeurs de l'ENS Cachan en particulier,

Monsieur Peyroche je vous remercie pour vos sincères encouragements. C'est dans une de vos UE que j'ai étudié un article de Schreiber qui m'a fait découvrir l'immunoéditing. Je me suis alors dit immédiatement : « C'est génial, c'est grâce au système immunitaire qu'on va pouvoir guérir le cancer ». Même si c'était une vision un peu naïve, j'avais trouvé ce que je voulais faire : de l'immunité anti-tumorale. C'était une évidence, ça l'est toujours 6 ans plus tard. Merci aussi pour ça !

C'est aussi grâce aux théories de Shcreiber, mon cher Julien qu'on s'est rencontré. Et quelle rencontre ?! J'ai tellement adoré nos longues discussions scientifiques que passer des heures dans la chambre froide pour t'aider sur tes western blots pendant mon stage de licence m'a semblé … trop rapide … J'avais trouvé mon alter ego scientifique ! C'est avec plaisir que je t'ai retrouvé à Nice et je suis contente que tu fasses parti des auteurs de mon papier. Merci Julien de m'avoir épaulée pendant cette thèse, de m'avoir suggéré des bonnes idées (même si je suis très/trop difficile à convaincre parfois. Toi aussi, non ?!), d'avoir grandement participé à améliorer l'article, je suis vraiment ravie qu'on ait pu re-travailler ensemble !

Merci Armelle de m'avoir accueillie dans ton labo dès mon M2, puis de m'avoir guidée pendant ma thèse. A tes côtés, pendant cette thèse, j'ai appris à rédiger un article scientifique, présenter mes données dans des congrès, encadrer des étudiants (Benoît, Erwan et Laura), j'ai aussi été lauréate de la fondation SILAB. J'en profite pour remercier Brigitte et Florence pour leur présence à cette soutenance. Autant d'expériences enrichissantes qui ont nourri ma thèse et qui me confortent dans la volonté de poursuivre dans cette voie. Dès notre entretien de M2, je savais que je faisais le bon choix grâce à ton ouverture d'esprit, ton envie de communiquer et ta capacité à prendre en compte mes idées. Ta porte a toujours été ouverte, merci pour ça. Je te remercie sincèrement pour nos nombreuses et passionnantes discussions sur l'immunité anti-tumorale, le monde de la recherche, et tes connaissances bibliographiques. Je te remercie également énormément de m'avoir fait confiance et de m'avoir laissé l'autonomie dont j'avais besoin tout au long de cette thèse tout en sachant m'épauler quand il le fallait et, en particulier dans la dernière ligne droite … Merci enfin d'avoir toujours tout corrigé malgré les délais.

Renée, je te remercie pour ton soutien, pour m'avoir transmis quelques unes de tes nombreuses compétences techniques et d'avoir été toujours partante pour explorer des nouvelles pistes de manips avec l'entrain qui te caractérise. Même si ça n'a pas toujours été concluant, je n'oublie pas que tu m'as suivie même dans mes idées les plus compliquées. Enfin, merci de m'avoir épaulée et guidée en l'absence d'Armelle, en particulier pendant mon

M2. Merci aussi pour ta bonne humeur, ton écoute patiente et bienveillante, et même pour tes coups de gueule !

Lloyd, poulet, merci pour tout ! Pour ta bonne humeur communicative et caractéristique, pour écouter patiemment tout le temps, pour ton réconfort, pour supporter ma franchise pas tout le temps délicate, pour ne pas avoir pris peur pendant ton entretien de M2, d'avoir passé soirées, dimanche pour m'aider dans mes manips notamment celles pour Nice, et de rester positif même quand on passe le dimanche au labo et que ça foire !!! Enfin, pour ta caipi légendaire et pour ton sens de la fête ! Accroche toi, frérot, c'est bientôt ton tour …

Laura, j'ai été ravie de t'encadrer pendant tes stages de L3 et de M1 et je suis certaine que ta rigueur et ta capacité de travail te permettront de réussir brillamment dans l'équipe en M2 et en thèse ! Reste comme tu es.

A celles qui sont parties mais qui sont devenues mes amies « docteurs » avant moi, un énorme merci ou plutôt 10 000 mais il y a tellement de choses pour lesquelles je voudrais vous remercier que j'ai peur d'en oublier … Alors pardon d'avance. Je vous redirai tout ça de vive voix bien sur !!!

On commence par toi Camille, évidemment sans toi, ma confidente, mon amie tout aurait été beaucoup plus dur. Merci pour les papotages dans la pièce de culture, je me suis sentie bien seule quand tu es partie parce que on y passait un sacré bout de temps, que ça soit pour se raconter ou pour franchement se marrer … Bravo pour ton jeu de mimes ! Merci de m'avoir soutenue dans la rédaction de mon M2, et plus récemment de m'avoir expliquée end note. A 18 000 km, c'était sport mais tes qualités de pédagogue ont fait le reste. Ta sensibilité et ton sens de l'écoute sont tes plus grands atouts. Merci ma belle.

Kahina, mon amie, ma confidente, au fort caractère : merci pour nos nombreuses discussions que j'adore, heureusement qu'elles sont toujours, même depuis Tizi, même après la naissance de ta merveilleuse Luna. Je te remercie de savoir trouver les mots, de ne pas avoir douté de moi même à 15 jours de la date fatidique, d'être restée zen en me disant que je pouvais le faire ! Merci aussi pour nos débats scientifiques, pour la transmission de tes protocoles, pour tes coups de main techniques. Merci d'être toi et d'être là.

Sonia, ma petite cousine du 95, merci pour ton écoute tout au long de ces années, merci pour ton calme, si agréable et ton côté positif. Je suis ravie du chemin qu'on a parcouru l'une à côté de l'autre. Et qu'on s'en soit tirée toutes les 2. Des cours de Pasteur à la thèse ! Merci aussi d'être toujours motivée par tout, pour ton sens de la fête et ton côté fofolle, danseuse jusqu'à épuisement ! Et puis, j'ai failli oublier mais, non … Ton organisation des soirées aux urgences ;-) ! Sueurs froides garanties !!!

Meriem, ma voisine de bureau à un moment donné, évidemment tu sais pourquoi je vais te remercier ? 1) d'avoir survécu à mon bordel que tu as su contenir dans un endroit bien délimité (quand tu es partie j'étais seule et là ce fut la grosse fête : y en avait partout, va falloir que je range maintenant) !!!! 2) pour notre karaoké bien sur … Un gros coup de mou allez une chanson ! Toujours la même … Mais chut ça restera entre nous. Heureusement le ridicule ne tue pas, ouffffff … 3) n'oublions pas le remède international à tous les maux : « Mal à la tête ? », « Cheveux gras ? », « Manip ratée ? » : une cuillère de zit ouzmour et ça repart !!!

Heureusement, les filles que vous n'êtes pas toutes parties en même temps, parce que ce fut bien vide sans vous à la fin !

Aurélie, merci pour ta bonne humeur et ton excellent gâteau au chocolat (quoi ?! j'en ai mangé déjà 4 parts ??? non je vous crois pas, je peux en avoir une autre ?!!!), même si tu m'as donné la recette eh ben je peux te dire que définitivement les gâteaux c'est pas pour moi ! Merci aussi pour ta franchise c'est une grande qualité !!! Nelly, tu sais pourquoi je voudrais te remercier ??? C'est tellement évident, mon pêché mignon : la soupe de champagne. Je me souviens d'une manip faite après quelques coupes de ton breuvage, c'était très rigolo, j'ai beaucoup chanté (seule dans mon labo) mais j'ai du mettre 4h de plus … (pas de panique, j'ai refait la manip après !). Merci aux autres membres de l'équipe Bruno M, Cédric, Matthieu, Alexandra et au chef Bruno L, en particulier merci de m'avoir apporté ton soutien et tes conseils en l'absence d'Armelle pendant mon M2, je t'en suis très reconnaissante. Enfin merci aux autres membres du 8ème étage du bâtiment Gustave Roussy (Lene, Stéphane, JB, Marco, Jen, Charly, Vincent, Yolande, Gwen, Anne, Jan-Philippe et j'en oublie c'est sur mais le cœur y est !). La solidarité qui règne à cet étage et la facilité des interactions entre les équipes permettent de venir au labo, le cœur léger. Tous ces moments ont réellement rendu ma thèse plus agréable. Enfin, je n'oublie pas tous ceux des autres étages avec lesquels j'ai pu travailler : Karine, Emma et Muriel, et puis Clothilde à l'animalerie par exemple !

Merci aussi à mes amis du dehors, en particulier ma chère Alice merci pour tout le réconfort que tu m'apportes, pour me comprendre si bien, pour me faire mourir de rire quand je divague (un petit coup de Donatella ?), merci d'être là dans les bons moments et de t'occuper de moi dans les moments durs. Merci à ma famille pour votre amour et vos encouragements. Plus précisément, mon papa, pour ton écoute sans jugement et ton soutien, ma sœur pour tes conseils, mon beau-frère pour ton écoute, Matthieu, mon neveu préféré et Mélanie et Loanne, mes deux nièces préférées.

Résumé

Au cours du développement d'un cancer, la tumeur se forme dans un environnement adapté à sa croissance appelé microenvironnement tumoral. Celui-ci est constitué d'un réseau complexe qui orchestre la progression tumorale et dans lequel sont présents différents types cellulaires, des facteurs solubles ainsi que des composants de la matrice extracellulaire. Parmi les cellules du microenvironnement tumoral, on trouve les cellules du système immunitaire. Certaines ont la capacité de reconnaître et d'éliminer directement les cellules cancéreuses, tandis que d'autres promeuvent la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Les lymphocytes T γδ ont longtemps été considérés uniquement comme des acteurs anti-tumoraux, agissant grâce à leur fonction cytotoxique et à leur sécrétion précoce d'interféron (IFN)-γ. Dans de plus en plus de travaux récents, l'idée que les lymphocytes T γδ soient, également, des acteurs pro-tumoraux est mise en évidence. Leurs fonctions pro-tumorales sont principalement attribuées à leur production d'interleukine (IL)-17, favorisant l'angiogenèse et le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs). Le mécanisme induisant la polarisation des T γδ vers la production d'IL-17 plutôt que d'IFN-γ restait à préciser. Nous avons identifié la synthétase de l'oxyde nitrique de type 2 (NOS2) comme candidat potentiel étant donné son action exercée sur la production d'IL-17 par les lymphocytes T αβ $CD4^+$ (Th17).

Nous montrons que les cellules T γδ expriment NOS2 dans les tumeurs primaires de mélanome chez les patients et également chez la souris, dans un modèle de développement spontané de mélanome. Nous avons identifié que l'expression de NOS2 endogène était un inducteur clé de la sécrétion d'IL-17 par les T γδ dans le mélanome, ce qui a pour conséquence de recruter les MDSCs dans la tumeur primaire et d'induire la dissémination métastatique. En parallèle, les T γδ exprimant NOS2 produisent moins d'IFN-γ et présentent, *in vitro*, des capacités de lyse des cellules tumorales réduites en comparaison avec les T γδ déficients pour NOS2. Nous émettons l'hypothèse que le microenvironnement tumoral puisse fournir les facteurs nécessaires à l'activation des T γδ (comme l'IL-1β, l'IL-6 et ou la reconnaissance d'un antigène par le TCR) pour permettre l'expression endogène de NOS2 par les cellules T γδ. En plus de favoriser la polarisation des T γδ en effecteurs pro-tumoraux, nous montrons que NOS2 favorise leur expansion par un mécanisme dépendant de l'IL-2. En effet, les T γδ déficients pour NOS2 montrent des capacités de prolifération et un métabolisme glycolytique réduits qui sont restaurés par l'ajout d'IL-2 exogène.

Liste des abréviations

ADCC : Activation induce cell death

ARG1 : Arginase-1

CD : Cluster of Differentiation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CTL : Lymphocyte T Cytotoxique

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DAMP : danger associated molecular pattern

DC : cellules dendritiques

DETC : dendritic epidermal gd T cell

EMT : transition épithélio mésenchymateuse

EPCR : endothelial protein C receptor

Fc : Fragment constant des immunoglobulines

FasL : Fas ligand

FoxP3 : Forkhead box P3

G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GMPc : guanosine monophosphate cyclique

HSP : heat shock protein

IDO : Indolamine 2, 3-Dioxygénase

IFN : interféron

IL : interleukine

IL4I1 : interleukine-4 induced gene 1

iTreg : lymphocyte T régulateur induit

KC : keratinocyte-derived cytokine

KO : knock out

LB : Lymphocyte B

LPS : Lipopolysaccharide

MDSC : myeloid derived suppressor cell

MICA/MICB : MCH class I-related chain A/B

M-MDSC : MDSC monocytaire

MSC : cellule souche mésenchymateuse

NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

nTreg : lymphocyte T régulateur naturel

NK : Natural Killer

NKR : Natural Killer Receptor

NO : Nitric Oxide

NOS : Nitric Oxide Synthase

pAgs : phosphoantigènes

PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PD-1 : Programmed Death-1

PE : phycoérythrine

PMA : Phorbol Myristate Acetate

PMN : polymorphonuéclaire

PMN-MDSC : MDSC granulocytaire

PRRs : Pathogen Recognition Receptor

RNS : Reactive Nitrogen Species

Rae-1 : retinoic acid early-1

RORγt : RAR-related Orphan Receptor γt

ROS : Reactive Oxygen Species

shRNA : short hairpin RNA

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

Tγδ17 : lymphocyte T γδ producteur d'IL-17

TCR : T Cell Receptor

TGF-β : Transforming Growth Factor β

TIL : lymphocytes infiltrant les tumeurs

Th : T helper

TLR : Toll Like Receptor

TNF-α : Tumor Necrosis Factor α

TRAIL : TNF Related Apoptosis Inducing Ligand

TRAILR : TRAIL Receptor

Treg : lymphocyte T régulateur

ULBP : UL-16 binding protein

UV : UltraViolet

VEGF : vascular endothelial growth factor

WT : wild type

Table des matières

Résumé **2**

Liste des abréviations **8**

Introduction **14**

I. Le système immunitaire, un acteur du microenvironnement tumoral **15**

I.1. Le mélanome et la réponse immunitaire anti-tumorale 16

I.1.1) Quelques informations sur le mélanome 16

I.1.2) Rôles du système immunitaire dans le contrôle du développement du mélanome 16

I.1.3) De l'immunosurveillance à « l'immunoediting » 17

I.1.3.1) L'élimination et les effecteurs de l'immunité anti-tumorale 17

a) Les lymphocytes T αβ et γδ 18

b) Les lymphocytes « Natural Killer » (NK) 18

c) Les lymphocytes B 18

d) Les macrophages 19

I.3.1.2) L'équilibre 19

I.3.1.3) Troisième phase : l'échappement 20

I.2. Les mécanismes d'immunosuppression 22

I.2.1) Médiés par les cellules tumorales 22

I.2.2) Médiés par les cellules immunitaires 22

I.2.2.1) Les lymphocytes T régulateurs (Treg) 23

a) Caractéristiques des Treg 23

b) Les Treg dans le cancer 23

c) Mécanismes immunosuppresseurs 23

I.2.2.2) Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) 24

a) Caractéristiques des MDSCs 24

b) Mécanismes immunosuppresseurs (Figure 3) 24

c) Les MDSCs acteurs de la dissémination tumorale 26

I.2.3) Métabolisme des acides aminés 27

I.2.3.1) L'arginase de type 1 (ARG1) et les synthétases de l'oxyde nitrique (NOS) 27

I.2.3.2) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 27

I.2.3.3) L'interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1) 28

II. Les lymphocytes T γδ dans le cancer **29**

II.1. Quelques caractéristiques des lymphocytes T γδ 31

II.1.1) Distribution anatomique et principaux sous-types 31

II.1.2) Activation et ligands des lymphocytes T γδ 32

II.1.2.1) Activation des lymphocytes T γδ 32

II.1.2.2) Quelques ligands activateurs des lymphocytes T γδ 34

a) Antigènes non-peptidiques 34

b) Molécules du CMH 34

c) Protéines solubles 35

II.1.3) Principales fonctions effectrices des lymphocytes T γδ 35

II.2. Les lymphocytes T γδ, acteurs de la surveillance anti-tumorale 37

II.2.1) Evidences issues des modèles murins de cancer 37

II.2.1.1) Cancers cutanés (carcinomes et mélanomes) 37

II.2.1.2) Autres tumeurs 38

II.2.2) Chez l'homme 38

II.3. Rôles des lymphocytes T γδ dans la progression tumorale 39

II.3.1) Les lymphocytes T γδ, des effecteurs pro-tumoraux ? 39
II.3.2) Mécanismes médiés par les lymphocytes T γδ favorisant la progression tumorale 40
II.3.2.1) Inhibition des réponses anti-tumorales 40
II.3.2.2) Rôles de l'IL-17 41
a) Impact sur l'angiogenèse....41
b) Recrutement de cellules myéloïdes pro-tumorales 42
II.3.3) Induction de la production d'IL-17 par les lymphocytes T γδ 43
II.3.3.1) Microbiote 43
II.3.3.2) Microenvironnement cytokinique 44
II.3.3.3) L'engagement du TCR....45
III. NOS2, système immunitaire et cancer 46
III.1. NOS2, une synthétase inductible de l'oxyde nitrique (NO) 46
III.1.1) Source de NO dans l'organisme 46
III.1.1.1) Les NOS 46
III.1.1.2) Autres sources de NO 47
III.1.2) Mécanismes d'action du NO 48
III.1.2.1) Actions directes 49
III.1.2.2) Actions indirectes....49
a) Action sur les protéines 49
b) Action sur les lipides et les acides nucléiques....50
III.1.3) Régulation de l'expression de NOS2 dans les cellules immunes 50
III.1.3.1) Cytokines et produits bactériens....50
III.1.3.2) Disponibilité du substrat....51
III.1.3.3) Régulation de l'activité de NOS2 52
III.2. Rôles de l'expression de NOS2 sur les cellules immunitaires 52
III.2.1) Fonctions de NOS2 dans les cellules myéloïdes 52
III.2.1.1) Lutte contre les pathogènes 52
III.2.1.2) Suppression des réponses immunitaires dans le contexte tumoral....53
III.2.1.3) NO dérivé de NOS2 et métabolisme 53
III.2.2) Effet du NO sur les lymphocytes T αβ 54
III.2.2.1) Effets du NO exogène 54
a) Inhibition de la prolifération....54
b) Effets sur l'expansion et la différenciation des lymphocytes T αβ 54
III.2.2.2) Effets du NO dérivé de NOS2 (NO endogène)....55
III.2.3) NOS2 et les lymphocytes B 57
III.3. Effets ambivalents du NO dérivé de NOS2 dans le cancer, focus sur le mélanome 57
III.3.1) Effets du NO sur la transformation cellulaire néoplasique 57
III.3.2) Effets du NO sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique 57
III.3.2.1) Sur les tumeurs....57
III.3.2.2) Sur l'angiogenèse 58
III.3.3) Effets du NO sur les réponses immunitaires....58
IV. Contexte et objectifs des travaux de thèse 60
Résultats....62
Discussion....105
I. L'expression de NOS2 induit la dissémination métastatique 106
I.1. Quelle(s) cellule(s) $NOS2^+$ favorise(nt) l'apparition des métastases ?....106
I.2. Comment sont recrutés les PMN-MDSCs infiltrant les tumeurs primaires les plus agressives ? 107

II. NOS2 induit l'expansion et la polarisation des T γδ en effecteurs pro-tumoraux 110
II.1. Comment l'expression de NOS2 est-elle induite dans les lymphocytes T γδ ? 110
II.2. Par quel(s) mécanisme(s) NOS2 polarise les lymphocytes T γδ en effecteurs pro-tumoraux sécréteurs d'IL-17 ? 111
II.3. Comment NOS2 promeut-elle l'expansion des lymphocytes T γδ ? 113
III. Quelle est la contribution des lymphocytes T γδ NOS2$^+$ dans le développement du mélanome ? 115
III.1. Quelques questions laissées en suspens 115
III.2. Les souris Ret déficientes en lymphocytes T γδ sont-elles un bon modèle d'étude pour appréhender la contribution des T γδ à la progression tumorale ? 115
III.3. Comment évaluer la contribution relative des lymphocytes T γδ exprimant NOS2 à la progression du mélanome ? 117
IV. Le vitiligo et l'inactivation de Nos2 ralentissent-ils la progression tumorale par les mêmes mécanismes ? 119
V. Conclusions 121

Références bibliographiques 122

Annexes 133
Annexe n° 1 **..... 134**
Annexe n° 2 **..... 140**

Liste des illustrations

Figure 1 : Les cellules du microenvironnement tumoral. **15**
Figure 2 : Les trois phases de l' « immunoediting » **21**
Figure 3 : Mécanismes d'inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T par les MDSCs. **26**
Figure 4 : Comparaison des rôles pro- et anti-tumoraux médiés par les lymphocytes T γδ murins. **30**
Figure 5 : Developpement des lymphocytes T γδ murins.. ..... **32**
Figure 6 : Détection du stress cellulaire et des cellules infectées par les lymphocytes T γδ.. ..... **33**
Figure 7 : Six fonctions principales des lymphocytes T γδ. **37**
Figure 8 : Les lymphocytes T γδ exercent des fonctions pro-tumorales par différents mécanismes. **43**
Figure 9 : Les différentes sources de NO dans l'organisme. **48**
Figure 10 : Effets du NO endogène dérivé de NOS2 sur la différenciation des lymphocytes T αβ $CD4^+$ en Th17 chez l'homme et chez la souris. **56**

Liste des tables

Table 1 : Corrélations entre la présence de lymphocytes T γδ infiltrant les tumeurs et différents paramètres cliniques. **39**
Table 2 : Stimuli régulant la production de NOS2 dans les cellules immunitaires primaires. **51**

Introduction

I. Le système immunitaire, un acteur du microenvironnement tumoral

Une tumeur n'est pas constituée d'une population cellulaire clonale unique mais d'un microenvironnement complexe composé de différents sous-types de cellules immunitaires, de fibroblastes, cellules vasculaires endothéliales, de cellules tumorales présentant des propriétés de cellules souches, de quantités variables de matrice extracellulaire (Figure 1). Les interactions entre les cellules tumorales et les cellules saines non transformées du microenvironnement influencent la croissance tumorale et les réponses immunes de l'hôte ([1]). L'accumulation de mutations génétiques et les aberrations épigénétiques ne sont pas suffisantes pour entrainer la progression tumorale. Pour former une métastase, les tumeurs doivent envahir les tissus environnants, entrer dans la circulation et proliférer dans un organe permissif. Le microenvironnement tumoral joue un rôle actif dans ces processus. Ainsi, Hanahan et Weinberg ont récemment revisité la théorie des six caractéristiques du développement d'une tumeur. Celle-ci ne considérait, initialement, que les modifications génomiques de la cellule tumorale. Depuis seulement quatre ans, les interactions entre la tumeur et son microenvironnement sont prises en compte dans cette théorie et l'échappement des cellules à la réponse immunitaire est désormais considéré comme une étape indispensable à la progression tumorale ([2]).

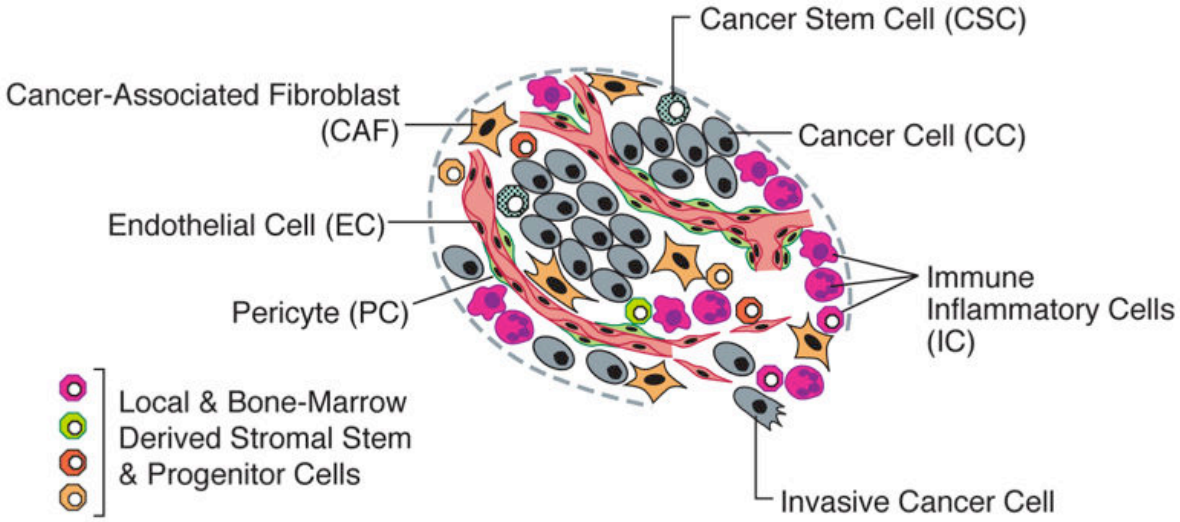


Figure 1 : Les cellules du microenvironnement tumoral. Les tumeurs solides sont constituées de plusieurs sous-types cellulaires. Le parenchyme et le stroma de la tumeur contiennent des cellules capables de favoriser la croissance tumorale et la progression métastatique. En particulier, les cellules immunitaires présentes dans la tumeur peuvent à la fois favoriser la progression tumorale et lyser les cellules tumorales. *D'après Hanahan et Weinberg, 2011* ([2]).

Le mélanome est un cancer immunogène, il exprime des antigènes reconnus par les cellules immunitaires. Pourtant, c'est également un cancer hautement métastatique ce qui traduit l'échec de la réponse anti-tumorale. La tumeur façonne le système immunitaire pour le rendre immunosuppresseur et réciproquement, le système immunitaire exerce une pression de sélection sur la tumeur permettant l'émergence des clones tumoraux résistants. Par ailleurs, les cellules immunes, en particulier, les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) promeuvent directement ou indirectement la formation de métastases.

I.1. Le mélanome et la réponse immunitaire anti-tumorale

I.1.1) Quelques informations sur le mélanome

Le mélanome résulte de la transformation maligne des mélanocytes ou de leurs précurseurs, les mélanoblastes, cellules dérivées de la crête neurale. La survenue du mélanome cutané, le type le plus commun de mélanome, est favorisée notamment par l'exposition aux UV. Des mélanomes peuvent se former partout où sont localisés les mélanocytes (yeux, viscères, muqueuses). Les mélanomes uvéaux sont les tumeurs intraoculaires primitives les plus fréquentes de l'adulte. Ils se forment aux dépens des mélanocytes localisés dans le tractus uvéal de l'œil (choroïde, iris, corps ciliaire). Comme les mélanomes cutanés, les mélanomes uvéaux sont des cancers hautement métastatiques. Ils sont souvent diagnostiqués tardivement et au stade métastatique, l'issue est souvent fatale. La survie médiane sans traitement est de 5 mois pour les mélanomes uvéaux qui représentent 13% des décès dus au mélanome. Les mélanomes cutanés ayant disséminé à distance et dans les organes viscéraux sont presque toujours incurables. Néanmoins, les nouveaux traitements ciblant le système immunitaire, comme les anticorps monoclonaux anti-CTLA4 ou anti-PD1 donnent des résultats prometteurs ([3], [4]).

I.1.2) Rôles du système immunitaire dans le contrôle du développement du mélanome

Les cellules des mélanomes cutanés et uvéaux expriment des antigènes tumoraux, tels que les antigènes de différenciation mélanocytaire (GP100, TRP2, Melan A, …) ou des antigènes exprimés exclusivement par le tissu tumoral (Mage, Gage, NY-ESO1, …). Les lymphocytes T des patients atteints de ce cancer sont capables de reconnaître ces antigènes permettant le développement d'une réponse anti-tumorale ([5]). Chez 1 à 2% des patients atteints de mélanome primaire, avec ou sans métastases, il est possible d'observer

des régressions spontanées, complètes ou plus souvent partielles mettant en évidence le rôle essentiel du système immunitaire dans le contrôle de cancer ([6]). De plus, une réaction auto-immune appelée vitiligo, engendrant la dépigmentation de certaines zones cutanées causée par la destruction des mélanocytes, peut survenir à la suite d'un traitement par immunothérapie. Gogas *et al.*, ont montré que le développement d'un vitiligo chez des patients atteints de mélanome traités à l'interféron alpha (IFN-α) était associé à un meilleur pronostic vital ([7]). Ainsi, le vitiligo apparait consécutivement à l'induction d'une réponse anti-tumorale dirigée contre les antigènes de différenciation mélanocytaire. L'immunosuppression est un facteur de risque pour le développement du mélanome. En effet, les patients ayant subi une transplantation du rein ont une plus grande probabilité de développer un mélanome à cause de leur traitement immunosuppressif ([8]). Ces données soulignent l'importance de la réponse immunitaire dans le contrôle du mélanome.

I.1.3) De l'immunosurveillance à « l'immunoediting »

La théorie de l'immunosurveillance, initiée par Elhrich en 1909 et revisitée par Burnett et Thomas dans les années 50, établissait un rôle essentiel du système immunitaire dans le contrôle du développement tumoral. En effet, l'émergence de cellules transformées ou tumorales serait un phénomène fréquent chez l'homme. La détection de celles-ci par le système immunitaire favoriserait l'induction d'une réponse anti-tumorale efficace. Cependant, la plupart des cancers se développent chez des patients immunocompétents traduisant l'échec de cette réponse. Ainsi, il apparaît que la théorie de l'immunosurveillance ne prend en compte qu'une seule dimension de la relation complexe entre les cellules tumorales et le système immunitaire. Au début des années 2000, Schreiber a proposé une théorie plus globale permettant d'expliquer la dualité fonctionnelle du système immunitaire dans le cancer. Cette théorie, appelée « immunoediting », décrit un processus dynamique et séquentiel composé de 3 phases : Elimination, Equilibre et Echappement (Figure 2) ([9]). Ce concept explique comment le système immunitaire peut à la fois contrôler la croissance tumorale, en détruisant les cellules cancéreuses, et promouvoir la progression tumorale en sélectionnant les clones résistants les moins immunogènes et les plus prompts à survivre dans un hôte immunocompétent.

I.1.3.1) L'élimination et les effecteurs de l'immunité anti-tumorale

La phase d'élimination reprend le concept orignal de l'immunosurveillance. Au cours de cette étape, les effecteurs de l'immunité innée et adaptative coopèrent pour détruire des

cellules tumorales, bien avant que la tumeur ne soit détectable cliniquement. Pendant l'oncogenèse, la croissance tumorale anarchique entraine un remodelage du stroma environnant perturbant l'équilibre naturel du tissu. Il en résulte la production de molécules de danger capables d'activer les cellules dendritiques (DCs) via les récepteurs de type Toll (TLR) et de signaux inflammatoires permettant le recrutement des cellules immunitaires innées ([10]). Les DCs activées orchestrent la mise en place de la réponse immunitaire. Les principaux effecteurs de l'immunité anti-tumorale sont décrits ci-dessous :

a) Les lymphocytes T αβ et γδ

Après une forte activation par l'antigène, les lymphocytes T αβ $CD4^+$ de type Th1 peuvent avoir un rôle anti-tumoral direct via la sécrétion d'FN-γ, de TNF-α ou la libération de granules cytotoxiques. Cependant, leurs actions s'exercent principalement via leur capacité à activer et à différencier des lymphocytes T αβ $CD8^+$ en cellules cytotoxiques (CTLs). La reconnaissance par le récepteur à l'antigène des lymphocytes T (TCR) d'un complexe composé du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) et d'un peptide antigénique peut conduire à la lyse de la cellule tumorale via l'exocytose de granules contenant des molécules cytotoxiques telles que granzyme et perforine. L'apoptose de la cellule tumorale peut également être induite par l'interaction de la molécule FasL présente sur les CTLs et le récepteur Fas exprimé par les cellules tumorales ([11]).

Les rôles des lymphocytes T γδ dans le cancer sont détaillés dans la seconde partie de cette introduction.

b) Les lymphocytes « Natural Killer » (NK)

Les cellules NK reconnaissent leurs cibles indépendamment des antigènes présentés par les molécules de CMHI. Leur activation est contrôlée par un équilibre entre les signaux activateurs (molécules de stress : MICA et MICB, …) et inhibiteurs (CMHI, …). L'activation de ces cellules est déclenchée lorsque l'équilibre penche en faveur des signaux activateurs et entraine la cytotoxicité des cellules cibles. La lyse des cellules tumorales par les NK fait intervenir des mécanismes identiques à ceux utilisés par les CTLs ([12]), [13]).

c) Les lymphocytes B

Les lymphocytes B se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps et en cellules B mémoires après avoir rencontré leur antigène. Les anticorps participent à l'immunité anti-tumorale par des mécanismes impliquant soit leur région variable liant l'antigène, soit leur région constante (Fc). Par exemple, la liaison d'un anticorps à un antigène tumoral peut directement déclencher un signal d'apoptose dans la cellule tumorale. Grâce aux régions Fc se liant aux récepteurs Fc (FcR) activateurs des macrophages ou des NK, la liaison d'un

anticorps sur la cellule tumorale peut entrainer la lyse de la cellule par un mécanisme d'ADCC (activation induce cell death). La région Fc permet également l'activation du complément ([14]).

d) Les macrophages

Les macrophages activés de manière classique (type M1), par l'IFN-γ seul ou en combinaison avec du LPS, peuvent exercer une activité anti-tumorale ([15]). Les M1 sont capables de présenter les antigènes, de sécréter de l'IL-12 et de l'IL-23 et d'activer les réponses de type Th1. Ils lysent les cellules tumorales directement grâce à leur production d'espèces dérivées de l'oxygène (ROS) et d'oxyde nitrique (NO), ou, indirectement, par l'expression des FcR permettant l'ADCC.

Le NO est produit à partir de la dégradation de l'acide aminé L-arginine grâce aux synthétases de l'oxyde nitrique (NOS). De faibles doses d'irradiation permettent d'activer les macrophages intra-tumoraux vers un profil M1 exerçant une activité anti-tumorale dépendante du NO ([16]).

Les rôles du NO dérivé de NOS2 dans le cancer et le système immunitaire sont abordés dans la troisième partie de l'introduction.

Si, à l'issue de la phase d'élimination, la totalité des cellules tumorales n'est pas éliminée, la phase d'équilibre est atteinte.

I.3.1.2) L'équilibre

La phase d'équilibre, probablement la plus longue des 3 phases, correspond à une période de chronicité de la maladie. Le système immunitaire adaptatif maintient les cellules tumorales résiduelles dans un état de dormance. Ce terme est utilisé pour décrire des cellules tumorales latentes qui peuvent perdurer chez le patient pendant des décennies avant l'apparition d'une nouvelle tumeur primaire ou de métastases ([17]). Cette phase de dormance a été mise en évidence chez la souris transgénique pour le proto-oncogène Ret développant spontanément un mélanome uvéal métastatique. Dans ce modèle, les cellules de la tumeur primaire disséminent dès l'âge de 3 semaines, puis forment des métastases plusieurs semaines plus tard. Eyles *et al.*, démontrent également l'implication des lymphocytes T αβ $CD8^+$ dans le maintien de la dormance des cellules tumorales disséminées ([18]).

I.3.1.3) Troisième phase : l'échappement

Au cours de cette phase, la tumeur atteint une taille détectable cliniquement. L'instabilité génomique, propriété intrinsèque des cellules tumorales, et la pression de sélection exercée par le système immunitaire sur celles-ci au cours de la phase d'équilibre favorisent l'émergence de clones tumoraux moins immunogènes susceptibles de survivre dans un hôte immunocompétent. Par exemple, elles expriment plus faiblement les molécules de CMHI, ce qui limite leur reconnaissance par les CTLs. Elles perdent aussi l'expression de certains antigènes tumoraux. Ainsi, 100% des mélanomes cutanés primitifs expriment MART-1, contre seulement 75% des mélanomes métastatiques ([19]).

Les clones tumoraux émergeants peuvent devenir résistants aux mécanismes de lyse et/ou acquérir des fonctions immunosuppressives limitant la fonctionnalité des cellules de l'immunité. Ils peuvent également favoriser le recrutement, l'expansion et la différenciation de cellules immunitaires immunosuppressives comme les lymphocytes T régulateurs (Treg) ou les cellules myéloïdes suppressives.

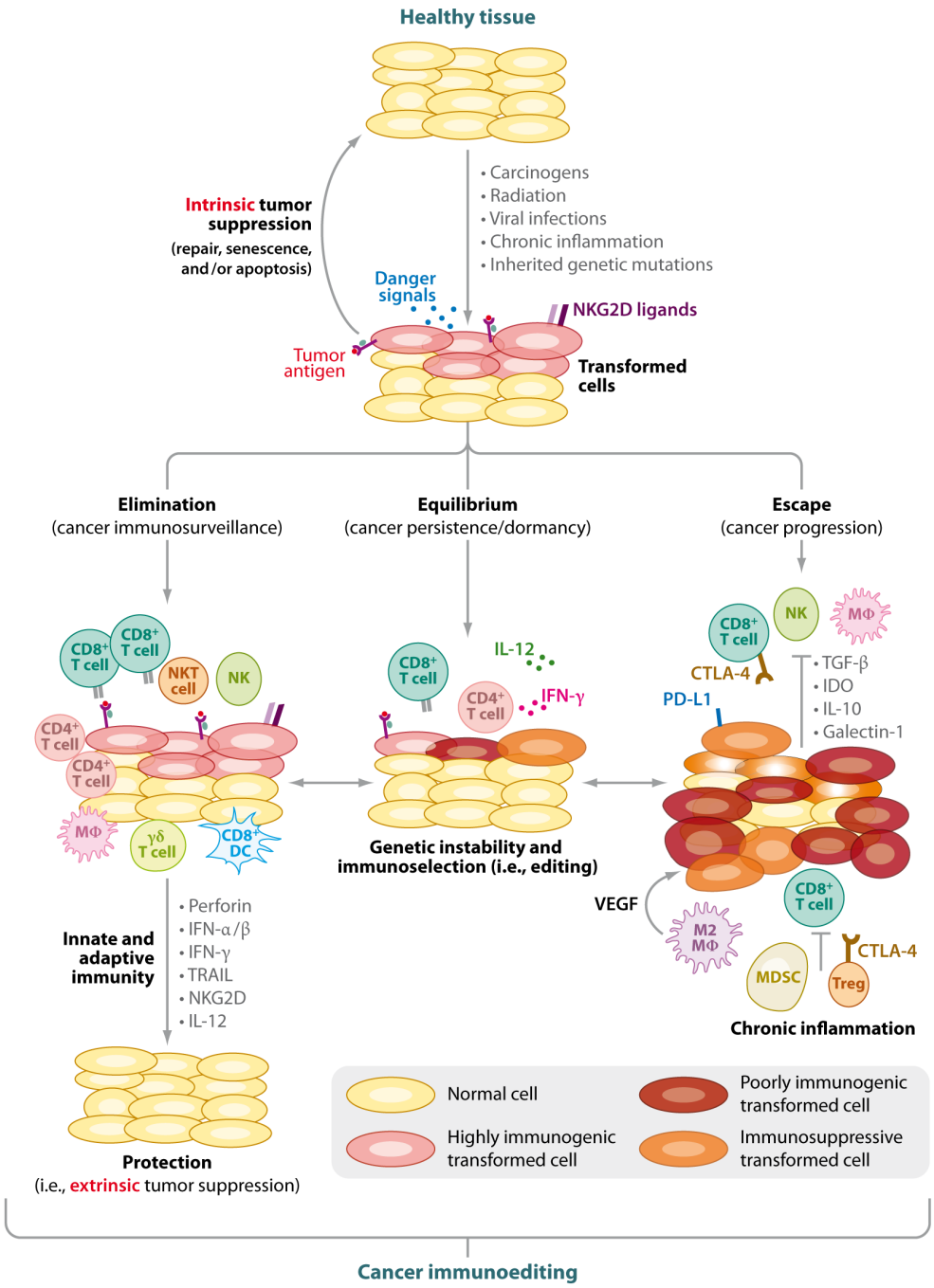


Figure 2 : Les trois phases de l' « immunoediting ». L' « immunoediting » du cancer est un processus séquentiel composé de trois phases. Après la transformation d'une cellule saine par l'activation d'oncogènes et l'échec des mécanismes suppresseurs de tumeurs intrinsèques, le système immunitaire devient un suppresseur de tumeurs en éliminant les cellules nouvellement transformées. Pendant la phase d'élimination, les cellules immunitaires innées et adaptatives reconnaissent et éliminent les cellules tumorales. Il en résulte le retour à un tissu physiologique normal. Cependant, si l'immunité anti-tumorale est incapable d'éliminer l'ensemble des cellules transformées, des variants tumoraux survivent. Dans la phase d'équilibre ou phase de dormance, les cellules immunitaires contrôlent la croissance tumorale mais favorisent l'acquisition de nouvelles mutations dans les clones tumoraux. Cela leur permet d'échapper à la reconnaissance du système immunitaire, de lyser les cellules immunitaires et d'induire un microenvironnement tumoral suppresseur favorable à la croissance tumorale. Dans la phase d'échappement, les tumeurs progressent et deviennent détectables cliniquement. *D'après Vesely et al., 2011* ([20]).

I.2. Les mécanismes d'immunosuppression

I.2.1) Médiés par les cellules tumorales

Les mécanismes d'immunosuppression médiés par les cellules tumorales ont récemment été revus ([21]). Je ne citerai ici que quelques exemples.

Les cellules tumorales peuvent secréter des molécules solubles ou exprimer des ligands de récepteurs inhibiteurs, physiologiquement exprimés par les cellules hématopoïétiques, créant ainsi un microenvironnement immunosuppresseur. Leur sécrétion de TGF-β conduit notamment à l'inactivation des DCs, des lymphocytes T et des cellules NK. Des études ont montré que les lymphocytes T αβ $CD8^+$ infiltrant les tumeurs peuvent présenter des caractéristiques de cellules anergiques. Ainsi, chez les patients atteints de mélanome métastatique, certains lymphocytes T αβ $CD8^+$ spécifiques de MART-1 ou de la tyrosinase sont incapables de lyser des cellules cibles ou de sécréter de l'IFN-γ ([22], [23]). L'expression, par les cellules de mélanome notamment, des molécules CD80/86, PDL-1 et HVEM pourrait expliquer l'anergie de ces LT qui expriment les récepteurs inhibiteurs CTLA-4, PD-1, et BTLA ([24], [25]).

Les tumeurs sécrètent des molécules appelées galectines capables de reconnaître des fragments de sucre. Les galectines, en particulier la galectine 1 et 3 se fixent sur les glycoprotéines de surface des TILs. Les TILs deviennent alors incapables de répondre aux signaux extérieurs pour sécréter des cytokines par exemple. L'expression des galectines dans le microenvironnement tumoral conduit à l'échappement tumoral ([26]).

I.2.2) Médiés par les cellules immunitaires

Les cellules participant à l'immunosurveillance peuvent être polarisées en cellules effectrices immunosuppressives et ainsi favoriser la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Ainsi, les macrophages peuvent être polarisés de manière alternative (M2) par l'IL-4 et l'IL-13 ou l'IL-10. Les M2 ont de faibles capacités de présentation de l'antigène, sécrètent de l'IL-10 et contribuent à la progression tumorale ([15]). De même, il existe une population de lymphocytes B régulateurs capable de sécréter de l'IL-10 une cytokine immunosuppressive ([27]). Dans cette partie, seuls les effets immunosuppresseurs des lymphocytes T régulateurs (Treg) et des cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) sont décrits.

I.2.2.1) Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

a) Caractéristiques des Treg

En situation physiologique, les Treg $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ participent au maintien de la tolérance périphérique et jouent un rôle essentiel dans la prévention de l'apparition de maladies auto-immunes ([28]). Il existe d'autres populations de Treg « non classiques » $FoxP3^-$ comme les cellules Tr1 ou NO-Treg, par exemple ([29], [30]). On distingue deux types de Treg : les Treg dits « naturels » (nTreg) qui se différencient dans le thymus ([31]) et les Tregs dits « induits » (iTreg) qui sont polarisés en périphérie à partir de lymphocytes T αβ $CD4^+$. Un contexte d'inflammation chronique et la présence de TGF-β favorise la différenciation des lymphocytes T en iTreg *in vivo* ([32]).

b) Les Treg dans le cancer

Les Treg contribuent à l'homéostasie de la réponse immunitaire en inhibant les fonctions effectrices des lymphocytes T conventionnels. Cependant, lors du développement de pathologies cancéreuses, les Treg limitent l'immunosurveillance ([33]). Dans le mélanome humain, les Treg s'accumulent dans les ganglions métastatiques ([34]), la tumeur primaire et les métastases ([35]). Dans la plupart des cas, les Treg participent à la progression tumorale en inhibant les réponses anti-tumorales. L'utilisation d'un anticorps anti-CD25, molécule fortement exprimée par les Treg, bloque les fonctions effectrices des Treg et augmente la survie et réduit la formation des métastases ([36], [37]). L'origine des Treg dans la tumeur est controversée, il est possible que le microenvironnement tumoral induise la génération de iTreg et favorise le recrutement de nTreg de manière simultanée ([38]).

c) Mécanismes immunosuppresseurs

Les Treg inhibent notamment les fonctions effectrices des lymphocytes T :

- (i) en produisant des **cytokines immunosuppressives**. Ainsi, l'IL-10 et le TGF-β les Treg limitent les réponses anti-tumorales dans les carcinomes de la tête et du cou chez l'homme ([39]), dans les lymphomes ([40]) et dans les cancers pulmonaires ([41]).

- (ii) **en séquestrant l'IL-2**. Les Treg expriment un haut niveau de CD25 leur permettant de consommer l'IL-2 local et ainsi d'empêcher la prolifération des lymphocytes T voisins ([42]).

- (iii) en modulant la **maturation et/ou la fonction des DCs**. Les DCs sont requises pour présenter l'antigène aux lymphocytes T et induire les réponses effectrices. Les Treg expriment constitutivement la molécule inhibitrice CTLA-4 ([43]). En se fixant au CD80/CD86, le CTLA-4 induit la production de l'enzyme indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) par les DCs les rendant tolérogènes ([44]). IDO catabolise la dégradation du tryptophane. La pénurie en tryptophane peut induire l'arrêt de la prolifération des lymphocytes T ainsi que leur apoptose ([45]).

I.2.2.2) Les cellules myéloïdes suppressives (MDSCs)

a) Caractéristiques des MDSCs

Une des caractéristiques immunologiques des patients atteints de cancer est la différenciation anormale du compartiment myéloïde. Chez des individus sains, des progéniteurs myéloïdes sont continuellement générés dans la moelle osseuse et se différencient en macrophages, granulocytes ou en cellules dendritiques. En revanche, la myélopoïèse est altérée chez les patients atteints de cancer. La différenciation des progéniteurs myéloïdes est détournée par la tumeur pour favoriser l'accumulation de cellules myéloïdes immatures aux capacités suppressives (MDSCs) ([46]).

Les MDSCs sont une population hétérogène de cellules myéloïdes immatures, divisées en deux populations sur la base de leurs phénotypes. Les MDSC monocytaires expriment les marqueurs $CD11b^{+}Ly6g^{-}Ly6C^{high}$ chez la souris et $CD11b^{+}CD14^{+}$ chez l'homme (M-MDSCs). Les MDSCs de type granulocytaires ou PMN (polymorphonucléaires) –MDSCs expriment $CD11b^{+}Ly6g^{+}Ly6c^{+}$ chez la souris et $CD11b^{+}CD14^{-}CD15^{+}$ chez l'homme ([47]). L'analyse de ces deux populations dans dix modèles tumoraux a révélé une expansion systématique des PMN-MDSCs ([48]). Les M-MDSCs s'acculent également chez les patients atteints de mélanome et leur nombre corrèle avec l'échec du traitement avec l'ipilimumab, un anticorps anti-CTLA-4 ([49]).

Les cellules tumorales favorisent l'expansion des MDSCs par des mécanismes induisant la sécrétion de facteurs solubles, citons par exemple le G-CSF, le GM-CSF, l'IL-1β, l'IL-6, le VEGF (vascular endothelial growth factor) ou le TGF-β ([50]).

b) Mécanismes immunosuppresseurs (Figure 3)

Les MDSCs inhibent principalement les lymphocytes T en modulant le métabolisme d'acides aminés et la production de réactifs oxygénés. En particulier, l'activité immunosuppressive des MDSCs a été associée à l'expression d'enzymes nécessaires au catabolisme de la L-arginine : l'arginase I (ARG1) et la synthétase inductible de l'oxyde

nitrique (NOS2). Les MDSCs produisent des grandes quantités intracellulaires d'ARG1 nécessitant un import massif d'arginine. Il en résulte une déplétion en L-arginine au sein du microenvironnement tumoral. Les lymphocytes, privés de cet acide aminé essentiel, présentent une déficience de la chaine ζ du CD3 et restent bloqués en phase G0/G1 du cycle cellulaire ([51]). De plus, les PMN-MDSCs suppriment les réponses T en sécrétant massivement des espèces réactives de l'oxygène (incluant les peroxynitrites et le peroxyde d'hydrogène) induisant la nitration du TCR, qui devient alors incapable de reconnaitre les complexes CMH-peptide.

Les MDSCs induiraient l'activation et l'expansion des Treg mais aussi favoriseraient leur différenciation à partir de lymphocytes T αβ $CD4^+$. Les mécanismes impliqueraient (i) un contact direct entre les MDSCs et les Treg via les molécules CD40-CD40L ([52]), (ii) la production par les MDSCs de TGF-β, IFN-γ, ou d'IL-10 ([53]) ainsi que (iii) l'expression de l'ARG 1 par les MDSCs. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ARG-1 dans un lymphome B inhibe la prolifération des Treg induite par les MDSCs ([54]).

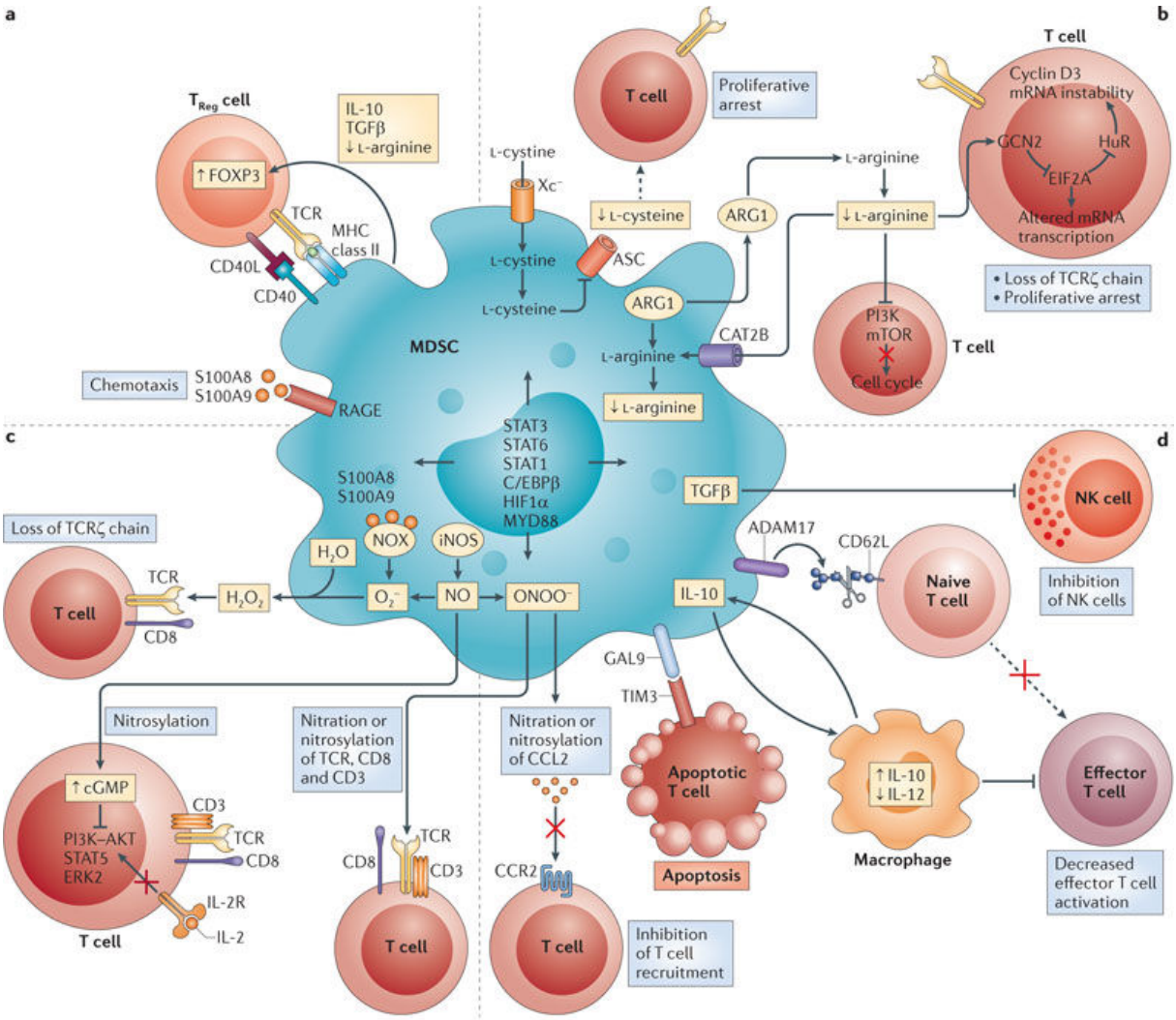


Figure 3 : Mécanismes d'inhibition de l'activation et de la prolifération des lymphocytes T par les MDSCs. Les MDSCs utilisent quatre mécanismes principaux pour supprimer l'action des lymphocytes T. a) Elles suppriment les réponses T en induisant l'expansion des Treg. b) les MDSCs peuvent priver les lymphocytes T des acides aminés essentiels à leur fonctionnement tels que la L-arginine ou la cystéine. c) la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des espèces réactives de l'azote (RNS) notamment les peroxynitrites et le peroxyde d'hydrogène entrainent par exemple la nitration du TCR qui devient alors non fonctionnel. d) Enfin les MDSCs peuvent également interférer avec le trafic des lymphocytes T ou leur viabilité. *D'après Gabrilovich et al., 2012* ([46]).

c) Les MDSCs acteurs de la dissémination tumorale

En plus de limiter les réponses immunitaires anti-tumorales, les MDSCs sont directement impliquées dans la dissémination métastatique. Elles favorisent l'angiogenèse ([50]), l'activité des métalloprotéinases, permettant la dégradation de la matrice extracellulaire ([55]) et le processus de transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Pour disséminer, envahir les tissus et former des métastases, certaines cellules tumorales effectuent une EMT. Les cellules perdent leurs marqueurs épithéliaux et présentent des caractéristiques de cellules mésenchymateuses. Ainsi Toh *et al.* démontrèrent que les PMN-MDSCs recrutés dans les

tumeurs primaires de mélanome (modèle Ret) induisent l'EMT des cellules tumorales. Ainsi, dans le modèle Ret, la déplétion in vivo des PMN-MDSCs entrainent une diminution de la dissémination métastatique dans les souris Ret ([56]).

Par ailleurs, les MDSCs pourraient envahir les sites pré-métastatiques avant les cellules tumorales afin de préparer un environnement immunosuppresseur propice à la croissance tumorale ([50]).

I.2.3) Métabolisme des acides aminés

Le métabolisme des acides aminés essentiels ou semi-essentiels joue un rôle important dans les mécanismes d'immunosuppression. Ces enzymes sont exprimées à la fois par les cellules tumorales et par les cellules immunitaires, elles participent à la modulation de la réponse immunitaire anti-tumorale et peuvent favoriser l'échappement.

I.2.3.1) L'arginase de type 1 (ARG1) et les synthétases de l'oxyde nitrique (NOS)

L'ARG1 est une enzyme qui hydrolyse la L-Arginine en urée et en L-ornithine. Sa surexpression dans les cellules myéloïdes est corrélée à une déplétion de la L-arginine dans le milieu extracellulaire, ce qui affecte les fonctions et la prolifération des lymphocytes T dans le microenvironnement tumoral ([57]. Son expression est induite par l'IL-4 et l'IL-13. Les synthétases de l'oxyde nitrique (NOS) catalysent la dégradation de la L-Arginine pour former de l'oxyde nitrique (NO). La seconde partie de l'introduction est consacrée aux effets de l'isoforme inductible des NOS : NOS2 dans le système immunitaire et le cancer.

Les MDSCs suppriment les réponses immunitaires en utilisant ces deux enzymes (voir introduction paragraphe I.2.2.2)b).

I.2.3.2) Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)

L'indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), principalement induite par l'IFN-γ, catabolise la dégradation du L-Tryptophane. IDO est constitutivement exprimée par les cellules tumorales, induites dans les Treg, et peut également être exprimée par les cellules endothéliales du microenvironnement tumoral. En déplétant le tryptophane et en produisant de la kynurenine (métabolite toxique), IDO inhibe l'activation des lymphocytes T directement ou par l'intermédiaire des Treg et favorise l'établissement d'une tolérance périphérique aux

antigènes tumoraux ([58]). Plusieurs types de cancers incluant les mélanomes sur-expriment IDO ([59]).

I.2.3.3) L'interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1)

L'interleukine-4 induced gene 1 (IL4I1) est une oxydase sécrétée localisée aux niveaux des tissus lymphoïdes. Elle catalyse l'oxydation de la L-phénylalanine en peroxyde d'hydrogène, ammonium et en phénylpyruvate. L'enzyme IL4I1 humaine est retrouvée fortement exprimée dans certains lymphomes B et de rares tumeurs solides (([60]). De façon intéressante, l'IL4I1 est également exprimée par les macrophages infiltrant les tumeurs lors d'un contexte inflammatoire ([60]). L'expression d'IL4I1 est un facteur de mauvais pronostique dans le cancer du sein ([61]).

Dans le contexte tumoral, les cellules du système immunitaire jouent des rôles ambivalents selon qu'elles soient polarisées en cellules effectrices pro- ou anti-tumorales. Les lymphocytes T γδ, après avoir longtemps été considérés uniquement comme des acteurs majeurs de la lutte contre la progression tumorale, n'échappent pas à cette observation (voir la seconde partie de l'introduction). De plus, les données récentes de la littérature ainsi que mes travaux montrent qu'une enzyme impliquée dans le métabolisme des acides aminés, NOS2, ne participe pas uniquement aux mécanismes effecteurs de l'immunosuppression mais, également, à la modulation des fonctions des lymphocytes (voir la troisième partie de l'introduction).

II. Les lymphocytes T γδ dans le cancer

Les lymphocytes T infiltrant les tumeurs (TILs) sont des acteurs clés de la surveillance immunitaire des cancers. Parmi les différents sous-types de lymphocytes impliqués dans la protection tumorale, on trouve les lymphocytes T γδ qui, comme les lymphocytes T αβ $CD8^+$, peuvent éliminer les cellules tumorales. Parce qu'ils sont impliqués dans la phase précoce de la réponse immune, qu'ils produisent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN-γ, qu'ils activent les cellules T αβ, ou qu'ils sont nécessaires à la maturation des cellules dendritiques (DCs), les lymphocytes T γδ jouent un rôle crucial dans la mise en place de la réponse immune anti-tumorale. Cependant, des études récentes, menées à la fois chez l'homme et dans des modèles murins de cancers, montrent que dans certaines conditions, les lymphocytes T γδ favorisent la croissance tumorale et la dissémination métastatique. La figure 4 présente les rôles pro- et anti-tumoraux médiés par les lymphocytes T γδ murins décrits à ce jour.

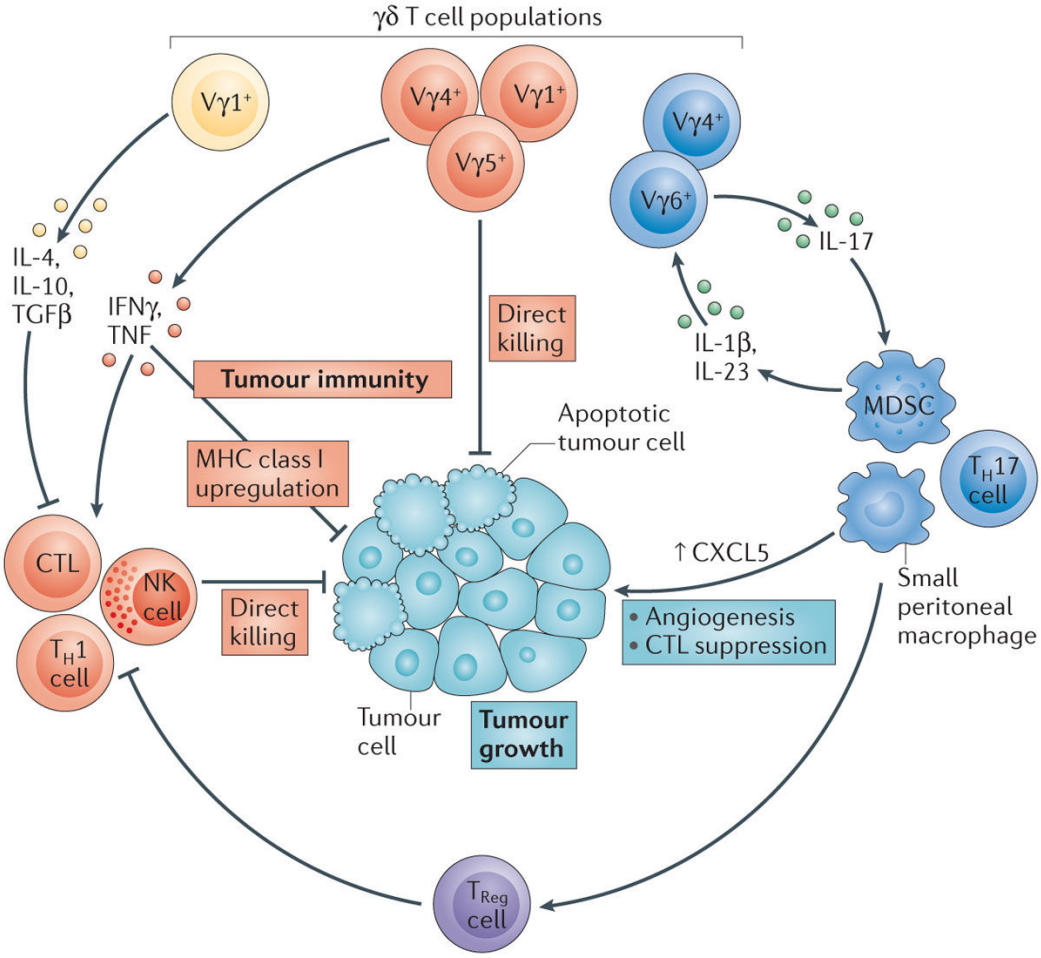


Figure 4 : Comparaison des rôles pro- et anti-tumoraux médiés par les lymphocytes T γδ murins. Les fonctions anti-tumorales des lymphocytes T γδ sont associées à la cytotoxicité et à la production d'IFN- γ, qui peut agir directement sur les cellules tumorales ou en induisant l'expression des molécules du CMH-I, augmentant ainsi les réponses T αβ $CD8^+$. Au contraire, la production d'IL-17 par certaines sous-populations de lymphocytes T γδ permet le recrutement de cellules myéloïdes immunosuppressives (comme les MDSCs ou les petits macrophages péritonéaux) qui promeuvent l'angiogenèse, la croissance tumorale et l'induction de la différenciation des Treg. Par ailleurs, les lymphocytes T γδ produisant de l'IL-4, de l'IL-10 ou du TGF-β supprimeraient les réponses anti-tumorales en inhibant la maturation des cellules dendritiques et/ou les fonctions effectrices des lymphocytes T γδ et T αβ $CD4^+$ et $CD8^+$. Les sous populations de lymphocytes T γδ exprimant une chaine variable Vγ particulière associées préférentiellement à une fonction sont également représentées. *D'après Silva-Santos et al., 2015* ([62]).

II.1. Quelques caractéristiques des lymphocytes T γδ

II.1.1) Distribution anatomique et principaux sous-types

Les lymphocytes T γδ sont une sous-population de lymphocytes T minoritaires dans le sang, les ganglions et la rate, mais sont nettement enrichis dans les tissus épithéliaux. Dans le sang périphérique humain adulte, les cellules T γδ représentent entre 0,5% et 16% des lymphocytes totaux (4% en moyenne). Les lymphocytes T γδ sont également retrouvés dans les tissus lymphoïdes (thymus, amygdale, ganglions et rate) et dans les systèmes lymphoïdes associés à l'intestin et à la peau ([63]). Dans les souris adultes, les lymphocytes T γδ représentent 1 à 4% des lymphocytes T totaux dans le thymus et dans les organes lymphoïdes secondaires. Les lymphocytes T γδ sont plus nombreux dans les sites muqueux: de 10 à 20% des T du tractus reproductif, de 20 à 40% des T intestinaux et de 50 à 70 % des T de la peau ([64]).

Selon leur localisation anatomique, on distingue deux populations de lymphocytes T γδ ; les cellules dites « circulantes » dans le sang et les organes lymphoïdes, et les cellules dites « résidentes » qui migrent dans les tissus, en particulier dans les épithélia. Le tropisme tissulaire est une caractéristique importante des lymphocytes T γδ car il leur confère la propriété de répondre rapidement à une agression extérieure ou à un stress cellulaire. Leur « homing » semble être régulé par leur ontogénie. Chez la souris, la génération des différentes sous-populations de lymphocytes T γδ se fait par vagues successives à partir de la période embryonnaire et pendant la période néonatale (Figure 5) ([65]). En fonction de l'expression de leur chaine γ, on distingue 5 sous-populations. Les $V\gamma5^+$ sont les premières cellules à se développer. Ces cellules peuplent la peau et sont également appelées DETC pour « dendritic epidermal T cells ». Les $V\gamma6^+$ vont ensuite coloniser l'utérus et les poumons. Les $V\gamma4^+$ et les $V\gamma1^+$ sont les cellules « circulantes » du sang, de la rate et des ganglions. A noter que les $V\gamma4^+$ sont également présents dans les muqueuses pulmonaires. Enfin, les $V\gamma7^+$ localisées dans l'intestin semblent suivre une différenciation extra-thymique. Chez l'homme, les lymphocytes T γδ sont identifiés par la chaine δ qu'ils expriment. L'ontogénie des lymphocytes T γδ se ferait également par vagues avec l'apparition en premier des $V\delta2^+$ prédominants dans la circulation sanguine ([66]). La majorité s'associe à la chaine Vγ9 pour former les cellules Vγ9δ2. Les $V\delta1^+$ peuplent principalement les tissus épithéliaux et constituent une proportion importante des lymphocytes intra-épithéliaux ([67]).

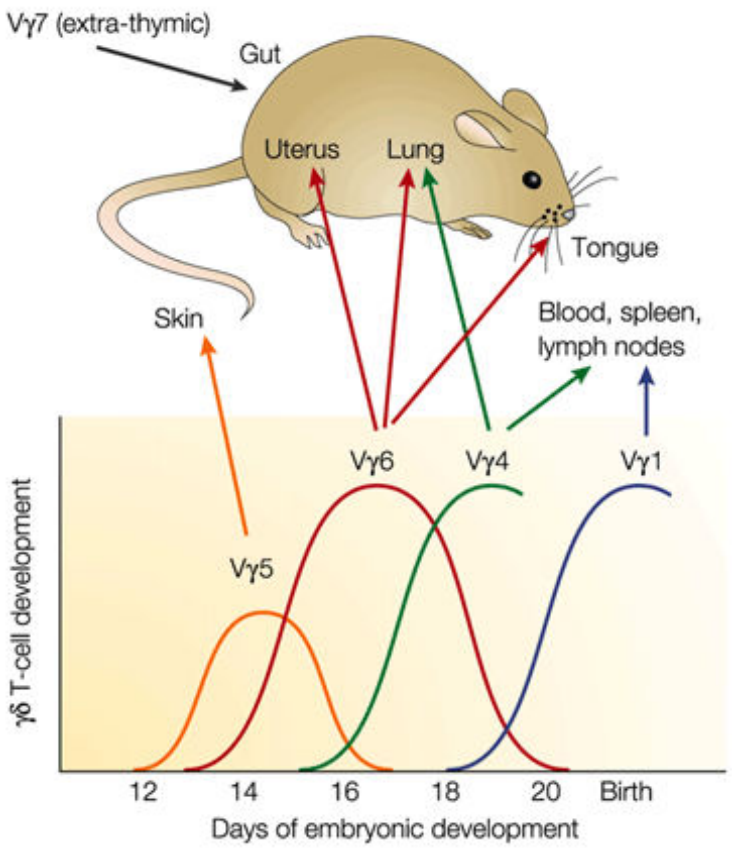


Figure 5 : Developpement des lymphocytes T γδ murins. Les lymphocytes T γδ présentent à leur surface des TCR qui sont codés par des segments géniques Vγ. Ils sont exportés du thymus à différentes périodes du développement fœtal et néonatal puis ils migrent et peuplent les différents tissus épithéliaux des souris adultes. Le développement de certains lymphocytes Vγ7+ intra-épithéliaux résidants dans l'intestin peut être indépendant du thymus. *D'après Carding et al., 2002* ([65]).

II.1.2) Activation et ligands des lymphocytes T γδ

II.1.2.1) Activation des lymphocytes T γδ

Chez la souris et chez l'homme, les réponses fonctionnelles des lymphocytes T γδ sont médiées par la détection des molécules induites par le stress. Ils reconnaissent de nombreux types de ligands incluant des antigènes non peptidiques, des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou des protéines solubles. La reconnaissance de ces ligands met en jeu des récepteurs partagés entre l'immunité innée et leur récepteur spécifique de l'antigène (TCR). Leur TCR leur permet de subir une expansion clonale et de montrer une mémoire antigénique spécifique [68]. Ils possèdent également des récepteurs partagés avec l'immunité innée comme des récepteurs NKRs, ou des récepteurs appelés PRRs (pour pattern recognition receptors) comme les TLRs. Les PRRs leur permettent de

reconnaitre les motifs moléculaires associés aux pathogènes [69] ou les motifs moléculaires associés aux signaux de danger (DAMP) ([70], [71]). La réponse fonctionnelle des lymphocytes T γδ n'est pas seulement dictée par l'engagement du TCR et par les cytokines environnantes, mais également par des récepteurs NKRs activateurs ou inhibiteurs présents à leur surface. Ces récepteurs agissent séparément, en synergie ou de manière additive pour activer les fonctions effectrices des lymphocytes T γδ ([70], [72]) (Figure 6).

Ainsi, les lymphocytes T γδ lient l'immunité innée et adaptative et augmentent la réponse immunitaire contre les pathogènes extérieurs ou les signaux de danger émis par les cellules du soi. Armés de leurs nombreux récepteurs, ils sont capables de reconnaître les cellules tumorales et de les éliminer.

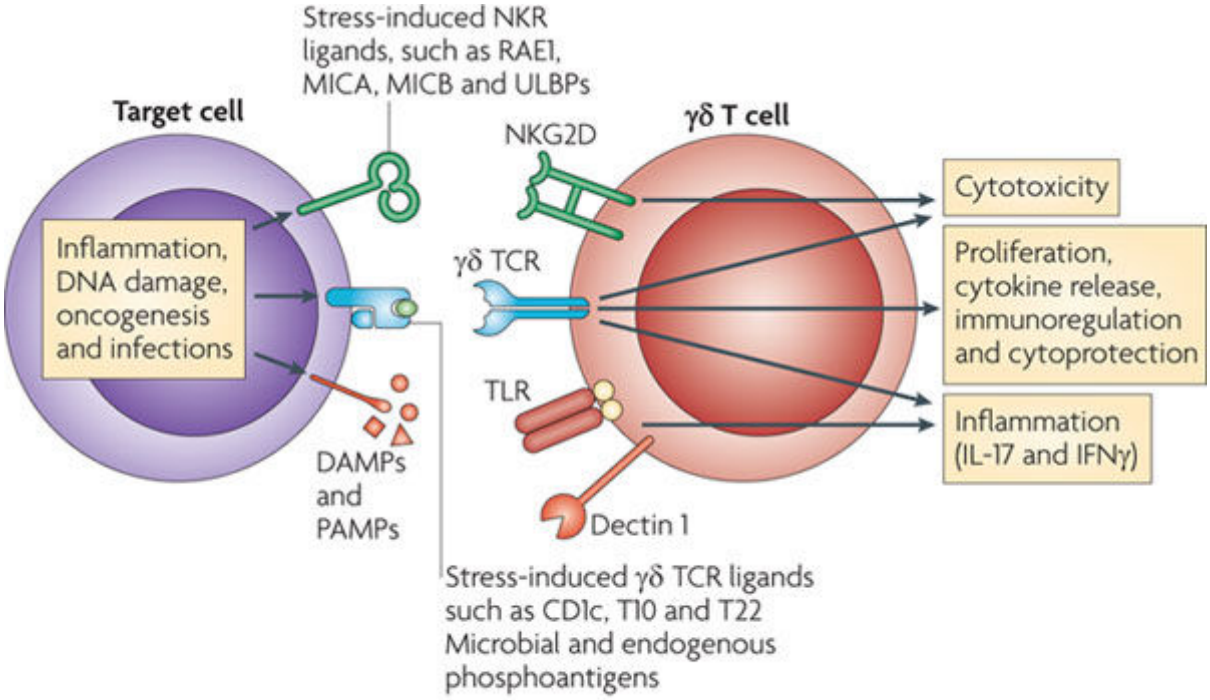


Figure 6 : Détection du stress cellulaire et des cellules infectées par les lymphocytes T γδ. Les cellules T γδ peuvent reconnaitre séparément, de manière additive ou synergique trois sortes de stimuli : des molécules apparentées au CMH, des molécules de surface variées et des DAMPs et PAMPs. Ces ligands peuvent être reconnus par les TCR, les NKRs ou les PRRs. *D'après Bonneville et al., 2010* ([70]).

II.1.2.2) Quelques ligands activateurs des lymphocytes T γδ

Via leurs différents récepteurs, les lymphocytes T γδ sont capables de reconnaître les cellules stressées, infectées ou transformées et d'induire une réponse fonctionnelle. Malgré l'identification probablement partielle de leurs ligands, les lymphocytes T γδ montrent une large réactivité antigénique les aidant à répondre rapidement à une situation de stress.

a) Antigènes non-peptidiques

Les lymphocytes T γδ humains, en particulier les Vγ9δ2, reconnaissent des phosphoantigènes (pAgs) issus de la voie métabolique du mévalonate ([73]). La biosynthèse des pAgs est fortement augmentée dans les cellules cancéreuses. L'accumulation des métabolites du mévalonate dans ces dernières fournit un signal de danger capable d'activer les lymphocytes T γδ ([74]). La butyrophiline 3A1 a été identifiée comme une molécule de présentation des pAgs aux lymphocytes T γδ ([75]). Les essais d'immunothérapie anti-tumorale impliquant les cellules Vγ9δ2 sont basés sur l'activation par les pAgs ([76]).

b) Molécules du CMH

Reconnaissance via le TCRγδ

Les lymphocytes T γδ peuvent reconnaître des molécules de la famille CD1, apparentées au CMH de classe 1 présentant des lipides ([77], [78]). La molécule EPCR (molécule apparentée au CMH de classe 1) permet aux lymphocytes T γδ (en particulier le clone Vγ4δ5^{+}) de reconnaitre les cellules endothéliales infectées par le cytomégalovirus ou les tumeurs épithéliales ([79]).

Les T γδ murins reconnaissent également les molécules T10 et T22 ([80], [81]).

Reconnaissance via les NKRs

Les molécules MICA/MICB ou ULBP surexprimées au cours du stress ou de la transformation tumorale, ainsi que l'équivalent murins Rae1, sont reconnues par le récepteur activateur NKG2D présent à la surface des lymphocytes T γδ humains et murins ([82], [83]). NKG2D exprimé par les Vγ9δ2 humains est un récepteur clé pour la reconnaissance de plusieurs cancers ([84], [83] [85]). Il peut soit fonctionner en synergie avec le TCRγδ pour activer les lymphocytes T γδ dans un contexte tumoral ([85]), soit fonctionner en absence de signal TCR. En effet, l'activation de NKG2D seule serait suffisante à induire une réponse cytotoxique des DETC ([86]).

c) Protéines solubles

Les lymphocytes T γδ reconnaissent les protéines de choc thermique (HSPs), sur-exprimées, notamment au cours de la transformation cellulaire, par les cellules de mélanome ([87]). Ainsi, ils acquièrent leur fonction cytotoxique suite à la reconnaissance d'HSP60 exprimées par les cellules tumorales de patients atteints de cancers de la bouche et de l'œsophage ([88], [89]).

Les lymphocytes T γδ humains et murins reconnaissent également la phycoerythrine (PE), une molécule fluorescente des cyanobactéries et des algues rouges. Cette reconnaissance favorise la production rapide d'IL-17 par les lymphocytes T γδ ([90]).

II.1.3) Principales fonctions effectrices des lymphocytes T γδ

Les lymphocytes T γδ jouent un rôle central dans la défense de l'hôte contre les infections, les maladies inflammatoires et l'immunosurveillance des tumeurs. Bien que connus pour leur capacité à éliminer directement les cellules infectées ou stressées, ils exercent également bien d'autres propriétés immuno-régulatrices en agissant sur des cellules immunitaires ou stromales. Leurs six principales fonctions sont représentées sur la figure 7 ([91]) :

(i) lyse des cellules cibles : les lymphocytes T γδ emploient des mécanismes analogues aux autres lymphocytes cytotoxiques, T αβ $CD8^+$ ou cellules NK, pour éliminer leurs cellules cibles. En particulier, deux mécanismes principaux permettent l'élimination des cellules tumorales : l'engagement des récepteurs de mort et la sécrétion de molécules cytotoxiques. Les lymphocytes T γδ expriment le ligand de Fas ou la molécule TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand), qui induisent la mort par apoptose de cellules cibles exprimant respectivement les récepteurs Fas ou TRAIL-R. Les lymphocytes T γδ peuvent également sécréter les molécules cytotoxiques pré-formées granzymes et perforine ([70]).

(ii) la sécrétion de cytokines et chimiokines : l'activation des cellules T γδ induit la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines, déterminant leurs fonctions effectrices. Selon les cytokines présentes dans le milieu, elles peuvent être polarisées selon différents profils et entrainer des réponses de type Th1 (IFN-γ, IL-2), Th2 (IL-4) ou Th17 (IL-17). Les lymphocytes T γδ peuvent également limiter une réponse inflammatoire en sécrétant des cytokines immunosuppressives comme le TGF-β ou l'IL-10 ([92]).

Ainsi, lorsqu'elles sont polarisées en Th1, elles sont capables de sécréter des taux élevés d'IFN-γ et contribuent ainsi au contrôle tumoral. Par contre, leur production d'IL-17

dans un microenvironnement tumoral est associée à une activité pro-tumorale. Chez la souris, on distingue les cellules T γδ exprimant le marqueur de surface CD27 associées à la production d'IFN-γ, tandis que les cellules productrices d'IL-17 sont $CD27^-$ ([93]).

(iii) la maturation des cellules dendritiques (DC) : par exemple, les lymphocytes T γδ peuvent induire la maturation des DCs en produisant de l'IFN-γ et en exprimant le CD40 ligand au cours d'une infection parasitaire chez la souris ([94]).

(iv) l'activation des lymphocytes T αβ : les cellules Vγ9δ2 humaines présentent des caractéristiques de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. En plus d'exprimer des molécules de co-stimulation comme CD80, les Vγ9δ2 activées présentent des antigènes aux lymphocytes T αβ $CD4^+$ ou $CD8^+$. Ainsi, elles sont capables d'induire la prolifération et la différenciation des lymphocytes T αβ naïfs [95].

(v) l'aide aux lymphocytes B (LB) : les cellules T γδ humaines et murines fournissent de l'aide aux LB. En particulier, Wen *et al.* ont montré chez la souris que les lymphocytes T γδ induisent la production d'immunoglobulines dépendantes des lymphocytes T αβ [96].

(vi) la régulation des fonctions des cellules stromales : par exemple, les DETC chez la souris et les lymphocytes T γδ résidant dans la peau chez l'homme maintiennent l'intégrité tissulaire en participant à la cicatrisation cutanée à travers leurs interactions avec les kératinocytes ([97], [98]). De plus, les lymphocytes T γδ limitent les dommages à l'ADN induit par les rayonnements ultraviolets dans les kératinocytes ([99]).

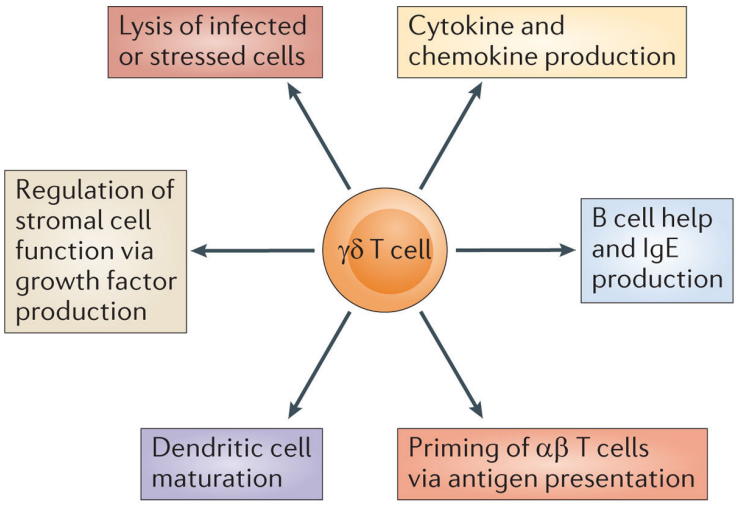


Figure 7 : Six fonctions principales des lymphocytes T γδ. Les lymphocytes T γδ ont un rôle central dans la défense de l'organisme contre une grande variété de stress. Cette protection s'effectue par six mécanismes principaux. 1) Les cellules T γδ sont capables d'éliminer les cellules stressées ou infectées. 2) Ils peuvent produire diverses cytokines et chimiokines pour réguler leur environnement. 3) Ils peuvent fournir une aide aux lymphocytes B et favorisent la production des IgE. 4) Ils peuvent présenter des antigènes aux lymphocytes T αβ et ainsi les activer. 5) Ils peuvent favoriser la maturation des cellules dendritiques. 6) Ils peuvent réguler la fonction des cellules stromales par la production de facteurs de croissance. *D'après Vantourout et Hayday, 2010* ([91]).

II.2. Les lymphocytes T γδ, acteurs de la surveillance anti-tumorale

II.2.1) Evidences issues des modèles murins de cancer

Chez la souris, les lymphocytes T γδ exercent des rôles anti-tumoraux dans des modèles de cancers transplantés, induits chimiquement, spontanés ou transgéniques. Leurs effets bénéfiques s'exercent principalement grâce à la sécrétion d'IFN-γ et à la dégranulation de molécules cytotoxiques après activation du TCR et/ou du récepteur NKG2D.

II.2.1.1) Cancers cutanés (carcinomes et mélanomes)

Les lymphocytes T γδ participent à la reconnaissance et à l'élimination des cellules transformées précédant la tumorigénèse. Ils agissent précocement au cours du développement de carcinomes cutanés. En particulier, ils diminuent l'incidence de formation des papillomes dans un modèle d'induction chimique de tumeurs bénignes qui évoluent en tumeurs plus agressives. La présence de ligands pour NKG2D sur les papillomes expliquerait l'effet bénéfique des lymphocytes T γδ [100] [101].

Les travaux menés sur les souris déficientes en lymphocytes T γδ ont également permis de mettre en évidence leurs effets bénéfiques dans le contrôle des tumeurs. Ainsi, dans trois modèles de carcinomes de la peau (injection intradermique de cellules tumorales, induction chimique par méthylcholanthrène (MCA) ou par applications de dimethyl-benzanthracène (DMBA) et phorbol ester), Girardi *et al.* furent les premiers à démontrer le rôle anti-tumoral des lymphocytes T γδ. *In vitro*, ces derniers tuent les cellules cancéreuses par un mécanisme dépendant du récepteur NKG2D [86]. De la même manière, Gao *et al.* démontrèrent que les souris déficientes en lymphocytes T γδ développaient plus de tumeurs que les souris sauvages en réponse au MCA et suite à l'injection sous-cutané de cellules de mélanome B16-F0. Les auteurs ont mis en évidence que les lymphocytes T γδ étaient recrutés dans la tumeur avant les lymphocytes T αβ et produisaient une source précoce d'IFN-γ potentialisant l'activité anti-tumorale des lymphocytes T αβ [102]. En 2010, le même groupe identifia que l'activité anti-tumorale des T γδ était médiée par les cellules $V\gamma4^+$ exprimant le facteur de transcription Eomesodermin ([103]). Lanca e*t al.* ont confirmé le rôle protecteur des lymphocytes T γδ dans le modèle de transplantation sous-cutanée de cellules B16-F0. Ils démontrent le rôle important de l'expression des molécules perforine et granzyme B dans leur cytotoxicité vis à vis des cellules tumorales *in vitro* [104].

II.2.1.2) Autres tumeurs

Le rôle anti-tumoral des lymphocytes T γδ dans les tumeurs hématologiques a été mis en évidence par les travaux de Street *et al.* En effet, les lymphocytes T γδ lysent, en collaboration avec les cellules NK, les cellules tumorales dans un modèle de lymphome B spontané [105].

Dans un modèle murin développant spontanément un cancer de la prostate, Liu *et al.* ont montré que le transfert adoptif de lymphocytes T γδ contrôlait la croissance tumorale et améliorait la survie des souris [106].

II.2.2) Chez l'homme

Des lymphocytes T γδ ont été observés *in situ* dans des cancers humains. Ils sont également associés à des réponses anti-tumorales. Ainsi, ils présentent des capacités cytotoxiques envers des tumeurs hématologiques ([107], [108]) et solides ([89], [109], [110], [82], [111]). Après leur activation dépendante du TCR ou d'un récepteur activateur tel que NKG2D, les lymphocytes T γδ sécrètent de grande quantité d'IFN-γ, ou de TNF-α ou produisent des molécules cytotoxiques ([82], [111]).

Les propriétés anti-tumorales des Vγ9δ2 font l'objet d'essais cliniques en utilisant soit des transferts adoptifs de cellules T γδ activées et amplifiées *in vitro* avant d'être ré-injectées aux patients, soit en les stimulant directement *in vivo* par l'administration de molécules d'aminobisphosphonates permettant l'accumulation métabolique d'isopentenyl pyrophosphate un agoniste de leur TCR. Néanmoins, les résultats de ces essais cliniques sont contrastés ([112]).

De plus, même si les lymphocytes T γδ infiltrent les tumeurs humaines, leur contribution à l'immunosurveillance est peu claire et pourrait dépendre en partie du type de cancer ou du microenvironnement tumoral notamment cytokinique. Le tableau 1 présente les résultats des études de corrélations entre la présence de lymphocytes T γδ et les pronostics cliniques.

Table 1 : Corrélations entre la présence de lymphocytes T γδ infiltrant les tumeurs et différents paramètres cliniques.

Type de cancer	Nombre d'échantillons examinés	Présence de T γδ	Corrélation	Rôle des T γδ dans la progression tumorale	Références
Mélanome choroïdien nécrosant	74	parmi les biopsies : Vγ1 détéctés dans 39%, Vδ1 dans 57%	Corrélation positive avec la survie	Protecteur	Bialasiewicz *et al.*, 1999
Mélanome cutané	74	T γδ détectés dans 62% des biopsies, population majoritaires parmi les TILs	La présence de Vδ2 corrèle négativement avec les stades avancés	Protecteur (Vδ2)	Cordova *et al.*, 2012
Carcinome rénal	248	Moins de 1% des TILs	Aucune corrélation observée	?	Inman *et al.*, 2008
Cancer du sein	46	dans 93% des biopsies et moins de 1% dans le tissu mammaire sain	Corrélation avec une faible survie et un risque elevé de rechute	Délètere	Ma *et al.*, 2012

Références : [113], [111], [114], [115]

II.3. Rôles des lymphocytes T γδ dans la progression tumorale

II.3.1) Les lymphocytes T γδ, des effecteurs pro-tumoraux ?

Les lymphocytes T γδ infiltrant les tumeurs ont longtemps été considérés uniquement comme des acteurs impliqués dans l'immunosurveillance. Néanmoins, en 2007, une étude a révélé leur potentiel pro-tumoral chez l'homme. En effet, les lymphocytes T γδ isolés de biopsies de cancer du sein inhibent la prolifération des lymphocytes T ainsi que la maturation et l'activité des DCs ([116]). En accord avec ces résultats, les lymphocytes T γδ infiltrant les tumeurs sont un facteur pronostique permettant d'évaluer la sévérité de la maladie dans le cancer du sein ([115] et table 1).

Dans le mélanome, deux sous-populations jouent des rôles opposés dans la progression tumorale. Les cellules Vγ4$^+$ montrent des propriétés anti-tumorales, tandis que les Vγ1$^+$ inhibent les réponses favorables des Vγ4$^+$ par un mécanisme dépendant de l'IL-4 ([117]). Alors que l'utilisation de souris déficientes en lymphocytes T γδ a montré le rôle protecteur des T γδ dans le modèle de transplantation B16-F0 ([102], [104]), Paget *et al.* n'ont pas observé de protection lorsque les cellules issues de la lignée de mélanome B16-F10 sont injectées en intraveineuse à des souris déficientes en T γδ. En effet, dans ce modèle mimant la formation de métastases pulmonaires, les souris déficientes en T γδ développent le même nombre de foyers tumoraux pulmonaires que leurs homologues immunocompétents. Il en est de même avec l'utilisation de cellules 3LL issues de carcinome pulmonaire ([118]). Ces données suggèrent que certaines sous-populations de T γδ contrôlent les stades précoces de la tumeur tandis que d'autres seraient impliquées dans la dissémination tumorale.

Par ailleurs, de plus en plus d'études démontrent dans des modèles de cancer murins et chez l'homme, les activités pro-tumorales des lymphocytes T γδ producteurs d'IL-17 (voir introduction paragraphe II.3.2.2). Pourtant, dans des situations où le développement tumoral est associé à un traitement par antibiotique ou une chimiothérapie, les fonctions protectrices des cellules T γδ17 ont été démontrées ([119], [120]). Ces données suggèrent que les lymphocytes T γδ17 peuvent eux aussi être polarisés en effecteurs pro- et anti-tumoraux probablement en fonction du microenvironnement dans lequel ils sont polarisés.

II.3.2) Mécanismes médiés par les lymphocytes T γδ favorisant la progression tumorale

La capacité des lymphocytes T γδ à entraver une réponse anti-tumorale efficace a été établie à la fois dans des modèles de cancer chez la souris et chez l'homme. Les cellules T γδ peuvent directement inhiber les réponses immunes cytotoxiques ou favoriser la dissémination métastatique via la sécrétion d'IL-17. La figure 8 adaptée de Rei *et al.* ([121]) récapitule les mécanismes impliquant les T γδ dans des fonctions pro-tumorales.

II.3.2.1) Inhibition des réponses anti-tumorales

Les cellules T γδ peuvent acquérir des propriétés de lymphocytes T régulateurs (Treg), en particulier en présence de TGF-β ([122]) abondant dans le microenvironnement tumoral. Les cellules T γδ polarisées en T γδ régulateurs favorisent l'inhibition des réponses anti-tumorales. Peng *et al.* démontrèrent que les T γδ humaines Vδ1$^+$ isolées à partir des biopsies de cancer inhibaient les réponses T effectrices et les fonctions des DCs ([116]). Les

cellules Vδ1$^+$ induisent la sénescence des lymphocytes T et des DCs leur conférant à leur tour des propriétés immunosuppressives ([123]).

Chez la souris, Ke *et al.* montrèrent que la croissance tumorale des cellules E.G7-OVA était profondément diminuée dans les souris déficientes en T γδ. Dans ce modèle de lymphome, les lymphocytes T γδ inhiberaient les réponses immunitaires anti-tumorales par un mécanisme dépendant de l'IL-10 ([124]). Dans une étude publiée en 2015, Rutkowski *et al.* ont démontré l'activité immunosuppressive des lymphocytes T γδ dans des modèles murins de sarcome et de cancer ovarien [125]. Ces lymphocytes expriment une molécule immunosuppressive, la galectine 1, probablement en réponse à la production d'adénosine par les MDSCs. Les T γδ sécrétant de la galectine 1 suppriment les réponses T *in vitro* et accélèrent la croissance tumorale *in vivo* [125].

II.3.2.2) Rôles de l'IL-17

Les lymphocytes T αβ CD4$^+$ (Th17) et T γδ (Tγδ17) sont les deux principales populations productrices d'IL-17. Dans les modèles murins de fibrosarcome, métastases pulmonaires, carcinome hépatocellulaire, cancers ovarien et mammaire ainsi que dans le cancer colorectal chez l'homme, il a été récemment montré que les cellules T γδ sont la principale source d'IL-17 ([126], [127], [128], [129], [130], [131]). Cette production d'IL-17 n'impacte pas forcément la formation de la tumeur primaire ([130]), mais favorise la progression métastatique en promouvant l'angiogenèse et le recrutement de cellules myéloïdes aux propriétés immunosuppressives.

a) Impact sur l'angiogenèse

Wakita *et al.* ont suggéré que les lymphocytes T γδ promouvaient l'angiogenèse par leur production d'IL-17 dans un modèle murin de fibrosarcome ([126]). En effet, l'inhibition de la croissance tumorale corrélait à une réduction du nombre des vaisseaux sanguins intra-tumoraux dans des souris déficientes en IL-17. D'autre part, dans le modèle cancer ovarien (transplantation en intra péritonéale de cellules tumorales ID8), les tumeurs issues des souris déficientes en IL-17 et en T γδ expriment des niveaux plus faibles de ang-2 et vegf que celles développées dans des animaux sauvages ([129]). Finalement, les cellules T γδ17 favorisent la mobilisation de macrophages pro-angiogéniques dans la cavité péritonéale ([129]).

b) Recrutement de cellules myéloïdes pro-tumorales

Les lymphocytes T γδ producteurs d'IL-17 induisent le recrutement de cellules myéloïdes suppressives (MDSCs) dans les modèles murins de carcinome hépatocellulaire et de cancer du sein ([128], [130]). Les MDSCs inhibent alors les réponses cytotoxiques médiées par les cellules T αβ $CD8^+$ et favorisent la formation de métastases ([130]). Les T γδ17 recrutent également les MDSCs dans le cancer colorectal humain ([131]). Cette étude décrit notamment le rôle des lymphocytes T γδ dans la migration *in vitro*, la prolifération et la survie des MDSCs via la production d'IL-17, d'IL-8, de GM-CSF et de TNF-α ([131]).

Comme indiqué précédemment, les T γδ17 favorisent la mobilisation de petits macrophages péritonéaux dérivés du sang (SPMs) après transplantation de cellules ID8 de cancer ovarien ([129]). Ces SPMs potentialisent la croissance tumorale des cellules ID8 *in vitro* ([129]).

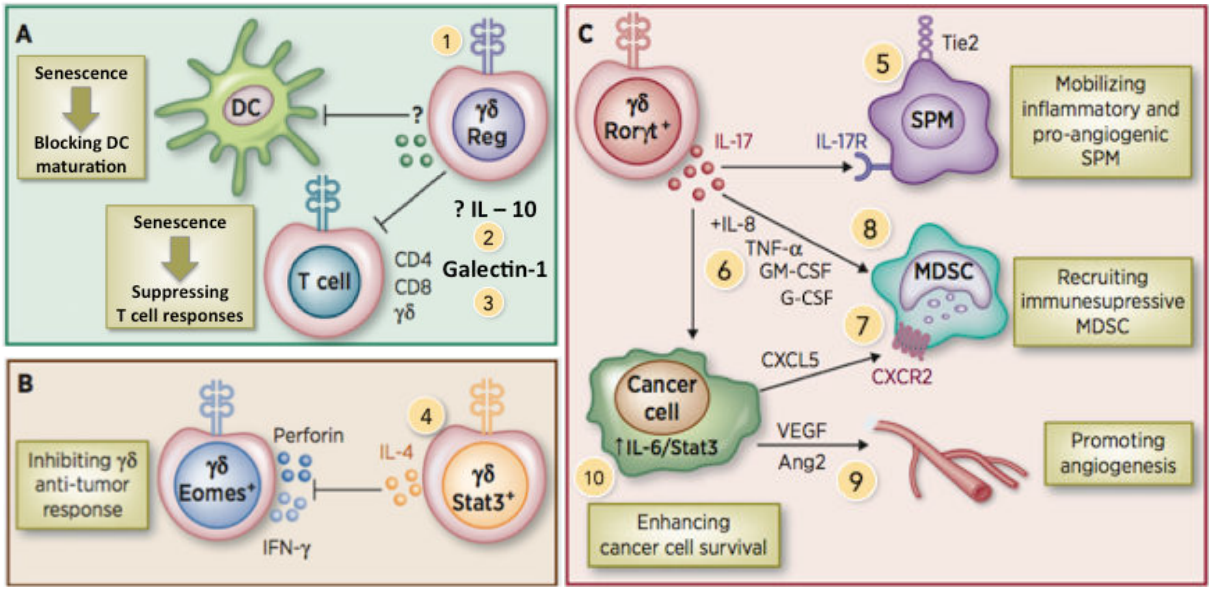


Figure 8 : Les lymphocytes T γδ exercent des fonctions pro-tumorales par différents mécanismes. A. Les lymphocytes T γδ régulateurs peuvent supprimer les réponses anti-tumorales en inhibant la maturation des DC et les fonctions effectrices des lymphocytes T αβ $CD4^+$, $CD8^+$ et T γδ Le facteur moléculaire impliqué dans ce rôle inhibiteur est encore inconnu. Ils inhibent également les réponses T en produisant de l'IL-10 et la Galectine-1. B. Les lymphocytes T γδ exprimant STAT3 peuvent produire de l'IL-4 qui inhibe la sécrétion d'IFN-γ et la dégranulation des molécules de perforine par les lymphocytes T γδ $Eomes^+$. C. L'IL-17 sécrétée par les lymphocytes T γδ $ROR\gamma t^+$ exerce des effets pro-tumoraux via la mobilisation des SPMs inflammatoires et pro-angiogéniques, le recrutement des MDSCs (permis également par l'IL-8, le TNF-α, le GM-CSF et le G-CSF), l'augmentation de CXCL5 dans les cellules cancéreuses qui recrute les MDSCs par l'interaction avec CXCR2 ; L'IL-17 sécrétée par les lymphocytes T γδ augmente l'expression des facteurs pro-angiogéniques VEGF and Ang-2 et la signalisation IL-6/STAT3 dans les cellules cancéreuses ce qui favorise leur survie. Ces mécanismes ont été décrits dans les cancers humains ou les modèles murins suivants : 1 cancer du sein humain, 2 lymphome murin, 3 modèles murin de sarcome et cancer ovarien, 4 mélanome murin, 5 cancer ovarien murin, 6 cancer colorectal humain, 7 carcinome hépatocellulaire murin, 8 cancer du sein murin, 9, fibrosarcome murin 10, cancer pancréatique murin. *Adapté de Rei et al., 2015* ([121]).

II.3.3) Induction de la production d'IL-17 par les lymphocytes T γδ

Le microbiote et le microenvironnement tumoral jouent des rôles déterminants dans la polarisation des T γδ en **effecteurs pro-tumoraux** en induisant leur sécrétion d'IL-17.

II.3.3.1) Microbiote

Le microbiote est l'ensemble des bactéries commensales présentes dans notre organisme (flore intestinale, vaginale, buccale, de la peau). Le microbiote intestinal influence les activités des cellules immunes à la fois dans des conditions physiologique et

pathologique ([132]) et module les réponses immunes aux thérapies même à des sites extra intestinaux (I[133], [134]). Wu *et al.* [131] ont montré, chez les patients atteints de cancer du colon, que le développement tumoral pouvait causer la destruction de la barrière épithéliale. Cette destruction entraine l'invasion de la tumeur par des bactéries commensales (*E. coli*) et la libération de produits bactériens induisant la production d'IL-23 par les DC ce qui a pour conséquence de polariser *in situ* les lymphocytes T γδ en cellules productrices d'IL-17. Une étude plus récente [125], a montré que la reconnaissance des bactéries commensales par le TLR5 affectait la progression tumorale extra intestinale (modèles de sarcome et cancer ovarien) en modulant l'inflammation systémique (en particulier l'IL-6) et les réponses immunes dirigées contre les tumeurs. La déplétion par antibiotiques de la flore commensale induit une diminution de la croissance tumorale associée à une diminution du nombre de lymphocytes T γδ intra tumoraux. Néanmoins, le traitement par antibiotiques dans les souris sauvages n'induit ni de diminution de l'IL-17 sérique, ni de cellules productrices d'IL-17. Dans cette étude, les cellules productrices d'IL-17 (lymphocytes T αβ $CD4^+$ et T γδ) dans le microenvironnement tumoral (sarcome) sont en proportions similaires. Ainsi, les lymphocytes T γδ ne semblent pas être la source majeure d'IL-17 (à nuancer car on ne connaît pas les proportions de cellules T γδ et $CD4^+$ infiltrant la tumeur). Cependant, dans les souris déficientes pour le TLR5, le traitement par antibiotiques diminue significativement les proportions sériques d'IL-17 et de cellules productrices d'IL-17. De plus, la croissance tumorale (cancer du sein), est significativement diminuée dans les souris déficientes pour le TLR5 après traitement antibiotiques. Il n'y a pas de lien direct entre le microbiote et la production d'IL-17 par les lymphocytes T γδ dans cette étude. Néanmoins, comme l'élimination de la flore réduit la proportion d'IL-17 dans les souris déficientes en TLR5 et que l'IL-17 est produit en proportion similaire par les lymphocytes T αβ $CD4^+$ et T γδ y compris dans les souris déficientes en TLR5, on peut supposer que les bactéries spécifiques présentes dans la flore des souris TLR5 déficientes puissent activer la production d'IL-17 par les lymphocytes T γδ.

II.3.3.2) Microenvironnement cytokinique

Les cytokines produites dans le microenvironnement tumoral jouent un rôle déterminant dans la polarisation des T γδ vers un profil T γδ 17 pro-tumoral. L'**IL-1-β** permet le recrutement et la polarisation en T γδ producteurs d'IL-17 dans un modèle de développement spontané de cancer du sein ([130]) et dans un modèle de métastases pulmonaires ([127]). Dans le modèle de cancer du sein, la neutralisation *in vivo* de l'IL1-β diminue l'expression de l'IL-17 par les T γδ, mais la neutralisation de l'IL-23 n'a pas d'effet

([130]). Dans d'autres modèles cependant, il a été montré que l'IL-23 jouait un rôle clé pour l'expression de l'IL-17. L'inhibition *in vivo* par des anticorps bloquant le récepteur à l'**IL-6**, le **TGF-β** ou l'**IL-23**, dans un modèle de fibrosarcome, réduit partiellement mais significativement le pourcentage de cellules Tγδ17 ([126]). *In vitro*, l'IL-23 seule permet la production d'IL-17 par les T γδ, alors que la combinaison IL-6 + TGF-β est inefficace ([126]). Les auteurs concluent donc que l'IL-6 et le TGF-β permettent la différenciation des T γδ en cellules capables de produire de l'IL-17, tandis que l'IL-23 déclenche la production d'IL-17. De manière similaire, dans le cancer colorectal humain, l'IL-23 dérivée des DCs polarise les T γδ vers la production d'IL-17 ([131])). Dans le modèle de carcinome hépatocellulaire, la déplétion *in vivo* des MDSCs engendre l'absence de sécrétion d'IL-1β et d'IL-23 et diminue les Tγδ17 infiltrant les tumeurs ([128]).

II.3.3.3) L'engagement du TCR

Pour déterminer si la reconnaissance d'un antigène spécifique par le TCR était essentiel pour la production de l'IL-17 par les T γδ, Wakita *et al.* ont utilisé des anticorps bloquant le TCR et le NKG2D. La production d'IL-17 est diminuée avec l'utilisation d'un anti-TCRγδ et partiellement avec l'anti-NKG2D ([126]). L'engagement du TCR semble ainsi essentiel à la production de l'IL-17 par les lymphocytes T γδ.

Ces données montrent que l'engagement du TCR, le microenvironnement cytokinique et le microbiote induisent la polarisation des les lymphocytes T γδ en cellules productrices d'IL-17. Pourtant, certains travaux attribuent des propriétés anti-tumorales au les lymphocytes T γδ IL-17^{+} suggérant un rôle différent du microenvironnement dans la polarisation (([119], [120])). On peut émettre une hypothèse supplémentaire : il pourrait exister un autre facteur, intrinsèque aux lymphocytes T γδ, permettant de polariser ces cellules en effectrices pro-tumorales. Au cours de mon travail, nous avons observé que l'enzyme NOS2 pouvait être un candidat potentiel, en raison des ses effets sur la production d'IL-17 par les lymphocytes Th17.

III. NOS2, système immunitaire et cancer

Le nitrique oxyde (NO) régule des nombreuses fonctions physiologiques dans l'organisme incluant les fonctions vasculaires, neurologiques et immunitaires. La découverte de l'expression de NOS2 a d'abord été faite dans les cellules myéloïdes, restreignant le rôle du NO dérivé de NOS2, au sein du système immunitaire, à celui d'un effecteur clé dans la lutte contre les infections. La découverte récente de l'expression de NOS2 par les cellules lymphoïdes montre son action dans le développement, la différenciation et les fonctions des lymphocytes T αβ et B. Dans le contexte tumoral, le NO peut être exprimé par différentes populations (immunes, stromales, tumorales). En physiologie et en pathologie, le NO peut exercer des effets opposés (régulateur et toxiques, propriétés stimulatrices et suppressives dans le système immunitaire, pro- et anti-tumoral). Ces effets ambivalents peuvent être expliqués (i) par la quantité de NO produite (du nM au µM), (ii) par son origine par rapport à la cellule cible (endogène versus exogène), (iii) par la variété des cibles moléculaires avec lesquelles il peut interagir.

III.1. NOS2, une synthétase inductible de l'oxyde nitrique (NO)

III.1.1) Source de NO dans l'organisme

Dans l'organisme, le NO peut provenir des cellules eucaryotes ou même des bactéries présentes dans la flore commensale. La figure 9 résume les différentes voies de formation du NO.

III.1.1.1) Les NOS

Trois isoformes de synthétases de l'oxyde nitrique (NOS) ont été décrites : NOS1 est présente dans les cellules nerveuses, NOS2 est exprimée par de nombreux types cellulaires (stromales, immunitaires et même tumorales), et enfin NOS3 est retrouvée dans les cellules endothéliales. Ces enzymes sont impliquées dans le métabolisme d'un acide aminé, la L-arginine selon la réaction suivante :

$$\text{L-arginine} + \text{NADPH},H^+ + O_2 \longrightarrow \text{L-citrulline} + \text{NADP}^+ + \text{NO}$$

NOS1 et NOS3 produisent des concentrations de NO de l'ordre du pM au nM, NOS2 permet la production d'une plus grande quantité de NO, de l'ordre du µM. Une propriété caractéristique de NOS2 est son absence d'expression dans les cellules au repos. NOS1 et NOS3 sont exprimées constitutivement et s'activent avec l'augmentation intracellulaire de calcium. Comme son nom l'indique, l'expression d'iNOS ou NOS2 est induite par divers stimuli indépendamment du calcium (voir introduction paragraphe III.1.3)).

III.1.1.2) Autres sources de NO

En conditions de normoxie, le NO est rapidement métabolisé en produits stables comme le nitrite et le nitrate qui constituent des réserves de NO. Ainsi, le NO peut être formé à partir du nitrite indépendamment des NOS, soit par l'activité enzymatique des nitrites réductases, soit par des mécanismes de réduction non enzymatiques engendrés par un pH acide, des réactions avec les groupements hème ou des rayonnements ultra-violets (UV) ([135]). En effet, l'exposition de la peau humaine à des UV conduit à la formation de NO et d'autres espèces réactives de l'azote (RNS) due à la décomposition de S-nitrosothiol et des réservoirs de nitrites dans l'épiderme et le derme ([136]). Les conséquences immunologiques et les dommages potentiels sur la peau de ce phénomène n'ont pas encore été établis.

Enfin, de nombreuses bactéries environnementales, commensales et pathogènes utilisent le nitrate et le nitrite comme source d'énergie en conditions anaérobiques conduisant la formation de NO ([137]). Certaines bactéries possèdent une NO synthétase bactérienne (bNOS) permettant la synthèse de NO à partir de la L-arginine ([138]).

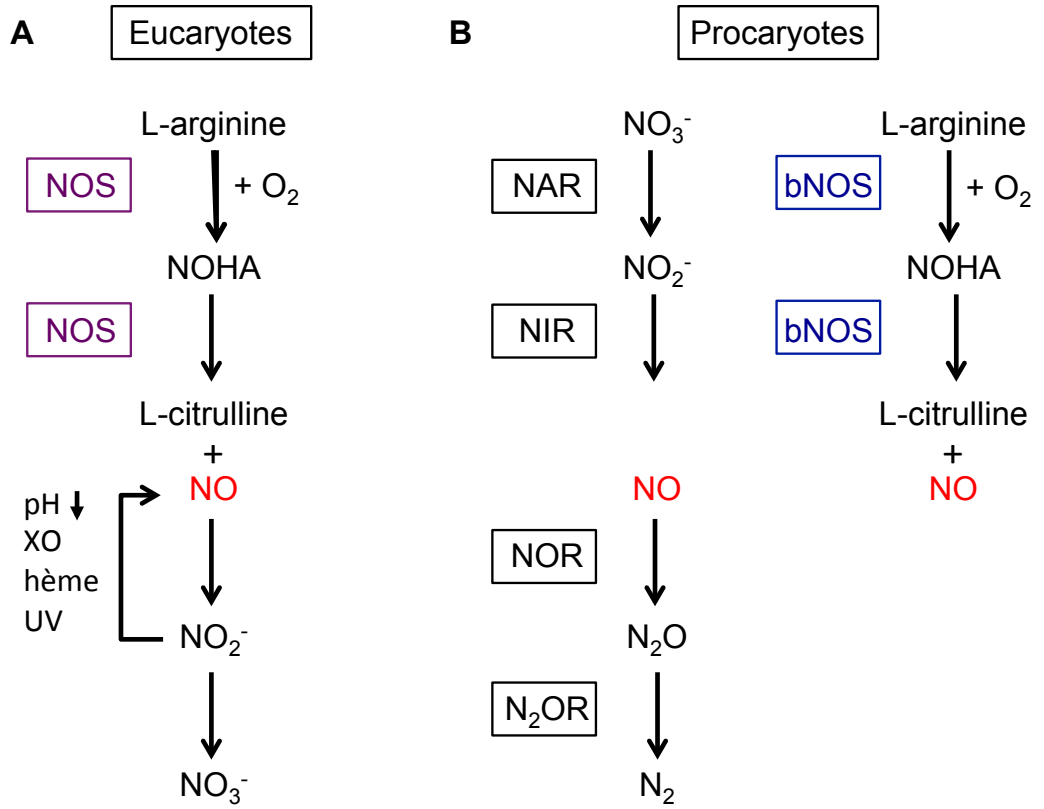


Figure 9 : Les différentes sources de NO dans l'organisme. A. Dans les cellules eucaryotes, les NOS métabolisent la L-Arginine pour produire du NO. Le NO peut également être produit indépendamment des NOS par des réactions enzymatiques (XO : xantine oxidase) ou non enzymatiques par la réduction du nitrite (engendrée par un pH acide, par les UV ou des réactions avec des groupements hème). B. Plusieurs espèces bactériennes utilisent le nitrite et le nitrate comme source d'énergie dans des conditions anaérobiques (respiration des nitrates), ce qui génère du NO (NAR : nitrate reductase, NIR : nitrite reductase, NOR : nitric oxyde reductase, N_2OR : nitrous oxide reductase). Dans certaines bactéries, la synthèse du NO est le résultat de la présence d'une NOS bactérienne (bNOS). *D'après Bogdan, 2015* ([139]).

III.1.2) Mécanismes d'action du NO

Le NO est un radical libre très réactif qui possède une demi-vie courte. Il peut agir sur sa cellule cible de manière autocrine (NO produit de manière endogène) ou paracrine (NO exogène) car il peut diffuser à travers les membranes. Le NO ne possède pas de récepteur cellulaire. Il ne déclenche donc pas de cascade de signalisation typique des interactions messager / récepteur cellulaire. Néanmoins, ses actions sont médiées par les cibles moléculaires avec lesquelles il peut interagir.

III.1.2.1) Actions directes

Le NO se fixe sur des cations divalents ($Fe2^+$ dans les groupements hème ou $Zn2^+$) ce qui régule la fonction de nombreux facteurs de transcription et d'enzymes. En particulier, le NO active directement la guanylate cyclase soluble (GCs) permettant la génération de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) à partir de GTP. La transduction du signal engendrée par la cascade de signalisation NO/GMPc régule plusieurs effets physiologiques, incluant la relaxation du muscle lisse, la neurotransmission ou l'inhibition de l'agrégation et de l'adhésion des plaquettes ([140]).

III.1.2.2) Actions indirectes

a) Action sur les protéines

L'action du NO sur certains acides aminés (cystéines et tyrosines) induit des modifications post-traductionnelles sur les protéines, régulant positivement ou négativement leur activité.

- Sur les cystéines : le NO peut réagir avec les groupements thiols des résidus cystéines induisant la formation de groupement S-nitrosothiol (ajout d'un groupement NO au groupement thiol d'une cystéine de manière covalente). La modification post-traductionnelle des cystéines, appelée S-nitrosylation, permet d'activer ou d'inactiver de nombreuses protéines comme les facteurs de transcription, les canaux ioniques ou les kinases.
Les protéines S-nitrosylées peuvent être dé-nitrosylées par l'action de protéines appelées dénitrosylases (GSNOR (S-nitrosoglutathione-réductase)), ce qui permet de réguler les niveaux de protéines S-nitrosylées dans la cellule. La S-nitrosylation et la S-dénitrosylation sont des mécanismes à la base des nombreux effets médiés par le NO au sein du système immunitaire ([141]). Par exemple, les souris déficientes en GSNOR développent une lymphopénie périphérique. Dans le thymus, la déficience en GSNOR cause une S-nitrosylation excessive des protéines, une augmentation de l'apoptose et en conséquence réduit le nombre des thymocytes T $CD4^+$ ([142]).

- Sur les tyrosines : le NO peut réagir avec le radical anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) pour former du peroxynitrite ($ONOO^-$) capable de modifier les protéines et en particulier induire la nitration de résidus tyrosines ([143], [144]).

b) Action sur les lipides et les acides nucléiques

Le NO peut également induire la nitration des lipides, en particulier les lipides insaturés. Enfin, les dommages à l'ADN dans des conditions inflammatoires jouent un rôle important dans l'accumulation des mutations et l'oncogenèse. Un des mécanismes est médié par le NO. Par exemple, l'attaque du peroxynitrite sur les acides nucléiques peut conduire à la nitration d'un acide nucléique telle que la formation de 8-nitroguanine à partir de la désoxyguanosine ([144]).

III.1.3) Régulation de l'expression de NOS2 dans les cellules immunes

NOS2 n'est pas exprimée dans les cellules non activées. Divers stimuli activent ou inhibent l'expression de NOS2 dans les cellules immunitaires. D'autres mécanismes de régulation sont également mis en place dans l'organisme pour réguler la production de NO, en affectant par exemple la biodisponibilité du substrat ou en contrecarrant les effets de l'enzyme.

III.1.3.1) Cytokines et produits bactériens

L'activation du promoteur du gène Nos2 est un mécanisme important de régulation de l'expression de NOS2 par les cytokines. Le tableau 2 récapitule les principaux stimuli cytokiniques induisant ou inhibant la production de NOS2 dans les cellules immunitaires primaires (c'est à dire non dérivées de lignées, de clones ou de tumeurs).

Table 2 : Stimuli régulant la production de NOS2 dans les cellules immunitaires primaires.

Stimuli	Cellules	NOS2	Références
interférons (IFN-γ + IFN de type 1) + LPS	myéloïdes	induction	Bogdan *et al*., 2015
IL-1β	macrophages	induction	Lima-Junior *et al.*, 2013
IL-1β (+TCR)	Th17 humains	induction	Obermajer *et al*., 2013
IL-1β + IL-6 + IL-23 (+TCR)	Th17 humains	induction	Obermajer *et al*., 2013
IL-6 + TGF-β (+TCR)	Th17 murins	induction	Yang *et al*. 2013
IL-6	plasmocytes	induction	Saini *et al*., 2014
LPS	lymphocytes B1	induction	Tumurkhuu *et al*., 2010
IL-33	macrophages	induction	Li *et al*., 2014
IL-2 + IL-12	NK	induction	Diefenbach *et al*., 1999
EPO	macrophages	inhibition	Nairz *et al*., 2011

Références : [139], [145], [146], [147], [148],([149], [150], [151], [152]
Pour note, l'activation du TCR *in vitro* (anticorps dirigés contre le CD3 et le CD28) induit l'expression de NOS2 dans les cellules T $CD4^+$ chez l'homme et la souris ([146], [147]).

III.1.3.2) Disponibilité du substrat

L'activité de NOS2 est modulée par la disponibilité de son substrat, la L-arginine. La L-arginine peut être dégradée par d'autres enzymes que les NOS, et en particulier par l'Arginase de type 1 (ARG 1). L'ARG 1 permet la production d'urée et d'ornithine à partir de L-arginine. La déplétion de l'arginine médiée par l'ARG 1 inhibe les réponses lymphocytaires T spécifiques de l'antigène dans le contexte tumoral ([57], [153]). L'ARG 1 induit également une déplétion d'arginine dans les macrophages inhibant la génération de NO nécessaire à leur activité anti-microbienne ([154]). D'autres enzymes permettent la production de L-arginine, en particulier, même si les macrophages sont incapables de régénérer de la L-arginine à partir d'ornithine, ils peuvent le faire à partir de la L-citrulline via les activités de l'arginosuccinate synthase 1 et arginosuccinate lyase ([155]).

III.1.3.3) Régulation de l'activité de NOS2

La dénitrosylation des S-nitrosothiols peut inverser les effets de la signalisation du NO dérivé de NOS2 et ainsi être considérée comme un niveau supplémentaire de régulation de l'activité de NOS2 ([139]).

III.2. Rôles de l'expression de NOS2 sur les cellules immunitaires

L'expression de NOS2 a d'abord été découverte dans les macrophages, puis dans les cellules myéloïdes. La question de l'expression par les cellules lymphoïdes est restée longtemps source de débat. En effet, celle-ci a d'abord été mise en lumière dans les lymphocytes T issus de clones, de lignées ou les cellules tumorales. Néanmoins, quatre études récentes ont démontré son expression par les lymphocytes T et B primaires ([146], [147],[148],([149],).

III.2.1) Fonctions de NOS2 dans les cellules myéloïdes

L'expression de NOS2 par les cellules myéloïdes peut avoir des conséquences physiologiquement ambivalentes. D'une part, l'expression de NOS2 permet la lyse des cellules cibles ce qui est nécessaire à l'élimination des pathogènes et potentiellement des cellules tumorales. D'autre part, l'expression de NOS2 par les cellules myéloïdes dans le contexte tumoral peut inhiber des réponses lymphocytaires T anti-tumorales. De plus, l'expression de NOS2 dans les cellules myéloïdes peut induire d'autres fonctions, en particulier réguler le métabolisme des cellules dendritiques (DCs).

III.2.1.1) Lutte contre les pathogènes

L'expression de NOS2 par les macrophages leur permet d'exercer un rôle anti-bactérien, anti-viral et anti-parasitaire ([139]). D'autres populations de cellules myéloïdes (DCs, neutrophiles et éosinophiles) peuvent également lutter contre les pathogènes via l'expression de NOS2 ([156], [139]). Les mécanismes de défense anti-microbienne médiée par le NO sont en grande partie dus à la S-nitrosylation ([157]).
Le contrôle des agents infectieux par le NO dérivé de NOS2 n'implique pas nécessairement une mort et une élimination du pathogène. Dans le cas du parasite protozoaire *Leishmania major*, le NO entraine une réduction de l'activité métabolique microbienne ce qui limite la prolifération du pathogène *in vivo* et permet la résolution clinique de la maladie ([158]).

III.2.1.2) Suppression des réponses immunitaires dans le contexte tumoral

Les cellules myéloïdes associées aux tumeurs exercent des activités suppressives sur les réponses lymphocytaires T anti-tumorales. Ces cellules, principalement les MDSCs, génèrent la formation de RNS entrainant :

- la tolérance antigénique des cellules T αβ CD8$^+$: Nagaraj *et al.* ont démontré que le peroxynitrite produit par les MDSCs induisait la nitration du TCR et des molécules CD8 sur les lymphocytes T αβ CD8$^+$ par un mécanisme dépendant du contact cellulaire. Les MDSCs présentent l'antigène aux lymphocytes T αβ CD8$^+$ et provoquent la nitration des TCRs qui perdent alors la capacité de reconnaître les complexes CMH-peptides présentés par les cellules tumorales. Ainsi, les cellules T αβ CD8$^+$ deviennent tolérantes à l'antigène et facilitent l'échappement tumoral ([159], [160]). Lu *et al.* ont également démontré que le peroxynitrite dérivé des MDSCs entrainait la nitration du complexe CMH-peptide de la cellule tumorale. Cette modification réduit la capacité de lier des peptides antigéniques et limite la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T cytotoxiques ([161]).

- l'inhibition de la prolifération : Mazzoni *et al*. montrèrent que le NO produit par une lignée de cellules myéloïdes suppressives inhibait la prolifération des lymphocytes T en interférant avec la signalisation en aval du récepteur à l'IL-2. Les auteurs ont émis l'hypothèse que la S-nitrosylation de cystéines pouvait expliquer ce phénomène ([162]).

- **l'inhibition du recrutement des lymphocytes T au niveau de la tumeur :** Molon *et al.* ont démontré que le peroxynitrite dérivé du NO induisait la nitration de la chimiokine CCL2 altérant la migration intra-tumorale des lymphocytes T effecteurs ([163]).

III.2.1.3) NO dérivé de NOS2 et métabolisme

Peu de données sont actuellement disponibles sur le rôle de NOS2 dans le contrôle du métabolisme des cellules immunitaires. Néanmoins, le NO dérivé de NOS2 a été récemment identifié comme un régulateur métabolique important dans les DCs dérivées des monocytes inflammatoires. En effet, Everts *et al*. ont montré que le NO inhibait la respiration mitochondriale dans les DCs. Ainsi, les DCs produisant du NO utilisent préférentiellement la voie de la glycolyse plutôt que la respiration mitochondriale pour subvenir à leurs besoins énergétiques en ATP. Ce processus leur permet de maintenir leurs fonctions et leur survie en l'absence du fonctionnement de leur chaine respiratoire ([164]).

III.2.2) Effet du NO sur les lymphocytes T αβ

Le NO peut provenir de différentes sources dans l'organisme. Le NO peut avoir des effets opposés sur les lymphocytes T αβ selon qu'il provienne d'une source exogène (non généré par les lymphocytes T) ou endogène (c'est à dire produit par la cellule elle-même). A ma connaissance, l'effet de l'expression de NOS2 par les cellules T γδ primaires n'a pas été étudié.

III.2.2.1) Effets du NO exogène

a) Inhibition de la prolifération

Le NO généré par les cellules myéloïdes inhibe la prolifération et limite les réponses lymphocytaires T anti-tumorales (voir introduction paragraphe III.2.1.2)).

Les cellules souches mésenchymateuses (MSCs) induisent une immunosuppression. En effet, en réponse à une stimulation cytokinique (IFN-γ, TNF-α, IL-1α, IL-1β), les MSCs activées expriment NOS2 et produisent des chimiokines responsables de l'attraction des cellules T à proximité des MSCs. Le NO relargué par les MDSCs inhibe fortement la prolifération des cellules T *in vitro* et *in vivo* ([165]). De la même manière, dans un ganglion inflammatoire, les cellules fibroblastiques réticulaires et les cellules endothéliales lymphoïdes expriment NOS2 en réponse à l'IFN-γ secrété par les lymphocytes T αβ activés. Ces cellules stromales inhibent la prolifération de ces derniers par un mécanisme dépendant de NOS2, participant ainsi à la résolution de l'inflammation ([166], [167]).

b) Effets sur l'expansion et la différenciation des lymphocytes T αβ

Les lymphocytes T αβ naïfs peuvent se différencier en lymphocytes T effecteurs de type Th1, Th2, Th9, Th17 ou Treg. Le NO exogène influence chacune de ses sous-populations exceptées les Th2 :

- Th1 : deux fonctions opposées du NO produit par NOS2 sur les cellules Th1 ont été décrites. Dans le cadre d'une infection par *Leishmania major*, les Th1 produisent de l'IFN-γ qui active la production de NOS2 par les macrophages. Ce NO inhibe alors la production d'IL-12 par les macrophages et indirectement l'expansion des Th1 ([168]). Cependant, des faibles doses de NO augmentent la différenciation en Th1 mais par en Th2 ([169]). Des travaux plus récents montrent également que des donneurs de NO et le NO dérivé de DCs $NOS2^+$ favorisent la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th1 ([170]).

- Th9 : dans des conditions de polarisation de lymphocytes T naïfs en Th9 (TGF-β+IL-4), la présence d'un donneur de NO (50 – 100 µM) promeut la génération de Th9 murins et humains *in vitro*. Dans un modèle d'asthme, les souris déficientes en NOS2 montrent une fréquence réduite de Th9. L'induction de l'IL-9 par le NO est reliée à l'augmentation de la production d'IL-2 ([171]).

- **Treg** : le NO peut induire une population de lymphocytes Treg appelée NO-Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^-$) à partir d'une population T $CD4^+CD25^-$. Les NO-Treg suppriment la prolifération et l'expansion des cellules T $CD4^+CD25^-$ *in vitro* et réduisent les effets de la colite et de l'arthrite chez la souris par un mécanisme dépendant de l'IL-10 ([30]). Un autre groupe montre que le NO en présence de TGF-β inhibe l'induction des lymphocytes Treg « classiques » $Foxp3^+$ pour potentialiser la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th1 ([170]).

- **Th17** : Yang *et al*. montrèrent, chez la souris, que le NO exogène (10 – 200 nM) empêche la différenciation des lymphocytes Th0 en Th17 ([147]), confirmant les données antérieures de Lee *et al.* ([170]). Dans les deux études, les Th17 sont induits en présence de TGF-β. Le mécanisme responsable de l'inhibition de l'expression de l'IL-17 a été démontré *in vitro* en utilisant des donneurs de NO. Le NO induit la nitration des résidus tyrosine de RORγt, inhibant sa capacité à activer le promoteur de l'IL-17 ([147]). En revanche, Obermajer *et al.* ont observé que des faibles doses de NO exogènes (10-25 mM) délivrées par des donneurs de NO ou par les MDSCs favorisaient le développement de cellules Th17 ([146]).

III.2.2.2) Effets du NO dérivé de NOS2 (NO endogène)

Deux groupes ont récemment fourni la démonstration de l'expression de NOS2 dans les lymphocytes T αβ $CD4^+$ dont les Th17 murins et humains. Néanmoins, ils sont parvenus à des conclusions opposées sur la fonction de l'expression de NOS2 par ces cellules.

Chez la souris, Yang *et al.* ont démontré que la stimulation du TCR par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 induisait l'expression *in vitro* de NOS2 dans les lymphocytes T αβ $CD4^+$, seule ou en combinaison avec l'IL-6 et le TGF-β (conditions de polarisation en Th17) (table 2). La différenciation *in vitro* des lymphocytes T naïfs en Th1, Th2 ou Treg n'est pas affectée par la déficience de ces cellules en NOS2, tandis que le développement en Th17 est fortement augmenté. Les auteurs ont montré que l'expression de NOS2 endogène inhibait la production d'IL-17 par un mécanisme résultant de la nitration des tyrosines du facteur de transcription RORγt. NOS1 ou NOS3 n'ont pas d'effet détectable sur ce mécanisme ([147]).

Chez l'homme, Obermajer *et al.* ont montré également que les lymphocytes T αβ CD4$^+$ exprimaient NOS2 de manière endogène en réponse à la stimulation de leur TCR avec ou sans ajout de cytokines induisant la différenciation des lymphocytes T naïfs en Th17 (IL-1β, IL-6, IL-23). De manière importante, la stimulation du TCR et l'ajout de TGF-β seul ou en plus de l'IL-β, IL-6 et IL-23 inhibe l'expression de NOS2 et la production d'IL-17. Le NOS2 endogène favorise la production d'IL-17 par un mécanisme dépendant de la voie de signalisation NO/GMPc ([146]).

Le rôle du NO sur les lymphocytes T est complexe. Il semble dépendre de la source, endogène ou exogène, de production du NO et probablement de la dose de NO. Toutefois, les résultats concernant l'action du NO sur les Th17 et les Treg paraissent contradictoires. En considérant les résultats des différents groupes en tenant compte de la présence ou non de TGF-β dans les cultures, on constate que les différenciations en Treg et en Th17 sont diminuées quand les cellules sont en présence de NO et de TGF-β ([147]), ([170]), mais qu'elles sont augmentées en présence de NO seul (absence de TGF-β) (([30]), [146]). Ainsi, le TGF-β pourrait déclencher les actions médiées par le NO comme la nitration des résidus tyrosine. Les effets du NO endogène sur la différenciation des T αβ sont récapitulés sur la figure 10.

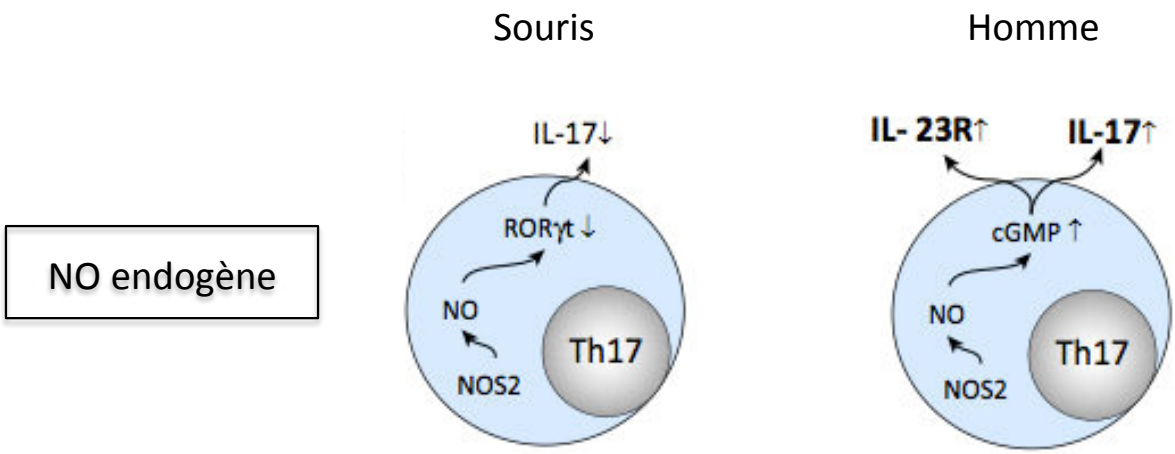


Figure 10 : Effets du NO endogène dérivé de NOS2 sur la différenciation des lymphocytes T αβ CD4$^+$ en Th17 chez l'homme et chez la souris. L'expression de NOS2 endogène entrave la différenciation des cellules Th17 chez la souris en inactivant le facteur de transcription RORγt. Chez l'homme, les cellules Th17 (mémoires) expriment NOS2 et produise du NO activant la guanylate cyclase. Le GMPc en résultant aide à maintenir l'expression de l'IL-17 et du récepteur à l'IL-23, c'est à dire le phénotype de cellules Th17. *D'après Bogdan, 2015* ([139]).

III.2.3) NOS2 et les lymphocytes B

Les lymphocytes B et les plasmocytes expriment NOS2 en réponse au LPS et à l'IL-6 respectivement ([149], [148]). Saini *et al.* ont observé que la sécrétion des anticorps est plus faible en l'absence de NOS2. Ils ont ainsi montré que NOS2 favorise la survie des plasmocytes ([148]).

III.3. Effets ambivalents du NO dérivé de NOS2 dans le cancer, focus sur le mélanome

Les sources de NO dans le microenvironnement tumoral sont multiples : cellules stromales, immunitaires (MDSCs et lymphocytes) et tumorales. Plusieurs études ont montré que le NO peut à la fois promouvoir et inhiber la croissance tumorale et la formation de métastases. Les effets du NO dans la tumeur semblent dépendre de l'activité des isoformes de NOS, de la concentration du NO, de la durée d'exposition au NO et de la sensibilité de la cellule tumorale au NO.

III.3.1) Effets du NO sur la transformation cellulaire néoplasique

L'exposition chronique des cellules au NO dérivé de NOS2 peut promouvoir la transformation cellulaire néoplasique. Le NO et les RNS induisent un stress cellulaire conduisant potentiellement à des lésions de l'ADN (modifications des acides nucléiques, coupures des brins d'ADN, …) et à l'inhibition des enzymes de réparation de l'ADN ([172]). Par ailleurs, la S-nitrosylation des caspases peut rendre les cellules résistantes à l'apoptose, ce qui favorise l'accumulation des mutations engendrées par les lésions à l'ADN et, par conséquent, la transformation ([173]). En parallèle, les dommages à l'ADN causés par le NO peuvent entrainer la mort de la cellule transformée, le NO devient alors un frein à la tumorigénèse dans plusieurs modèles de cancers ([174], [175], [176]).

III.3.2) Effets du NO sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique

III.3.2.1) Sur les tumeurs

Les souris déficientes en Nos2 (Nos2KO) développent des plus grosses tumeurs que les souris sauvages (WT) après des injections sous-cutanées de cellules de mélanome B16-

BL6. En revanche, lorsque ces cellules sont injectées en intra-veineuse, les souris Nos2KO forment moins de foyers tumoraux pulmonaires que leurs homologues WT. Ces données indiquent un rôle différent de NOS2 sur la croissance tumorale et sur la dissémination métastatique dans le mélanome ([177]). Tandis que NOS2 semble promouvoir la formation de métastases dans le mélanome, Xie *et al.* montrent que l'expression de NOS2 recombinante dans les cellules murines de mélanome K-1735 diminue leur pouvoir métastatique ([178]). Ces résultats sont en accord avec une étude précédente révélant que les cellules non métastatiques de mélanome présentent une grande activité de NOS2 contrairement aux cellules métastatiques de mélanome ([179]).

III.3.2.2) Sur l'angiogenèse

L'angiogenèse favorise la croissance tumorale et la dissémination métastatique ([180]). Le NO produit par les cellules tumorales ou stromales exerce plusieurs effets sur l'angiogenèse. Il augmente la synthèse d'ADN, la prolifération cellulaire et la migration des cellules endothéliales par la voie de signalisation NO/GMPc et la S-nitrosylation ([181], [182], [183]). Plusieurs études ont montré que l'induction de NOS2 dans les cellules tumorales ou le stroma favorisait la formation de vaisseaux dans la tumeur en augmentant l'expression de facteurs pro-angiogéniques comme VEGF ou le bFGF (basic fibroblast growth factor), permettant ainsi la dissémination métastatique ([184]). En utilisant l'injection en sous-cutanée de cellules B16-F1, Konopka *et al.* ont montré que l'expression de NOS2 par les cellules de l'hôte (stromales ou immunes) contribuait à la croissance du mélanome *in vivo* en favorisant l'expression du VEGF ([185]).

III.3.3) Effets du NO sur les réponses immunitaires

Dans le contexte tumoral, le NO produit par les cellules myéloïdes peut induire une tolérance des lymphocytes T αβ $CD8^+$ spécifiques des tumeurs, inhiber la prolifération des lymphocytes T ou limiter le recrutement intra-tumoral des lymphocytes T. Cependant, des faibles doses d'irradiation induisent l'expression de NOS2 par les macrophages du microenvironnement tumoral. Ces cellules orchestrent alors le recrutement des lymphocytes T cytotoxiques et l'élimination des cellules tumorales par un mécanisme dépendant du NO dans plusieurs modèles de cancers ([16]).

Le NO produit par les cellules métastatiques de mélanome B16-BL6 réduit les réactions lymphocytaires dans les souris transplantées, ce qui facilite l'échappement immunitaire et la dissémination métastatique ([186]). Il inhibe également l'expression de CXCL10 sur les

cellules de mélanomes limitant le recrutement des cellules immunitaires ([187]). Les cellules de mélanome dérivées de métastases de souris Ret, développant spontanément un mélanome métastatique, exprimant NOS2 sécrètent du VEGF. Le VEGF permet le recrutement et l'activation des MDSCs dans la tumeur ([188]).

Ainsi, dans le mélanome, lorsque le NO est produit par les cellules myéloïdes, il peut inhiber et favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale. Lorsqu'il est produit par les cellules tumorales, il semble par contre favoriser l'immunosuppression uniquement. A ma connaissance, aucune étude n'a été publiée analysant le rôle de l'expression de NOS2 par les cellules lymphoïdes sur la progression tumorale.

IV. Contexte et objectifs des travaux de thèse

L'effet du NO dérivé de l'expression de NOS2 a principalement été étudié dans des modèles expérimentaux de tumeurs transplantées, et son rôle au cours de la progression du mélanome reste complexe et controversé. Son expression par les cellules tumorales et les cellules myéloïdes peut à la fois conduire au contrôle de la progression tumorale ainsi qu'à l'inhibition des réponses anti-tumorales. Pourtant, dans les mélanomes cutanés et uvéaux, l'expression de NOS2 est associée à un mauvais pronostic clinique ([189], [190], [191]).

Les objectifs de mes travaux de thèse étaient de comprendre comment l'expression de NOS2 affectait le développement du mélanome en focalisant mon attention sur la modulation des populations immunitaires au cours de la progression tumorale.

Pour appréhender cette question, le modèle expérimental utilisé est une souris transgénique exprimant constitutivement la forme active du proto-oncogène humain Ret. Les souris Ret développent spontanément un mélanome uvéal métastatique ([18]). Dans ce modèle initialement établi par Kato et ses collaborateurs, l'activation constitutive de Ret, une chaine de signalisation à activité tyrosine kinase, entraine l'activation des cascades de signalisation favorisant la survie (voie RAS-BRAF-ERK) ou la motilité cellulaire (voie PI3K) ([192]). Les mutations de l'oncogène Ret prédisposent au développement de pathologies cancéreuses telles que le neuroblastome ou encore les néoplasies endocrines multiples de type II, forme héréditaire des carcinomes médullaires de la thyroïde. Plus récemment, le développement du mélanome humain a été associé à des mutations activatrices de Ret ([193]). Les premières lésions atteignent l'uvée (choroïde ou corps ciliaire) d'un œil, puis dans les 2 semaines l'œil controlatéral ([18]). Après quelques semaines, les cellules tumorales ayant disséminé vont former des métastases cutanées sur la face et le dos de l'animal, et des métastases à distance avec des atteintes le plus souvent médiastinales et/ou viscérales ([194]). Nous avons généré, en croisant une souris Ret avec une souris inactivée pour Nos2, des souris RetNos2KO qui développent spontanément un mélanome métastatique et dans lesquelles l'ensemble des cellules est inactivé pour le gène Nos2.

Après avoir observé que la déficience en NOS2 améliorait la survie des souris et ne bloquait pas la formation de la tumeur primaire, mais limitait plutôt la dissémination métastatique, je me suis intéressée à **caractériser les populations immunitaires infiltrant les tumeurs primaires des souris Ret et RetNos2KO**. Par comparaison de l'ensemble des cellules lymphoïdes et myéloïdes, seules deux populations étaient statistiquement diminuées dans les tumeurs primaires des souris RetNos2KO : les lymphocytes T γδ et les PMN-

MDSCs. L'objectif suivant a été **de déterminer si les PMN-MDSCs favorisaient le processus métastatique par un mécanisme dépendant de NOS2**. En effet notre équipe en collaboration avec Toh *et al.* a montré le rôle crucial de ces PMN-MDSCs dans la dissémination métastatique chez les souris Ret ([56]).

Notre première hypothèse de travail était la suivante : les PMN-MDSCs de souris Ret ont-ils des capacités d'inhibition des réponses anti-tumorales plus importantes que ceux dérivés des souris RetNos2KO ? Mes résultats expérimentaux ont permis d'exclure cette hypothèse. Cela est en accord avec les données de la littérature décrivant que les PMN-MDSCs expriment d'importantes quantités de ROS et de faibles quantités de NO. A l'inverse, les M-MDSCs se caractérisent par une importante production de NO et une très faible expression de ROS ([48]).

Je me suis alors intéressée **aux lymphocytes T γδ et aux modulations de leurs fonctions engendrées par NOS2**. Seuls deux articles avaient exploré le rôle de l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ auparavant. Ces articles, en plus de fournir des résultats contradictoires, reposent sur l'utilisation de clones de lymphocytes T γδ humains amplifiés *in vitro* avec des agonistes de leur TCR et une source exogène d'IL-2. Le premier groupe montre que l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ entraine leur apoptose ([195]). Le second groupe n'a pas détecté l'expression de NOS2, mais uniquement celle de NOS3 dans les lymphocytes T γδ et montre que le NO endogène confère une protection contre l'apoptose ([196]). L'originalité de mon travail repose en partie sur l'étude de lymphocytes T γδ primaires issus de souris sauvages (WT ou Ret) ou inactivées pour NOS2 (Nos2KO et RetNos2KO) afin de déterminer l'impact de NOS2 sur la fonction de ces cellules dans les contextes physiologique ou de développement tumoral.

Les résultats de mes travaux ont donné lieu à la rédaction d'un article, actuellement soumis à publication. Ces données sont détaillées dans la partie « Résultats » de ma thèse.

Résultats

Article soumis à publication

Endogenous nitric oxide synthase 2 (NOS2) induces the expansion of pro-tumor γδ T cells

Cet article est actuellement en soumission. J'ai présenté les principaux résultats de ce travail au cours d'une communication orale lors du congrès international du centre de recherche contre le cancer de Lyon (CRCL) en septembre 2015.

Les lymphocytes T γδ sont des acteurs majeurs de l'immunosurveillance, en particulier grâce à leur production d'IFN-γ et leur capacité de lyse des cellules tumorales. Cependant, de plus en plus d'études leur attribuent des fonctions pro-tumorales principalement médiées par leur production d'IL-17. Les lymphocytes T γδ producteurs d'IL-17 (Tγδ17) favorisent le recrutement des PMN-MDSCs et par conséquent la dissémination métastatique.

Pourtant, selon le microenvironnement tumoral dans lequel les cellules T γδ sont polarisées, les Tγδ17 peuvent favoriser ou inhiber le développement tumoral, ajoutant un niveau de complexité supplémentaire pour discriminer les effecteurs T γδ anti-tumoraux des effecteurs T γδ anti-tumoraux. Nous avons émis l'hypothèse qu'il existait un facteur intrinsèque aux lymphocytes T γδ nécessaire à leur polarisation en cellules pro-tumorales. Nous avons identifié, la synthétase de l'oxyde nitrique de type 2 (NOS2) comme étant un candidat potentiel en raison des effets qu'elle exerce sur la production d'IL-17 par les lymphocytes Th17.

Nous montrons pour la première fois que les lymphocytes T γδ expriment NOS2 *in situ* dans les tumeurs primaires de mélanome chez l'homme. Pour analyser les effets de l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ dans le mélanome, nous avons utilisé un modèle murin développant spontanément un mélanome métastatique (souris Ret). Comme chez l'homme, des lymphocytes T γδ $NOS2^+$ sont retrouvés *ex vivo* dans les tumeurs primaires. En croisant, les souris Ret avec des souris inactivées pour le gène Nos2, nous avons établi les souris RetNos2KO. La survie des souris RetNos2KO est significativement augmentée en raison d'un délai dans l'apparition de la tumeur primaire et de l'inhibition de la dissémination métastatique. L'inactivation du gène Nos2 entraine les diminutions significatives des PMN-MDSCs et des lymphocytes T γδ infiltrant la tumeur primaire. Par ailleurs, l'inactivation de Nos2 ne module pas significativement les fonctions suppressives des PMN-MDSCs, mais impacte plusieurs fonctions des lymphocytes T γδ. Ainsi, les lymphocytes T γδ déficients en NOS2 sécrètent peu d'IL-17 et ont des capacités de sécrétion d'IFN-γ et de lyse des cellules tumorales significativement plus élevées que leurs

homologues exprimant NOS2. L'ensemble de ces données montre que l'expression de NOS2 polarise les lymphocytes T γδ vers un profil pro-tumoral.

Pour expliquer la diminution du nombre de lymphocytes T γδ dans les tumeurs primaires et les ganglions drainant la tumeur des souris RetNos2KO, nous avons analysé le pool des lymphocytes T γδ dans des souris Nos2KO non tumorales. Le nombre et la proportion des lymphocytes T γδ sont significativement diminués dans les ganglions périphériques des souris Nos2KO en comparaison aux souris sauvages (WT). Après avoir exclu une séquestration thymique et une augmentation de la mortalité, nous avons observé que les lymphocytes T γδ déficients en NOS2 avaient des capacités de prolifération *in vitro* réduites. Le NO endogène produit par les lymphocytes T γδ accroit leur capacité à proliférer. Pour expliquer les mécanismes mis en jeu, nous avons évalué le métabolisme glycolytique et la respiration mitochondriale. La déficience en NOS2 limite uniquement le métabolisme glycolytique des lymphocytes T γδ. Nous montrons donc que l'expression de NOS2 endogène est nécessaire pour optimiser le métabolisme glycolytique et accroitre la prolifération des lymphocytes T γδ. Lorsqu'on ajoute une source exogène d'IL-2, les lymphocytes T γδ déficients en NOS2 retrouvent les mêmes taux de prolifération et de glycolyse que leurs homologues exprimant NOS2. L'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ favorise leur capacité à produire de l'IL-2 en réponse à une stimulation PMA / ionomycine.

En prenant en compte l'ensemble de ces résultats, nous avons mis en évidence que l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ était nécessaire à leur polarisation en effecteurs pro-tumoraux et permettait leur expansion *in vivo* par un mécanisme dépendant de l'IL-2.

Endogenous nitric oxide synthase 2 (NOS2) induces the expansion of pro-tumor γδ T cells

Laetitia Douguet[1–3], Lloyd Bod[1–3, 9], Julien Cherfils-Vicini[4, 5, 9], Renée Lengagne[1–3, 9], Laura Labarthe[1–3, 6], Eric Gilson[4, 5], Masashi Kato[7], Marie-Françoise Avril[1–3, 8] & Armelle Prévost-Blondel[1–3]

[1]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), U1016, Institut Cochin, Paris, France

[2]Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), UMR8104, Paris, France

[3]Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

[4]Institute for Research on Cancer and Aging, Nice, Nice University, CNRS UMR7284-INSERM U1081, University of Nice, Nice, France

[5]Department of Medical Genetics, Archet 2 Hospital, CHU of Nice, Nice, France

[6]Ecole Normale Supérieure, Cachan, France

[7]Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Aichi, Japan

[8]Cochin Hospital, 75014 Paris, France

[9]These authors contributed equally to this work

Corresponding author: Correspondence should be addressed to Armelle Prévost-Blondel (Cochin Institute, 75014 Paris, France. 33-1-40516590, armelle.blondel@inserm.fr).

The authors have declared that no conflict of interest exists.

ABSTRACT

While the pro-tumor functions of γδ T cells are mainly attributed to their capacity to produce interleukin (IL)-17, the mechanism underlying the polarization of γδ T cells toward a pro-tumor phenotype remains unknown. Here we identified nitric oxide synthase 2 (NOS2) as a key inductor of IL-17 production by γδ T cells in melanoma. Endogenous NOS2 expression by γδ T cells was detected in primary tumors from patients and Ret mice that develop a spontaneous metastatic melanoma. γδ T cells expressing NOS2 exhibited a reduced tumor cell lysis activity and favored the recruitment of polymorphonuclear myeloid-derived suppressive cells (PMN-MDSC) within primary tumors inducing melanoma cell dissemination. Interestingly, NOS2-deficient γδ T cells displayed reduced proliferation and glycolytic capacities that are reversed by exogenous IL-2 addition. Our results showed that NOS2 promotes the expansion of γδ T cells *in vivo* through an IL-2 dependent mechanism. We suggest that the inflammatory tumor microenvironment (IL-1β, IL-6 and/or T cell receptor (TCR) triggering) activates γδ T cells to express endogenous NOS2 resulting in the expansion of pro-tumor γδ T cells.

INTRODUCTION

γδ T cells have long been considered involved in tumor immunosurveillance. In addition to their capacity to kill tumor cells, γδ T cells produce interferon-γ (IFN-γ) that mediates anti-tumor properties[1]. However, whether γδ T cells favor or inhibit tumor progression remains controversial[2-4]. In particular in melanoma, although γδ T cells were found to massively infiltrate human primary tumors[5], murine γδ T cells either exert anti-tumor properties[2,6] or promote tumor escape in the B16 transplantable model[3]. Their pro-tumor functions have been further revealed in colon and breast cancers, as their presence positively correlates with tumor severity[7]. Their action on tumor outgrowth is attributed to their capacity to secrete interleukin (IL)-17 (reviewed in[8]). However, the mechanism inducing the polarization of γδ T cells toward a pro-tumor phenotype needs to be deciphered.

Nitric oxide synthase 2 (NOS2) that catalyzes the production of nitric oxide (NO) was identified as a potent candidate owing to its effects on IL-17. Indeed, endogenous NOS2 expression has recently been discovered in both mouse and human $CD4^+$ T cells producing IL-17 (Th17)[9,10]. Autocrine NOS2 inhibited the polarization of murine Th17[9], whereas it was required for inducing and maintaining the Th17 phenotype of human $CD4^+$ T lymphocytes[10]. Various cell types such as immune, stromal and tumor cells express NOS2 after induction by pro-inflammatory factors in myeloid cells or T cell receptor (TCR) triggering in $CD4^+$ T cells. Its expression by primary γδ T cells was not yet described.

The present study reveals for the first time that melanoma infiltrating γδ T cells express NOS2 in humans and mice and that TCR triggering leads to NOS2 expression by naive γδ T cells. We report that NOS2 amplifies their pro-tumor properties and controls proliferation and glycolytic metabolism of γδ T cells through an IL-2 dependent mechanism. Thus, our findings identify NOS2 as a key actor in the expansion and polarization of pro-tumor γδ T cells.

RESULTS

γδ T cells infiltrating primary melanomas express NOS2

A recent study[5] and our *in situ* analyses showed that γδ T cells infiltrate human primary melanomas (**Figure 1A and Supplementary Table 1**). Here we investigated whether NOS2 was expressed by melanoma infiltrating γδ T cells (**Figure 1**). A total of 14 biopsies from primary lesions of patients with local (stage 0-2, n=11) or metastatic (stage 3-4, n=3) melanoma were analyzed. The clinical data and results of immunofluorescence are summarized in **Supplementary Table 1**. An arbitrary cut-off of γδ T cells per microscopic field was used to define tumors as highly (+++ to ++) or weakly (rare to +) infiltrated by γδ T cells. No γδ T cells were observed in one patient (#6). We detected NOS2 positive γδ T cells *in situ* in 12 out of the 13 primary melanomas. NOS2 positive γδ T cells were rare in seven patients, significant in four of them, and very abundant in one patient (#13). These cells were located either in the tumor periphery or in the tumor nest (**Figure 1A**).

We choose to study the consequences of this endogenous NOS2 expression in a spontaneous model of melanoma. Ret mice develop metastatic melanoma due to transgenic expression of a constitutively activated form of the human RET oncogene[11-13]. *Ex vivo* immunofluorescence experiments on RET primary tumors highlighted γδ T cells positive for NOS2 (**Figure 1B**). Consequently, we assessed if NOS2 affects the role of tumor infiltrating γδ T cells by setting up a new model of spontaneous melanoma in which NOS2 was inactivated (RetNos2KO mice).

γδ T cells expressing NOS2 correlate with PMN-MDSC in tumors

First, we found that NOS2 deficiency significantly reduced the proportion of γδ T cells in primary tumors (**Figure 2A**). The follow up of melanoma progression showed that

RetNos2KO mice survived better than Ret mice (**Figure 2B**). NOS2 deficiency does not block tumor formation but delays primary tumor onset (**Figure 2C**) and slows down tumor cell dissemination at skin and distant sites (**Figure 2D and Supplementary Table 2**). Micro-metastases at distant sites, revealed by trp2 and tyrosinase expression, were detected only in Ret mice excluding a better control of tumor cell dormancy in RetNos2KO mice (**Supplementary Figure 1**).

We have previously shown that MDSC are responsible for tumor cell dissemination in the Ret model[14]. The frequencies of dendritic cells (DC), macrophages and monocytic MDSC were not significantly modulated by NOS2 inactivation. In striking contrast, PMN-MDSC poorly infiltrated primary tumors in RetNos2KO mice compared with Ret mice (**Figure 2E**). The tumor-induced immunosuppression was assessed with an *in vivo* cytolysis assay (**Supplementary Figure 2A**). Inhibition of target cell lysis was similar in wild type (WT) and *Nos2*$^{-/-}$ (Nos2KO) tumor-bearing mice displaying comparable tumor weights. Our results show that NOS2 does not significantly improve the global immunosuppression, but rather promotes tumor cell dissemination by favoring PMN-MDSC recruitment within the primary tumor. Because the proportions of tumor infiltrating γδ T cells and PMN-MDSC are highly reduced in RetNos2KO mice, we analyzed the correlation between these populations. When NOS2 is functional there was a positive correlation between the numbers of γδ T cells and PMN-MDSC, whereas no correlation was observed in primary tumors from RetNos2KO mice (**Figure 2F**). Our results suggest that endogenous NOS2 expression by γδ T cells allows the recruitment of PMN-MDSC in primary melanoma.

Finally, we assessed how PMN-MDSC are recruited by analyzing cytokine profiles of proteins extracted from primary tumors (**Figure 2G and Supplementary Figure 2B**). The levels of IL-12, IFN-γ, IL-10, and tumor necrosis factor-α were quite similar in both groups. Vascular endothelial growth factor (VEGF) was statistically more abundant in Ret mice

consistent with the higher tumor cell dissemination (**Figure 2D**). More interestingly, tumor lysates from Ret mice contained much more keratinocyte-derived cytokine (KC), involved in PMN recruitment, and granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), a key regulator in PMN biology. IL1-β and IL-6, known to stimulate IL-17 from lymphocytes, were also up-regulated when NOS2 was functional. Our findings evidence that NOS2 favors the massive infiltration of PMN-MDSC within primary tumors by promoting an inflammatory microenvironment that may support a Th17 and/or a γδT17 response.

NOS2 polarizes γδ T cells toward a pro-tumor phenotype

Ex vivo intracellular stainings were performed to determine which cells produce IL-17 in our melanoma model. After stimulation, immune cells from primary tumors (**Figure 3A**) and tumor dLNs (**Supplementary Figure 3 A and B**) of Ret mice produced much more IL-17 compared with their counterparts from RetNos2KO mice. Among IL-17-producing cells, the percentages and absolute numbers of γδ T cells were much more substantial than $CD4^+$ T cells both in tumors and tumor dLNs (**Figure 3 B and C and Supplementary Figure 3 A and B**). These results indicate that γδ T cells are the major IL-17-producing cells in melanoma. Interestingly, our data further indicate that NOS2 inactivation significantly reduced the pool of tumor-infiltrating γδT17 cells both in primary tumors and tumor dLNs. Alternatively, tumor infiltrating γδ T cells producing IFN-γ are more frequent in RetNos2KO mice than in Ret mice (**Figure 3D**). We further compared the ability of activated γδ T cells to control B16 melanoma cell proliferation *in vitro* over a 4 hour period (**Figure 3E**). γδ T cells from Ret mice killed less efficiently tumor cells than γδ T cells from RetNos2KO mice. Collectively, our data demonstrate that endogenous NOS2 expression enhances pro-tumor properties of γδ T cells by supporting IL-17 production and reducing their capacity to produce IFN-γ and to lyse tumor cells.

NOS2 regulates the pool of peripheral γδ T cells *in vivo*

To decrypt the mechanism involved in the low proportion of γδ T cells within the primary tumor and tumor dLNs of RetNos2KO mice (**Figure 2A and Supplementary Figure 3C**), we determined whether naive γδ T cells express NOS2 after TCR triggering. The staining of γδ T cells sorted from peripheral lymph nodes (pLNs) of WT mice and stimulated with CD3 and CD28-specific antibodies revealed a significant proportion of NOS2 expressing γδ T cells when compared with TCR sub-optimal stimulation (**Figure 4A**). This result prompted us to study the consequences of NOS2 deficiency in physiological context. The proportion and the absolute number of γδ T cells were significantly weaker in pLNs of Nos2KO mice compared to WT animals (**Figure 4B**). Thymus and skin contained the same γδ T cell pool excluding both thymus retention and skin relocation of γδ T cells in Nos2KO mice (**Figure 4 C and D**). Moreover, similar percentages of peripheral γδ T cells positive for annexin V were observed in both groups (**Figure 4E**), indicating that NOS2 deficiency did not increase γδ T cell death. These data support an intrinsic role of NOS2 *in vivo* in the regulation of the peripheral γδ T cell pool independently of the tumor microenvironment.

NOS2 deficiency impairs proliferation and glycolysis of γδ T cells

Next, we assessed if NOS2 derived from γδ T cells modulates their proliferation rate. Interestingly, 78% of WT γδ T cells proliferated, whereas only 62% of NOS2-deficient γδ T cells did (**Figure 5A**). WT γδ T cells treated with L-NMMA, a NOS inhibitor, proliferated to the same extent as their counterparts from Nos2KO mice, revealing the direct effect of endogenous NO (**Figure 5A**). The decreased percentage of proliferation in NOS2-deficient cells or following L-NMMA treatment was not due to higher cell mortality (**Figure 5B**). To investigate whether the reduced proliferation capacity of NOS2-deficient γδ T cells relies on a

metabolic failure, we compared the metabolic phenotypes of γδ T cells from WT and Nos2KO mice. We evaluated the oxygen-consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR), proportional to mitochondrial respiration and aerobic glycolysis, respectively. WT and NOS2-deficient γδ T cells displayed the same OCR at basal level and after addition of metabolic inhibitors (**Supplementary Figure 4**), suggesting that mitochondrial respiration is NOS2 independent. Both γδ T cells displayed increased ECAR following glucose addition (**Figure 5C**), but the glycolysis rate was about two fold less for NOS2-deficient γδ T cells (**Figure 5C**). Oligomycin was added to promote maximal ECAR. However, γδ T cells, expressing NOS2 or not, did not show any ECAR increase, indicating that they had already reached their maximal glycolytic capacity after glucose addition. Because of high levels of ECAR baselines, γδ T cells were then starved for 18 h before metabolic analysis (**Figure 5D**). WT γδ T cells performed significantly more glycolysis than NOS2-deficient γδ T cells or L-NMMA treated WT γδ T cells (**Figure 5D**) revealing a role of NOS2 in the control of this metabolic pathway. Collectively, these data show that NOS2 up regulates proliferation and glycolysis of γδ T cells and suggest that a more efficient glycolysis in NOS2 expressing γδ T cells may contribute to their better capacity to proliferate.

NOS2 controls γδ T cell expansion by promoting IL-2

To assess if the impairments of proliferation and glycolytic metabolism in NOS2-deficient γδ T cells could be rescued, γδ T cells were cultured or stimulated with IL-2 (**Figure 6 A and B**). NOS2-deficient γδ T cells proliferate as efficiently as WT γδ T cells after addition of exogenous IL-2 at the beginning of the culture (**Figure 6A**). The IL-2 stimulation globally increased ECAR at basal levels and after glucose and oligomycin addition in all conditions tested (**Supplementary Figure 5**). Interestingly, WT γδ T cells, L-NMMA treated WT γδ T cells, and NOS2-deficient γδ T cells displayed similar ECAR and glycolysis rates (**Figure**

6B), indicating that exogenous IL-2 rescued the impairment of glycolytic metabolism in NOS2-deficient γδ T cells. To understand how γδ T cells expressing NOS2 efficiently proliferate and perform glycolysis, we analyzed their capacity to produce IL-2 after stimulation. γδ T cells from pLNs and tumor dLNs of Nos2KO and RetNos2KO mice were less efficient in producing IL-2 than their WT counterparts (**Figure 6 C and D**). These results demonstrate that *in vivo* NOS2 up regulates the pool of peripheral γδ T cells through promoting their IL-2 dependent proliferation and glycolysis.

DISCUSSION

NOS2 expression was first described in myeloid cells exposed to pro-inflammatory factors (IFN-γ, lipopolysaccharide (LPS)). Later studies highlighted the induction of NOS2 in cell lines, clones or tumor cells of B and T cell origin[15]. However, whether primary T lymphocytes could produce NOS2 remained unknown until the recent demonstration that TCR-activated $CD4^+$ αβ T cells express NOS2[9,10]. Here, we demonstrate that both human and mouse γδ T cells display the capacity to express NOS2. This expression is acquired after TCR activation *in vitro* and can be observed without any stimulation in primary melanomas. Our data suggest that activation of naïve γδ T cells is required to induce NOS2, but whether the TCR or other pathways lead to NOS2 production by melanoma infiltrating γδ T cells remains questionable.

NOS2 expression has been associated with a poor prognosis in human cutaneous[16,17] as well as uveal[18] melanoma. Accordingly, RetNos2KO mice displayed a better survival than Ret mice owing to the significant delay of tumor cell dissemination, despite a comparable incidence of primary tumors in 6-month-old animals. As supported by our previous demonstration in the Ret model[14], the poor accumulation of PMN-MDSC at the primary tumor site explains, at least in part, the better control of metastasis formation in RetNos2KO mice. Our data suggest that γδ T cells expressing NOS2 recruit, expand, and favor differentiation and/or survival of PMN-MDSC in primary melanoma. Indeed, we demonstrate that tumor infiltrating γδ T cells are the major source of IL-17 in our spontaneous model of melanoma. Several groups have recently highlighted that γδT17 cells promote directly (or via cancer cell stimulation) the recruitment, expansion, differentiation and survival of PMN-MDSC both in mouse models of hepatocellular carcinoma[19] and breast cancer[20], and in human colorectal cancer[21]. In 2015, Coffelt *et al*. demonstrated that γδ T cell-derived IL-17

induced the G-CSF signaling cascade required for PMN-MDSC expansion[20]. Wu *et al.* showed that γδT17 cells produced interleukin 8 – the human equivalent of murine KC– to attract MDSC in colorectal cancer[21]. Moreover, Wakita *et al.* indicated that γδT17 cells promote angiogenesis via induction of VEGF secretion[22]. Taken with these data, our results support the hypothesis that, in melanoma, γδT17 cells via KC and G-CSF could recruit PMN-MDSC, which favor tumor cell dissemination in addition with the induction of VEGF secretion by γδT17 cells. Interestingly, our study revealed the crucial role of endogenous NOS2 for inducing γδT17 cells. NOS2 polarizes γδ T cells toward a pro-tumor phenotype including down-regulation of anti-tumor properties (i.e. IFN-γ production and tumor cell lysis). When compared with RetNos2KO mice, levels of IL-1β and IL-6 were significantly higher in the tumor microenvironment of Ret mice. These cytokines, in combination with interleukin 23 and tumor growth factor -β (TGF-β), are known to promote γδT17 cell polarization[21,23]. IL-1β has been recently identified as an inducer of NOS2 expression in mouse macrophages and other cell types (i.e. rat and human hepatocytes)[24] and IL-6 induces *Nos2* transcription in plasma cells[25]. We thus hypothesize that IL-1β and IL-6 and/or TCR triggering induce NOS2 expression in γδ T cells, involved in IL-17 expression and subsequent production of KC, G-CSF and VEGF by themselves or in the tumor microenvironment (**Supplementary Figure 6**).

Two previous studies investigated the function of autocrine NO production by human γδ T cells and gave rise to conflicting results. NOS3 protein, but neither NOS1 nor NOS2, was detected in γδ T cells and endogenous NOS3-derived NO was involved in γδ T cell protection from apoptosis[26]. On the other hand, NOS2 expression was found in γδ T cells upon stimulation with heat shock protein that led to their apoptosis through the mitochondrial death pathway[27]. Our study was performed on primary γδ T cells, whereas quoted works used γδ T

cell clones. This difference may explain why we failed to observe any effect on γδ T cell apoptosis, but rather highlighted an effect on γδ T cell expansion.

We show that NOS2 regulated the pool of peripheral γδ T cells *in vivo* independently of tumor microenvironment via promoting IL-2 production. A link between NO and the up-regulation of IL-2 was recently found in an αβ T cell subset (i.e. Th9 cells)[28]. However, NOS2 expressed by murine $CD4^+$ T cells does not regulate their number, and naïve $CD4^+$ T cells from WT and Nos2KO mice proliferate similarly after *in vitro* stimulation ([9] and our unpublished data). Proliferating T cells require adaptation of their metabolic programs to provide sufficient biosynthetic precursors and adequate energy. In particular, activated αβ T lymphocytes up-regulate aerobic glycolysis to rapidly grow and divide[29]. We found that endogenous NOS2 enhanced glycolysis in γδ T cells consistent with their efficient ability to proliferate *in vitro*. The effects of NOS2 on immune cell metabolism remain poorly described. Nevertheless, NOS2-derived NO was identified as a metabolic regulator in inflammatory DC[30]. Autocrine NO production by DC leads to a switch towards glycolysis as a consequence of inhibition of mitochondrial respiration. Glycolysis is linked to availability of nutrients such as glucose. Moreover, NO has been shown to enhance glucose uptake in the HEK293T cell line via up-regulation of the glucose transporter (GLUT) 3[31]. We hypothesized that NOS2 defective γδ T cells express fewer glucose transporters than WT γδ T cells, resulting in less capacity for glycolysis and subsequently reduced proliferation. Consistent with this, IL-2 promotes GLUT1 expression and glucose uptake in activated αβ T cells[29] and our data indicate that adding exogenous IL-2 restored the rate of glycolysis in NOS2 defective γδ T cells.

To date, studies investigating the role of NOS2 in the context of cancer mainly focus on NOS2 expressed by tumor cells or myeloid cells. Our data highlight for the first time that γδ T cells infiltrating primary tumors are a crucial source of NO both in human melanoma and in

our murine melanoma model. Endogenous NOS2 is a new key actor in the polarization of γδ T cells toward a pro-tumor profile. IL-6 and IL-1β might further up-regulate the expression of NOS2 by tumor infiltrating γδ T cells, but this hypothesis remains to be confirmed. Collectively, our data show that this source of NOS2 contributes to the NOS2-related poor prognosis in melanoma.

METHODS

Mice.

C57BL/6J (designated as WT) mice were purchased from Harlan and Jackson Laboratories. C57BL/6J *Nos2*$^{-/-}$ (designated as Nos2KO) mice were provided by Dr. Henri-Jean Garchon (Institut Cochin, France). WT and Nos2KO mice were used between 6 to 12 weeks of age. MT/ret$^{+/-}$ transgenic mice (called Ret later) that were on the C57BL/6J background expressed heterozygously the human RET oncogene. Ret mice were crossed with Nos2KO mice to obtain RetNos2KO mice. Clinical signs of mice were assessed twice a month. 3 to 7 month old mice were used for experiments. Mice were sacrificed at indicated times or when considered moribund (prostrated, bristly, skinny). All mice were maintained in our animal facility under specific pathogen-free conditions.

Human samples.

Cutaneous primary melanoma samples were obtained from patients at stages *in situ* to IV of the disease and were collected in two hospitals (Cochin and Bichat Hospitals, Paris, France). Patients were included if the size of the primary tumor was large enough to allow both an adequate pathological analysis and to spare a fresh tumor sample for the research program. Altogether 14 primary melanomas were collected.

Melanoma cell lines and tumor inoculations.

The B16-F10 melanoma cell line (called B16 later) provided by Prof. I. Fidler (The University of Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, TX) was cultured in RPMI 1640+Glutamax (Gibco®), 10% FCS, 100 U ml^{-1} penicillin and streptomycin at 37°C, 5%

CO_2. Tumor cells were inoculated s.c. (1×10^6) into the flank of WT or Nos2KO mice. Tumors or were removed two weeks after tumor challenge.

Single cell suspension procedures.

LNs and thymus were mechanically dissociated, homogenized, and passed through a 100 µM cell strainer in 5% (vol/vol) FCS and 0.5% EDTA in phosphate-buffered saline (PBS). For skin suspensions, ears were collected and were cut in small parts and digested with 0.4 mg ml^{-1} liberase, 0.05 mg ml^{-1} collagenase D, and 0.1 mg ml^{-1} DNase I (Roche) for 1 h at 37°C. Tumors were mechanically dissociated and digested with 1 mg ml^{-1} collagenase D and 0,1 mg ml^{-1} DNase I for 20 min 37°C.

Culture of γδ T cells.

γδ T cells were sorted from peripheral LNs (pLNs). $CD4^+$, $CD8^+$ and $CD19^+$ cells were depleted using Dynabeads® (Invitrogen) before a negative sorting using Aria III cytometer (BD Biosciences). Highly purity of γδ T cells with untouched TCR was obtained. γδ T cells were cultured in RPMI 1640+Glutamax (Gibco®) with 10% FCS, 100 U ml^{-1} penicillin and streptomycin, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, non-essential amino acids, 50 µM 2-mercaptoethanol in 96 well plates at 37°C, 5% CO_2. When indicated 15 - 30 U ml^{-1} of rIL-2 and 15 µg ml^{-1} rIL-7 (R&D Systems) were used. Cells were cultured on plate-bound with 0.1 µg ml^{-1} anti-CD3ε (145-2C11) and 10 µg ml^{-1} anti-CD28 (37.51) (both from eBioscience).

Antibodies.

Following anti-mouse Abs were used for flow cytometry: FITC – conjugated anti-Ly6G (1A8), anti-B220 (RA3-632) and anti-IFN-γ (XMG1.2), PE – conjugated anti-δTCR (GL3) and anti-NK1.1 (PK136), APC- conjugated anti-CD45.2 (104), anti-CD11b (M1/70) and anti-

IL-2 (JES6-5H4) PerCP-Cy5.5 – conjugated anti-CD3 (145-2C11), anti-βTCR (H57-597), and anti-CD45.2 (104), Pacific Blue- conjugated anti-CD4 (RM4-5), V450-conjugated anti-Ly6C (AL-21), PE-Cy7-conjugated anti-CD11c (HL3), APC-H7-conjugated anti-CD8 (53-6.7), Alexa Fluor 700-conjugated anti-IL-17A (TC11-18H10). Abs were purchased from BD Biosciences except anti-CD11b, anti-B220 and anti-βTCR from eBioscience. NOS2 staining was performed using a primary goat anti-mouse Ab (M19 Santa Cruz) following by anti-goat PerCP conjugated Ab (Jackson immuno research).

Following purified anti-mouse Abs were purchased from eBioscience and used to deplete cells before γδ T cells cell sorting: anti-CD19 (eBio1D3), anti-CD8 (53-6.7), anti-CD4 (GK 1.5).

Microscopy was performed using primary Abs; rabbit anti-human **NOS2 (SP126, ThermoFisher Scientific), mouse anti-human γδ TCR (11F2, BD Biosciences),** biotin hamster anti-mouse γδ TCR (GL3, BD Biosciences) and rabbit anti-mouse NOS2 (Calbiochem). Alexa fluor 488-conjugated goat anti-rabbit (Jackson immuno research), Alexa fluor 546-conjugated goat anti-mouse (Life Technologies) and PE-conjugated streptavidine (BD Biosciences) were used as secondary Abs.

Cell staining and flow cytometry.

Surface staining was performed by incubating cells on ice, for 20 min, with saturating concentrations of labeled Abs in PBS, 5% FCS and 0.5% EDTA. Mouse cell-staining reactions were preceded by a 15-min incubation with purified anti-CD16/32 Abs (FcγRII/III block; 2.4G2) obtained from hybridoma supernatants. Intracellular cytokine staining were performed after stimulation of single cell suspensions with Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) **(50 ng ml^{-1}) (Sigma), ionomycin (0.5 µg ml^{-1}) (Sigma) and 1 µL ml^{-1} Golgi Plug™ (BD Biosciences) for 4 h at 37°C 5% CO_2. Cells were** incubated with Live/Dead Blue stain

(Invitrogen), according to the manufacturer protocol prior to Ab surface staining. Then, intracellular staining **was performed using Cytofix/Cytoperm^{TM} kit (BD biosciences) following the manufacturer's instructions.** γδ T cell apoptosis were assessed *ex vivo* by staining pLNs for FITC-conjugated annexin V (BioLegend) according to the manufacturer's instructions. **Data files were acquired and analyzed on LSRII using Diva software (BD Biosciences).**

Microscopy.

For mouse staining, hematopoietic cells were magnetically sorted from primary tumors of Ret mice with anti-CD45^{+} MicroBeads (Miltenyi Biotec). Then, hematopoietic cells were centrifuged onto a microscope slide using Cellspin 1 (Tharmac). For human staining, **sections of 7 µm thickness were obtained from frozen biopsy of melanoma.** Non-specific reactivity was performed with incubation of PBS, 1% BSA for 20 min at room temperature (RT). Primary Abs were incubated 1 h at RT. Then, slides were washed in PBS, 1% BSA before being incubated with the appropriate conjugated secondary Ab for 30 min at RT. Finally nuclei were labeled with DAPI and slides were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Labs). Images were acquired using a confocal imaging microscope (Leica DMI6000) using 10X, 40X or 100X objectives or with an automated high-resolution scanning system (Lamina™, PerkinElmer) with 40X objective. Acquisitions were performed with Metamorph software and images were analyzed with ImageJ and or Pannoramic Viewer (3DHISTECH).

Functional assays.

For γδ T cell proliferation, cells were labeled with 2.5 µM CFSE (Molecular Probes) at 37°C for 7 min. Cells were seeded in a 96-well plate pre-coated with anti-CD3ε and anti-CD28. After incubation at 37°C for 48 h, cells were stained with Live/Dead Blue Stain (Invitrogen)

before being analyzed by flow cytometry for CFSE dilution. When indicated 15 U ml^{-1} rIL-2 (R&D Systems) or 10 mM L-NMMA (Cabiochem) were added to the cultures.

For metabolic assays, γδ T cells was sorted from WT and Nos2KO mice and cultured for 4 d in 0.1 μg ml^{-1} anti-CD3ε, 10 μg ml^{-1} anti-CD28, 15 μg ml^{-1} rIL-7 and 15 U ml^{-1} rIL-2. Metabolism analyses were performed directly or after 18 h of resting followed by 4 h of stimulation in media containing 5 mM L-NMMA and or 15 U ml^{-1} rIL-2 when indicated. **500 000 cells per well were plated in Seahorse plates coated with CellTak (Corning).** The OCR and ECAR were measured in XF medium (unbuffered RPMI containing 2 mM glutamine, pH 7.4) under basal conditions and in response to glucose (25 mM), oligomycin (1 μM), FCCP (1.5 M) plus pyruvate (1 mM) and antimycin A (1 μM) plus rotenone (0.1 μM) with an XF-24 Extracellular Flux Analyzer (Seahorse Bioscience). Rate of glycolysis was defined as the difference between ECAR following the injection of glucose and the basal ECAR reading.

For *in vivo* lysis assay**,** WT and Nos2KO mice were transplanted, or not, subcutaneously with 10^6 B16 melanoma cells. 8 days later, mice were immunized with the OVA peptide (257–264) emulsified in incomplete Freund's adjuvant. Six days later, syngeneic donor splenocytes (target cells) were loaded or not with $OVA_{257–264}$, labeled with a low or a high dose of CFSE respectively, and adoptively transferred at a 1:1 ratio in immunized mice. One day later, the percentage of $CFSE^+$ donor cells among recipient peripheral blood lymphocytes was determined using FACS analysis. Donor cell rejection (i. e.: lysis) was calculated using the formula: 100 - ((% of CFSE lo / % of CFSE high in immunized mice / % of CFSE lo / % of CFSE high in naive mice) x 100). Percentages of inhibition of lysis were calculated using the formula: ((% of lysis in non transplanted mice - % of lysis in transplanted mice)/% of lysis in non transplanted mice) x 100.

Cytotoxicity capacity of γδ T cells was explored using the xCELLigence System (Roche)[32]. The system dynamically measures electrical impedance across microelectrodes integrated on specific 96 well plates (E-plates). The impedance values, expressed as cell index (CI), provide quantitative information of cell adhesion, number, and morphology. γδ T cells were sorted from pLNs from Ret and RetNos2KO mice, then cultured for 48 h with 0.1 μg ml^{-1} anti-CD3ε and 10 μg ml^{-1} anti-CD28 and 15 U ml^{-1} rIL-2. B16 (5.10^4 cells) were seeded into wells of E-plates. After adhesion of tumor cells (4 h), 2.10^4 γδ T cells were added to the cultures. Tumor cell proliferation was dynamically monitored every 30 min for up 4 hours. Results are expressed as percentage of lysis determined from cell index (CI) normalized with RTCA Software (nCI): $[(nCI\ (B16)_{t=4h} - nCI\ (B16 + \gamma\delta\ T\ cell)_{t=4h} / nCI\ (B16)_{t=4h})]\times 100$.

Protein quantifications.

Quantitative determination of IFN-γ, IL-12, IL-10, TNF-α, VEGF, G-CSF, KC, IL-1β, IL-6, and IL-17 concentrations were performed in aqueous humor using kits from R&D Systems or Meso Scale Discovery according to supplier instructions. For aqueous humor collection, primary tumors from Ret and RetNos2KO mice were mechanically dissociated in 150 μl of PBS and frozen until use.

qRT-PCR.

RNA was extracted from primary tumor, tumor draining LNs and bladder as previously described[33]. Quantitative PCR was carried out using fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and a real time PCR system (Light Cycler 1.5, Roche Diagnostics, Division Applied Sciences, Meylan, France) according to standard PCR conditions. Gene expression was normalized to GAPDH expression. Trp2 and tyrosinase expressions were measured as previously described[33].

Statistics.

Data are expressed as mean ± **SEM**. The significance of differences between two series of results was assessed using the Mann-Whitney test. Comparison between survival or incidence curves was performed using **Mantel-Cox** log-rank and **Gehan-Breslow-Wilcoxon tests**. Linear correlations were evaluated with Perason test. (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$). All statistical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad).

Study approval.

Mice experiments were carried out in accordance with the guidelines of the French Veterinary Department and were approved by the Paris-Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation (decision CEEA34.AB.038.12).

The study protocol was approved by the ethics committee CPP Ile de France III (N° Am5937-3-2834) (EUDRACT 2010-A00838-31) and the study was performed according to the Declaration of Helsinki Principles. Patients who had to be treated surgically for a primary melanoma were informed of the objectives of the study and signed a written consent before inclusion.

AUTHORS CONTRIBUTION

L.D., L.B., J.C.V., R.L., and L.L. did experiments; L.D., J.C.V., and A.P.B., designed the study with the help of E.G., M.K., and M.F.A. and L.D., and A.P.B. wrote the manuscript; and all authors critically reviewed the manuscript.

Acknowledgments

We are grateful to Y. Richard and HJ. Garchon for critical review of the manuscript. We thank E. Donnadieu for his advices on microscopy experiments, B. Lucas for helpful discussions and E. Morgan for his technical support. We greatly acknowledge K. Labroquère, E. Maillard and M. Andrieu from the Cochin cytometry and Immunobiology facility, M. Favier from the Histology and Immunostaining facility, A. Lebon from the Cochin Animal core facility and L. Cervera from CytoMed, the flow cytometry facility of the Institute for Research on Cancer and Aging, Nice. We thank F. Boitier, N. Kramkimel, J. Chanal and E. Maubec for patient recruitment, patients who gave their consent to participate to this study, and C. Auger and D. Bourgeois from URC Paris Centre who contributed to the immumela project. This work was supported by a grant from the SILAB Jean Paufique foundation and the French Society of Dermatology. The materials of CytoMed were supported by le Conseil général 06, FEDER, le Ministère de l'Enseignement Supérieur, la Région Provence Alpes-Côte d'Azur and INSERM. L. Douguet was supported by the "Ligue contre le Cancer" and Paris VII University. J. Cherfils-Vicini was supported by the "Fondation de France". A. Prévost-Blondel's team is supported by ARC and Comité "Ile de France" Ligue contre le Cancer. E. Gilson's team is supported by "Ligue contre le Cancer" (Equipe Labélisée) and the French Government (National Research Agency, ANR through the InnaTelo program and the "Investments for the Future" LABEX SIGNALIFE: program reference #ANR-11-LABX-0028-01).

REFERENCES

1. *Lanca, T. & Silva-Santos, B. The split nature of tumor-infiltrating leukocytes: Implications for cancer surveillance and immunotherapy. Oncoimmunology **1**, 717-725 (2012).*
2. *Gao, Y., et al. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. J Exp Med **198**, 433-442 (2003).*
3. *Hao, J., et al. Regulatory role of Vgamma1 gammadelta T cells in tumor immunity through IL-4 production. J Immunol **187**, 4979-4986 (2011).*
4. *Lanca, T., et al. Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gammadelta T lymphocytes to tumor beds. J Immunol **190**, 6673-6680 (2013).*
5. *Cordova, A., et al. Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas. PLoS One **7**, e49878 (2012).*
6. *Lanca, T. & Silva-Santos, B. Recruitment of gammadelta T lymphocytes to tumors: A new role for the pleiotropic chemokine CCL2. Oncoimmunology **2**, e25461 (2013).*
7. *Lo Presti, E., Dieli, F. & Meraviglia, S. Tumor-Infiltrating gammadelta T Lymphocytes: Pathogenic Role, Clinical Significance, and Differential Programing in the Tumor Microenvironment. Front Immunol **5**, 607 (2014).*
8. *Rei, M., Pennington, D.J. & Silva-Santos, B. The Emerging Protumor Role of gammadelta T Lymphocytes: Implications for Cancer Immunotherapy. Cancer Res (2015).*
9. *Jianjun, Y., et al. T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. J Exp Med **210**, 1447-1462 (2013).*

10. *Obermajer, N., et al. Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. J Exp Med **210**, 1433-1445 (2013).*

11. *Eyles, J., et al. Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. J Clin Invest **120**, 2030-2039 (2010).*

12. *Kato, M., et al. Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. Oncogene **17**, 1885-1888 (1998).*

13. *Lengagne, R., et al. Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of tumor-specific CD8+ T cells. Cancer Res **64**, 1496-1501 (2004).*

14. *Toh, B., et al. Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. PLoS Biol **9**, e1001162 (2011).*

15. *Bogdan, C. Nitric oxide and the immune response. Nature immunology **2**, 907-916 (2001).*

16. *Ekmekcioglu, S., et al. Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival. Clin Cancer Res **6**, 4768-4775 (2000).*

17. *Massi, D., et al. Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions. The Journal of pathology **194**, 194-200 (2001).*

18. *Johansson, C.C., et al. Expression and prognostic significance of iNOS in uveal melanoma. Int J Cancer **126**, 2682-2689 (2010).*

19. *Ma, S., et al. IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma. Cancer Res **74**, 1969-1982 (2014).*

20. *Coffelt, S.B., et al. IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. Nature (2015).*

21. *Wu, P., et al. gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. Immunity **40**, 785-800 (2014).*

22. *Wakita, D., et al. Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. Eur J Immunol **40**, 1927-1937 (2010).*

23. *Caccamo, N., et al. Differentiation, phenotype, and function of interleukin-17-producing human Vgamma9Vdelta2 T cells. Blood **118**, 129-138 (2011).*

24. *Bogdan, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. Trends in immunology (2015).*

25. *Saini, A.S., Shenoy, G.N., Rath, S., Bal, V. & George, A. Inducible nitric oxide synthase is a major intermediate in signaling pathways for the survival of plasma cells. Nature immunology **15**, 275-282 (2014).*

26. *Sciorati, C., et al. Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gammadelta T lymphocytes. The Journal of biological chemistry **272**, 23211-23215 (1997).*

27. *Atre, N., Thomas, L., Mistry, R., Pathak, K. & Chiplunkar, S. Role of nitric oxide in heat shock protein induced apoptosis of gammadeltaT cells. Int J Cancer **119**, 1368-1376 (2006).*

28. *Niedbala, W., et al. Nitric oxide enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation. Nature communications **5**, 4575 (2014).*

29. *MacIver, N.J., Michalek, R.D. & Rathmell, J.C. Metabolic regulation of T lymphocytes. Annual review of immunology **31**, 259-283 (2013).*

30. *Everts, B., et al. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. Blood **120**, 1422-1431 (2012).*

31. *Cidad, P., Almeida, A. & Bolanos, J.P. Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide rapidly stimulates cytoprotective GLUT3-mediated glucose uptake through 5'-AMP-activated protein kinase. The Biochemical journal **384**, 629-636 (2004).*

32. *Lengagne, R., et al. T cells contribute to tumor progression by favoring pro-tumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma. PLoS One **6**, e20235 (2011).*

33. *Lengagne, R., et al. Distinct role for CD8 T cells toward cutaneous tumors and visceral metastases. J Immunol **180**, 130-137 (2008).*

FIGURES AND FIGURE LEGENDS

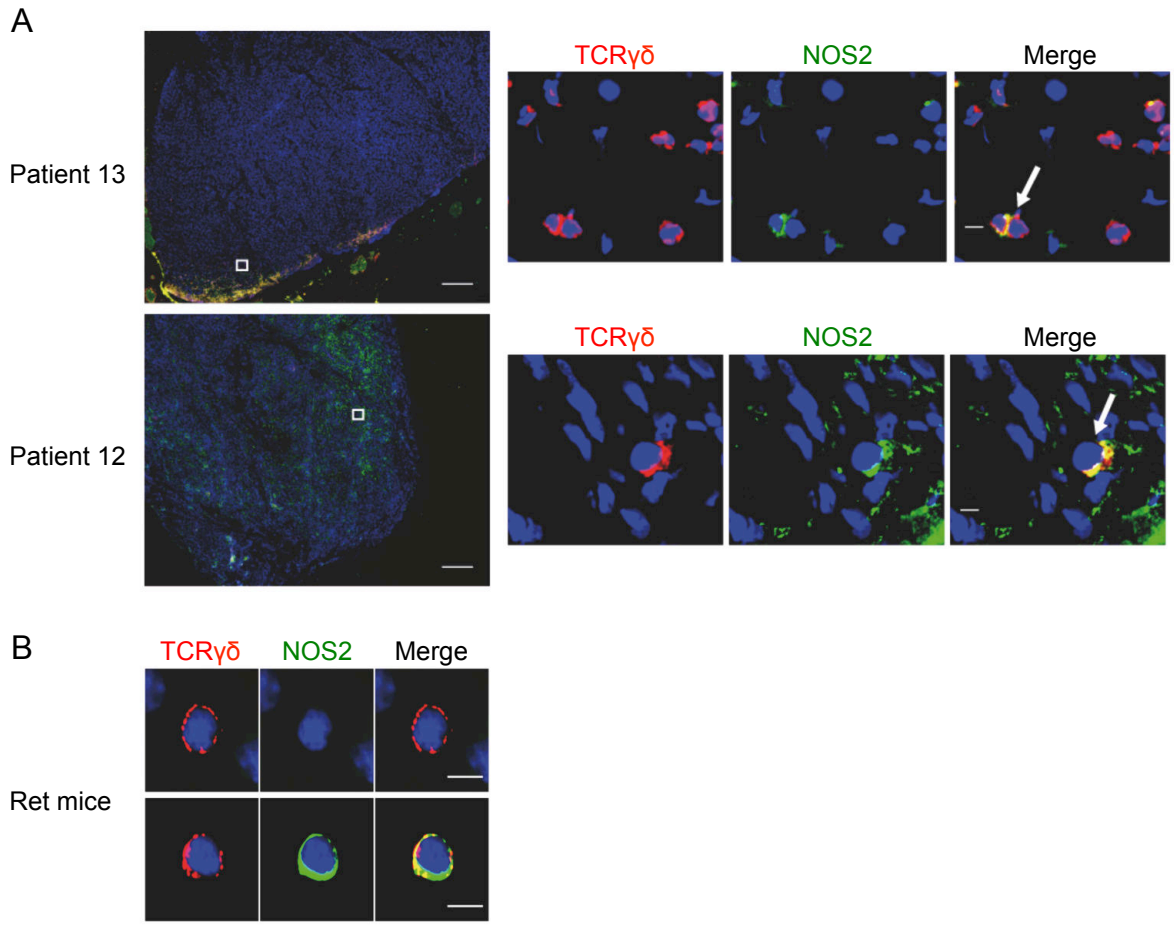


Figure 1. Melanoma infiltrating γδ T cells express NOS2 in primary tumors from human and mice. (**A**) Representative digital microscopy images **of 7 µm sections from frozen biopsies of human primary melanoma (patient 13 and 12 respectively). Sections** were stained with antibodies to TCR γδ (red) and NOS2 (green). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Left panels represent sample large views (bars 150 µM) and right panels show a magnification of regions of interest (marked by squares) (bars 5 µM). Arrows indicate NOS2 expressing γδ T cells. 40 X objective. (**B**) Representative confocal microscopy images showing γδ T cells positive (lower) or negative (upper) for NOS2 from $CD45^+$ cells sorted from a pool of primary tumors from 6 Ret mice stained with antibodies to TCR γδ (red), NOS2 (green) and counterstained with DAPI (blue). Bars 5 µM. 100 X objective. Experiments were performed twice.

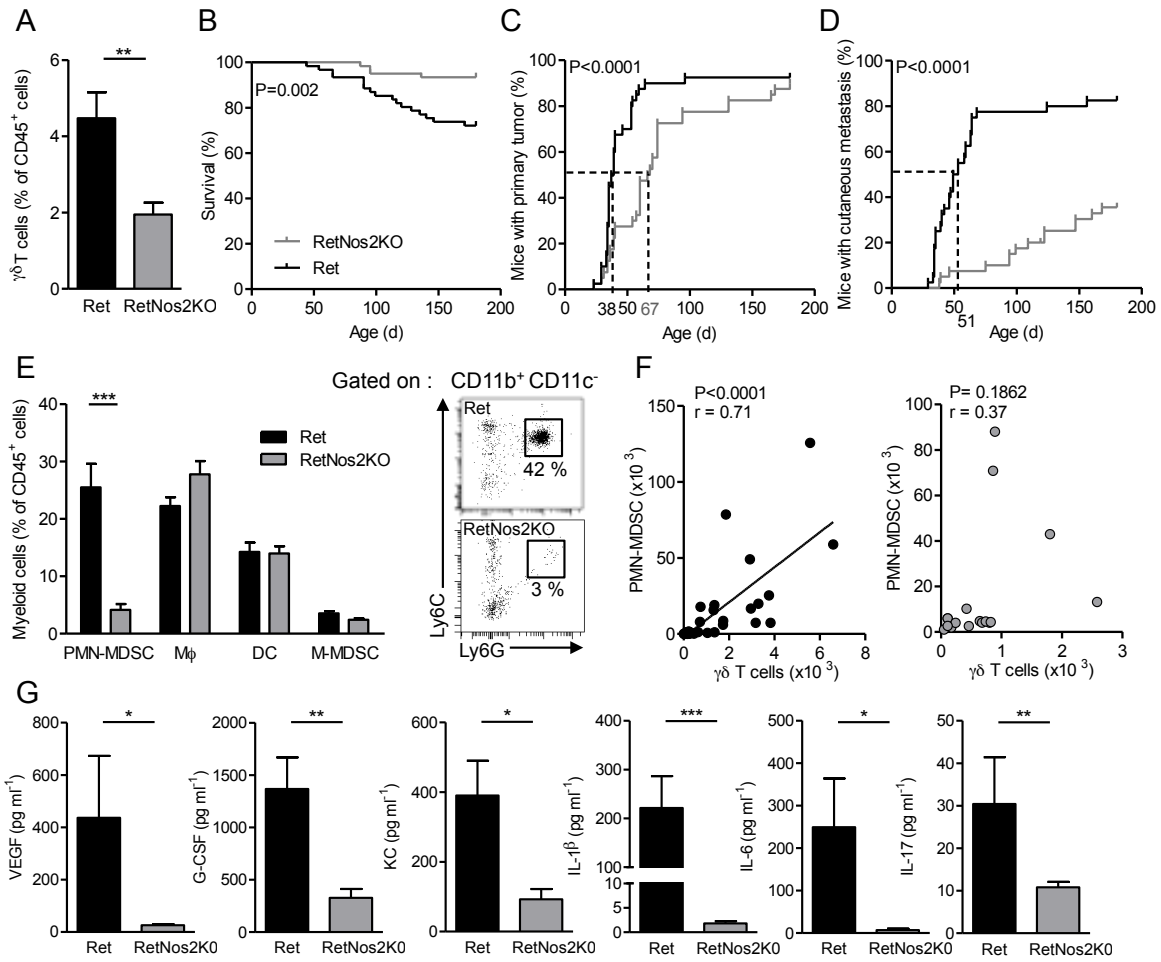


Figure 2. NOS2 deficiency delays melanoma progression and inhibits γδ T cells and PMN-MDSC recruitment within primary tumors. (**A**) Percentage of γδ T cells among $CD45^+$ cells in primary tumors of Ret (n=9) and RetNos2KO mice (n=11). (**B-D**) 6-month follow-up of melanoma development from Ret (n=40) and RetNos2KO (n=40) mice. (**B**) Survival analysis. (**C,D**) Time courses of primary tumor and cutaneous metastasis onset. Mice were examined every two weeks. Mantel-Cox and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests (**B-D**). (**E**) Dendritic cells (DC: $CD11c^+$), macrophages (MΦ: $CD11b^+CD11c^-Ly6C^{-/low}Ly6G^-$), monocytic MDSC (M-MDSC: $CD11b^+CD11c^-Ly6C^{high}Ly6G^-$) and PMN-MDSC ($CD11b^+CD11c^-Ly6C^{low}Ly6G^+$) were analyzed by flow cytometry. Percentages of myeloid cell subsets within primary tumors of Ret (n=35) and RetNos2KO (n=16) mice are shown in left and representative stainings of PMN-MDSC in right. Data are pooled from at least three independent experiments. (**F**) Correlation between the numbers of γδ T cells and PMN-MDSC within the primary tumors of Ret (n=33) (left) and RetNos2KO (n=17) (right) mice. Each point represents individual mouse and line is linear regression. Pearson correlation test. (**G**) Protein levels of indicated cytokines in lysates of primary tumors, from Ret (n=14, except for G-CSF n=11, IL-17 n=10 and VEGF n=8) and RetNos2KO (n=8, except for IL-17 n=6) mice, determined by ELISA and multiplex ELISA. Bars are mean ± SEM *$P<0.05$, **$P<0.01$ ***$P<0.001$ (Mann-Whitney test (**A,E,G**)).

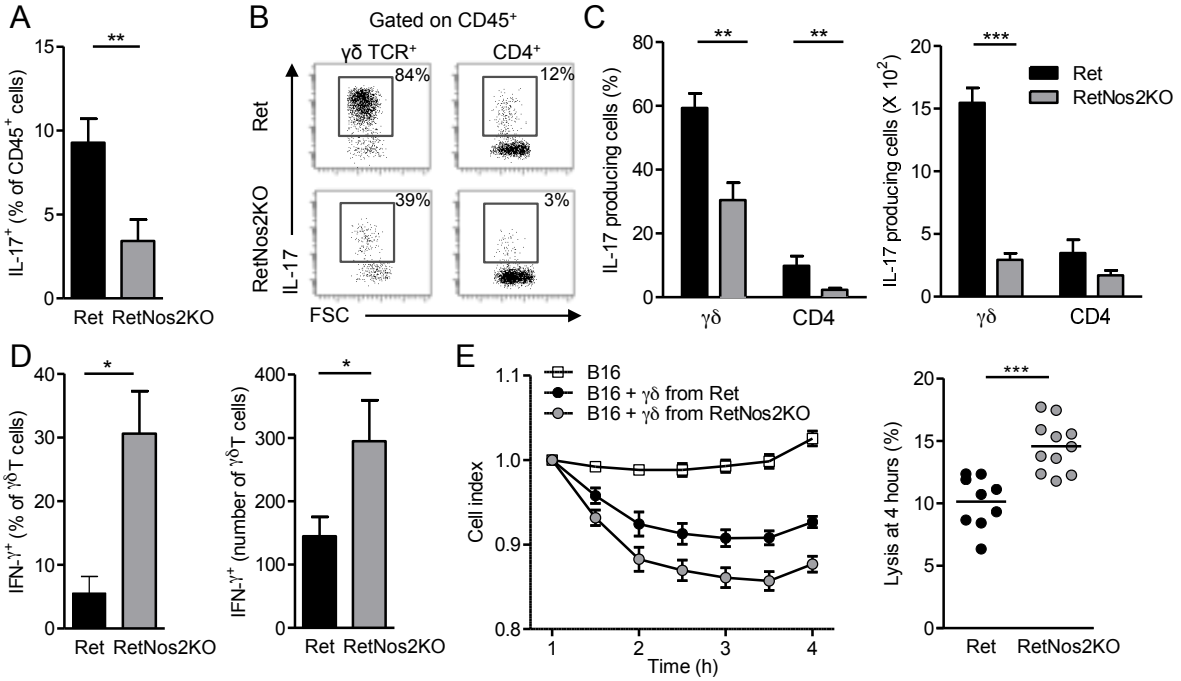


Figure 3. NOS2 improves pro-tumor properties of γδ T cells. (**A-C**) IL-17 production assessed by flow cytometry on single cell suspensions derived from primary tumors of Ret (n=11) and RetNos2KO mice (n=10) after PMA/ionomycin stimulation. (**A**) Percentage of total IL-17 producing $CD45^+$ cells. (**B**) Representative FSC/IL-17 dot plots are shown for γδ T cells and $CD4^+$ T cells. (**C**) Percentage (left) and absolute number (right) of γδ T cells and $CD4^+$ T cells producing IL-17. (**D**) Percentage (left) and absolute number (right) of γδ T cells derived from the primary tumor of Ret (n=5) and RetNos2KO mice (n=4) producing IFN-γ in response to PMA/ionomycin stimulation. (**E**) Cytotoxic activity of γδ T cells derived from Ret and RetNos2KO mice. B16 cells were seeded in wells of E-plates. γδ T cells were added to a ratio of one γδ T cell for two B16 cells. The inhibition of tumor cell proliferation was assessed by dynamically monitoring every 30 min on cell impedance. The graph (left) shows the normalized cell index values. The percent of B16 melanoma cell lysis (right) was calculated 4 h after addition of effector cells. Data are pooled from two independent experiments with 9 (Ret) and 11 (RetNos2KO) replicates. Data are mean ± SEM. (**A, C-E left**) except mean (**E right**). Each point represents one replicate (**E right**). *$P<0.05$, **$P<0.01$, ***$P<0.001$ (Mann-Whitney test).

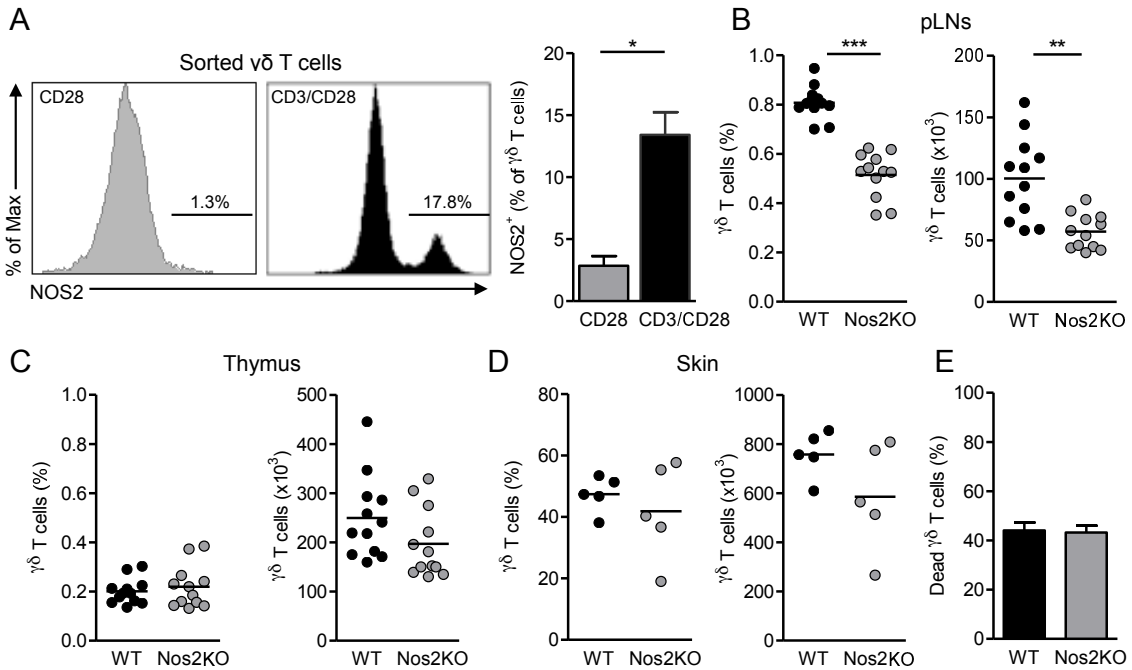


Figure 4. Endogenous NOS2 regulates the pool of peripheral γδ T cells *in vivo*. (**A**) Sorted γδ T cells from pLNs of WT mice were cultured for 2 d in presence of IL-2 and CD28-specific antibody, plus CD3-specific antibody when indicated (n=4 replicates each condition). Cells were stained for NOS2 and a viability marker. Flow cytometry representative stainings and percentages of $NOS2^+$ γδ T cells among living cells are shown. Numbers above line indicates percent $NOS2^+$ γδ T cells. (**B-D**) *Ex vivo* analysis of percentages (left) and absolute number (right) of γδ T cells, defined as $CD3\varepsilon^+TCR\delta^+$ cells, from pLNs (**B**), thymus (**C**) and skin (**D**) of WT and Nos2KO mice. Bars are mean and each point represents one mouse, n=12 (**b,c**) and n=5 per group (**D**). (**E**) Proportion of dead γδ T cells from pLNs of WT (n=10) and Nos2KO (n=9) mice analyzed *ex vivo*. Bars are mean ± SEM. Date are from one (**D**), two (**C**) or three (**A,B,E**) experiments. Not significant (*P>0.05*), **P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001* (Mann-Whitney test).

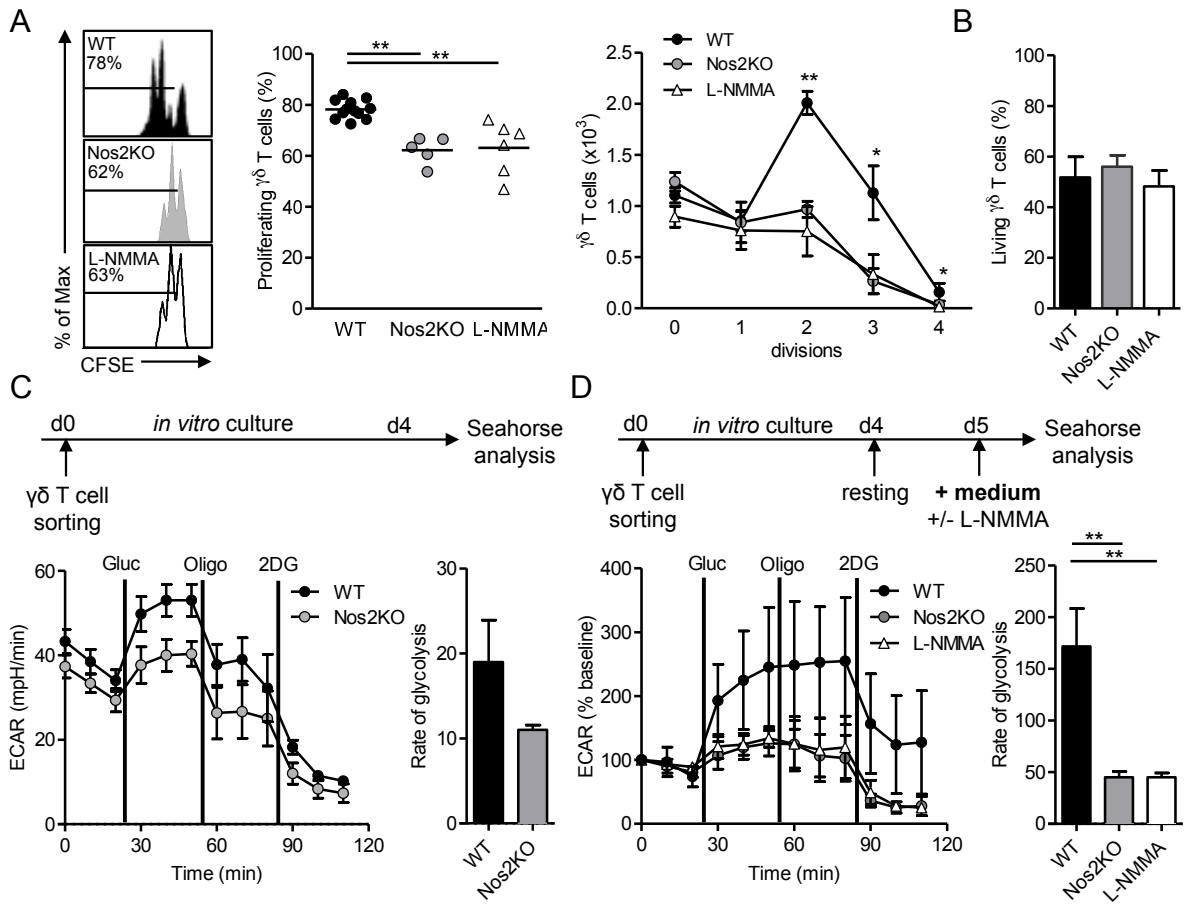


Figure 5. Proliferation and glycolysis of γδ T cells require autocrine NOS2-derived NO. (**A,B**) γδ T cells sorted from pLNs of WT and Nos2KO mice and labeled with CFSE were cultured for 2 d in presence of CD3 and CD28-specific antibodies and L-NMMA when indicated. (**A**) Numbers above line on CFSE plots indicate percent of proliferating cells. Percentages of γδ T cell proliferation and number of cells undergoing division. (**B**) Proportion of living γδ T cells after culture. Data are pooled from five independent experiments with 6 (**B**), 12 (**A**) WT, 5 Nos2KO and 6 L-NMMA replicates. (**C,D**) Sorted γδ T cells from pLNs were expanded *in vitro* for 4 d in presence of CD3 and CD28- specific antibodies, IL-7 and IL-2. Glycolytic metabolism was analyzed using a Seahorse XF-24 analyzer either directly (**C**), or after 18 h of resting following by an additional 4 h of stimulation with media containing L-NMMA when indicated (**D**). ECAR was assessed after glucose (gluc) addition and in response to metabolic inhibitors oligomycin (oligo) and 2-Deoxy-D-glucose (2DG). Shown are time courses (**C left**), normalized time courses as % of baseline (**D left**) and calculations of rate of glycolysis (**C,D right panels**). Data are from one experiment with 3 (Nos2KO) and 4 (WT) replicates and are pooled from three independent experiments with 7 (WT), 5 (Nos2KO) and 5 (L-NMMA) replicates (mean ± SEM.). Not significant (*P>0.05*), **P<0.05, **P < 0.01* (Mann-Whitney test).

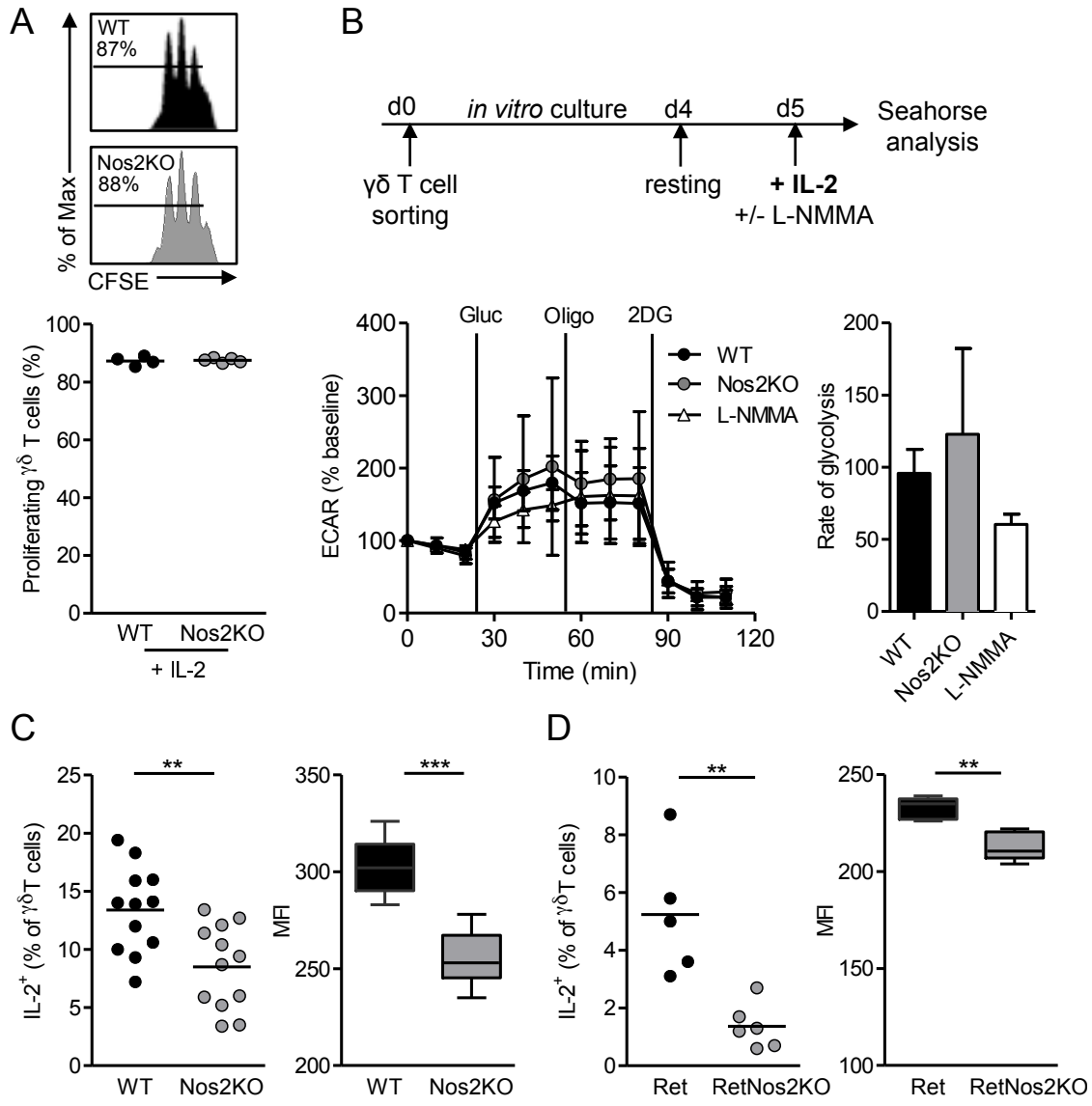
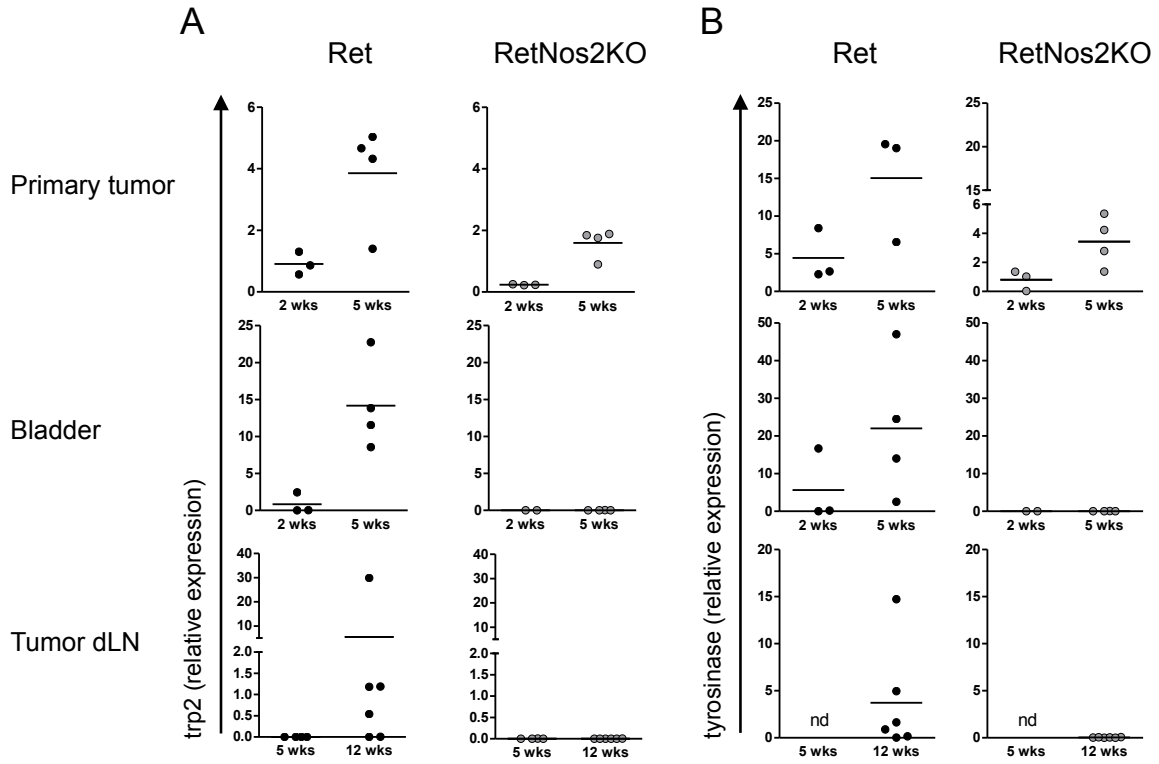
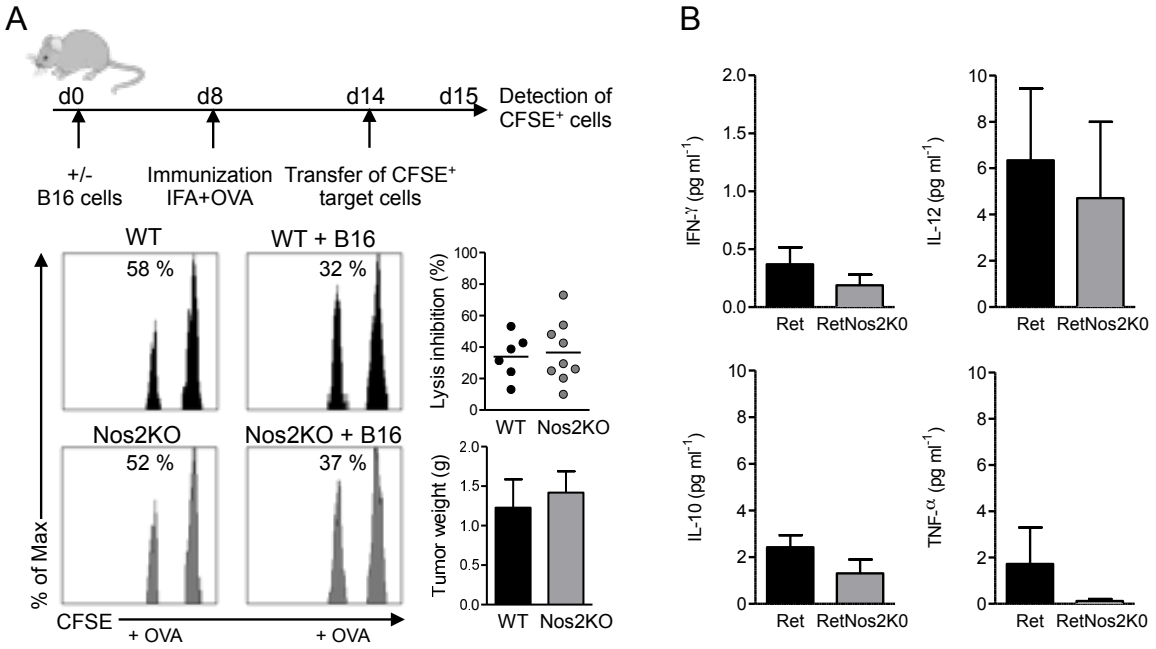


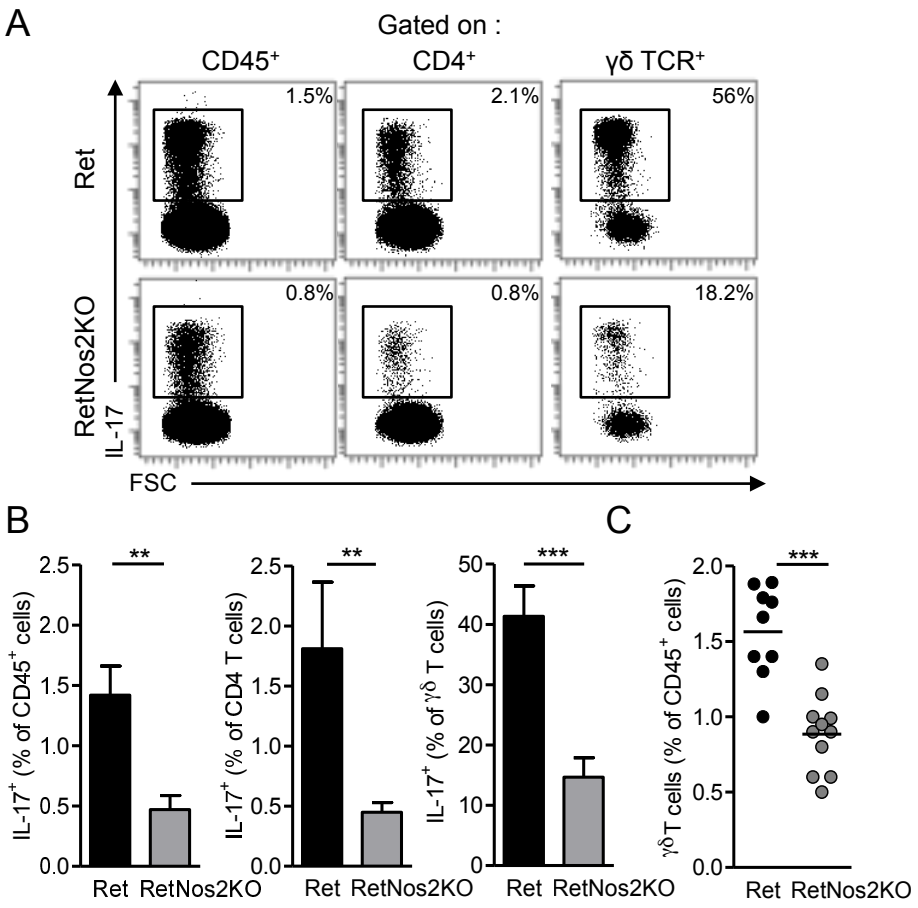
Figure 6. IL-2 whose expression is controlled by NOS2 restores the proliferation and glycolysis of Nos2-deficient γδ T cells. (**A**) γδ T cells sorted from pLNs of WT and Nos2KO mice and labeled with CFSE were cultured for 2 d in presence of CD3 and CD28-specific antibodies and IL-2. Numbers above line on CFSE plots indicate percent of proliferating cells. Percentages of γδ T cell proliferation are shown below. Data are representative of two experiments with 4 WT and 5 Nos2KO replicates. (**B**) Sorted γδ T cells from pLNs were expanded *in vitro* for 4 d in presence of CD3 and CD28-specific antibodies, IL-7 and IL-2. ECAR was analyzed after 18 h of resting following by an additional 4 h of stimulation with IL-2. Media contain L-NMMA when indicated. Shown are normalized time courses as % of baseline and calculations of rate of glycolysis Data are pooled from three independent experiments with 7 (WT), 5 (Nos2KO) and 5 (L-NMMA) replicates (mean ± SEM.). (**C,D**) IL-2 production by γδ T cells after PMA/ionomycin stimulation from pLNs from WT (n=12) and Nos2KO (n=12) mice (**c**) and tumor dLNs of Ret (n=5) and RetNos2KO (n=6) mice (**D**). Percentages are shown in left and geometric mean of fluorescence intensity (MFI) in right. Data are from one (**D**) or two (**C**) experiments. Point represents individual mouse, bars are mean and box and whiskers are min to max values and median. Not significant (*P>0.05*), ***P<0.01, ***P<0.001* (Mann-Whitney test).



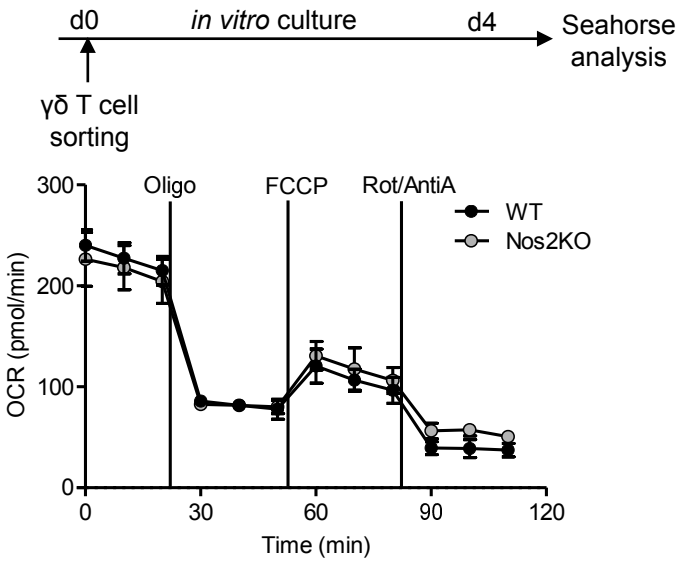
Supplementary Figure 1. NOS2 deficiency leads to less tumor dissemination in Ret mice. Trp2 (**A**) and tyrosinase (**B**) expressions were measured by qRT-PCR in bladders and tumor dLNs collected from Ret and RetNos2KO mice aged of 2 (n=3 per group except for RetNos2KO bladder n=2), 5 (n=4 per group) or 12 (n=6 per group) weeks. Primary tumors were used as positive controls for melanoma associated antigen expression. Expressions were normalized using GAPDH. Each point represents one mouse. nd:not determined.



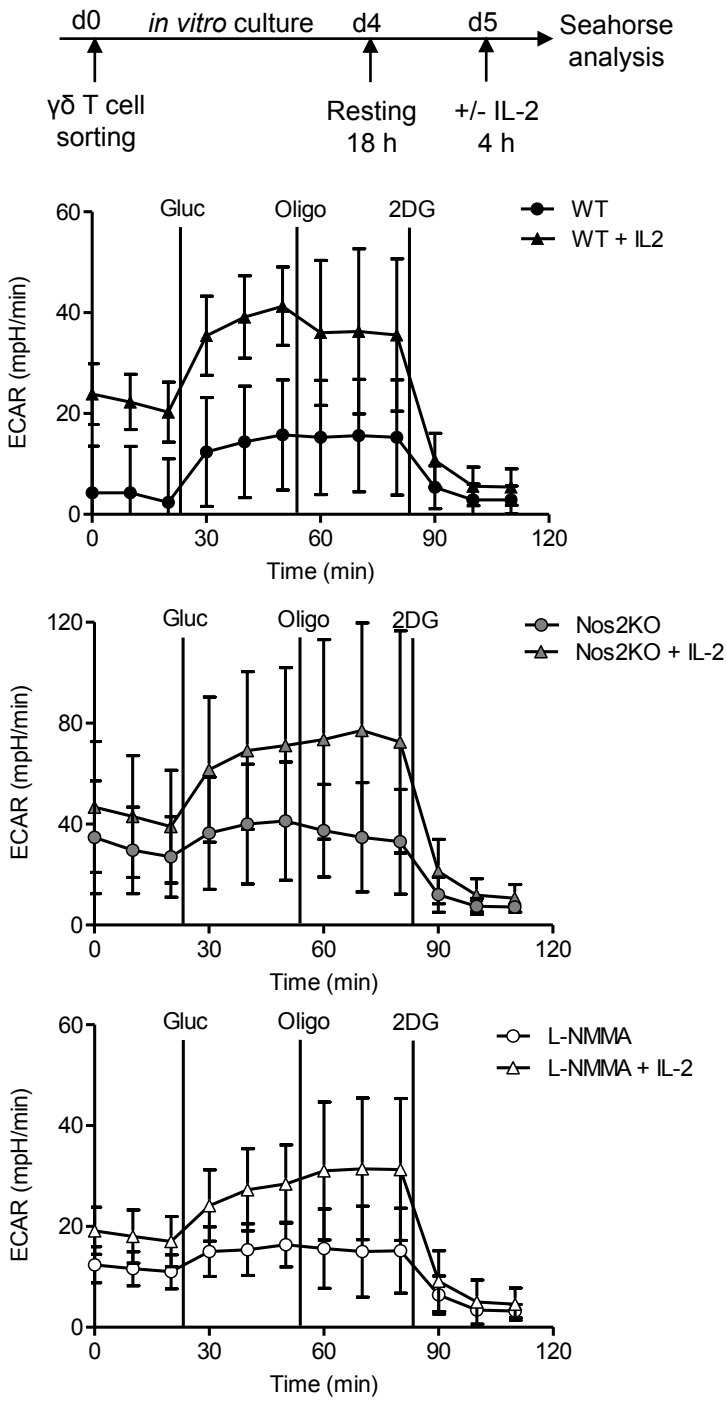
Supplementary Figure 2. NOS2 does not improve the global immunosuppression. (**A**) WT (n=6) and Nos2KO (n=9) mice were transplanted, or not, with B16 melanoma cells, and immunized 8 d later with the $OVA_{257–264}$ peptide in IFA. At d 14, syngeneic splenocytes (target cells) were loaded or not with $OVA_{257–264}$, labeled with a low or high dose of CFSE respectively and injected in immunized and in naïve mice. 24 h later, the proportion of $CFSE^{low}$ and $CFSE^{high}$ cells was determined using flow cytometry. Percentages of lysis indicated on CFSE graphs were calculated as described in Methods. Lysis inhibition (upper right panel) was calculated as described in Methods. Each point represents one mouse and bars are mean. Data are pooled from two experiments. Tumor weights (lower right panel). Bars are mean ± SEM. (**B**) Protein levels of indicated cytokines in lysates of primary tumors from Ret (n=14) and RetNos2KO (n=8) mice, determined by multiplex ELISA. Bars are mean ± SEM. Not significant (*P>0.05*) (Mann-Whitney test).



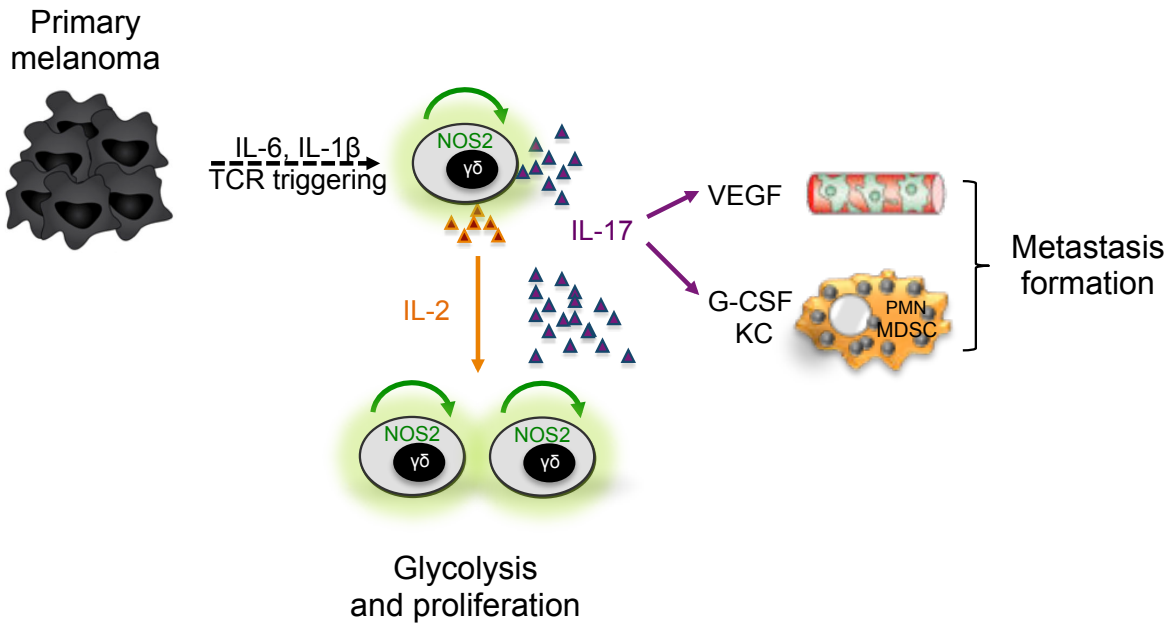
Supplementary Figure 3. γδ T cells are the main producers of IL-17 within tumor dLNs. IL-17 production assessed by flow cytometry on single cell suspensions derived from tumor dLNs of Ret (n=10) and RetNos2KO mice (n=10) after PMA/ionomycin stimulation. (**A**) Representative FSC/IL-17 dot plots are shown for $CD45^+$, $CD4^+$ and γδ T cells. (**B**) Percentage of subsets producing IL-17. Bars are mean ± SEM. Data are pooled from two independent experiments. (**C**) Percentage of γδ T cells among $CD45^+$ cells in tumor dLNs of Ret (n=9) and RetNos2KO (n=11) mice. ***P<0.01* ****P<0.001* (Mann-Whitney test).



Supplementary Figure 4. Mitochondrial respiration is independent of NOS2 expression in γδ T cells. Sorted γδ T cells from pLNs were expanded *in vitro* for 4 d in presence of CD3 and CD28- specific antibodies, IL-7 and IL-2. Metabolism was analyzed using a Seahorse XF-24 analyzer. OCR was assessed in response to mitochondrial inhibitors: oligomycin (oligo), Carbonyl cyanide 4 - (trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP), and rotenone and antimycin A (Rot/AntiA). Shown are time courses. Data are representative of one experiment with 3 (Nos2KO) and 4 (WT) replicates.



Supplementary Figure 5. Exogenous source of IL-2 enhances γδ T cell glycolysis independently of NOS2 expression. γδ T cells sorted from pLNs of WT and Nos2KO mice were expanded *in vitro* for 4 d in presence of CD3 and CD28-specific antibodies, IL-7 and IL-2. Glycolytic metabolism analysis was performed after 18 h of resting following by an additional 4 h of stimulation with media containing L-NMMA and/or IL-2 when indicated. ECAR was assessed after adding glucose and in response to metabolic inhibitors oligo and 2DG. Time courses are pooled from three independent experiments.



Supplementary Figure 6. Model of the contribution of γδ T cell derived NOS2 in the pro-tumor signaling cascade. Primary melanoma and/or its microenvironment (stromal cells, vessels, immune cells) (not represented on the scheme) induce an inflammatory cascade leading to IL-6 and IL-1β production. These cytokines and/or TCR triggering could activate γδ T cells to produce NOS2. NOS2 expression promotes IL-17 expression by γδ T cells. An increased local level of IL-17 up regulates amount of VEGF, KC and G-CSF within the microenvironment that subsequently promotes angiogenesis and PMN-MDSC recruitment favoring metastasis formation. In addition, NOS2 expression by γδ T cells enhances IL-2 production that allows their glycolysis and proliferation resulting in the expansion of pro-tumor γδ T cells.

TABLES

Supplementary Table 1 Patient clinical characteristics and data from immunofluorescence. An arbitrary cut-off of γδ T cells per microscopic field was used to define different groups of patients, highly (+++ for >25 and ++ for >8) or weakly (rare for <4 and + for <8) infiltrated by γδ T cells. nd, not detected.

Patient code	Gender	Age (years)	Histological type	Location	Stage	γδ T cells	$NOS2^+$ γδ T cells
1	F	77	Dubreuilh	Face	*in situ*	+	+
2	M	61	SSM	Trunk	IA	++	rare
3	F	77	Epithelioid	Vulva	IIB	+++	nd
4	M	83	SSM	Elbow	IIA	+++	rare
5	M	53	SSM	Leg	IA	+	rare
6	M	61	Nodular	Trunk	IIIC	nd	nd
7	M	30	SSM	Trunk	IB	+++	rare
8	F	66	SSM	Back	IIA	++	rare
9	F	92	Nodular	Face	IIC	+	rare
10	F	53	Acral lentiginous	Heel	IIB	++	+
11	M	84	SSM	Arm	IIC	++	+
12	M	82	Desmoplastic	Face	IIC	+++	+
13	M	56	Epithelioid	Trunk	IV	+++	+++
14	M	66	Acral lentiginous	Heel	IIIB	+++	rare

Supplementary Table 2 Incidence and locations of distant metastasis in Ret and RetNos2KO mice.

	Ret mice	RetNos2KO mice
Age of autopsy (months)	6	8
Incidence of distant metastasis	54%	17%
Mean of metastasis /mice	1.4	1.3
Bladder metastasis/total mice	48/108	7/69
Lung metastasis/total mice	27/108	7/69
Other metastasis/total mice	5/108	2/69

Discussion

Les résultats obtenus lors de ce projet ont permis de montrer que l'expression de NOS2 favorise la dissémination tumorale en augmentant le recrutement et/ou l'expansion des PMN-MDSCs au niveau de la tumeur primaire dans un modèle expérimental de mélanome spontané. Ces cellules myéloïdes suppressives sont recrutées par les lymphocytes T γδ exprimant NOS2. NOS2 promeut l'activité pro-tumorale des T γδ en optimisant leur production d'IL-17 et en réduisant leurs capacités de sécrétion d'IFN-γ et de lyse des cellules tumorales. En parallèle, l'expression endogène de NOS2 induit l'expansion des T γδ *in vivo* en favorisant leur production d'IL-2, nécessaire à la glycolyse et à la prolifération.

I. L'expression de NOS2 induit la dissémination métastatique

I.1. Quelle(s) cellule(s) NOS2$^+$ favorise(nt) l'apparition des métastases ?

Chez les patients atteints de mélanomes cutanés et uvéaux, l'expression de NOS2 est associée à un mauvais pronostic ([189], [190], [191]). La comparaison des diagnostics cliniques des souris Ret et RetNos2KO a permis de mettre en évidence un effet protecteur de l'inactivation de Nos2, validant l'utilisation de ce modèle. Cet effet se manifeste par une augmentation de la survie des souris RetNos2KO à 6 mois associée à une nette diminution de l'incidence des métastases. Comme les souris Ret, la majorité des souris RetNos2KO développent une tumeur primaire dans les 6 mois indiquant que l'inactivation de Nos2 ne bloque pas la formation tumorale mais retarde plutôt la formation des métastases. Les données obtenues dans un modèle de transplantation tumorale couramment utilisé confirment cette conclusion. Lorsque les cellules de mélanome B16-F10 sont injectées en intraveineuse, on retrouve moins de foyers tumoraux dans les poumons des souris Nos2KO par rapport à ceux des souris WT. Deux hypothèses permettent d'expliquer l'effet de l'inactivation de Nos2 sur la formation des métastases dans les souris RetNos2KO : 1) les cellules tumorales issues des lésions primaires disséminent moins et/ou 2) elles sont maintenues à l'état de dormance aux niveaux des organes cibles empêchant la formation de macro-métastases délétères pour l'organisme. Par des expériences de qPCR réalisées dans les organes où la dissémination s'effectue préférentiellement, nous avons montré, l'absence de micro-métastases dans les souris RetNos2KO. Ainsi, nous avons exclu la deuxième hypothèse et montré que l'expression de NOS2 favorisait la formation de métastases.

L'enzyme NOS2 est exprimée par de nombreux types cellulaires au sein du microenvironnement tumoral (cellules stromales, immunitaires et tumorales), rendant difficile l'évaluation de la contribution d'une population cellulaire $NOS2^+$ particulière sur le développement tumoral. En effectuant des expériences de chimères hématopoïétiques, j'ai voulu déterminer si les cellules immunitaires jouaient un rôle crucial dans le processus de formation des métastases. J'ai d'abord choisi d'irradier des souris Ret et RetNos2KO pour les reconstituer avec des cellules souches hématopoïétiques issues des moelles de souris WT ou Nos2KO. Malheureusement, nous n'avons pas retrouvé la différence de progression tumorale observée dans les souris Ret et RetNos2KO dans nos deux groupes contrôles : souris Ret CD45.2 reconstituées avec des cellules WT CD45.1 et souris RetNos2KO CD45.2 reconstituées avec des cellules Nos2KO CD45.1. Les résultats étaient alors ininterprétables. En plus des effets des rayonnements sur le développement tumoral, nous avons irradié des souris adultes de 6 à 7 semaines, alors que les travaux du laboratoire ont précédemment montré que la dissémination tumorale s'effectuait dès l'âge de 3 semaines ([18]). En parallèle, j'ai constaté que le pourcentage de reconstitution des cellules T γδ était très faible puisque les cellules T γδ de l'hôte persistaient dans les yeux, site de la tumeur primaire. Nous avons finalement simplifié la problématique et nous avons évalué si l'expression de NOS2 par les cellules tumorales avait un impact sur le développement tumoral. Pour cela, j'ai transplanté des souris WT et Nos2KO avec des lignées de mélanome produisant NOS2 ou non. La lignée déficiente pour Nos2 a été établie à partir d'une métastase cutanée prélevée sur une souris RetNos2KO (la caractérisation de la lignée est montrée en annexe n°1 figure 1A). En accord avec le contrôle tumoral observé dans les souris RetNos2KO, la pousse tumorale est réduite dans les souris Nos2KO. De façon intéressante, ce résultat s'observe que les tumeurs expriment ou non NOS2 (Annexe n°1 figure 1B). Nous suggérons donc que le NO produit par les cellules de l'hôte est responsable d'une potentialisation de la croissance tumorale indépendamment de l'expression de NOS2 par les lignées tumorales. Parmi les cellules de l'hôte, les cellules immunitaires et/ou stromales peuvent être responsables de cet effet potentialisateur. Afin de préciser ce résultat, il serait intéressant de reprendre les expériences de transplantation tumorale dans des chimères hématopoïétiques de souris WT et Nos2KO non transgéniques.

I.2. Comment sont recrutés les PMN-MDSCs infiltrant les tumeurs primaires les plus agressives ?

Pour comprendre le meilleur contrôle tumoral observé dans les souris RetNos2KO, je me suis principalement intéressée à caractériser les cellules de l'immunité infiltrant les tumeurs primaires. En effet, même si les souris RetNos2KO développent très peu de métastases, les

souris Ret et RetNos2KO développent toutes les deux des tumeurs primaires à 6 mois. J'ai donc voulu analyser si ces phénomènes étaient en lien avec une modulation de l'immunité dans la tumeur primaire. L'œil est un site de privilège immun dans lequel règne une ambiance immunosuppressive (expression de FasL par les cellules de l'œil, présence de TGFß dans l'humeur aqueuse, …) nécessaire pour préserver la vision et prévenir les inflammations susceptibles de détruire les cellules normales de l'œil. Les rejets de greffes de cornée ou de tumeurs transplantées chez l'animal illustrent, malgré tout, l'induction possible de réponses immunitaires dans l'œil ([197]). De même chez l'homme, des régressions spontanées de mélanome uvéal ont été montrées ([198], [199]). Ainsi, la mise en évidence de cellules immunitaires infiltrant des mélanomes uvéaux établit que l'œil n'est pas un sanctuaire immunologique en conditions physiopathologiques. Les yeux tumoraux des souris Ret et RetNos2KO présentent un infiltrat hématopoïétique significatif (10%). En revanche, l'analyse des yeux non tumoraux des souris WT et Nos2KO révèle un très faible pourcentage de cellules $CD45^+$ (inférieur à 1%). Ces données suggèrent que l'établissement de la tumeur primaire entraine une inflammation permettant le recrutement des cellules hématopoïétiques.

Toh *et al.* ont montré dans le modèle Ret que les PMN-MDSCs infiltrant les tumeurs primaires favorisaient activement la dissémination tumorale en induisant une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses ([56]). Ils ont ainsi clairement expliqué les mécanismes mis en jeu lors de la dissémination tumorale précoce (dès 3 semaines dans les souris Ret). Jusqu'alors, il était admis que le phénomène métastatique était tardif car il nécessitait une accumulation de mutations conférant un phénotype motile à la cellule tumorale. Par les travaux menés conjointement avec le laboratoire, l'idée que les PMN-MDSCs soient responsables de la dissémination précoce fait sens. En effet, les PMN-MDSCs infiltrent massivement les tumeurs primaires des souris Ret (près de 40% des cellules hématopoïétiques) mais sont peu présents dans les métastases cutanées ([56]). De façon très intéressante, mes travaux mettent en évidence un infiltrat en PMN-MDSCs bien moins important dans les yeux des souris RetNos2KO.

La manière dont sont recrutés les PMN-MDSCs au niveau de la tumeur primaire reste à éclaircir. Nos résultats semblent indiquer l'implication directe ou indirecte de NOS2 dans le recrutement des PMN-MDSCs. En effet, notre étude de l'ensemble des cellules lymphoïdes et myéloïdes infiltrant les tumeurs primaires montre qu'une seule autre population est statistiquement diminuée dans les yeux des souris RetNos2KO. Il s'agit des lymphocytes T γδ.

Au début de ma thèse, il n'était pas connu que les cellules T γδ puissent exercer des fonctions pro-tumorales en favorisant le recrutement, l'expansion et/ou la survie des PMN-MDSCs dans la tumeur primaire ([121]). Néanmoins, des travaux montraient la capacité des cellules T γδ à recruter les neutrophiles via la production d'IL-17 dans un modèle infectieux ([200]). C'est donc naturellement que nous nous sommes intéressés aux fonctions des T γδ et aux rôles de NOS2 sur ces fonctions.

II. NOS2 induit l'expansion et la polarisation des T γδ en effecteurs pro-tumoraux

II.1. Comment l'expression de NOS2 est-elle induite dans les lymphocytes T γδ ?

Au début de ma thèse, nous ne soupçonnions pas que les cellules lymphoïdes, et les lymphocytes T γδ en particulier, puissent exprimer NOS2. En effet, NOS2 était détectée dans des lignées cellulaires, des clones ou des cellules tumorales provenant de cellules B ou T ([201]), mais aucune donnée ne permettait de conclure sur la production de NOS2 par les lymphocytes T primaires. Ce sont les travaux publiés en parallèle par Yang *et al.* et Obermajer *et al.* qui démontrent en 2013 que les cellules T αβ $CD4^+$ activées expriment NOS2 ([146], [147]). Pour la première fois, nous mettons en évidence des lymphocytes T γδ $NOS2^+$ *in situ* aux niveaux de tumeurs primaires de mélanome chez l'homme et la souris. Nous détectons également l'enzyme NOS2 dans des lymphocytes T γδ après stimulation de leur TCR et ajout d'IL-2 *in vitro*. Nos données suggèrent que l'activation des cellules T γδ est requise pour induire l'expression de NOS2. Nous émettons l'hypothèse que des cytokines comme l'IL-1β et l'IL-6 permettent cette induction au niveau du microenvironnement tumoral. En effet, nous avons détecté des concentrations significatives d'IL-1β et d'IL-6 dans les humeurs aqueuses des souris Ret. L'IL-1β a récemment été identifiée comme un inducteur de NOS2 dans les macrophages murins ([139]) et l'IL-6 induit la transcription de Nos2 dans les plasmocytes ([148]). De plus, Obermajer *et al.* ont montré que l'IL-1β est suffisante pour provoquer l'expression de NOS2 dans les lymphocytes T αβ $CD4^+$ humains, mais que son induction maximale était réalisée avec une stimulation par IL-1β, IL-6 et IL-23 ([146]). Ces cytokines, connues pour promouvoir la différenciation des lymphocytes T en Th17, induisent donc l'expression de NOS2. Les résultats de mes travaux indiquent clairement que l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ est requise pour optimiser leur production d'IL-17. Ainsi, pour comprendre les mécanismes d'induction de NOS2 dans les lymphocytes T γδ, il me paraît opportun de stimuler ces cellules avec les cytokines permettant la polarisation des T γδ en T γδ producteurs d'IL-17 (Tγδ17). L'IL-1β, l'IL-6, l'IL-23, le TGF-β et l'IL-7 selon différentes combinaisons sont connus pour induire cette polarisation dans le cadre de la progression tumorale (voir introduction paragraphe II.3.3.2). Il serait donc intéressant de cultiver *in vitro* les cellules T γδ triées à partir de souris WT avec différentes combinaisons de ces cytokines en stimulant ou non leur TCR avec des anticorps anti-CD3/CD28 et d'évaluer l'induction de NOS2 dans ces cellules.

Ces observations n'excluent pas le fait que d'autres mécanismes, additionnels ou parallèles à la stimulation médiée par les cytokines puissent être envisagés. En particulier,

les protéines de choc thermique (HSPs) sont connues pour être des ligands du TCR γδ. Les HSPs sont sur-exprimées en cas de stress et au cours de la transformation tumorale. En 2006, Atre *et al.* ont montré que les protéines HSPs 60 et 70 étaient capables d'induire l'expression de NOS2 dans des clones de T γδ dérivés de sang de patients atteints de cancers oraux ([195]). On peut noter que la protéine HSP 70 est surexprimée dans le mélanome, sa reconnaissance par le TCR γδ pourrait donc participer à l'induction de NOS2 dans les lymphocytes T γδ ([87]).

II.2. Par quel(s) mécanisme(s) NOS2 polarise les lymphocytes T γδ en effecteurs pro-tumoraux sécréteurs d'IL-17 ?

Nous avons observé d'une part que le nombre de lymphocytes T γδ corrélait positivement avec celui des PMN-MDSCs dans la tumeur primaire uniquement quand la protéine NOS2 est fonctionnelle et d'autre part, que l'expression de NOS2 permettait la production optimale d'IL-17 par les lymphocytes T γδ. De plus, leurs activités anti-tumorales sont inhibées lorsque NOS2 est fonctionnelle (production d'IFN-γ, lyse des cellules tumorales). Ces données démontrent le rôle crucial de NOS2 dans la polarisation des T γδ en effecteurs pro-tumoraux. Comme dans d'autres cancers ([126], [127], [128], [129], [130], [131]), les cellules T γδ infiltrant les tumeurs primaires sont les principaux producteurs d'IL-17 dans le mélanome. Lors des deux dernières années, plusieurs groupes ont démontré que les T γδ producteurs d'IL-17 (Tγδ17) promouvaient le recrutement, l'expansion, et/ou la survie des PMN-MDSCs à la fois chez l'homme et la souris dans plusieurs modèles de cancers ([128],[130], [131]). Ainsi, Coffelt *et al.* démontrèrent en 2015 que la production d'IL-17 par les lymphocytes T γδ entrainait la sécrétion de G-CSF nécessaire à l'expansion des PMN-MDSCs dans un modèle murin de cancer du sein ([130]). Wu *et al*. observèrent que les Tγδ17 sécrétaient également de l'IL-8 attirant les MDSCs dans le cancer colorectal chez l'homme ([131]). Les PMN-MDSCs promeuvent activement la dissémination métastatique dans notre modèle en induisant une transition épithélio-mésenchymateuse des cellules tumorales ([56]). Plus généralement, ils inhibent les réponses anti-tumorales, médiées par exemple par les lymphocytes T αβ $CD8^+$ cytotoxiques ce qui maximise les probabilités de développer des métastases ([130]). Les PMN-MDSCs ne sont pas les seuls responsables des effets pro-tumoraux engendrés par les Tγδ17 ([121]). En effet, Wakita *et al.* indiquèrent que les Tγδ17 permettent la sécrétion de VEGF favorisant l'angiogenèse et donc le processus de dissémination tumorale ([126]). Nous avons quantifié les concentrations de G-CSF, de KC (équivalent murin de l'IL-8) et de VEGF directement dans les extraits protéiques obtenus à partir des tumeurs primaires et constaté que les concentrations de ces cytokines étaient plus élevées quand NOS2 est fonctionnelle. Ainsi, en tenant compte des

observations précédemment publiées et de nos résultats, nous émettons l'hypothèse que l'activation des lymphocytes T γδ entraine l'expression de NOS2, nécessaire pour l'expression d'IL-17. Les lymphocytes Tγδ17 pourraient sécréter eux-mêmes ou déclencher dans le microenvironnement tumoral les productions de KC, G-CSF et VEGF nécessaire au recrutement des PMN-MDSCs et à l'augmentation de l'angiogenèse conduisant finalement au processus métastatique.

Le rôle crucial de NOS2 dans la polarisation des lymphocytes T γδ vers un profil pro-tumoral semble assez clair, en particulier dans le fait qu'il induise la production d'IL-17. Pourtant, les deux groupes ayant mis en évidence l'expression de NOS2 par les cellules T αβ $CD4^+$ ont publié des résultats opposés concernant le rôle de cette expression sur la production d'IL-17. Obermajer *et al.* ont montré que l'expression du NOS2 endogène favorisait la production d'IL-17 par les cellules T αβ $CD4^+$ humains selon une voie dépendante de l'activation de la GMPc par le NO ([146]). Tandis que, Yang *et al.* ont observé que le NO inhibait la différenciation des lymphocytes T αβ $CD4^+$ murins en Th17 impliquant un mécanisme résultant de la nitration de résidus tyrosine du facteur de transcription RORγt ([147]). Ces résultats sont contradictoires mais ne peuvent pas seulement être expliqués par l'origine des ces cellules (souris et homme). Ils pourraient être également expliqués par l'utilisation de stimuli différents pour différencier les lymphocytes T naïfs en Th17. En effet, Yang *et al.* utilisent de l'IL-6 et du TGF-β tandis que Obermajer *et al.* utilisent de l'IL-1β, IL-6 et IL-23 et ont montré que l'ajout de TGF-β à ce cocktail inhibe à la fois la production de NOS2 et d'IL-17 ([147], [146]). En prenant en compte ces observations comment pourrait-on envisager le mécanisme par lequel NOS2 favorise la production d'IL-17 dans les lymphocytes T γδ ? Etant donné les similitudes entre les populations Th17 et T γδ17, on pourrait supposer que NOS2 favorise l'activation de la GMPc. Mais si elle induisait la nitration inhibitrice du facteur de transcription RORγt comme observé dans les cellules $CD4^+$ murines pourrait-on quand même envisager que NOS2 favorise la production d'IL-17 par les T γδ ? En 2009, Ribot *et al.* ont montré que l'ensemble des cellules T γδ $CD27^-$ productrices d'IL-17 exprimaient RORγt, même si l'expression de RORγt n'est pas suffisante à la production d'IL-17 elle est nécessaire chez les Th17 et les T γδ ([93]). Pour le moment, nous n'avons pas évalué l'un ou l'autre de ces mécanismes. Cependant, nous avons remarqué, en condition physiologique, que la proportion de lymphocytes T γδ produisant de l'IL-17 était significativement plus faible dans les souris Nos2KO en comparaison avec les souris WT (Annexe n°1 figure 2A). Ainsi, NOS2 agirait intrinsèquement sur la production d'IL-17 indépendamment du contexte tumoral. Cette idée reste à approfondir mais de manière intéressante, nous avons également observé que les proportions de cellules $CD27^-$ (cellules productrices d'IL-17) parmi l'ensemble des lymphocytes T γδ et parmi les sous-

populations Vγ1$^+$ et Vγ4$^+$ sont plus faibles dans les ganglions périphériques des souris Nos2KO (Annexe n°1 figure 2B). Si tel est également le cas en condition tumorale, ces résultats suggèreraient la nécessité de l'expression de NOS2 pour la génération, le maintien et/ou la survie des cellules T γδ CD27$^-$.

II.3. Comment NOS2 promeut-elle l'expansion des lymphocytes T γδ ?

En plus d'avoir montré que NOS2 favorisait les capacités pro-tumorales des T γδ, nous avons observé que les cellules T γδ étaient plus nombreuses dans les tumeurs primaires et dans les ganglions drainants la tumeur des souris Ret que des souris RetNos2KO. Nous nous sommes demandés si le NOS2 produit par la tumeur permettait le recrutement et/ou l'expansion des T γδ intra-tumoraux. Nous avons généré une lignée de mélanome B16-F10 (B16) exprimant stablement un petit ARN interférant avec l'expression de NOS2 (B16sh), dont l'extinction de NOS2 s'élève à près de 80% (Annexe n°1 figure 3A,B). Nous avons transplanté en sous-cutané des cellules B16sh et B16 à des souris WT et Nos2KO. Les lymphocytes T γδ infiltrant les tumeurs sont moins fréquents dans les souris Nos2KO indépendamment de la capacité des cellules tumorales à produire ou non NOS2 (Annexe n°1 figure 3C). Ces résultats indiquent que le recrutement et/ou la prolifération des lymphocytes T γδ sont indépendants du NO produit par la tumeur mais qu'ils requièrent l'expression de NOS2 par l'hôte. Ce résultat est cohérent avec la moindre proportion des lymphocytes T γδ observée dans les ganglions périphériques de souris NOS2KO dans des conditions physiologiques comparée à celle de souris WT.

Nos données montrent que la déficience en NOS2 dans les souris NOS2KO n'augmente pas la mort des lymphocytes T γδ murins. Deux études ont investigué l'impact de la production du NO sur les lymphocytes T γδ humains et ont donné lieu à des résultats opposés. Le premier groupe montre que l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ induite par HSP entraine leur apoptose ([195]). Le second groupe n'a pas détecté l'expression de NOS2 mais uniquement celle de NOS3 dans les T γδ et montre que le NO endogène confère une protection contre l'apoptose ([196]). Ces deux études reposent sur l'utilisation de clones T γδ humains amplifiés *in vitro,* alors que nous utilisons des cellules primaires murines, ce qui pourrait expliquer les différences dans nos observations.

De façon intéressante, le NO endogène dérivé de l'expression de NOS2 favorise l'expansion des lymphocytes T γδ. En effet, les cellules compétentes pour NOS2 prolifèrent mieux *in vitro* que les lymphocytes T γδ issus de souris WT traités avec un inhibiteur des NOS ou de souris Nos2KO. En accord avec leur meilleure capacité à proliférer, le métabolisme glycolytique de ces cellules est plus performant lorsqu'elles expriment NOS2.

La prolifération et le métabolisme glycolytique sont restaurés dans les lymphocytes T γδ déficients en NOS2 lorsqu'on ajoute une source d'IL-2 exogène. Enfin, les lymphocytes T γδ compétents pour NOS2 ont la capacité de produire plus d'IL-2 que leurs homologues déficients pour NOS2, dans les contextes physiologiques et tumoraux. Ainsi, nous montrons que NOS2 régule, *in vivo,* le pool de cellules T γδ périphériques par un mécanisme dépendant de l'IL-2. On peut souligner que même si NOS2 est exprimée par les lymphocytes T $CD4^+$ murins, celle-ci n'impacte ni leur nombre *in vivo* ni leur capacité à proliférer *in vitro*. Pourtant, un lien entre le NO et la production d'IL-2 dans les lymphocytes T αβ $CD4^+$ a été mis en évidence. L'apport de NO exogène à des lymphocytes T αβ naïfs cultivés en condition de polarisation Th9 augmente leur capacité à produire de l'IL-2 ([171]).

Les effets de NOS2 sur le métabolisme des cellules immunitaires sont peu connus. La glycolyse est liée à la disponibilité intracellulaire des nutriments et en particulier du glucose. L'expression des transporteurs de glucose (GLUT) régule l'absorption intracellulaire du glucose. Par ailleurs, il a été montré que le NO augmentait l'expression de GLUT3 et donc l'absorption du glucose dans la lignée cellulaire HEK293T ([202]). Nous émettons donc l'hypothèse que le NO dérivé de NOS2 augmente directement ou indirectement l'expression des GLUT sur les cellules T γδ. Ainsi, les lymphocytes T γδ déficients pour NOS2 exprimeraient moins de transporteurs de glucose que les lymphocytes T γδ compétents pour NOS2, ce qui entrainerait la diminution de la glycolyse et en conséquence la baisse de leur capacité proliférative. Néanmoins, comment comprendre qu'une source exogène d'IL-2 restaure la glycolyse et donc la prolifération ? Il a été montré que l'IL-2 induisait l'expression de GLUT1 dans les lymphocytes T αβ activés entrainant une meilleure absorption du glucose ([203]). Pour résumer, l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ favorise la production d'IL-2. L'IL-2 augmenterait l'expression des GLUT à leur surface et permettrait d'augmenter l'absorption du glucose et en conséquence la glycolyse conduisant à la prolifération optimale de ces cellules. Cette hypothèse sera testée en comparant l'absorption du glucose dans les lymphocytes T γδ WT ou Nos2KO par cytométrie à l'aide de molécules de glucose fluorescentes (2-NBDG). Si l'absorption du glucose est modulée, alors nous évaluerons quels sont les GLUT impliqués.

III. Quelle est la contribution des lymphocytes T γδ NOS2$^+$ dans le développement du mélanome ?

III.1. Quelques questions laissées en suspens

A l'issue de ce travail, la contribution des lymphocytes T γδ exprimant NOS2 dans le développement du mélanome reste à déterminer. Bien qu'ils recrutent les PMN-MDSCs et qu'ils favorisent l'angiogenèse via leur capacité de production extrême d'IL-17 (pour rappel 80% lymphocytes des T γδ compétents pour NOS2 sont capables d'exprimer l'IL-17 dans la tumeur primaire), que leurs propriétés anti-tumorales soient limitées, nous ne pouvons conclure sur leur rôle dans la progression métastatique. Ces cellules sont-elles responsables à elles seules de l'initiation du processus métastatique ? Occupent-elles une place majeure dans la progression du mélanome ? Ou bien s'agit-il des phénomènes coopératifs ? Par exemple, le stroma tumoral en exprimant NOS2 serait-il plus permissif à la dissémination métastatique ? N'aurait-il qu'une importance secondaire face aux lymphocytes T γδ ? En raison des limites du modèle utilisé, ces questions restent à explorer.

III.2. Les souris Ret déficientes en lymphocytes T γδ sont-elles un bon modèle d'étude pour appréhender la contribution des T γδ à la progression tumorale ?

Nous essayons actuellement de comprendre quelle est la contribution globale des T γδ dans la progression du mélanome en utilisant des souris Ret déficientes en T γδ (RetTgdKO). Mais s'agit-il du bon modèle pour évaluer la contribution globale des lymphocytes T γδ sur l'évolution tumorale ?

La plupart des études menées sur le mélanome utilisent des modèles de transplantation. Ainsi, pour simuler des lésions cutanées et métastatiques chez des souris, les cellules de mélanome B16 sont injectées respectivement en sous cutané ou en intraveineuse ([204]). Ces expériences de transplantation, malgré leur utilité pour la compréhension de la pathologie cancéreuse, peuvent introduire un biais expérimental rendant délicate l'étude des interactions cellules immunitaires – cellules tumorales. En effet, l'inflammation causée au site de l'injection ne permet pas de récapituler l'inflammation réellement mise en place pendant l'établissement d'une tumeur. Les souris Ret présentent l'avantage de développer spontanément un mélanome métastatique. Ainsi, les lésions de mélanome primaire localisées au niveau de la choroïde disséminent progressivement ([18]). Le modèle Ret permet d'étudier la formation de métastases de manière physiologique. Nos résultats montrent que les lymphocytes T γδ infiltrent les tumeurs primaires des souris présentant une

forte dissémination métastatique, mais n'indiquent pas la contribution relative de ces cellules à la progression tumorale.

Au cours de ma dernière année de thèse, j'ai établi une lignée de souris RetTγδKO. Pour le moment, nous disposons de 14 souris de 3 mois. Aucune différence dans les cinétiques de développement de la tumeur primaire et des métastases cutanées n'est observée à ce jour (Annexe n°1 figure 4A). Pour parvenir à une conclusion définitive il faut poursuivre le suivi pendant 6 mois sur une cohorte de 40 souris. Néanmoins, les résultats obtenus au laboratoire et par Paget *et al.* dans les modèles d'injections de cellules tumorales vont dans le même sens que nos premières observations. En effet, les injections sous-cutanées de cellules B16-F10 révèlent des pousses tumorales identiques dans les animaux sauvages et déficients en lymphocytes T γδ (Annexe n°1 figure 4B). Paget *et al.* ont injecté des cellules B16-F10 en intraveineuse mimant un modèle de formation de métastases pulmonaires. Le même nombre de foyers tumoraux métastatiques a été observé dans les souris sauvages et dans les souris T γδ KO ([118]). L'ensemble de ces résultats signifient-ils pour autant que les T γδ n'ont pas d'influence dans le développement du mélanome ? Pourtant, les rôles pro- ou anti tumoraux des lymphocytes T γδ ont été mis en évidence par d'autres travaux (voir introduction II).

Pour tenter de répondre, il faut se demander si les souris déficientes en lymphocytes T γδ sont réellement un bon modèle d'étude. Comme dans tous les modèles KO, il peut exister des mécanismes masquant le rôle d'une population cellulaire parce qu'une autre population cellulaire compense ses effets. La tumeur est en prolifération constante accumulant les mutations, ce sont les clones cellulaires les plus adaptés à la survie, les plus agressifs qui sont sélectionnés dans un microenvironnement tumoral donné. Ainsi, la tumeur peut s'adapter à son environnement et continuer à moduler le système immunitaire pour le rendre plus suppressif et lui permettre de disséminer. Finalement, dans une souris totalement déficiente en lymphocytes T γδ, on peut supposer que la tumeur s'adapte et crée des nouveaux mécanismes d'échappement. On a vu dans notre modèle que le recrutement des PMN-MDSCs permettait aux cellules tumorales de gagner la circulation sanguine en effectuant une transition mésenchymateuse ([56]). Les données de la littérature récente montrent dans le cancer que l'IL-17 est importante pour recruter ces cellules (voir introduction paragraphe II.3.2.2b). Même si les lymphocytes T γδ représentent souvent la majeure source de production d'IL-17 dans les cancers, y compris dans le mélanome, ce ne sont pas les seules cellules à pouvoir produire de l'IL-17. Les lymphocytes T αβ $CD4^+$ pourraient prendre le relais et compenser la production d'IL-17 dans les souris déficientes en T γδ. Dans les souris Ret, la part des cellules $CD4^+$ productrices d'IL-17 est faible en comparaison à celle occupée par les lymphocytes T γδ, mais en l'absence de T γδ la question reste à éclaircir. Ces expériences sont prévues à partir de janvier 2016, quand les

souris RetTγδKO auront 6 mois et à l'issue de leur diagnostic. En utilisant le modèle de transplantation de cellules B16-F10, nous avons malgré tout obtenu des données préliminaires étayant cette hypothèse (Annexe n°1 figure 4C). Les lymphocytes T αβ $CD4^+$ des ganglions drainant la tumeur ont une plus grande capacité à produire de l'IL-17 quand ils proviennent des souris TγδKO. Il faut noter que les lymphocytes T αβ $CD4^+$ n'ont intrinsèquement pas la capacité de produire plus d'IL-17 en l'absence de tumeurs puisque les T αβ $CD4^+$ issus des ganglions de souris WT et TγδKO non transplantées sont capables de produire la même quantité d'IL-17. Obermajer *et al*. ont montré que les lymphocytes T αβ $CD4^+$ exprimant NOS2 produisaient de l'IL-17 ([146]). On peut envisager que le microenvironnement tumoral entraine une inflammation capable d'activer la production de NOS2 lymphocytes T γδ et T αβ $CD4^+$. En l'absence de lymphocytes T γδ, les cytokines pro-inflammatoires seraient plus disponibles pour activer les lymphocytes T αβ $CD4^+$ et engendrer la cascade « expression de NOS2 – production d'IL-17 – recrutement de PMN-MDSCs – dissémination métastatique ».

Mais alors pourquoi les lymphocytes T αβ $CD4^+$ ne prennent pas le relais de pour produire davantage d'IL-17 dans les souris RetNos2KO ? En accord avec les tailles de tumeurs réduites, le délai d'apparition de la tumeur primaire et le contrôle de la progression tumorale, on peut émettre l'hypothèse que l'inflammation est plus faible dans les souris déficientes en NOS2. D'ailleurs, l'IL-1β et l'IL-6 sont en moins grande quantité dans les tumeurs primaires des souris RetNos2KO.

Pour conclure, même si on observait la même dissémination tumorale dans les souris RetTγδKO, on ne pourrait pas conclure à l'absence de rôle des lymphocytes T γδ dans la progression du mélanome sans avoir au moins vérifié 1) la quantité d'IL-17 dans les tumeurs primaires, 2) la capacité des lymphocytes T $CD4^+$ à produire de l'IL-17, 3) le nombre des PMN-MDSCs infiltrant les tumeurs.

III.3. Comment évaluer la contribution relative des lymphocytes T γδ exprimant NOS2 à la progression du mélanome ?

Pour pallier les mécanismes de compensation évoqués précédemment, mais également parce qu'il peut co-exister des sous-populations de lymphocytes T γδ anti et pro-tumoraux, un modèle dans lequel on pourrait induire ou stopper l'expression de NOS2 dans une population cellulaire particulière parait idéal. Il permettrait de décrypter quelle est la contribution relative des lymphocytes T γδ $NOS2^+$ dans le développement du mélanome et en particulier dans le processus métastatique.

Malheureusement, à ma connaissance, il n'existe pas de souris déficiente en NOS2 mais dans laquelle l'expression de NOS2 serait inductible dans un tissu spécifique. Néanmoins, avec les outils disponibles au laboratoire, on pourrait malgré tout envisager d'appréhender cette question. En effet, lorsque nous générons les souris RetNos2KO nous obtenons des souris RetNos2$^{+/-}$. Lors de l'établissement de la lignée de souris RetNos2KO nous avons étudié le développement tumoral dans ces souris et observé que les souris RetNos2$^{+/-}$ étaient protégées de la même manière que les souris inactivées pour Nos2 (Annexe n°1 figure 5B). Ce résultat laisse supposer que l'expression de NOS2 est faible ou inexistante dans les souris RetNos2$^{+/-}$. Si tel est le cas et une fois décryptés les mécanismes d'induction de l'expression de NOS2 dans les lymphocytes T γδ, nous pourrions considérer les souris RetNos2$^{+/-}$ comme un modèle inductible. Ainsi, si l'IL-1β et/ou l'IL-6 s'avèrent être des inducteurs de Nos2 dans notre modèle, nous pourrions traiter les souris RetNos2$^{+/-}$ avec ces cytokines. On pourrait évaluer 1) si elles sont plus malades que les souris contrôles 2) si leur lymphocytes T γδ produisent du NOS2 au sein de la tumeur primaire 3) quelle est la capacité des lymphocytes T γδ à produire de l'IL-17 en comparaison avec les lymphocytes T CD4^{+} et 4) analyser les modifications de l'infiltrat immunitaire au sein de la tumeur primaire. Nous ne pourrions pas exclure avec de telles expériences que les effets observés ne soient pas dus à l'induction de NOS2 dans d'autres populations cellulaires (comme les lymphocytes T CD4^{+} par exemple), indépendamment de l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ.

En complément, nous pourrions transférer des lymphocytes T γδ issus des ganglions périphériques des souris Nos2KO ou WT dans des souris RetNos2KO et évaluer la progression métastatique. Plusieurs problèmes se poseraient dans cette expérience. Premièrement, les hôtes RetNos2KO ne sont pas immuno-déficients. Est ce qu'il y aura assez de place pour que les lymphocytes T γδ transférés puissent survivre et avoir un impact ? Deuxièmement, les populations de lymphocytes T γδ WT et Nos2KO ne sont pas homogènes en terme de répertoire. Comment s'affranchir de ce biais de répertoire ? Enfin, faut-il expandre *in vitro* ces cellules peu abondantes avant de les injecter *in vivo* ? La fonctionnalité des cellules doit être contrôlée après l'expansion *in vitro*. En effet, on a vu que l'activation du TCRγδ induisait la lyse des cellules tumorales *in vitro*. L'amplification *in vitro* pourrait biaiser le pool des lymphocytes T γδ et favoriser la prolifération des cellules anti tumorales productrices d'IFN-γ.

IV. Le vitiligo et l'inactivation de Nos2 ralentissent-ils la progression tumorale par les mêmes mécanismes ?

L'apparition d'un vitiligo est un évènement protecteur dans le modèle Ret ([194]), mais également chez les patients atteints de mélanome ([205]). Le vitiligo correspond à une dépigmentation engendrée par la destruction de mélanocytes sains et tumoraux partageant des antigènes. Il est associé à une réduction de l'incidence des métastases dans les souris Ret.

Les travaux du laboratoire, auxquels j'ai été associée (Annexe n°2 [206]), ont montré grâce à l'utilisation *in vivo* d'anticorps déplétants que les monocytes inflammatoires étaient responsables de la lyse des mélanocytes. Le traitement par un anticorps éliminant à la fois les monocytes inflammatoires et les granulocytes augmente la mortalité des souris Ret ainsi que la dissémination métastatique chez les quelques souris survivant au traitement. Ces données indiquent que l'une, l'autre, ou ces deux populations participent au contrôle de la dissémination tumorale. De plus, les souris traitées avec un anticorps éliminant uniquement les granulocytes développent moins de métastases que les souris non traitées. En sachant que les monocytes inflammatoires s'accumulent dans la peau des souris présentant un vitiligo actif, ces données suggèrent le rôle protecteur des monocytes. En parallèle et en accord avec les travaux antérieurs de l'équipe, ces résultats démontrent également la contribution majeure des PMN-MDSCs dans le processus de dissémination ([56]).

Dans la mesure où les souris RetNos2KO contrôlent la dissémination métastatique, on s'est naturellement demandé si l'inactivation de Nos2 augmentait l'incidence du vitiligo. Or, comme les souris Ret, un tiers des souris RetNos2KO développe un vitiligo. De plus, les souris RetNos2KO présentant un vitiligo ne sont pas plus protégées que les souris RetNos2KO sans vitiligo (Annexe n°1 figure 5A). Enfin l'inactivation de Nos2 ralentit plus fortement la progression tumorale que le vitiligo (Annexe n°1 figure 6A). Ainsi, nous pourrions envisager que les souris Ret développant un vitiligo (RetV) expriment un niveau suffisamment faible de NOS2 pour leur conférer une protection quand à la dissémination métastatique.

On retrouve dans les yeux des souris RetV, un niveau intermédiaire de PMN-MDSCs coïncidant avec le ralentissement de l'incidence des métastases (Annexe n°1 figure 6B). De manière intéressante, on observe une proportion intermédiaire de cellules T γδ dans les yeux des souris RetV (Annexe n°1 figure 6B). L'ensemble des observations faites dans les tumeurs primaires des souris RetV incite à évaluer le pourcentage de cellules T γδ exprimant NOS2 et le niveau d'expression de NOS2. Ainsi, si dans les souris RetV moins de lymphocytes T γδ expriment NOS2 ou si les lymphocytes T γδ expriment un niveau plus faible de NOS2 en comparaison aux souris Ret sans vitiligo (RetNV), nous pourrions

apporter un mécanisme complémentaire situé en amont des travaux menés précédemment sur le développement du vitiligo. Les lymphocytes T γδ infiltrant les tumeurs primaires des souris RetV pourraient alors produire moins d'IL-17 et entrainer un moindre recrutement des PMN-MDSCs. Ainsi, la dissémination métastatique précoce serait limitée et les monocytes inflammatoires d'exerceraient leur action cytotoxique envers les mélanocytes normaux et pro-tumoraux.

Finalement, pour répondre à la question de la contribution des lymphocytes T γδ exprimant NOS2 à la progression du mélanome, on peut envisager que les modèles RetNos2$^{+/-}$ et RetV soient les modèles les plus adaptés si les hypothèses sont vérifiées dans les souris RetV.

V. Conclusions

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai démontré l'expression de NOS2 par les lymphocytes T γδ primaires dans le mélanome et en contexte physiologique. D'autre part, j'ai mis en évidence l'impact de l'expression de NOS2 sur la modulation des fonctions des lymphocytes T γδ. L'expression de NOS2 favorise la production d'IL-2 et d'IL-17 par les lymphocytes T γδ. Cette augmentation de la production d'IL-17 est reliée à une diminution des capacités de sécrétion d'IFN-γ et de lyse des cellules tumorales dans le mélanome. Puisque, en contexte physiologique, on retrouve plus de cellules $CD27^-$ dans les ganglions périphériques des souris compétentes pour NOS2 que dans ceux des souris Nos2KO, nous suggérons que NOS2 est un régulateur intrinsèque de la polarisation des lymphocytes T γδ en effecteurs pro-tumoraux. L'action de NOS2 sur la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes T γδ amplifie les effets pro-tumoraux des lymphocytes T γδ puisqu'elle permet leur expansion dans le contexte tumoral.

En raison de leurs propriétés anti-tumorales, les lymphocytes T γδ font actuellement l'objet d'essais cliniques dans plusieurs cancers. Les cellules sont soit activées directement *in vivo,* soit amplifiées *in vitro* avant leur transfert adoptif. Nos travaux suggèrent que le pourcentage de lymphocytes T γδ exprimant NOS2 et leur niveau d'expression de NOS2 doit être évalué chez les patients avant d'envisager une immunothérapie ciblant les lymphocytes T γδ. En effet, on peut supposer que l'immunothérapie ne soit bénéfique que si les lymphocytes T γδ n'expriment pas NOS2.

L'ensemble de nos résultats montre que l'expression de NOS2 est délétère dans le mélanome. Actuellement, des essais de phase I-II ciblent IDO une autre enzyme du métabolisme des acides aminés. Ainsi, des inhibiteurs de IDO ou des stratégies de vaccination ciblant IDO semblent bien tolérés chez les patients atteints de cancer et montrent des effets anti-tumoraux chez certains patients ([207]). Pourquoi ne pas envisager un traitement anti-tumoral inhibant l'expression de NOS2 dans le mélanome ?

Références bibliographiques

1. Catalano, V., et al., *Tumor and its microenvironment: a synergistic interplay.* Semin Cancer Biol, 2013. **23**(6 Pt B): p. 522-32.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation.* Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma.* N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
4. Eggermont, A.M., A. Spatz, and C. Robert, *Cutaneous melanoma.* Lancet, 2014. **383**(9919): p. 816-27.
5. Boon, T., et al., *Human T cell responses against melanoma.* Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 175-208.
6. Mackensen, A., et al., *Direct evidence to support the immunosurveillance concept in a human regressive melanoma.* J Clin Invest, 1994. **93**(4): p. 1397-402.
7. Gogas, H., et al., *Prognostic significance of autoimmunity during treatment of melanoma with interferon.* N Engl J Med, 2006. **354**(7): p. 709-18.
8. van Leeuwen, M.T., et al., *Effect of reduced immunosuppression after kidney transplant failure on risk of cancer: population based retrospective cohort study.* BMJ, 2010. **340**: p. c570.
9. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.* Nat Immunol, 2002. **3**(11): p. 991-8.
10. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family.* Annu Rev Immunol, 1994. **12**: p. 991-1045.
11. Restifo, N.P., M.E. Dudley, and S.A. Rosenberg, *Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 269-81.
12. Vivier, E., et al., *Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 239-52.
13. Messaoudene, M., et al., *Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma.* Cancer Res, 2014. **74**(1): p. 81-92.
14. Weiner, L.M., R. Surana, and S. Wang, *Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 317-27.
15. Allavena, P., et al., *The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance.* Immunol Rev, 2008. **222**: p. 155-61.
16. Klug, F., et al., *Low-dose irradiation programs macrophage differentiation to an iNOS(+)/M1 phenotype that orchestrates effective T cell immunotherapy.* Cancer Cell, 2013. **24**(5): p. 589-602.
17. Bui, J.D. and R.D. Schreiber, *Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes?* Curr Opin Immunol, 2007. **19**(2): p. 203-8.
18. Eyles, J., et al., *Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma.* J Clin Invest, 2010. **120**(6): p. 2030-9.
19. Hofbauer, G.F., et al., *Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution.* Melanoma Res, 1998. **8**(4): p. 337-43.
20. Vesely, M.D., et al., *Natural innate and adaptive immunity to cancer.* Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 235-71.
21. Wu, A.A., et al., *Reprogramming the tumor microenvironment: tumor-induced immunosuppressive factors paralyze T cells.* Oncoimmunology, 2015. **4**(7): p. e1016700.
22. Lee, P.P., et al., *Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients.* Nat Med, 1999. **5**(6): p. 677-85.
23. Maczek, C., et al., *Differences in phenotype and function between spontaneously occurring melan-A-, tyrosinase- and influenza matrix peptide-specific CTL in HLA-A*0201 melanoma patients.* Int J Cancer, 2005. **115**(3): p. 450-5.

24. Derre, L., et al., *BTLA mediates inhibition of human tumor-specific CD8+ T cells that can be partially reversed by vaccination.* J Clin Invest, 2010. **120**(1): p. 157-67.
25. Hino, R., et al., *Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma.* Cancer, 2010. **116**(7): p. 1757-66.
26. Gordon-Alonso, M., N. Demotte, and P. van der Bruggen, *Sugars boost exhausted tumor-infiltrating lymphocytes by counteracting immunosuppressive activities of galectins.* Oncoimmunology, 2014. **3**: p. e28783.
27. Serran, M.G., et al., *The regulatory role of B cells in autoimmunity, infections and cancer: Perspectives beyond IL10 production.* FEBS Lett, 2015.
28. Sakaguchi, S., T. Takahashi, and Y. Nishizuka, *Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. I. Requirement of Lyt-1 effector cells for oocytes damage after adoptive transfer.* J Exp Med, 1982. **156**(6): p. 1565-76.
29. Roncarolo, M.G., et al., *Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans.* Immunol Rev, 2006. **212**: p. 28-50.
30. Niedbala, W., et al., *Nitric oxide induces CD4+CD25+ Foxp3 regulatory T cells from CD4+CD25 T cells via p53, IL-2, and OX40.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(39): p. 15478-83.
31. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.* J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 387-96.
32. Bilate, A.M. and J.J. Lafaille, *Induced CD4+Foxp3+ regulatory T cells in immune tolerance.* Annu Rev Immunol, 2012. **30**: p. 733-58.
33. Nishikawa, H. and S. Sakaguchi, *Regulatory T cells in tumor immunity.* Int J Cancer, 2010. **127**(4): p. 759-67.
34. Viguier, M., et al., *Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells.* J Immunol, 2004. **173**(2): p. 1444-53.
35. Jacobs, J.F., et al., *Regulatory T cells in melanoma: the final hurdle towards effective immunotherapy?* Lancet Oncol, 2012. **13**(1): p. e32-42.
36. Onizuka, S., et al., *Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody.* Cancer Res, 1999. **59**(13): p. 3128-33.
37. Shimizu, J., S. Yamazaki, and S. Sakaguchi, *Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity.* J Immunol, 1999. **163**(10): p. 5211-8.
38. Zhou, G. and H.I. Levitsky, *Natural regulatory T cells and de novo-induced regulatory T cells contribute independently to tumor-specific tolerance.* J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2155-62.
39. Strauss, L., et al., *A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment.* Clin Cancer Res, 2007. **13**(15 Pt 1): p. 4345-54.
40. Hilchey, S.P., et al., *Follicular lymphoma intratumoral CD4+CD25+GITR+ regulatory T cells potently suppress CD3/CD28-costimulated autologous and allogeneic CD8+CD25- and CD4+CD25- T cells.* J Immunol, 2007. **178**(7): p. 4051-61.
41. Li, H., et al., *CD4 +CD25 + regulatory T cells decreased the antitumor activity of cytokine-induced killer (CIK) cells of lung cancer patients.* J Clin Immunol, 2007. **27**(3): p. 317-26.
42. de la Rosa, M., et al., *Interleukin-2 is essential for CD4+CD25+ regulatory T cell function.* Eur J Immunol, 2004. **34**(9): p. 2480-8.
43. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation.* J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 295-302.
44. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.* Nat Immunol, 2003. **4**(12): p. 1206-12.
45. van Baren, N. and B.J. Van den Eynde, *Tryptophan-degrading enzymes in tumoral immune resistance.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 34.

46. Gabrilovich, D.I., S. Ostrand-Rosenberg, and V. Bronte, *Coordinated regulation of myeloid cells by tumours.* Nat Rev Immunol, 2012. **12**(4): p. 253-68.
47. Gabrilovich, D.I. and S. Nagaraj, *Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.* Nat Rev Immunol, 2009. **9**(3): p. 162-74.
48. Youn, J.I., et al., *Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice.* J Immunol, 2008. **181**(8): p. 5791-802.
49. Meyer, C., et al., *Frequencies of circulating MDSC correlate with clinical outcome of melanoma patients treated with ipilimumab.* Cancer Immunol Immunother, 2014. **63**(3): p. 247-57.
50. Condamine, T., et al., *Regulation of tumor metastasis by myeloid-derived suppressor cells.* Annu Rev Med, 2015. **66**: p. 97-110.
51. Ostrand-Rosenberg, S., *Myeloid-derived suppressor cells: more mechanisms for inhibiting antitumor immunity.* Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(10): p. 1593-600.
52. Pan, P.Y., et al., *Immune stimulatory receptor CD40 is required for T-cell suppression and T regulatory cell activation mediated by myeloid-derived suppressor cells in cancer.* Cancer Res, 2010. **70**(1): p. 99-108.
53. Huang, B., et al., *Gr-1+CD115+ immature myeloid suppressor cells mediate the development of tumor-induced T regulatory cells and T-cell anergy in tumor-bearing host.* Cancer Res, 2006. **66**(2): p. 1123-31.
54. Serafini, P., et al., *Myeloid-derived suppressor cells promote cross-tolerance in B-cell lymphoma by expanding regulatory T cells.* Cancer Res, 2008. **68**(13): p. 5439-49.
55. Yang, L., et al., *Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis.* Cancer Cell, 2008. **13**(1): p. 23-35.
56. Toh, B., et al., *Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor.* PLoS Biol, 2011. **9**(9): p. e1001162.
57. Rodriguez, P.C., et al., *Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses.* Cancer Res, 2004. **64**(16): p. 5839-49.
58. van Baren, N. and B.J. Van den Eynde, *Tumoral Immune Resistance Mediated by Enzymes That Degrade Tryptophan.* Cancer Immunol Res, 2015. **3**(9): p. 978-85.
59. Uyttenhove, C., et al., *Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase.* Nat Med, 2003. **9**(10): p. 1269-74.
60. Carbonnelle-Puscian, A., et al., *The novel immunosuppressive enzyme IL4I1 is expressed by neoplastic cells of several B-cell lymphomas and by tumor-associated macrophages.* Leukemia, 2009. **23**(5): p. 952-60.
61. Finak, G., et al., *Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer.* Nat Med, 2008. **14**(5): p. 518-27.
62. Silva-Santos, B., K. Serre, and H. Norell, *gammadelta T cells in cancer.* Nat Rev Immunol, 2015. **15**(11): p. 683-91.
63. Groh, V., et al., *Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma/delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system.* J Exp Med, 1989. **169**(4): p. 1277-94.
64. Chien, Y.H., C. Meyer, and M. Bonneville, *gammadelta T cells: first line of defense and beyond.* Annu Rev Immunol, 2014. **32**: p. 121-55.
65. Carding, S.R. and P.J. Egan, *Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(5): p. 336-45.
66. McVay, L.D., et al., *Regulated expression and structure of T cell receptor gamma/delta transcripts in human thymic ontogeny.* EMBO J, 1991. **10**(1): p. 83-91.
67. Hayday, A., et al., *Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology.* Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 997-1003.

68. Morita, C.T., et al., *Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens.* Immunol Rev, 2007. **215**: p. 59-76.
69. Nascimento, F.P., et al., *Adenosine A1 receptor-dependent antinociception induced by inosine in mice: pharmacological, genetic and biochemical aspects.* Mol Neurobiol, 2015. **51**(3): p. 1368-78.
70. Bonneville, M., R.L. O'Brien, and W.K. Born, *Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(7): p. 467-78.
71. Dar, A.A., R.S. Patil, and S.V. Chiplunkar, *Insights into the Relationship between Toll Like Receptors and Gamma Delta T Cell Responses.* Front Immunol, 2014. **5**: p. 366.
72. Ribeiro, S.T., J.C. Ribot, and B. Silva-Santos, *Five Layers of Receptor Signaling in gammadelta T-Cell Differentiation and Activation.* Front Immunol, 2015. **6**: p. 15.
73. Tanaka, Y., et al., *Natural and synthetic non-peptide antigens recognized by human gamma delta T cells.* Nature, 1995. **375**(6527): p. 155-8.
74. Gober, H.J., et al., *Human T cell receptor gammadelta cells recognize endogenous mevalonate metabolites in tumor cells.* J Exp Med, 2003. **197**(2): p. 163-8.
75. Vavassori, S., et al., *Butyrophilin 3A1 binds phosphorylated antigens and stimulates human gammadelta T cells.* Nat Immunol, 2013. **14**(9): p. 908-16.
76. Gomes, A.Q., D.S. Martins, and B. Silva-Santos, *Targeting gammadelta T lymphocytes for cancer immunotherapy: from novel mechanistic insight to clinical application.* Cancer Res, 2010. **70**(24): p. 10024-7.
77. Agea, E., et al., *Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens.* J Exp Med, 2005. **202**(2): p. 295-308.
78. Dieude, M., et al., *Cardiolipin binds to CD1d and stimulates CD1d-restricted gammadelta T cells in the normal murine repertoire.* J Immunol, 2011. **186**(8): p. 4771-81.
79. Willcox, C.R., et al., *Cytomegalovirus and tumor stress surveillance by binding of a human gammadelta T cell antigen receptor to endothelial protein C receptor.* Nat Immunol, 2012. **13**(9): p. 872-9.
80. Crowley, M.P., et al., *The recognition of the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule, T10, by the gammadelta T cell, G8.* J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1223-30.
81. Adams, E.J., Y.H. Chien, and K.C. Garcia, *Structure of a gammadelta T cell receptor in complex with the nonclassical MHC T22.* Science, 2005. **308**(5719): p. 227-31.
82. Groh, V., et al., *Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(12): p. 6879-84.
83. Kong, Y., et al., *The NKG2D ligand ULBP4 binds to TCRgamma9/delta2 and induces cytotoxicity to tumor cells through both TCRgammadelta and NKG2D.* Blood, 2009. **114**(2): p. 310-7.
84. Lanca, T., et al., *The MHC class Ib protein ULBP1 is a nonredundant determinant of leukemia/lymphoma susceptibility to gammadelta T-cell cytotoxicity.* Blood, 2010. **115**(12): p. 2407-11.
85. Corvaisier, M., et al., *V gamma 9V delta 2 T cell response to colon carcinoma cells.* J Immunol, 2005. **175**(8): p. 5481-8.
86. Girardi, M., et al., *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells.* Science, 2001. **294**(5542): p. 605-9.
87. Farkas, B., et al., *Heat shock protein 70 membrane expression and melanoma-associated marker phenotype in primary and metastatic melanoma.* Melanoma Res, 2003. **13**(2): p. 147-52.
88. Laad, A.D., et al., *Human gamma delta T cells recognize heat shock protein-60 on oral tumor cells.* Int J Cancer, 1999. **80**(5): p. 709-14.

89. Thomas, M.L., et al., *gammadelta T cells lyse autologous and allogenic oesophageal tumours: involvement of heat-shock proteins in the tumour cell lysis.* Cancer Immunol Immunother, 2000. **48**(11): p. 653-9.
90. Zeng, X., et al., *gammadelta T cells recognize a microbial encoded B cell antigen to initiate a rapid antigen-specific interleukin-17 response.* Immunity, 2012. **37**(3): p. 524-34.
91. Vantourout, P. and A. Hayday, *Six-of-the-best: unique contributions of gammadelta T cells to immunology.* Nat Rev Immunol, 2013. **13**(2): p. 88-100.
92. Caccamo, N., et al., *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of human gammadelta T cells.* Cell Mol Immunol, 2013. **10**(1): p. 30-4.
93. Ribot, J.C., et al., *CD27 is a thymic determinant of the balance between interferon-gamma- and interleukin 17-producing gammadelta T cell subsets.* Nat Immunol, 2009. **10**(4): p. 427-36.
94. Inoue, S., et al., *Enhancement of dendritic cell activation via CD40 ligand-expressing gammadelta T cells is responsible for protective immunity to Plasmodium parasites.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(30): p. 12129-34.
95. Brandes, M., K. Willimann, and B. Moser, *Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells.* Science, 2005. **309**(5732): p. 264-8.
96. Wen, L., et al., *Germinal center formation, immunoglobulin class switching, and autoantibody production driven by "non alpha/beta" T cells.* J Exp Med, 1996. **183**(5): p. 2271-82.
97. Jameson, J. and W.L. Havran, *Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing.* Immunol Rev, 2007. **215**: p. 114-22.
98. Toulon, A., et al., *A role for human skin-resident T cells in wound healing.* J Exp Med, 2009. **206**(4): p. 743-50.
99. MacLeod, A.S., et al., *Skin-resident T cells sense ultraviolet radiation-induced injury and contribute to DNA repair.* J Immunol, 2014. **192**(12): p. 5695-702.
100. Girardi, M., et al., *The distinct contributions of murine T cell receptor (TCR)gammadelta+ and TCRalphabeta+ T cells to different stages of chemically induced skin cancer.* J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 747-55.
101. Strid, J., et al., *Acute upregulation of an NKG2D ligand promotes rapid reorganization of a local immune compartment with pleiotropic effects on carcinogenesis.* Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 146-54.
102. Gao, Y., et al., *Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity.* J Exp Med, 2003. **198**(3): p. 433-42.
103. He, W., et al., *Naturally activated V gamma 4 gamma delta T cells play a protective role in tumor immunity through expression of eomesodermin.* J Immunol, 2010. **185**(1): p. 126-33.
104. Lanca, T., et al., *Protective role of the inflammatory CCR2/CCL2 chemokine pathway through recruitment of type 1 cytotoxic gammadelta T lymphocytes to tumor beds.* J Immunol, 2013. **190**(12): p. 6673-80.
105. Street, S.E., et al., *Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells.* J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 879-84.
106. Liu, Z., et al., *Protective immunosurveillance and therapeutic antitumor activity of gammadelta T cells demonstrated in a mouse model of prostate cancer.* J Immunol, 2008. **180**(9): p. 6044-53.
107. Correia, D.V., et al., *Differentiation of human peripheral blood Vdelta1+ T cells expressing the natural cytotoxicity receptor NKp30 for recognition of lymphoid leukemia cells.* Blood, 2011. **118**(4): p. 992-1001.
108. Gertner-Dardenne, J., et al., *Human Vgamma9Vdelta2 T cells specifically recognize and kill acute myeloid leukemic blasts.* J Immunol, 2012. **188**(9): p. 4701-8.
109. Maeurer, M.J., et al., *Human intestinal Vdelta1+ lymphocytes recognize tumor cells of epithelial origin.* J Exp Med, 1996. **183**(4): p. 1681-96.

110. Choudhary, A., et al., *Selective lysis of autologous tumor cells by recurrent gamma delta tumor-infiltrating lymphocytes from renal carcinoma.* J Immunol, 1995. **154**(8): p. 3932-40.
111. Cordova, A., et al., *Characterization of human gammadelta T lymphocytes infiltrating primary malignant melanomas.* PLoS One, 2012. **7**(11): p. e49878.
112. Hannani, D., et al., *Harnessing gammadelta T cells in anticancer immunotherapy.* Trends Immunol, 2012. **33**(5): p. 199-206.
113. Bialasiewicz, A.A., J.X. Ma, and G. Richard, *Alpha/beta- and gamma/delta TCR(+) lymphocyte infiltration in necrotising choroidal melanomas.* Br J Ophthalmol, 1999. **83**(9): p. 1069-73.
114. Inman, B.A., et al., *Questionable relevance of gamma delta T lymphocytes in renal cell carcinoma.* J Immunol, 2008. **180**(5): p. 3578-84.
115. Ma, C., et al., *Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer.* J Immunol, 2012. **189**(10): p. 5029-36.
116. Peng, G., et al., *Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway.* Immunity, 2007. **27**(2): p. 334-48.
117. Hao, J., et al., *Regulatory role of Vgamma1 gammadelta T cells in tumor immunity through IL-4 production.* J Immunol, 2011. **187**(10): p. 4979-86.
118. Paget, C., et al., *Role of gammadelta T cells in alpha-galactosylceramide-mediated immunity.* J Immunol, 2012. **188**(8): p. 3928-39.
119. Cheng, M., et al., *Microbiota modulate tumoral immune surveillance in lung through a gammadeltaT17 immune cell-dependent mechanism.* Cancer Res, 2014. **74**(15): p. 4030-41.
120. Ma, Y., et al., *Contribution of IL-17-producing gamma delta T cells to the efficacy of anticancer chemotherapy.* J Exp Med, 2011. **208**(3): p. 491-503.
121. Rei, M., D.J. Pennington, and B. Silva-Santos, *The emerging Protumor role of gammadelta T lymphocytes: implications for cancer immunotherapy.* Cancer Res, 2015. **75**(5): p. 798-802.
122. Li, X., et al., *Generation of human regulatory gammadelta T cells by TCRgammadelta stimulation in the presence of TGF-beta and their involvement in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6693-700.
123. Ye, J., et al., *Tumor-derived gammadelta regulatory T cells suppress innate and adaptive immunity through the induction of immunosenescence.* J Immunol, 2013. **190**(5): p. 2403-14.
124. Ke, Y., L.M. Kapp, and J.A. Kapp, *Inhibition of tumor rejection by gammadelta T cells and IL-10.* Cell Immunol, 2003. **221**(2): p. 107-14.
125. Rutkowski, M.R., et al., *Microbially driven TLR5-dependent signaling governs distal malignant progression through tumor-promoting inflammation.* Cancer Cell, 2015. **27**(1): p. 27-40.
126. Wakita, D., et al., *Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis.* Eur J Immunol, 2010. **40**(7): p. 1927-37.
127. Carmi, Y., et al., *Microenvironment-derived IL-1 and IL-17 interact in the control of lung metastasis.* J Immunol, 2011. **186**(6): p. 3462-71.
128. Ma, S., et al., *IL-17A produced by gammadelta T cells promotes tumor growth in hepatocellular carcinoma.* Cancer Res, 2014. **74**(7): p. 1969-82.
129. Rei, M., et al., *Murine CD27(-) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(34): p. E3562-70.
130. Coffelt, S.B., et al., *IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis.* Nature, 2015. **522**(7556): p. 345-8.
131. Wu, P., et al., *gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer.* Immunity, 2014. **40**(5): p. 785-800.

132. Hooper, L.V., D.R. Littman, and A.J. Macpherson, *Interactions between the microbiota and the immune system.* Science, 2012. **336**(6086): p. 1268-73.
133. Iida, N., et al., *Commensal bacteria control cancer response to therapy by modulating the tumor microenvironment.* Science, 2013. **342**(6161): p. 967-70.
134. Viaud, S., et al., *The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide.* Science, 2013. **342**(6161): p. 971-6.
135. Lundberg, J.O., E. Weitzberg, and M.T. Gladwin, *The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics.* Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(2): p. 156-67.
136. Oplander, C., et al., *Mechanism and biological relevance of blue-light (420-453 nm)-induced nonenzymatic nitric oxide generation from photolabile nitric oxide derivates in human skin in vitro and in vivo.* Free Radic Biol Med, 2013. **65**: p. 1363-77.
137. Kraft, B., M. Strous, and H.E. Tegetmeyer, *Microbial nitrate respiration--genes, enzymes and environmental distribution.* J Biotechnol, 2011. **155**(1): p. 104-17.
138. Crane, B.R., J. Sudhamsu, and B.A. Patel, *Bacterial nitric oxide synthases.* Annu Rev Biochem, 2010. **79**: p. 445-70.
139. Bogdan, C., *Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update.* Trends Immunol, 2015. **36**(3): p. 161-78.
140. Friebe, A. and D. Koesling, *Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase.* Circ Res, 2003. **93**(2): p. 96-105.
141. Hernansanz-Agustin, P., et al., *Nitrosothiols in the immune system: signaling and protection.* Antioxid Redox Signal, 2013. **18**(3): p. 288-308.
142. Yang, Z., et al., *Lymphocyte development requires S-nitrosoglutathione reductase.* J Immunol, 2010. **185**(11): p. 6664-9.
143. Radi, R., *Peroxynitrite, a stealthy biological oxidant.* J Biol Chem, 2013. **288**(37): p. 26464-72.
144. Jones, L.H., *Chemistry and biology of biomolecule nitration.* Chem Biol, 2012. **19**(9): p. 1086-92.
145. Lima-Junior, D.S., et al., *Inflammasome-derived IL-1beta production induces nitric oxide-mediated resistance to Leishmania.* Nat Med, 2013. **19**(7): p. 909-15.
146. Obermajer, N., et al., *Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling.* J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1433-445.
147. Jianjun, Y., et al., *T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation.* J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1447-62.
148. Saini, A.S., et al., *Inducible nitric oxide synthase is a major intermediate in signaling pathways for the survival of plasma cells.* Nat Immunol, 2014. **15**(3): p. 275-82.
149. Tumurkhuu, G., et al., *B1 cells produce nitric oxide in response to a series of toll-like receptor ligands.* Cell Immunol, 2010. **261**(2): p. 122-7.
150. Li, C., et al., *Interleukin-33 increases antibacterial defense by activation of inducible nitric oxide synthase in skin.* PLoS Pathog, 2014. **10**(2): p. e1003918.
151. Diefenbach, A., et al., *Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in innate immunity.* Science, 1999. **284**(5416): p. 951-5.
152. Nairz, M., et al., *Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB-inducible immune pathways.* Immunity, 2011. **34**(1): p. 61-74.
153. Bronte, V. and P. Zanovello, *Regulation of immune responses by L-arginine metabolism.* Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 641-54.
154. El Kasmi, K.C., et al., *Toll-like receptor-induced arginase 1 in macrophages thwarts effective immunity against intracellular pathogens.* Nat Immunol, 2008. **9**(12): p. 1399-406.
155. Qualls, J.E., et al., *Sustained generation of nitric oxide and control of mycobacterial infection requires argininosuccinate synthase 1.* Cell Host Microbe, 2012. **12**(3): p. 313-23.
156. Serbina, N.V., et al., *TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection.* Immunity, 2003. **19**(1): p. 59-70.

157. Ding, H. and B. Demple, *Direct nitric oxide signal transduction via nitrosylation of iron-sulfur centers in the SoxR transcription activator.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5146-50.
158. Muller, A.J., et al., *Photoconvertible pathogen labeling reveals nitric oxide control of Leishmania major infection in vivo via dampening of parasite metabolism.* Cell Host Microbe, 2013. **14**(4): p. 460-7.
159. Nagaraj, S., et al., *Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer.* Nat Med, 2007. **13**(7): p. 828-35.
160. Nagaraj, S., et al., *Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells.* J Immunol, 2010. **184**(6): p. 3106-16.
161. Lu, T., et al., *Tumor-infiltrating myeloid cells induce tumor cell resistance to cytotoxic T cells in mice.* J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 4015-29.
162. Mazzoni, A., et al., *Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism.* J Immunol, 2002. **168**(2): p. 689-95.
163. Molon, B., et al., *Chemokine nitration prevents intratumoral infiltration of antigen-specific T cells.* J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 1949-62.
164. Everts, B., et al., *Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells.* Blood, 2012. **120**(7): p. 1422-31.
165. Ren, G., et al., *Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide.* Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 141-50.
166. Lukacs-Kornek, V., et al., *Regulated release of nitric oxide by nonhematopoietic stroma controls expansion of the activated T cell pool in lymph nodes.* Nat Immunol, 2011. **12**(11): p. 1096-104.
167. Siegert, S., et al., *Fibroblastic reticular cells from lymph nodes attenuate T cell expansion by producing nitric oxide.* PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27618.
168. Huang, F.P., et al., *Nitric oxide regulates Th1 cell development through the inhibition of IL-12 synthesis by macrophages.* Eur J Immunol, 1998. **28**(12): p. 4062-70.
169. Niedbala, W., et al., *Effects of nitric oxide on the induction and differentiation of Th1 cells.* Eur J Immunol, 1999. **29**(8): p. 2498-505.
170. Lee, S.W., et al., *Nitric oxide modulates TGF-beta-directive signals to suppress Foxp3+ regulatory T cell differentiation and potentiate Th1 development.* J Immunol, 2011. **186**(12): p. 6972-80.
171. Niedbala, W., et al., *Nitric oxide enhances Th9 cell differentiation and airway inflammation.* Nat Commun, 2014. **5**: p. 4575.
172. Lala, P.K. and C. Chakraborty, *Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression.* Lancet Oncol, 2001. **2**(3): p. 149-56.
173. Fukumura, D., S. Kashiwagi, and R.K. Jain, *The role of nitric oxide in tumour progression.* Nat Rev Cancer, 2006. **6**(7): p. 521-34.
174. Dhar, A., et al., *Nitric oxide does not mediate but inhibits transformation and tumor phenotype.* Mol Cancer Ther, 2003. **2**(12): p. 1285-93.
175. Scott, D.J., et al., *Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse.* Gastroenterology, 2001. **121**(4): p. 889-99.
176. Hussain, S.P., et al., *Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis.* Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6849-53.
177. Shi, Q., et al., *Influence of nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis.* Cancer Res, 2000. **60**(10): p. 2579-83.
178. Xie, K., et al., *Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells.* J Exp Med, 1995. **181**(4): p. 1333-43.
179. Dong, Z., et al., *Inverse correlation between expression of inducible nitric oxide synthase activity and production of metastasis in K-1735 murine melanoma cells.* Cancer Res, 1994. **54**(3): p. 789-93.
180. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.

181. Oliveira, C.J., et al., *Nitric oxide and cGMP activate the Ras-MAP kinase pathway-stimulating protein tyrosine phosphorylation in rabbit aortic endothelial cells.* Free Radic Biol Med, 2003. **35**(4): p. 381-96.
182. Kawasaki, K., et al., *Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Akt pathway mediates nitric oxide-induced endothelial cell migration and angiogenesis.* Mol Cell Biol, 2003. **23**(16): p. 5726-37.
183. Zaragoza, C., et al., *Activation of the mitogen activated protein kinase extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 by the nitric oxide-cGMP-cGMP-dependent protein kinase axis regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in vascular endothelial cells.* Mol Pharmacol, 2002. **62**(4): p. 927-35.
184. Jenkins, D.C., et al., *Roles of nitric oxide in tumor growth.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4392-6.
185. Konopka, T.E., et al., *Nitric oxide synthase II gene disruption: implications for tumor growth and vascular endothelial growth factor production.* Cancer Res, 2001. **61**(7): p. 3182-7.
186. Zhang, X.M. and Q. Xu, *Metastatic melanoma cells escape from immunosurveillance through the novel mechanism of releasing nitric oxide to induce dysfunction of immunocytes.* Melanoma Res, 2001. **11**(6): p. 559-67.
187. Tanese, K., E.A. Grimm, and S. Ekmekcioglu, *The role of melanoma tumor-derived nitric oxide in the tumor inflammatory microenvironment: its impact on the chemokine expression profile, including suppression of CXCL10.* Int J Cancer, 2012. **131**(4): p. 891-901.
188. Jayaraman, P., et al., *Tumor-expressed inducible nitric oxide synthase controls induction of functional myeloid-derived suppressor cells through modulation of vascular endothelial growth factor release.* J Immunol, 2012. **188**(11): p. 5365-76.
189. Ekmekcioglu, S., et al., *Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in human metastatic melanoma tumors correlate with poor survival.* Clin Cancer Res, 2000. **6**(12): p. 4768-75.
190. Massi, D., et al., *Inducible nitric oxide synthase expression in benign and malignant cutaneous melanocytic lesions.* J Pathol, 2001. **194**(2): p. 194-200.
191. Johansson, C.C., et al., *Expression and prognostic significance of iNOS in uveal melanoma.* Int J Cancer, 2010. **126**(11): p. 2682-9.
192. Kato, M., et al., *Transgenic mouse model for skin malignant melanoma.* Oncogene, 1998. **17**(14): p. 1885-8.
193. Narita, N., et al., *Functional RET G691S polymorphism in cutaneous malignant melanoma.* Oncogene, 2009. **28**(34): p. 3058-68.
194. Lengagne, R., et al., *Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: role of tumor-specific CD8+ T cells.* Cancer Res, 2004. **64**(4): p. 1496-501.
195. Atre, N., et al., *Role of nitric oxide in heat shock protein induced apoptosis of gammadeltaT cells.* Int J Cancer, 2006. **119**(6): p. 1368-76.
196. Sciorati, C., et al., *Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gammadelta T lymphocytes.* J Biol Chem, 1997. **272**(37): p. 23211-5.
197. Coursey, T.G., P.W. Chen, and J.Y. Niederkorn, *Abrogating TNF-alpha expression prevents bystander destruction of normal tissues during iNOS-mediated elimination of intraocular tumors.* Cancer Res, 2011. **71**(7): p. 2445-54.
198. Jensen, O.A. and S.R. Andersen, *Spontaneous regression of a malignant melanoma of the choroid.* Acta Ophthalmol (Copenh), 1974. **52**(2): p. 173-82.
199. Jain, A., et al., *Spontaneous regression of choroidal melanoma.* Eye (Lond), 2006. **20**(8): p. 959-61.
200. Martin, B., et al., *Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals.* Immunity, 2009. **31**(2): p. 321-30.
201. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response.* Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-16.

202. Cidad, P., A. Almeida, and J.P. Bolanos, *Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide rapidly stimulates cytoprotective GLUT3-mediated glucose uptake through 5'-AMP-activated protein kinase.* Biochem J, 2004. **384**(Pt 3): p. 629-36.
203. MacIver, N.J., R.D. Michalek, and J.C. Rathmell, *Metabolic regulation of T lymphocytes.* Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 259-83.
204. Fidler, I.J., *Selection of successive tumour lines for metastasis.* Nat New Biol, 1973. **242**(118): p. 148-9.
205. Quaglino, P., et al., *Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: results from a single-institution hospital-based observational cohort study.* Ann Oncol, 2010. **21**(2): p. 409-14.
206. Pommier, A., et al., *Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4+ T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(32): p. 13085-90.
207. Galluzzi, L., et al., *Classification of current anticancer immunotherapies.* Oncotarget, 2014. **5**(24): p. 12472-508.

Annexes

Annexe n° 1

Les figures ci-dessous sont commentées dans la discussion.

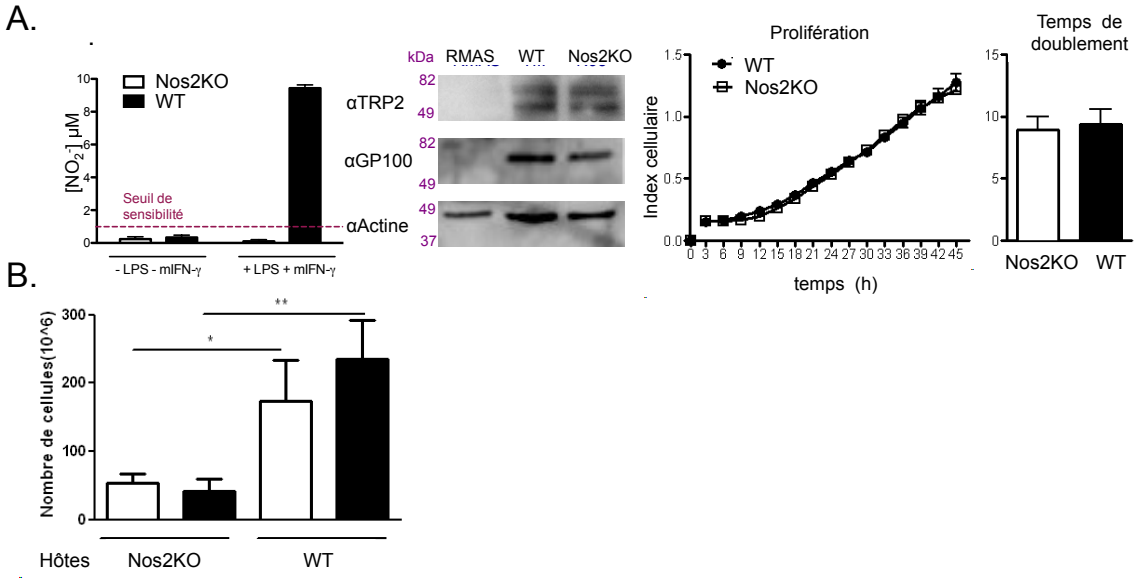


Figure 1 : **L'expression de NOS2 par les cellules de l'hôte augmente la croissance tumorale. (**A**)** Caractérisation de la lignée de mélanome Nos2KO générée à partir d'une métastase de souris RetNos2KO. Quantité de NO produite par les lignées WT et Nos2KO stimulées ou non par 0,05µg/mL de LPS et 250U/mL de mIFN-γ mesurée par la réaction de Griess (gauche). Analyse de l'expression de GP100 et TRP2 dans les lignées RMA-S, de mélanome WT et NOS2KO effectuée par Western Blot (milieu). La prolifération cellulaire et le temps de doublement *in vitro* des lignées ont été obtenus par le système xCELLigence (2 panels de droite). Les barres d'erreurs représentent les déviations standard obtenues sur des quadriplicats. (B) Des expériences de transplantations tumorales ont été réalisées en utilisant les lignées de mélanome Nos2KO (en blanc) et WT (en noir). 10^6 cellules de chaque lignée ont été transplantées dans des souris WT et Nos2KO après 18h de stimulation avec 0,05 µg/mL LPS and 62,5 U/mL mIFNγ. 17 jours après l'injection tumorale les souris ont été sacrifiées et les nombres de cellules ont été comptés. Les barres représentent la moyenne +/- SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au test de Mann-Whitney (* : p<0,05, ** : < 0,001). Les données sont le résultat de 3 expériences indépendantes avec n=6 souris dans chaque groupe.

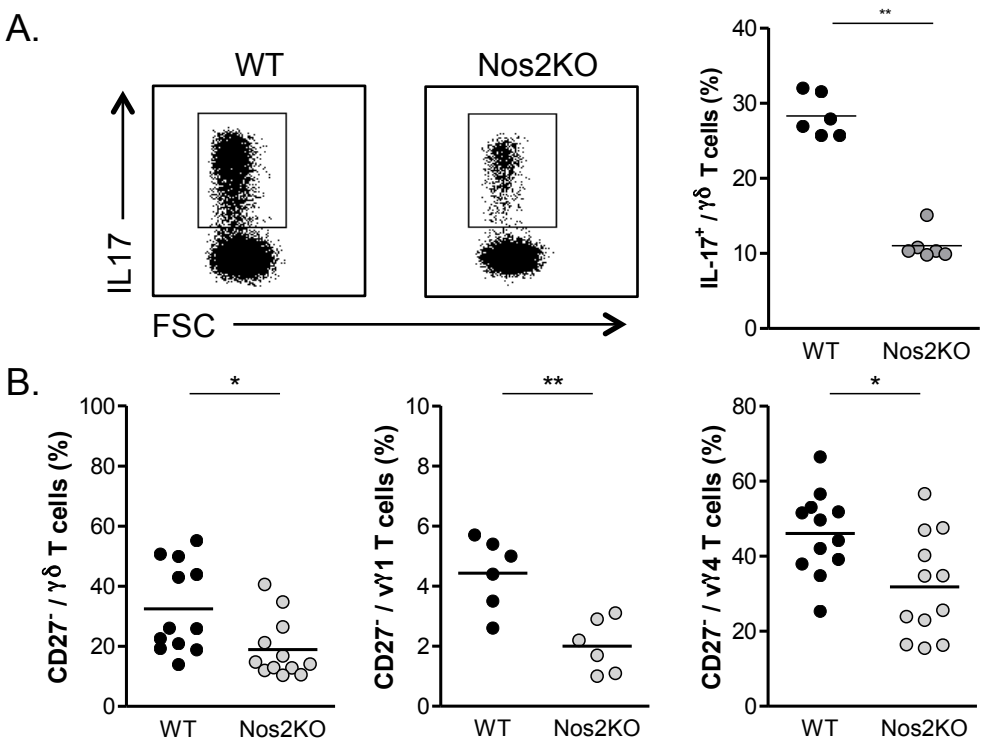


Figure 2 : **NOS2 régule le pourcentage de lymphocytes T γδ CD27⁻ en périphérie.** (A) Pourcentages de lymphocytes T γδ exprimant l'IL-17 après une stimulation PMA/ionomycine dans des souris WT et Nos2KO. Dots plots représentatifs des marquages obtenus en cytométrie (gauche). (B) Analyse des pourcentages de cellules CD27⁻ dans les ganglions périphériques de souris WT et Nos2KO, parmi l'ensemble des lymphocytes T γδ (gauche), parmi les Vγ1⁺ (milieu) et les Vγ4⁺ (droite). Chaque point représente une souris et les barres, la moyenne. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au test de Mann-Whitney (* : $p<0,05$, ** : $< 0,001$).

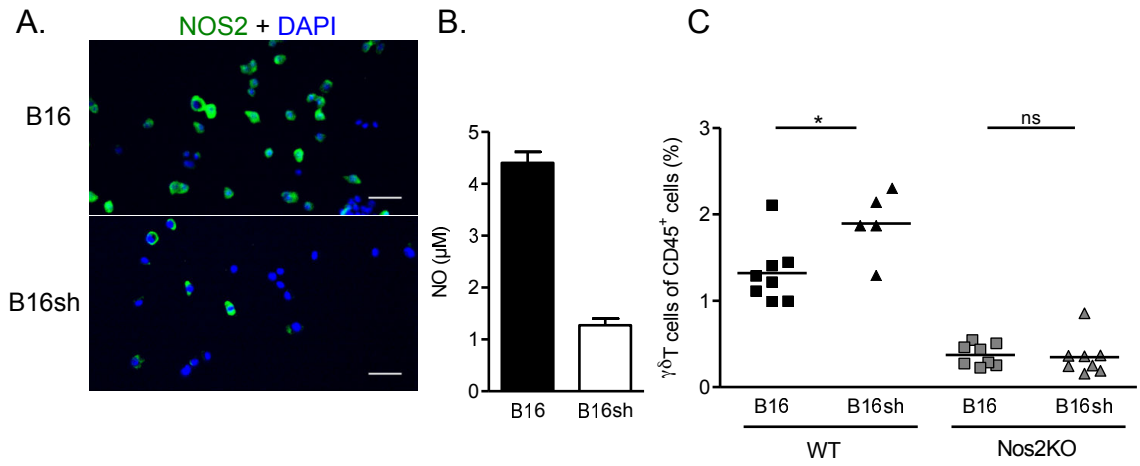


Figure 3 : **L'expression de NOS2 par les cellules de l'hôte est nécessaire à l'expansion et/ou au recrutement des lymphocytes T γδ au site tumoral.** (A, B) Caractérisation de l'extinction de NOS2 dans une lignée de mélanome B16 transfectée stablement avec une construction lentivirale contenant un sh spécifique de NOS2. Les cellules B16 et B16sh ont été cultivées 2 jours en présence de LPS et d'IFN-γ (A). Images représentatives de microscopie confocale après marquage avec un anticorps anti-NOS2 (vert) et le noyau est marqué par le DAPI (bleu). Barres : 50µM. Objectif : 10X. (B) Production de NO mesurée dans les surnageants de culture de B16 et B16sh. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes. (C) Pourcentages de cellules T γδ parmi les cellules $CD45^+$ infiltrant les tumeurs. Les souris WT et Nos2KO ont été injectées en sous-cutanée avec 10^5 B16 ou B16sh. Chaque point représente une souris et les barres, la moyenne. Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au test de Mann-Whitney (* : $p<0,05$, ns : non significatif).

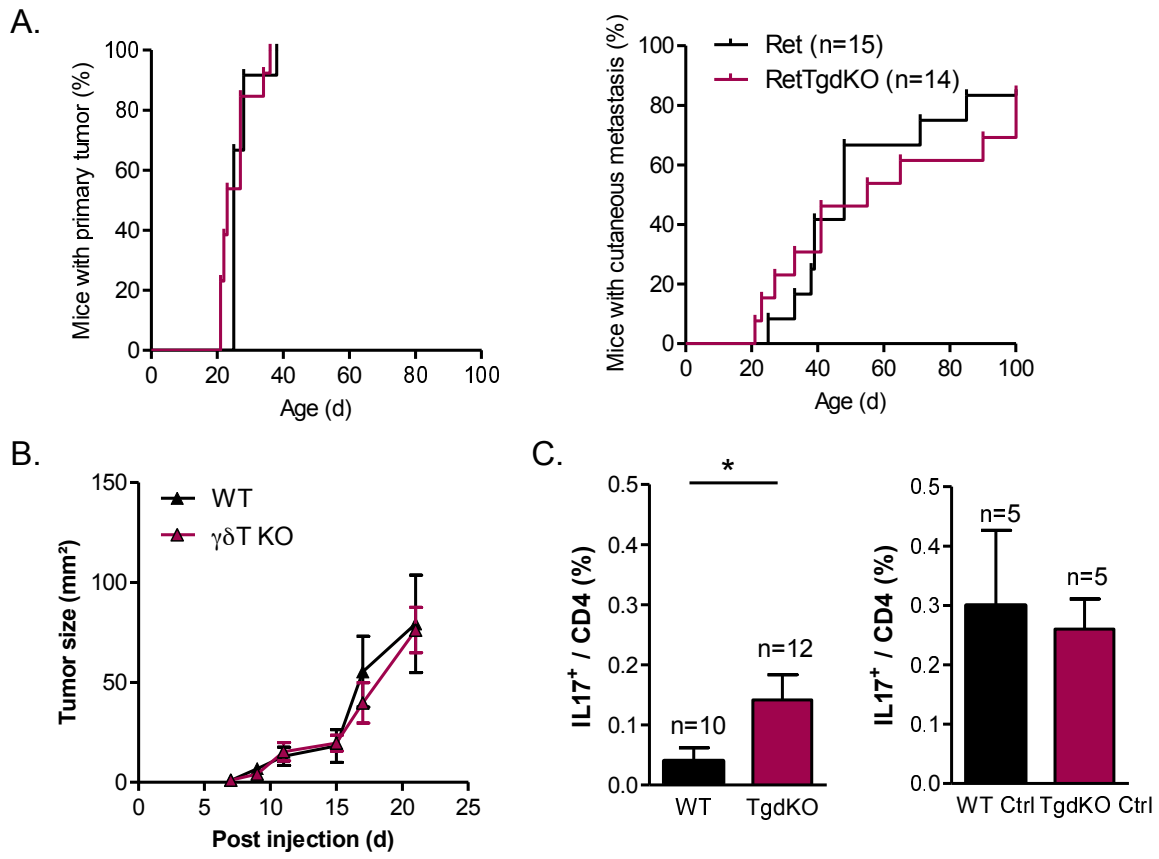


Figure 4 : **Effets de la déficience en lymphocytes T γδ sur le développement du mélanome et la production d'IL-17.** (A) Les souris Ret (n=15) et Ret TγδKO (n=14) ont été diagnostiquées toutes les 2 semaines pendant 100 jours au cours desquels les symptômes du mélanome uvéal ont été consignés. Les cinétiques d'apparition de la tumeur primaire (gauche) et des métastases cutanées de la face et/ou du dos (droite) sont représentées. (B) Croissance tumorale dans des souris WT et déficiente en cellules Tγδ. Les souris ont été injectées avec 10^5 cellules B16-F10 et la taille de la tumeur a été mesurée tous les 2 jours à partir du J7, jusqu'à J21. (C) Pourcentages de lymphocytes T αβ $CD4^+$ produisant de l'IL-17 après une stimulation PMA / ionomycine dans les ganglions drainants la tumeur de mélanome transplantée (gauche) ou dans les ganglions périphériques de souris contrôles non transplantées (droite). Les barres des histogrammes représentent la moyenne ± un écart type (SEM). Le test du log-rank a été utilisé en A et un test de Mann-Whitney en C. * : $p<0.05$.

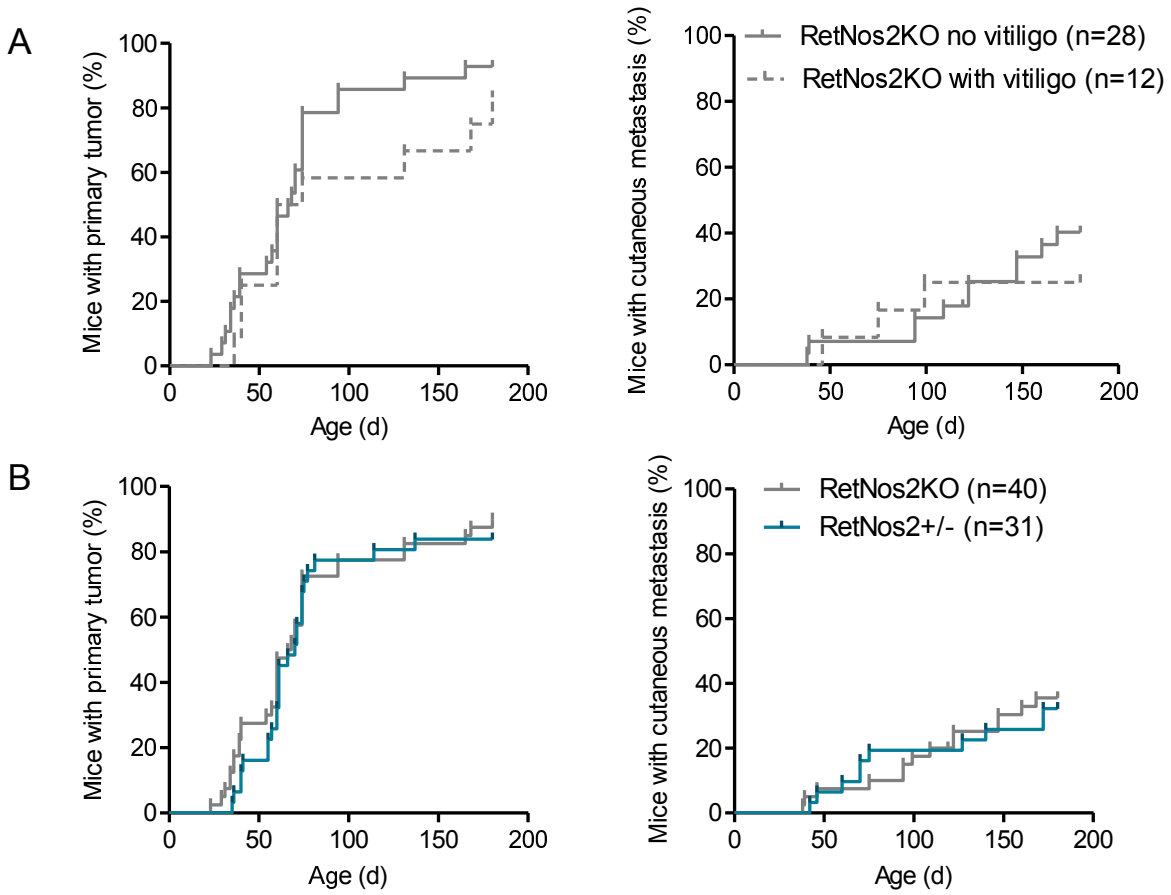
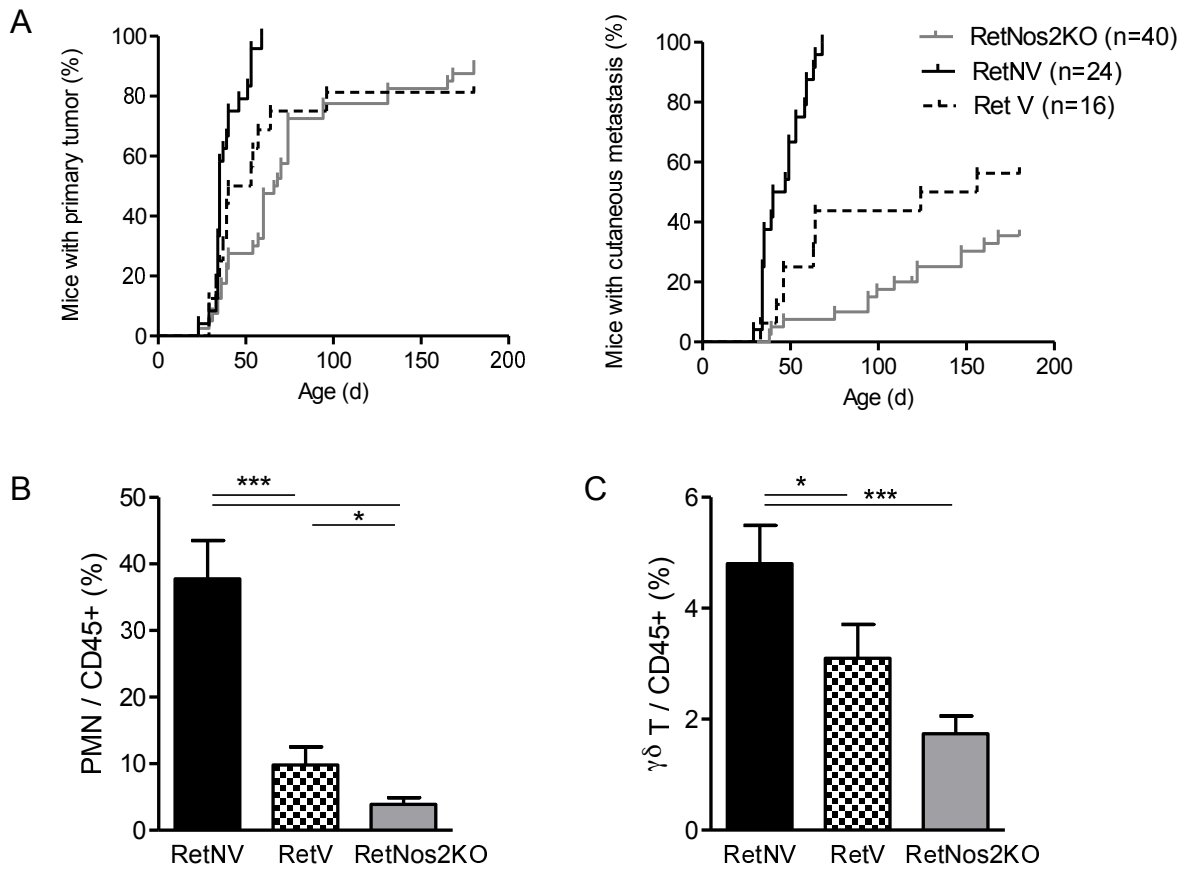


Figure 5 : **Cinétiques d'apparition des tumeurs primaires et des métastases cutanées dans les souris RetNos2KO et RetNos2$^{+/-}$.** 40 souris RetNos2KO et 31 souris RetNos2$^{+/-}$ ont été diagnostiquées toutes les 2 semaines pendant 6 mois au cours desquels les symptômes du mélanome uvéal ont été consignés. Les cinétiques d'apparition de la tumeur primaire (gauche) et des métastases cutanées de la face et/ou du dos (droite) sont représentées. (A) Les souris RetNos2KO sont distinguées en fonction de la présence d'un vitiligo (n=12) ou non (n=28). (B) Comparaison des symptômes en fonction de l'inactivation homozygote ou hétérozygote de Nos2.



<u>Figure 6 :</u> Comparaison des diagnostics cliniques et de l'infiltrat en PMN-MDSCs et lymphocytes T γδ dans les tumeurs primaires en fonction de la présence d'un vitiligo et de l'inactivation du gène Nos2. (A) Les souris Ret sans vitiligo (RetNV) (n=24), Ret avec un vitiligo (n=16) et RetNos2KO (n=40) ont été diagnostiquées toutes les 2 semaines pendant 6 mois au cours desquels les symptômes du mélanome uvéal ont été consignés. Les cinétiques d'apparition de la tumeur primaire (gauche) et des métastases cutanées de la face et/ou du dos (droite) sont représentées. (B) Analyse de l'infiltrat immunitaire présent dans la tumeur primaire des souris RetNV, RetV et RetNos2KO. PMN-MDSCs (gauche), lymphocytes T γδ (droite). Les barres des histogrammes représentent la moyenne ± un écart type (SEM). Le test de Mann-Whitney a été utilisé en B * : $p<0.05$ et *** : $p<0.0001$.

Annexe n° 2

Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4$^+$ T cells

J'ai été associée aux travaux menés par A. Pommier qui s'est intéressé aux mécanismes immunitaires impliqués dans l'établissement d'un vitiligo dans le modèle Ret. J'ai notamment participé à la mise en évidence de la cytotoxicité des monocytes inflammatoires vis-à-vis de cellules tumorales *in vitro*.

Les souris Ret développent spontanément un mélanome métastatique. Après la formation d'une tumeur primaire uvéale, les cellules tumorales disséminent et demeurent dormantes plusieurs semaines avant de former des métastases cutanées et à distance, principalement au niveau de la vessie, du médiastin. Un tiers des souris Ret développe spontanément des dépigmentations cutanées attribuées à la destruction des mélanocytes normaux. Ce vitiligo est associé à un retard du développement tumoral et à une réduction significative de l'incidence des métastases cutanées. Cette étude s'est intéressée à décrypter les mécanismes conduisant à l'apparition du vitiligo et au contrôle de la dissémination tumorale au niveau de la peau. Pour analyser ces mécanismes, les souris Ret ont été traitées par plusieurs anticorps déplétants ou neutralisants.

L'usage dès la naissance d'un anticorps anti-Gr1, éliminant à la fois les PMNs et les monocytes inflammatoires, a conduit à la mort de plus de 70% des souris traitées à 3 mois. Après seulement 4 semaines de traitement, les souris Ret développent plus fréquemment des métastases distantes (100%) et cutanées (56,5%) que les souris Ret non traitées. Ces données indiquent que les PMNs et/ou les monocytes inflammatoires empêchent la dissémination métastatique. Les souris Ret traitées avec un anticorps anti-Ly6G éliminant spécifiquement les PMNs développent plus de vitiligo et moins de métastases cutanées que les souris contrôles. En accord avec les travaux antérieurs de l'équipe, ce résultat démontre la contribution majeure des PMN-MDSCs dans le processus de dissémination ([56]).

L'ensemble des résultats met en évidence un rôle clé des monocytes inflammatoires dans le contrôle de la dissémination tumorale. Le pouvoir cytotoxique des monocytes inflammatoires envers la lignée de mélanome B16 a été montré *in vitro*. Ils agiraient selon un mécanisme dépendant des espèces réactives de l'oxygène. De plus, les lymphocytes T régulateurs via leur sécrétion d'IL-10 limitent la formation du vitiligo. Plusieurs données nous ont permis de proposer l'hypothèse selon laquelle les lymphocytes T régulateurs inhiberaient les propriétés anti-tumorales des monocytes inflammatoires.

Inflammatory monocytes are potent antitumor effectors controlled by regulatory CD4$^+$ T cells

Arnaud Pommier[a,b,c], Alexandra Audemard[a,b,c], Aurélie Durand[a,b,c], Renée Lengagne[a,b,c], Arnaud Delpoux[a,b,c], Bruno Martin[a,b,c], Laetitia Douguet[a,b,c], Armelle Le Campion[a,b,c], Masashi Kato[d], Marie-Françoise Avril[a,b,c], Cédric Auffray[a,b,c], Bruno Lucas[a,b,c,1,2], and Armelle Prévost-Blondel[a,b,c,1,2]

[a]Centre National de la Recherche Scientifique Unité Mixte de Recherche 8104, [b]Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale Unité 1016, and [c]Paris Descartes University, Cochin Hospital, 75014 Paris, France; and [d]Department of Occupational and Environmental Health, Nagoya University Graduate School of Medicine, Aichi 466-8550, Japan

Edited* by Douglas T. Fearon, University of Cambridge School of Clinical Medicine, Cambridge, United Kingdom, and approved June 25, 2013 (received for review January 7, 2013)

The present study evaluates the impact of immune cell populations on metastatic development in a model of spontaneous melanoma [mice expressing the human RET oncogene under the control of the metallothionein promoter (MT/ret mice)]. In this model, cancer cells disseminate early but remain dormant for several weeks. Then, MT/ret mice develop cutaneous metastases and, finally, distant metastases. A total of 35% of MT/ret mice develop a vitiligo, a skin depigmentation attributable to the lysis of normal melanocytes, associated with a delay in tumor progression. Here, we find that regulatory CD4$^+$ T cells accumulate in the skin, the spleen, and tumor-draining lymph nodes of MT/ret mice not developing vitiligo. Regulatory T-cell depletion and IL-10 neutralization led to increased occurrence of vitiligo that correlated with a decreased incidence of melanoma metastases. In contrast, inflammatory monocytes/dendritic cells accumulate in the skin of MT/ret mice with active vitiligo. Moreover, they inhibit tumor cell proliferation in vitro through a reactive oxygen species-dependent mechanism, and both their depletion and reactive oxygen species neutralization in vivo increased tumor cell dissemination. Altogether, our data suggest that regulatory CD4$^+$ T cells favor tumor progression, in part, by inhibiting recruitment and/or differentiation of inflammatory monocytes in the skin.

The concept of suppressive T cells, which was first described in the early 1970s, remained poorly investigated until Sakaguchi et al. demonstrated the suppressive functions of a subset of CD4$^+$ T cells now called regulatory T cells (Tregs) (1). Tregs express Foxp3 (2) and high surface levels of the α-chain of the IL-2 receptor (CD25) and are the main mediators of peripheral tolerance under physiological settings (1). Their role in the suppression of antitumor immunity was originally described in the 1980s (3) but remained, at first, largely underestimated. The demonstration that systemic depletion of Tregs favors tumor rejection in mouse models highlighted their contribution in tumor progression (4). Whereas it is established that Tregs potently interfere with tumor-specific T cells (5–8), their impact on innate immune cells, in particular, on myeloid cells, has been clearly less investigated in the context of tumor development (9, 10).

To decipher the role of Tregs in the relationship between cancer immunity and autoimmunity, we used mice expressing the human RET oncogene under the control of the metallothionein promoter (MT/ret mice) (11). In this model, the primary uveal tumor disseminates early but remains dormant for several weeks (12, 13). MT/ret mice then develop cutaneous metastases and finally distant (i.e., pulmonary, visceral, and mediastinal adenopathy) metastases (14). A significant proportion of MT/ret mice spontaneously develops vitiligo-like depigmentations. The tumor progression is significantly delayed in mice harboring vitiligo compared with mice without depigmented skin (14). The development of vitiligo in melanoma patients has also been associated with a better prognosis (15–18). It occurs most often in immunotherapeutic trials, although vitiligo may also develop in patients treated with surgery, radiotherapy, or chemotherapy.

Consistent with previous data obtained in melanoma patients (19, 20), we found that Tregs accumulated in tumor-draining lymph nodes (TdLNs) of MT/ret mice. Treg depletion led to a decreased occurrence of cutaneous metastases and an increased percentage of mice developing vitiligo. Interestingly, inflammatory (Ly-6C^{high}) monocytes and dendritic cells (DCs), initially described as important cells during inflammatory and infectious processes, appeared to be critical effectors during the early phase of the antitumor response, in particular by killing disseminated malignant melanocytes. Altogether, our results suggest that Tregs prevent the recruitment and/or differentiation of Ly-6C^{high} monocytes in the skin, subsequently favoring tumor progression.

Results

Decreased Incidence of Cutaneous Metastases in MT/ret Mice Developing Vitiligo. MT/ret mice were monitored for the occurrence of primary uveal melanoma, cutaneous metastases, and vitiligo (*SI Appendix*, Fig. S1). Most of MT/ret mice display a primary tumor at 3 mo of age (*SI Appendix*, Table S1 and ref. 12). Cutaneous metastases develop in nearly two-thirds of 6-mo-old mice and vitiligo in one-third (Fig. 1*A*). As described previously (14), mice with vitiligo displayed less cutaneous metastases than mice without vitiligo. Next, we compared, by flow cytometry (*SI Appendix*, Figs. S2 and S3), the proportions of the various myeloid and lymphoid subsets recovered from the spleen and cervical lymph nodes (LNs) (LNs that drained the primary tumor and facial cutaneous metastases) of 6-mo-old MT/ret mice with or without vitiligo (Fig. 1*B*). We did not detect any significant difference. Moreover, the proportions of these subpopulations were similar to those of age-matched control mice. Of note, melanoma cells were undetectable by flow cytometry within the secondary lymphoid organs of 6-mo-old mice (*SI Appendix*, Fig. S4).

Hematopoietic cells infiltrating cutaneous metastases were not different both quantitatively (CD45$^+$ cells represented 3.9% ± 0.5 and 5.0% ± 0.5 of the cells recovered from metastases of mice with or without vitiligo respectively; *SI Appendix*, Fig. S4) and qualitatively (Fig. 1*B*) whether or not the mice displayed vitiligo. These results suggest that the protection against metastatic spreading in mice harboring vitiligo would not rely on the quantity and nature of immune cells infiltrating established tumors.

Tregs Accumulate in the Spleen and TdLNs of Nonvitiligo MT/ret Mice. Tregs (Foxp3$^+$) were not more frequent within cutaneous metastases whether or not MT/ret mice displayed vitiligo (Fig. 2 *A*

IMMUNOLOGY

Author contributions: A.P., M.-F.A., C.A., B.L., and A.P.-B. designed research; A.P., A.A., A. Durand, R.L., A. Delpoux, B.M., L.D., A.L.C., C.A., and A.P.-B. performed research; M.K. contributed new reagents/analytic tools; A.P., A.A., A. Durand, B.L., and A.P.-B. analyzed data; and A.P., B.L., and A.P.-B. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

[1]B.L. and A.P.-B. contributed equally to this work.

[2]To whom correspondence may be addressed. E-mail: bruno.lucas@inserm.fr or armelle.blondel@inserm.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1300314110/-/DCSupplemental.

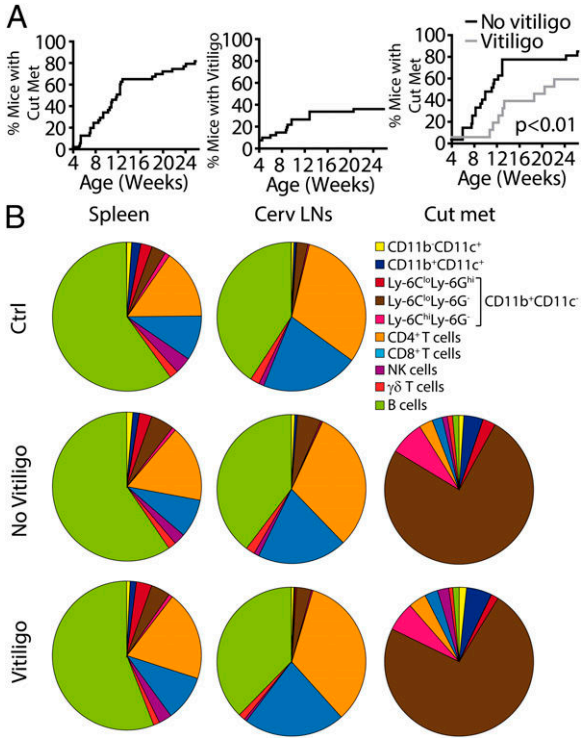


Fig. 1. Characterization of the MT/ret mouse model. Diagnosis was performed over a 6-mo period. (*A*, *Left*) Incidence of cutaneous metastases (Cut Met) in MT/ret mice (n = 42). (*A*, *Center*) Vitiligo occurrence in MT/ret mice. (*A*, *Right*) Cut Met incidence in MT/ret mice with (n = 16) or without vitiligo (n = 26). (*B*) Immune composition of tissues from 6-mo-old Ctrl or MT/ret mice with or without vitiligo. The different immune populations were defined as shown in *SI Appendix*, Figs. S2 and S3. Proportions are shown within CD45$^+$ cells for Cut Met.

and *B*). In contrast, Tregs accumulated both in proportion and absolute number (Fig. 2 *A* and *B* and *SI Appendix*, Fig. S5) in the spleen and cervical LNs of MT/ret mice without vitiligo compared with either MT/ret mice developing vitiligo or control mice. More precisely, Tregs were more frequent in the spleen and cervical LNs whether or not they have developed cutaneous or distant metastases (*SI Appendix*, Fig. S6). By contrast, the proportion of Tregs was increased in axillary LNs only in mice developing dorsal or distant metastases and in mesenteric LNs only in mice developing distant metastases. The increase in the proportion of Tregs observed in nonvitiligo MT/ret mice was, thus, restricted to TdLNs and the spleen.

Tregs Inhibit the Onset of Vitiligo and Favor Tumor Spread. We then investigated the role of Tregs in tumor spread and the occurrence of vitiligo. MT/ret mice were injected twice a week with the anti-CD25 depleting Ab, beginning 2 d after birth and monitored from weaning up to 6 mo of age. Anti-CD25 treatment did not affect the occurrence of primary tumors (*SI Appendix*, Table S1) but significantly delayed the development of cutaneous metastases (Fig. 2*C*). This reduced tumor spread correlated with a significant increase in the incidence of vitiligo.

We have recently shown that T cell-deficient MT/ret mice (RetCD3ε^{KO} mice) developed cutaneous metastases smaller than those from T cell-competent mice (21). Here, we further observed that T-cell deficiency correlated with a significant increase in the occurrence of vitiligo (Fig. 3*A*). Interestingly, RetCD3ε^{KO} mice with vitiligo developed less cutaneous metastases than nonvitiligo RetCD3ε^{KO} mice. Thus, similar to MT/ret mice, vitiligo in RetCD3ε^{KO} mice is associated with a more efficient tumor control. To confirm that Tregs were acting on tumor cell dissemination, we reconstituted RetCD3ε^{KO} mice, 5 d after birth, with CD4$^+$ T cells recovered from the spleen and cervical LNs of either C57BL/6 control mice or nonvitiligo tumor-bearing MT/ret mice. Reconstituted RetCD3ε^{KO} mice displayed an increased occurrence of cutaneous metastases correlated with a decrease in the incidence of vitiligo (Fig. 3*B* and *SI Appendix*, Table S2). Altogether, our results suggest that Tregs both inhibit vitiligo development and promote metastasis.

An Innate Immune Population Controls the Development of Cutaneous Metastases and Vitiligo. To determine which cells controlled tumor spread, we used a depleting Ab strategy. CD8$^+$ T-cell depletion had no effect on the incidence of cutaneous tumors or vitiligo (*SI Appendix*, Fig. S7*A*). In line with our previous data (22), the proportion of mice developing distant metastases increased after anti-CD8 treatment (*SI Appendix*, Table S2), indicating that CD8$^+$ T cells were not responsible for the control of cutaneous metastases but were crucial for controlling visceral dissemination.

The development of vitiligo has been associated with a production of Abs directed against melanocyte antigens (23). We surmised that CD3ε^{KO} mice are inefficient in producing antibodies because of the absence of CD4 T-cell help. To test this hypothesis, sera from T cell-deficient or -competent MT/ret mice were incubated with Melan-ret cells, a cell line derived from a cutaneous metastasis of a MT/ret mouse (14) or with Lewis lung carcinoma cells (LLCs). Significant staining (MFI ratio, >2) revealed the presence of autoantibodies in sera derived from MT/ret mice only with Melan-ret cells, but even in this case, only 9 out of 54 animals were seropositive (Fig. 3*C*). Thus, B lymphocytes do not seem to be required for the development of vitiligo in RetCD3ε^{KO} mice. Altogether, our data suggest that a cell population belonging to the innate immunity plays an important role in vitiligo development and in controlling tumor cell dissemination at the skin site.

Inflammatory Monocytes/DCs Play a Key Role in Controlling Tumor Dissemination. The occurrence of tumors and vitiligo was similar in MT/ret mice untreated or treated with an anti-NK1.1 Ab (*SI Appendix*, Table S2 and Fig. S7*B*), suggesting no crucial role of

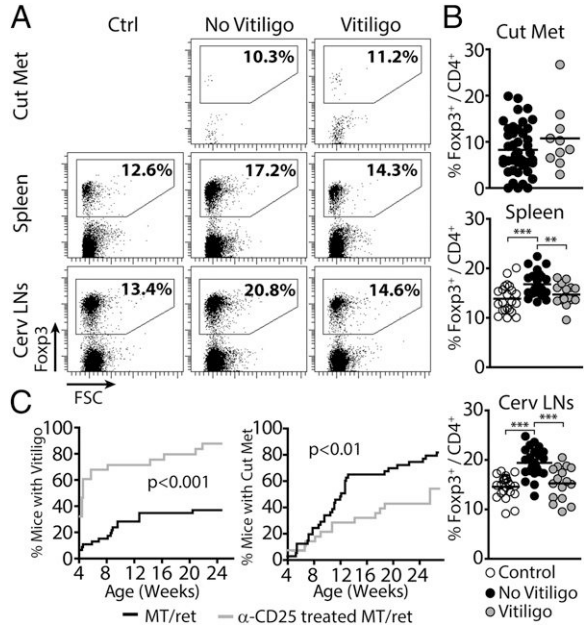


Fig. 2. Tregs accumulate in the spleen and TdLNs of MT/ret mice not developing vitiligo. (*A*) FSC/Foxp3 dot plots are shown for CD45$^+$ CD4$^+$ CD8$^-$ TcRβ$^+$ cells from the tissues of 6-mo-old Ctrl mice and MT/ret mice with or without vitiligo. (*B*) Percentage of Tregs in Cut Met, spleen, and cervical lymph nodes (Cerv LNs) of the indicated mice. (*C*) Incidence of Cut Met and vitiligo in MT/ret mice treated (n = 28) or not (n = 42) with anti-CD25 Ab.

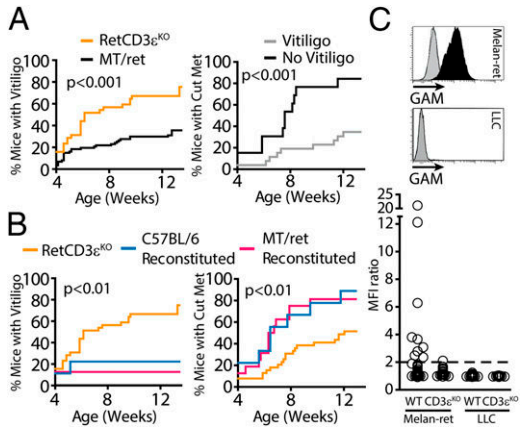


Fig. 3. Increased incidence of vitiligo in RetCD3ε^{KO} mice. (*A*) Vitiligo occurrence in MT/ret (n = 87) and RetCD3ε^{KO} (n = 39) mice (*Left*) and incidence of Cut Met in RetCD3ε^{KO} mice with or without vitiligo (*Right*). (*B*) Incidence of vitiligo and Cut Met in RetCD3ε^{KO} mice or RetCD3ε^{KO} mice reconstituted with CD4$^+$ T cells from either C57BL/6 Ctrl mice (n = 9) or 3-mo-old MT/ret mice without vitiligo (n = 16). Differences were significant between untreated RetCD3ε^{KO} mice and RetCD3ε^{KO} mice reconstituted with CD4$^+$ T cells from both Ctrl or MT/ret mice. (*C*) Flow-cytometric analysis of the presence of antitumor Abs in the sera of 3-mo-old MT/ret and RetCD3ε^{KO} mice. (*C*, *Upper*) Representative histograms (empty, staining with the secondary Ab only; gray, negative serum; black, positive serum). (*C*, *Lower*) MFI ratios were calculated by dividing the MFI obtained with a given serum by the MFI obtained with the secondary Ab.

natural killer (NK) cells in controlling tumor spread. Then, we assessed the role of cells from the myeloid lineage using the anti-Gr1 Ab. Gr1, a common epitope to Ly-6C and Ly-6G molecules, is expressed by granulocytes (Ly-6C^{low}, Ly-6G$^+$), inflammatory monocytes/DCs (Ly-6C^{high} Ly-6G$^-$), and a fraction of CD4$^+$ and CD8$^+$ T cells. In both MT/ret and RetCD3ε^{KO} mice, the treatment rapidly led to the death of a major proportion of our cohorts (Fig. 4*A*). Only 34.6% (9/26) of RetCD3ε^{KO} mice and 26.1% (6/23) of MT/ret mice were still alive after 3 mo of treatment. The remaining mice displayed an increased occurrence of cutaneous metastases and a decrease in vitiligo incidence (*SI Appendix*, Table S2). Mice displaying signs of poor health before 4 wk of age were killed. Interestingly, 56.5% of them had cutaneous metastases and nearly all of them already displayed pulmonary, visceral metastases, and/or mediastinal adenopathy (Fig. 4*B*). Thus, anti-Gr1 depletion acts on tumor spread at both cutaneous and distant sites. Because data were similar in both T cell-competent and -deficient mice, it seemed likely that granulocytes or/and inflammatory monocytes/DCs, rather than T cells, were involved in this process.

Next, we treated MT/ret mice with an anti–Ly-6G Ab. Granulocyte-depleted mice displayed a higher incidence of vitiligo and less cutaneous metastases than untreated mice (Fig. 4*C*). Interestingly, granulocyte depletion led to a rise in Ly-6C^{high} monocytes and DCs in blood and spleen (Fig. 4*D*). Thus, depletion of granulocytes may act either directly through the depletion of a key protumor effector and/or indirectly by increasing Ly-6C^{high} monocyte egress from the bone marrow. Inflammatory monocytes exit the bone marrow in response to CCL2 (24). Interestingly, a single injection of CCL2 led to transient increased proportions of both granulocytes and inflammatory monocytes in the blood (*SI Appendix*, Fig. S8). Granulocyte depletion may, thus, increase the level of serum CCL2 and, accordingly, favor the accumulation of circulating monocytes that would mediate vitiligo and promote tumor protection. In line with this assumption, CCL2-treated MT/ret mice displayed a higher incidence of vitiligo and a more efficient tumor control than untreated mice (Fig. 4*E*). Altogether, our results strongly suggest that inflammatory monocytes/DCs play a key role in controlling tumor cell dissemination.

To further understand the impact of myeloid cells on tumor development, the proliferation of a melanoma cell line (Melan-ret) was dynamically monitored in vitro. When it reached exponential growth phase, Ly-6C^{high} monocytes/DCs or Ly-6G$^+$ granulocytes were added (*SI Appendix*, Fig. S9). Ly-6G$^+$ granulocytes had only a marginal effect. Conversely, Ly-6C^{high} monocytes/DCs significantly decreased the tumor cell-proliferation index, and the percentage of inhibition of tumor cell proliferation was still significant at an effector to target ratio of 2/1 (*SI Appendix*, Fig. S9 *A–C*). Interestingly, *N*-acetyl cysteine (NAC), a strong inhibitor of reactive oxygen species (ROS) activity, reduced the impact of Ly-6C^{high} monocytes on tumor cell proliferation more significantly than a neutralizing anti–TNF-α Ab (*SI Appendix*, Fig. S9*D*). Consistently, the addition of NAC in drinking water from birth resulted in a decreased survival rate of treated MT/ret mice (*SI Appendix*, Table S2). Moreover, mice surviving until 3 mo of age displayed an increased occurrence of metastases correlated with a decreased incidence of vitiligo. Altogether, our results suggest that Ly-6C^{high} monocytes/DCs exhibit strong antitumor properties, in part through a ROS-dependent mechanism.

Inflammatory Monocytes/DCs Accumulate in the Skin of MT/ret Mice with Active Vitiligo. To identify the immune cells involved in the process of depigmentation in the MT/ret model, we studied the nature of hematopoietic cells infiltrating the skin of mice with or without vitiligo. Only inflammatory DCs were significantly more frequent in vitiliginous skin of 6-wk-old MT/ret mice (*SI Appendix*,

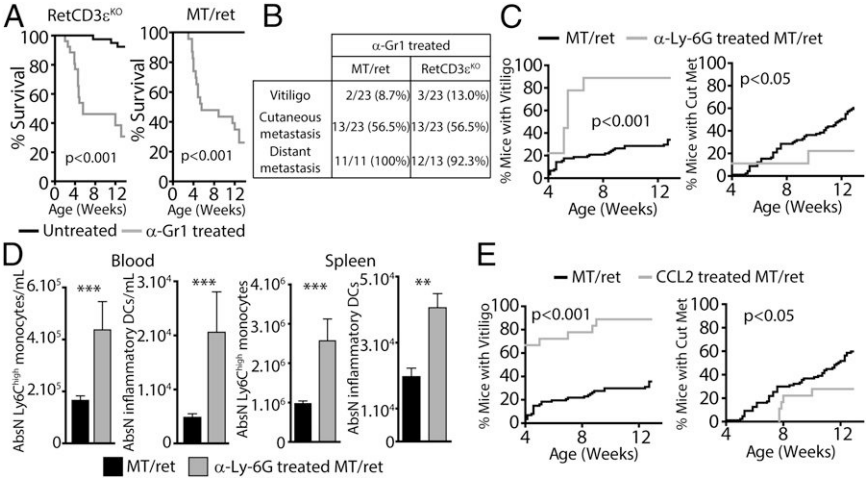


Fig. 4. Ly-6C–expressing innate immune cells are involved in vitiligo development and control of tumor spread. (*A*) Survival curves of RetCD3ε^{KO} (n = 26) and MT/ret (n = 23) mice treated or not with anti-Gr1 Ab. (*B*) Prevalence of vitiligo and cutaneous and distant metastases in 4-wk-old anti-Gr1–treated RetCD3ε^{KO} and MT/ret mice. Results are expressed as the number of mice with the indicated symptoms over the total number of analyzed mice. Numbers in brackets represent the proportion of analyzed mice with the indicated symptoms. (*C*) Incidence of vitiligo and Cut Met in MT/ret mice treated (n = 9) or not (n = 87) with anti–Ly-6G Ab. (*D*) Absolute numbers of Ly-6C^{high} monocytes and inflammatory DCs in the blood and spleen of 3-wk-old anti–Ly-6G–treated MT/ret mice compared with untreated ones. (*E*) Incidence of vitiligo and Cut Met in MT/ret mice treated (n = 18) or not (n = 87) with CCL2.

IMMUNOLOGY

Fig S10). We hypothesized that actors mediating vitiligo may not remain in the skin once it has been purged of dormant malignant melanocytes. Thus, we studied the skin of 3-wk-old mice with or without active ongoing vitiligo and found that the proportions of both inflammatory monocytes and DCs were significantly higher in vitiliginous skin (Fig. 5*A*–*C*). Together with the results obtained by selectively depleting populations of hematopoietic cells (*SI Appendix*, Table S2), these data strongly suggest that inflammatory monocytes/DCs are the main actors of vitiligo.

Interestingly, an increased proportion of Tregs can be detected in the skin of MT/ret mice not developing vitiligo compared with control mice or to MT/ret mice with ongoing vitiligo (Fig. 5*D*). Moreover, the percentages of inflammatory monocytes and DCs among skin-derived cells inversely correlate with the proportion of Tregs (Fig. 5*E*). This result strongly suggests that Tregs favor tumor spread by inhibiting the recruitment and/or the differentiation of inflammatory monocytes in the skin and subsequent killing of dormant malignant melanocytes.

IL-10 Inhibits the Recruitment/Differentiation of Inflammatory Monocytes/DCs in the Skin. Because skin-derived Tregs are very good IL-10 producers compared with Tregs from secondary lymphoid organs (*SI Appendix*, Fig. S11), we next investigated the impact of IL-10 on antitumor responses. The development of cutaneous metastases was significantly delayed in mice treated with an anti–IL-10 receptor (IL-10R) Ab, and this was correlated with a large increase in the occurrence of vitiligo (Fig. 6*A*). These curves were similar to those obtained after anti-CD25 treatment (Fig. 2*D*). Of note, an important proportion of Tregs in the spleen and TdLNs of MT/ret mice can be observed after IL-10 neutralization even when MT/ret mice display a vitiligo (Fig. 6*B*). Thus, although IL-10 neutralization does not inhibit the accumulation of Tregs in the spleen and TdLNs, it seems to counteract their protumor action.

Far more inflammatory DCs infiltrated the skin of 2- and 3-wk-old MT/ret mice treated with anti–IL-10R Ab compared with untreated animals (Fig. 6*C*). The proportion of Ly-6C^{high} monocytes was also increased 2 wk after birth but went back to baseline levels in 3-wk-old mice. Altogether, our data suggest that IL-10 suppress antitumor effectors of the innate immunity. The fact that similar results were obtained by neutralizing IL-10 or depleting Tregs (Fig. 6*C*) suggests that IL-10 might be derived from Tregs.

Discussion

Tregs are overrepresented in the peripheral blood of patients with metastatic melanoma compared with healthy donors and are enriched in the primary tumor, TdLNs, and metastatic lesions (20). In the aggressive melanoma developed in mice on conditional deletion of the INK4A/ARF tumor suppressor genes with concomitant expression of H-RasG12V, Tregs significantly accumulate in TdLNs and tumors (25). In MT/ret mice, we found that Treg infiltration remained marginal in cutaneous metastases. Tregs may, thus, not be the main suppressor cells at the tumor site, whereas other suppressive cells may hamper antitumor immunity locally in our model. In line with such an assumption, we have recently shown that type 2 macrophages infiltrate massively the most aggressive metastases (21), which is consistent with observations in human melanoma biopsies (26–28). In contrast, the proportion of Tregs among CD4$^+$ T cells was increased in the spleen and TdLNs of MT/ret mice without vitiligo, in agreement with the accumulation of Tregs observed in TdLNs few days after tumor cell implantation in several transplanted tumor models (7).

Immunosuppression mediated by Tregs is a dominant mechanism of tumor evasion. In many mouse models, CD25$^+$ T-cell ablation before tumor transplantation enhances immunity, tumor clearance, and survival of recipient mice (29). In MT/ret mice, Treg depletion was associated with a significant decrease in the incidence of cutaneous metastasis. Our results contrast with those reported by Umansky and coworkers showing that anti-CD25 Ab treatment did not delay melanoma development in MT/ret mice (30). Failure of the treatment in their study may be attributable to the late-depletion strategy. Indeed, they depleted Tregs in adult MT/ret mice, whereas we treated them from day 2 after birth. Thus, in the MT/ret mouse model, Tregs may have a crucial role at early stages of spontaneous tumor development. Treg depletion from birth also induced a marked increase in the proportion of MT/ret mice developing vitiligo. In line with this result, Treg frequency is decreased and/or their suppressive capacities impaired in vitiliginous or perilesional skin in humans (31–33).

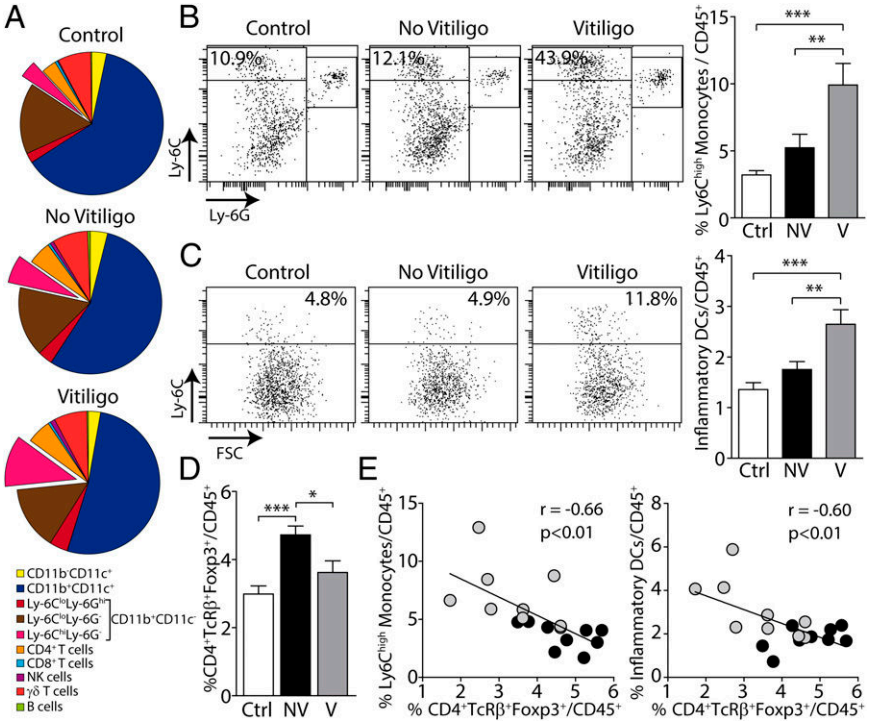


Fig. 5. Inflammatory monocytes and DCs accumulate in the skin of MT/ret mice with active vitiligo. (*A*) Characterization of immune cells infiltrating the skin of 3-wk-old Ctrl or MT/ret mice. Proportions are shown within CD45$^+$ cells. (*B*) Representative Ly-6G/Ly-6C dot plots are shown for CD45$^+$ CD11b$^+$ CD11c$^-$ NK1.1$^-$ cells (*Left*). The proportion of Ly-6C^{high} monocytes (CD11b$^+$ CD11c$^-$ NK1.1$^-$ Ly-6G$^-$ Ly-6C^{high} cells) within CD45$^+$ cells was plotted (*Right*). (*C*) Representative FSC/Ly-6C dot plots are shown for CD45$^+$ CD11b$^+$ CD11c$^+$ cells (*Left*). The proportion of inflammatory DCs (CD11b$^+$ CD11c$^+$ Ly-6C^{high} cells) within CD45$^+$ cells was plotted (*Right*). (*D*) Quantification of the Treg infiltrate within CD45$^+$ cells in the skin of indicated mice. (*E*) Correlation between the infiltration of Tregs and those of Ly-6C^{high} monocytes (*Left*) or inflammatory DCs (*Right*) in the skin of 3-wk-old MT/ret mice with (V) (gray) or without vitiligo (NV) (black).

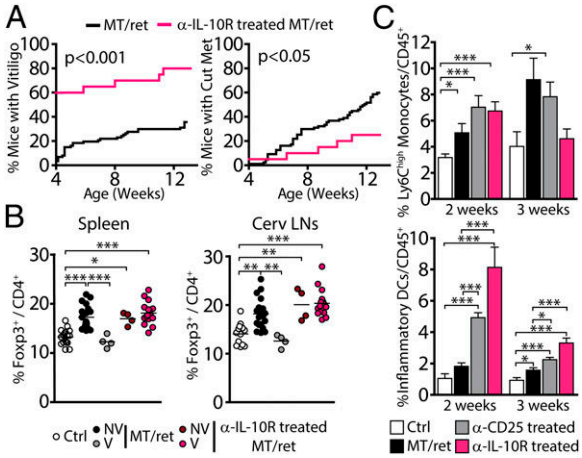


Fig. 6. Effect of IL-10R neutralization. (*A*) Incidence of Cut Met and vitiligo in 3-mo-old MT/ret mice treated (n = 20) or not (n = 87) with anti–IL-10R Ab. (*B*) Percentage of Tregs in the spleen and Cerv LNs of 3-mo-old Ctrl and MT/ret mice and anti–IL-10R–treated MT/ret mice. NV, no vitiligo; V, vitiligo. (*C*) The proportions of skin Ly-6C^{high} monocytes and inflammatory DCs are shown for 2- and 3-wk-old Ctrl or MT/ret mice. Proportions are shown within CD45$^+$ cells.

We have shown previously that strong melanoma-specific CD8$^+$ T-cell responses were detected in the secondary lymphoid organs of MT/ret mice with melanoma-associated vitiligo and that mice developing vitiligo were fully protected toward a challenge with syngeneic melanoma cells by a CD8$^+$ T cell-dependent mechanism (14). Moreover, CD8$^+$ T cells specific for melanocyte-differentiation antigens have been often detected in patients with vitiligo or melanoma-associated vitiligo (34, 35). Here, we found that CD8$^+$ T-cell depletion from birth had no impact on the onset of vitiligo, as well as on the incidence of cutaneous metastases. A lack of implication of CD8$^+$ T cells in the etiology of vitiligo and in controlling metastatic spread at the skin level fits with the results obtained in RetCD3ε^{KO} mice. Indeed, T cell-deficient MT/ret mice did not develop more aggressive cutaneous metastases than their T cell-competent littermates and yet developed a vitiligo. In MT/ret mice, increased T-cell reactivity against melanoma antigens would, thus, be a consequence of vitiligo rather than its cause. In line with this explanation, Byrne et al. have established that melanocyte destruction is crucial for inducing lasting melanoma-specific CD8$^+$ T cell-mediated responses, thus illustrating that immune-mediated destruction of normal tissues can perpetuate adaptive immune responses to cancer (36).

Our study provides unexpected insights into the mechanisms involved in the control of metastatic spread. Whereas CD8$^+$ T cell- or NK cell-depleted MT/ret mice survived over the 3-mo period of diagnosis, the majority of MT/ret mice treated with the anti-Gr1 Ab rapidly died. Treatment with the anti–Ly-6G Ab or the chemokine CCL2, both resulting in a rise in circulating inflammatory monocyte and DC levels, are consistent with a key role for these innate immune cells in controlling tumor progression. Inflammatory Ly-6C^{high} monocytes are selectively recruited to inflamed tissues and lymph nodes in vivo and produce high levels of TNF-α during infection or tissue damage (37). A number of studies strongly support the conclusion that at least a proportion of TNF-α–producing inflammatory DCs are the progeny of inflammatory monocytes (38). In the MT/ret model, we assume that the dissemination of tumor cells favors the recruitment within the skin of inflammatory monocyte/DCs that subsequently may lyse transformed, as well as normal, melanocytes by a bystander effect. Distinct mechanisms of monocyte-mediated tumoricidal activity have been highlighted using melanoma cell lines as target cells, related either on a direct recognition and cytotoxicity or on antibody-mediated lysis (39–41). Here, we found that inflammatory monocytes/DCs slowed down the in vitro growth of melanoma cells through their production of ROS, with TNF-α being apparently less important in this process. Moreover, ROS neutralization in vivo led to increased tumor cell dissemination. Altogether, our results suggest that inflammatory monocytes/DCs exert their antitumor properties, at least in part, via a ROS-dependent mechanism.

Inflammatory monocytes and DCs accumulate in the skin of MT/ret mice with active vitiligo. Interestingly, the inverse correlation between the proportion of Tregs and the proportion of Ly-6C^{high} monocytes and DCs among skin-derived cells suggests that Tregs interfere with their antitumor properties. Rubtsov et al. have found that Treg-derived IL-10 reduces inflammation at environmental interfaces such as the skin, the gut, and the lung (42). Furthermore, IL-10 affects inflammatory monocyte recruitment and subsequent differentiation into inflammatory DCs in the liver during *Trypanosoma* infection (43). Here, we found that an anti–IL-10R Ab delayed the development of cutaneous metastases and increased the occurrence of vitiligo. Moreover, both anti-CD25 and anti–IL-10R Ab treatments led to an increase of inflammatory monocytes and DCs in the skin of 2-wk-old MT/ret mice. Thus, Treg-derived IL-10 might inhibit, in our model, monocyte recruitment and/or differentiation in the skin. Of course, IL-10 produced by other cell types than Tregs might be implicated in the control of antitumor responses. Further investigations using conditional IL-10 knockout mice would be necessary to specifically test this hypothesis. Moreover, we do not exclude that other suppressive mechanisms could account for the control of antitumor responses by Tregs.

Our study sheds lights on the actors involved in tumor control. In MT/ret mice, tumor cell dissemination occurs early because dormant cells can be detected in 2- to 3-wk-old mice (12). Disseminated cells may promote the trafficking of Ly-6C^{high} monocytes to the skin and the activation and differentiation of Ly-6C^{high} monocytes into inflammatory DCs, leading to the lysis of tumor cells and to the bystander destruction of normal melanocytes, thereby causing depigmentation. Until now, monocytic cells have been somehow considered as protumoral cells that facilitate metastatic spread by promoting tumor cell dissemination and dampening antitumor responses (44–46). Our results rather support that inflammatory monocytes are the most efficient effectors in controlling disseminated tumor cells. Thus, depending on the tumor stage (primary tumors, disseminated tumor cells, or established metastases), immune cells may display different properties, either pro- versus antitumoral, highlighting the importance of studying the antitumor response in the course of spontaneous tumor development.

Materials and Methods

Mice. MT/ret$^{+/-}$ transgenic mice (designated as MT/ret mice) expressed heterozygously the human RET oncogene. They were used at different time points in the course of malignancy, and age-matched nontransgenic MT/ret$^{-/-}$ littermates (designated as Ctrl mice) were used as control mice. MT/ret mice were crossed with C57BL/6 CD3ε^{KO} mice to obtain RetCD3ε^{KO}. Mice were killed at the indicated times or when considered moribund (prostrated, bristly, skinny). All these mice were maintained in our specific pathogen free animal facility. All experiments were approved by the Paris-Descartes Ethical Committee for Animal Experimentation (decision CEEA34.BLAB.001.12).

Antibody and Chemokine Treatments. Purified anti-CD25 (PC61), anti–Ly-6G (1A8), and anti-CD8 (53.6.7) Abs were obtained from BioXCell. Purified anti-Gr1 (RB6-8C5) and anti-NK1.1 (PK136) Abs were purified from hybridoma supernatants using a G protein-coupled Sephadex bead column. Mice were injected intraperitoneally twice a week with either 200 μg of Abs or 400 ng of CCL2 (PeproTech). NAC was obtained from Sigma-Aldrich. Mice received 1 mg/mL NAC in drinking water from birth.

Single-Cell Suspension Procedures. Spleens and LNs were mechanically dissociated, homogenized, and passed through a nylon cell strainer (BD Falcon) in 5% (vol/vol) FCS and 0.1% NaN3 (Sigma-Aldrich) in PBS. For adoptive transfer, RPMI 1640 Glutamax (Gibco) supplemented with 10% (vol/vol) FCS (Biochrom) was used instead. Cutaneous metastases were mechanically dissociated and digested with 1 mg/mL collagenase D and 0.1 mg/mL DNase I (Roche) for 25 min at 37 °C. For skin suspensions, ears were collected and split in

IMMUNOLOGY

dorsal and ventral lobes. Lobes were cut in small parts and digested with 0.4 mg/mL liberase, 0.05 mg/mL collagenase D, and 0.1 mg/mL DNase I (Roche).

Cell-Surface Staining and Flow Cytometry. Surface staining was performed by incubating cells on ice, for 15 min, with Abs in 5% (vol/vol) FCS (Biochrom) and 0.1% NaN_3 (Sigma-Aldrich) in PBS. Each cell-staining reaction was preceded by a 15-min incubation with a purified anti-CD16/32 Ab (FcγRII/III block; 2.4G2) obtained from hybridoma supernatant followed by labeling with specific Abs. Multicolor immunofluorescence was analyzed using a LSR2 cytometer (BD Biosciences). Data files were analyzed using Diva software (BD Biosciences). Data acquisition was performed on the Cochin Cytometry and Immunobiology facility. For skin suspensions, incubation with Live/Dead Blue stain (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol, was performed before Ab staining.

Adoptive Transfer of $CD4^+$ T Cells. Cervical LNs and spleen cells were incubated on ice for 20 min with a mixture of anti-CD8 (53-6.7), anti-CD11b (Mac-1), and anti-CD19 (1D3) Abs, obtained from hybridoma supernatants, and then with magnetic beads coupled to anti-rat immunoglobulins (Dynal Biotech). Purified $CD4^+$ T cells (5×10^6 cells; 95–97% pure) were injected intraperitoneally into $RetCD3\varepsilon^{KO}$ mice 5 d after birth.

Antibody Titration by Flow Cytometry. Sera from MT/ret and $RetCD3\varepsilon^{KO}$ mice were obtained following intracardiac blood collection. Melan-ret cells (a cell line derived from a cutaneous metastases of a MT/ret mouse) and LLCs (American Type Culture Collection) were incubated with purified anti-CD16/32 Ab and then incubated with the sera. Cells were labeled with Alexa 488-conjugated Goat anti-mouse κ Ab (GAM) from Invitrogen. Cells submitted to the same protocol, but without serum incubation, were used as control.

Statistics. Data are expressed as means ± SEM. The significance of differences between two series of results was assessed using the Student's unpaired *t* test. The significance of differences between three or more series of results was assessed using the one-way ANOVA, and comparison between sets of results was assessed using Tukey posttest. Comparison between incidence curves was performed using log-rank test. Correlation analyses were performed using Pearson's correlation test. ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$). All statistical analyses were performed using Prism 5 software (GraphPad).

ACKNOWLEDGMENTS. We thank the Cochin Cytometry and Immunobiology and Animal Core facilities and, in particular, C. Lapert and O. Le Gall for animal care. We thank S. Kaveri for critical review of the manuscript. This work was supported by grants from the Ligue contre le Cancer and the Association pour la Recherche contre le Cancer, A.P. and A. Delpoux were supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer, and A.A. was supported by a master fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale.

1. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155(3):1151–1164.
2. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299(5609):1057–1061.
3. North RJ, Bursuker I (1984) Generation and decay of the immune response to a progressive fibrosarcoma. I. Ly-1+2- suppressor T cells down-regulate the generation of Ly-1-2+ effector T cells. *J Exp Med* 159(5):1295–1311.
4. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999) Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: A common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol* 163(10):5211–5218.
5. Antony PA, et al. (2005) CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells. *J Immunol* 174(5):2591–2601.
6. Chaput N, et al. (2007) Regulatory T cells prevent CD8 T cell maturation by inhibiting CD4 Th cells at tumor sites. *J Immunol* 179(8):4969–4978.
7. Darrasse-Jèze G, et al. (2009) Tumor emergence is sensed by self-specific CD44hi memory Tregs that create a dominant tolerogenic environment for tumors in mice. *J Clin Invest* 119(9):2648–2662.
8. Quezada SA, Peggs KS, Simpson TR, Allison JP (2011) Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: From tumor tolerance to eradication. *Immunol Rev* 241(1):104–118.
9. Boissonnas A, et al. (2010) Foxp3+ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity* 32(2):266–278.
10. Fujimura T, Ring S, Umansky V, Mahnke K, Enk AH (2012) Regulatory T cells stimulate B7-H1 expression in myeloid-derived suppressor cells in ret melanomas. *J Invest Dermatol* 132(4):1239–1246.
11. Kato M, et al. (1998) Transgenic mouse model for skin malignant melanoma. *Oncogene* 17(14):1885–1888.
12. Eyles J, et al. (2010) Tumor cells disseminate early, but immunosurveillance limits metastatic outgrowth, in a mouse model of melanoma. *J Clin Invest* 120(6):2030–2039.
13. Toh B, et al. (2011) Mesenchymal transition and dissemination of cancer cells is driven by myeloid-derived suppressor cells infiltrating the primary tumor. *PLoS Biol* 9(9):e1001162.
14. Lengagne R, et al. (2004) Spontaneous vitiligo in an animal model for human melanoma: Role of tumor-specific CD8+ T cells. *Cancer Res* 64(4):1496–1501.
15. Bystryn JC, Rigel D, Friedman RJ, Kopf A (1987) Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 123(8):1053–1055.
16. Duhra P, Ilchyshyn A (1991) Prolonged survival in metastatic malignant melanoma associated with vitiligo. *Clin Exp Dermatol* 16(4):303–305.
17. Quaglino P, et al. (2010) Vitiligo is an independent favourable prognostic factor in stage III and IV metastatic melanoma patients: Results from a single-institution hospital-based observational cohort study. *Ann Oncol* 21(2):409–414.
18. Byrne KT, Turk MJ (2011) New perspectives on the role of vitiligo in immune responses to melanoma. *Oncotarget* 2(9):684–694.
19. Viguier M, et al. (2004) Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173(2):1444–1453.
20. Jacobs JF, Nierkens S, Figdor CG, de Vries IJ, Adema GJ (2012) Regulatory T cells in melanoma: The final hurdle towards effective immunotherapy? *Lancet Oncol* 13(1):e32–e42.
21. Lengagne R, et al. (2011) T cells contribute to tumor progression by favoring protumoral properties of intra-tumoral myeloid cells in a mouse model for spontaneous melanoma. *PLoS ONE* 6(5):e20235.
22. Lengagne R, et al. (2008) Distinct role for CD8 T cells toward cutaneous tumors and visceral metastases. *J Immunol* 180(1):130–137.
23. Sandoval-Cruz M, et al. (2011) Immunopathogenesis of vitiligo. *Autoimmun Rev* 10(12):762–765.
24. Serbina NV, Pamer EG (2006) Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2. *Nat Immunol* 7(3):311–317.
25. Soudja SM, et al. (2010) Tumor-initiated inflammation overrides protective adaptive immunity in an induced melanoma model in mice. *Cancer Res* 70(9):3515–3525.
26. Bronkhorst IH, Jager MJ (2012) Uveal melanoma: The inflammatory microenvironment. *J Innate Immun* 4(5-6):454–462.
27. Piras F, et al. (2005) The predictive value of CD8, CD4, CD68, and human leukocyte antigen-D-related cells in the prognosis of cutaneous malignant melanoma with vertical growth phase. *Cancer* 104(6):1246–1254.
28. Varney ML, Johansson SL, Singh RK (2005) Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: Role of monocyte chemotactic protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. *Melanoma Res* 15(5):417–425.
29. Nizar S, Meyer B, Galustian C, Kumar D, Dalgleish A (2010) T regulatory cells, the evolution of targeted immunotherapy. *Biochim Biophys Acta* 1806(1):7–17.
30. Kimpfler S, et al. (2009) Skin melanoma development in ret transgenic mice despite the depletion of CD25+Foxp3+ regulatory T cells in lymphoid organs. *J Immunol* 183(10): 6330–6337.
31. Ben Ahmed M, et al. (2012) Functional defects of peripheral regulatory T lymphocytes in patients with progressive vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res* 25(1):99–109.
32. Klarquist J, et al. (2010) Reduced skin homing by functional Treg in vitiligo. *Pigment Cell Melanoma Res* 23(2):276–286.
33. Lili Y, et al. (2012) Global activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes correlates with an impairment in regulatory T cells in patients with generalized vitiligo. *PLoS ONE* 7(5):e37513.
34. Le Gal FA, et al. (2001) Direct evidence to support the role of antigen-specific CD8(+) T cells in melanoma-associated vitiligo. *J Invest Dermatol* 117(6):1464–1470.
35. Ogg GS, Rod Dunbar P, Romero P, Chen JL, Cerundolo V (1998) High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *J Exp Med* 188(6):1203–1208.
36. Byrne KT, et al. (2011) Autoimmune melanocyte destruction is required for robust CD8+ memory T cell responses to mouse melanoma. *J Clin Invest* 121(5):1797–1809.
37. Auffray C, et al. (2009) CX3CR1+ CD115+ CD135+ common macrophage/DC precursors and the role of CX3CR1 in their response to inflammation. *J Exp Med* 206(3):595–606.
38. Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F (2009) Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 27:669–692.
39. te Velde AA, Figdor CG (1992) Monocyte mediated cytotoxic activity against melanoma. *Melanoma Res* 1(5-6):303–309.
40. Griffith TS, et al. (1999) Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J Exp Med* 189(8):1343–1354.
41. Martin JH, Edwards SW (1993) Changes in mechanisms of monocyte/macrophage-mediated cytotoxicity during culture. Reactive oxygen intermediates are involved in monocyte-mediated cytotoxicity, whereas reactive nitrogen intermediates are employed by macrophages in tumor cell killing. *J Immunol* 150(8 Pt 1):3478–3486.
42. Rubtsov YP, et al. (2008) Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces. *Immunity* 28(4):546–558.
43. Bosschaerts T, et al. (2010) Tip-DC development during parasitic infection is regulated by IL-10 and requires CCL2/CCR2, IFN-gamma and MyD88 signaling. *PLoS Pathog* 6(8):e1001045.
44. Qian BZ, et al. (2011) CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. *Nature* 475(7355):222–225.
45. Lesokhin AM, et al. (2012) Monocytic CCR2(+) myeloid-derived suppressor cells promote immune escape by limiting activated CD8 T-cell infiltration into the tumor microenvironment. *Cancer Res* 72(4):876–886.
46. Wolf MJ, et al. (2012) Endothelial CCR2 signaling induced by colon carcinoma cells enables extravasation via the JAK2-Stat5 and p38MAPK pathway. *Cancer Cell* 22(1):91–105.

SUPPORTING INFORMATIONS

Mice	**MT/ret**			**RetCD3ε^{KO}**			**α-CD25 treated MT/ret**		
Age	1 month	3 mnths	6 months	1 month	3 months	6 months	1 month	3 months	6 months
Survival	87/87 (100)	87/87 (100)	42/46 (91.3)	42/42 (100)	39/42 (92.8)	18/21 (85.7)	40/40 (100)	40/40 (100)	28/28 (100)
incidence of 1^{ary} tumor	17/87 (19.5)	78/87 (89.7)	42/42 (100)	8/42 (19.0)	35/39 (89.7)	18/18 (100)	15/40 (37.5)	33/40 (82.5)	25/28 (89.3)
incidence of cut met[1]	2/87 (2.3)	52/87 (59.8)	34/42 (80.9)	3/42 (7.1)	22/39 (56.4)	16/18 (88.9)	2/40 (5.0)	9/40 (22.5)	11/28 (39.3)
incidence of distant met[2]	N.D	0/30 (0.0)	4/41 (9.7)	N.D	3/21 (14.3)	4/18 (22.2)	N.D	0/12 (0.0)	0/28 (0.0)
incidence of vitiligo	6/87 (6.9)	31/87 (35.6)	16/42 (38.1)	9/42 (21.4)	30/39 (76.9)	16/18 (88.9)	24/40 (60.0)	31/40 (77.5)	24/28 (85.7)

Table S1: Diagnosis of MT/ret, RetCD3ε^{KO} and anti-CD25 treated MT/ret mice. Survival and prevalence of primary tumors, cutaneous metastases[1], distant metastases[2] and vitiligo in the indicated mice as a function of mouse age. Results are expressed as the number of mice with the indicated symptoms over the total number of analyzed mice. Numbers in brackets represent the percentage of analyzed mice with the indicated symptoms. N.D: Not determined.

Mice	**MT/ret**								**RetCD3ε^{KO}**			
Treatment	None	αCD8	αNK1.1	αGr1	αLy6G	CCL2	αIL-10R	NAC	None	αGr1	CD4 T cells (C57BL/6)	CD4 T cells (MT/ret)
Survival	87/87 (100)	19/23 (82.6)	13/14 (92.9)	6/23 (26.1)	9/9 (100)	18/18 (100)	20/21 (95.2)	12/15 (80.0)	39/42 (92.8)	9/26 (34.6)	9/11 (81.8)	16/17 (94.1)
incidence of 1^{ary} tumor	78/87 (89.7)	19/19 (100)	12/13 (93.3)	6/6 (100)	8/9 (88.9)	15/18 (83.3)	16/20 (80.0)	12/12 (100)	35/39 (89.7)	8/9 (88.9)	9/9 (100)	16/16 (100)
incidence of cut met[1]	52/87 (59.8)	13/19 (68.4)	8/13 (61.5)	6/6 (100)	2/9 (22.2)	5/18 (27.7)	5/20 (25.0)	8/12 (66.7)	22/39 (56.4)	7/9 (77.7)	8/9 (88.9)	13/16 (81.2)
incidence of distant met[2]	0/30 (0.0)	10/19 (52.6)	2/13 (15.4)	6/6 (100)	0/9 (0.0)	2/18 (11.1)	0/20 (0.0)	9/12 (75.0)	3/21 (14.3)	7/9 (77.7)	3/9 (33.3)	4/16 (25.0)
incidence of vitiligo	31/87 (35.6)	7/19 (36.8)	5/13 (38.5)	1/6 (16.7)	8/9 (88.9)	16/18 (88.9)	16/20 (80.0)	3/12 (25.0)	30/39 (76.9)	3/9 (33.3)	2/9 (22.2)	2/16 (12.5)

Table S2: Diagnosis of untreated and treated 3-month old MT/ret and RetCD3ε^{KO} mice. Survival and prevalence of primary tumors, cutaneous metastases[1], distant metastases[2] and vitiligo in the indicated mice. Results are expressed as the number of mice with the indicated symptoms over the total number of analyzed mice. Numbers in brackets represent the percentage of analyzed mice with the indicated symptoms.

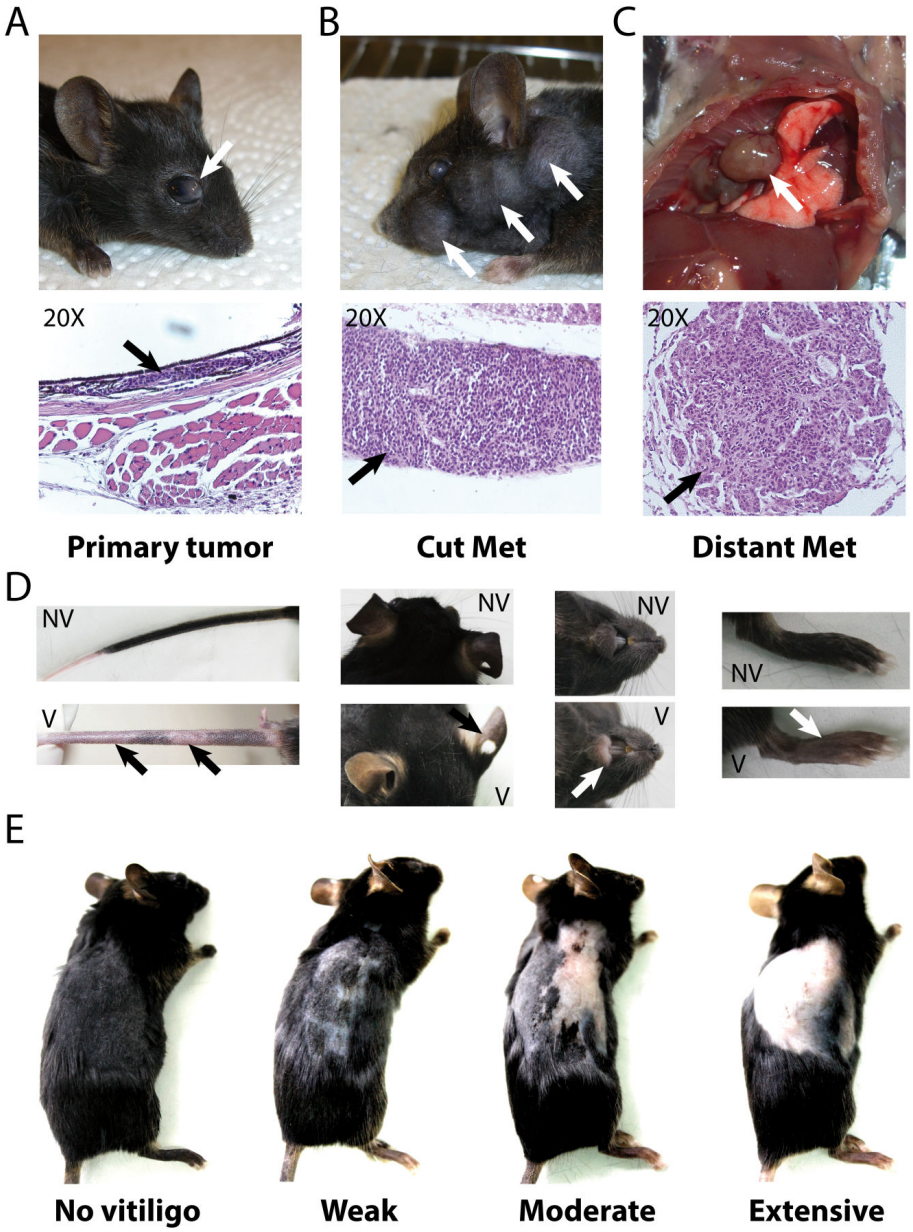


Figure S1: Diagnosis of MT/ret mice. Diagnosis of MT/ret and RetCD3ε^{KO} mice was performed from weaning and the development of primary tumors, facial or dorsal cutaneous metastases and vitiligo was recorded weekly. Representative pictures (upper part) and H&E staining (Lower part) of a primary tumor (*A*), cutaneous (*B*) and distant (*C*) metastases. The occurrence of vitiligo was monitored and recorded by the appearance of depigmented areas on (*D*) the tail, ears, snout and legs, and (*E*) confirmed at the time of the sacrifice by observation of the dorsal and ventral skin. Mice were classified as without vitiligo or with weak, moderate or extensive vitiligo accordingly.

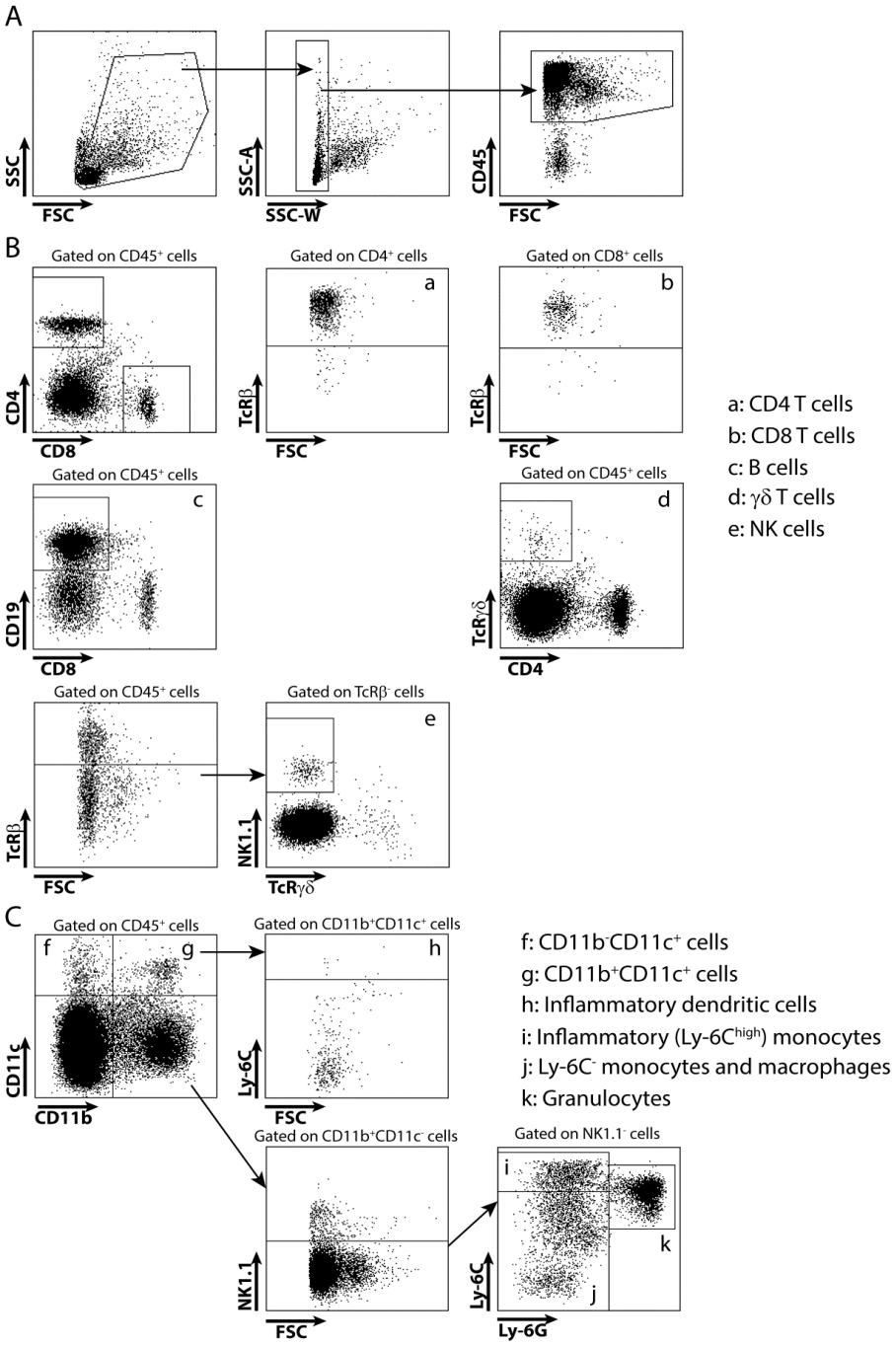


Figure S2: Identification of lymphoid and myeloid cell populations in spleen by flow cytometry. Representative dot plots showing (*A*) common gating strategy, identification of (*B*) lymphoid populations and (*C*) myeloid populations. Dot plots are shown for splenocytes of a 12-week old Ctrl mouse. PE-conjugated anti-NK1.1 (PK136), anti TcRγδ (GL3), PerCP-conjugated anti-CD4 (RM4-5), PerCP-Cy5.5 anti-NK1.1 (PK136), anti-CD45 (30F11), APC-conjugated anti-CD45 (30F11), FITC-conjugated anti-CD8 (53.6.7), anti-CD19 (1D3), anti-Ly-6G (1A8), PE-Cy7-conjugated anti CD11c (HL3), streptavidin, APC-H7-conjugated anti-CD8 (53-6.7), Pacific Blue conjugated anti-CD4 (RM4-5), biotinylated anti-Ly-6C (AL-21), anti-TcRβ (H57-597) antibodies were obtained from BD Biosciences. APC-conjugated anti-CD11b (M1/70) antibody was obtained from eBioscience. Pacific Blue-conjugated streptavidin was obtained from Invitrogen.

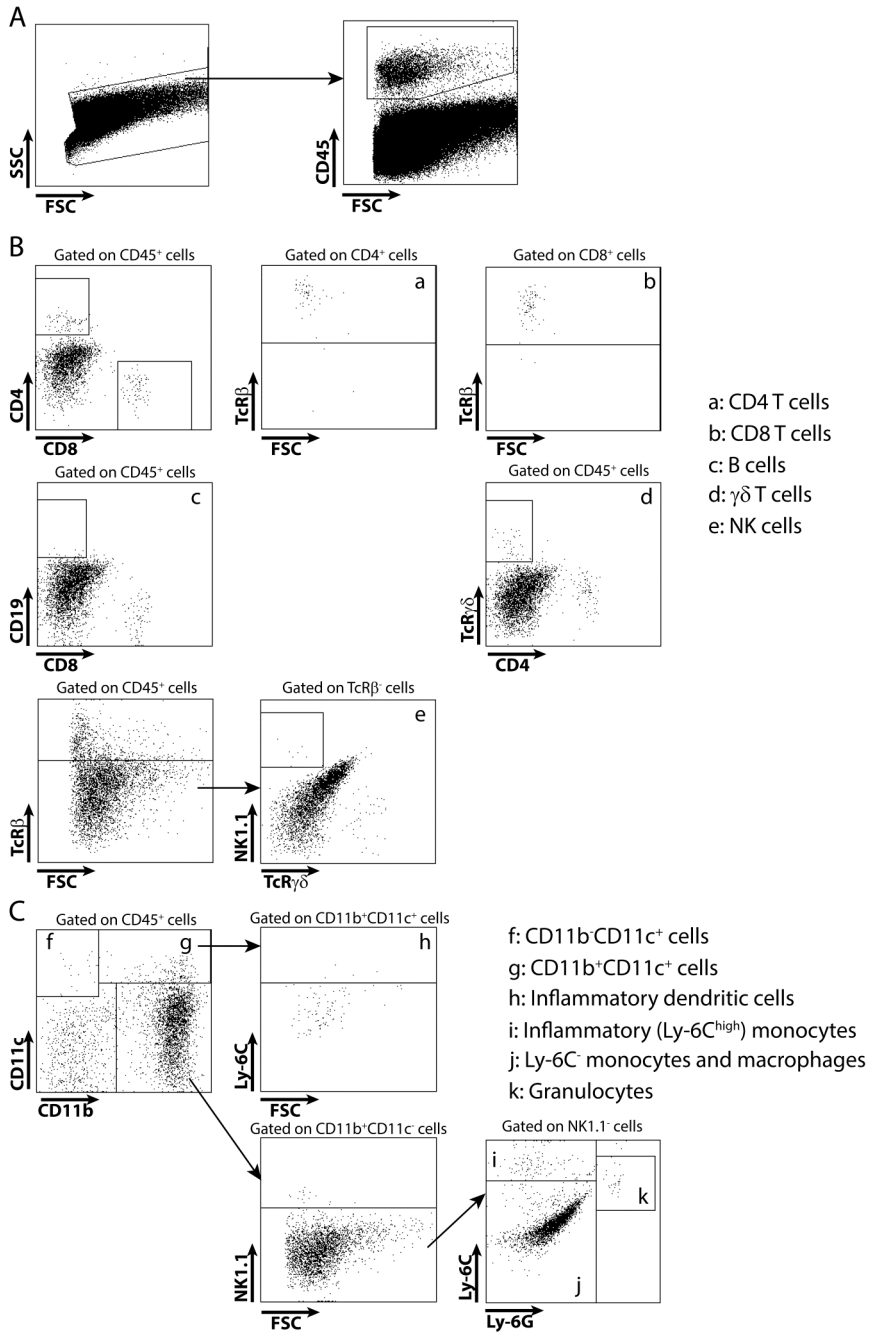


Figure S3: Identification of lymphoid and myeloid cell populations in cutaneous metastases by flow cytometry. Representative dot plots showing (*A*) common gating strategy, identification of (*B*) lymphoid populations and (*C*) myeloid populations. Dot plots are shown for a cutaneous metastasis cell suspension of a 24-week old MT/ret mouse. Antibodies were the same as in Fig. S2.

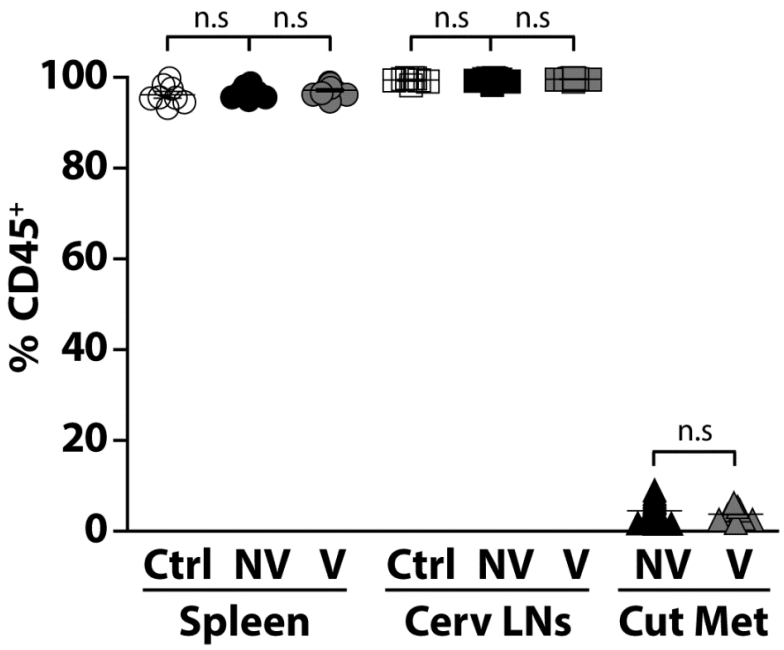


Figure S4: Proportion of hematopoietic cells in secondary lymphoid organs and tumors. A CD45 staining was systematically performed on cell suspensions of spleen, cervical lymph nodes and cutaneous metastases to assess the tumor invasion of secondary lymphoid organs and the immune infiltration of tumors. PerCP-Cy5.5 and APC-conjugated anti-CD45 (30F11) antibodies were obtained from BD Biosciences. The graph shows the proportion of CD45-expressing cells in the spleen, cervical lymph nodes and cutaneous metastases from 6-month old Ctrl or MT/ret mice with (V) or without (NV) vitiligo.

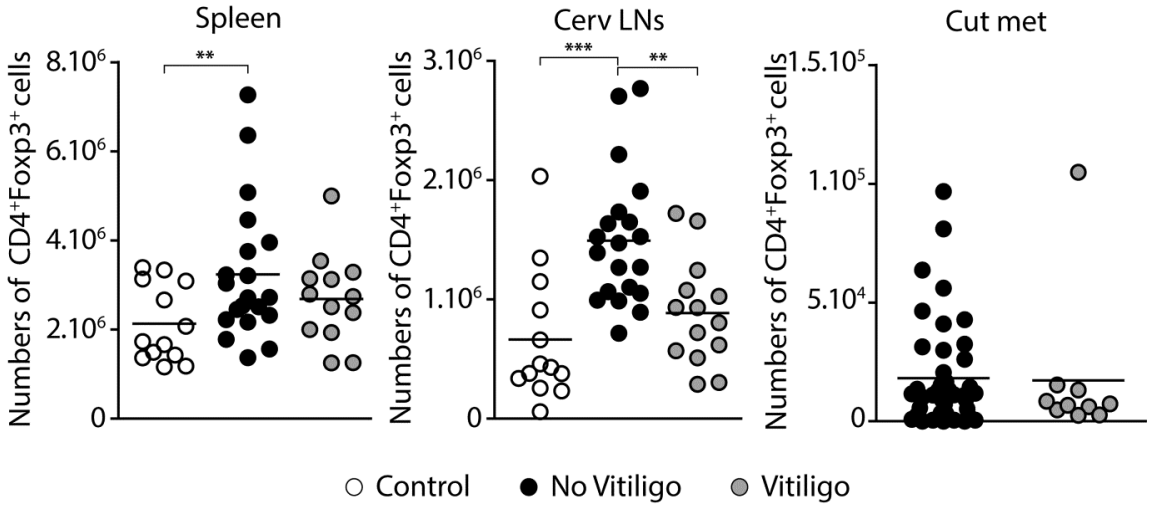


Figure S5: Accumulation of regulatory CD4$^+$ T cells in the spleen and cervical lymph nodes of non-vitiligo MT/ret mice. Absolute numbers of Tregs (CD4$^+$ CD8$^-$ TcRβ$^+$ Foxp3$^+$ cells) in cutaneous metastases of 6-month old MT/ret mice developing or not vitiligo and in the spleen and cervical lymph nodes of Ctrl mice and MT/ret mice. For each studied mouse, numbers were calculated as follows: Absolute numbers of cells per indicated tissue (Spleen, cervical lymph nodes or cutaneous metastases) × % CD45$^+$ cells in this tissue × % CD4$^+$ CD8$^-$ TcRβ$^+$ among CD45$^+$ cells × % Foxp3$^+$ among CD4$^+$ cells.

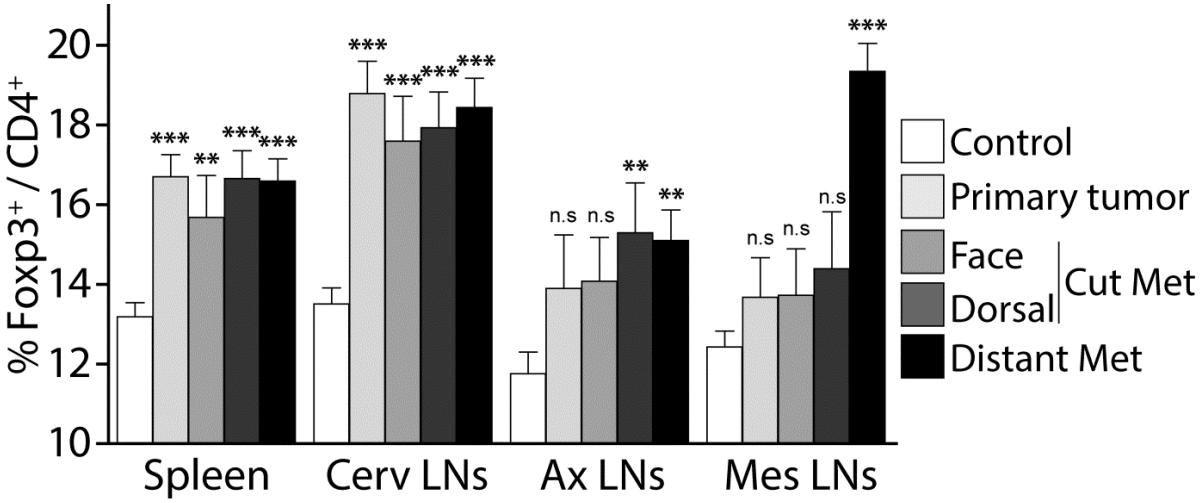


Figure S6: Percentage of Tregs in MT/ret mice according to their symptoms. Proportion of Foxp3^{+} cells within CD45^{+} CD4^{+} CD8^{-} TcRβ^{+} cells from the spleen, cervical (Cerv), axillary (Ax) and mesenteric (Mes) lymph nodes of 6-month old Ctrl and MT/ret mice without vitiligo.

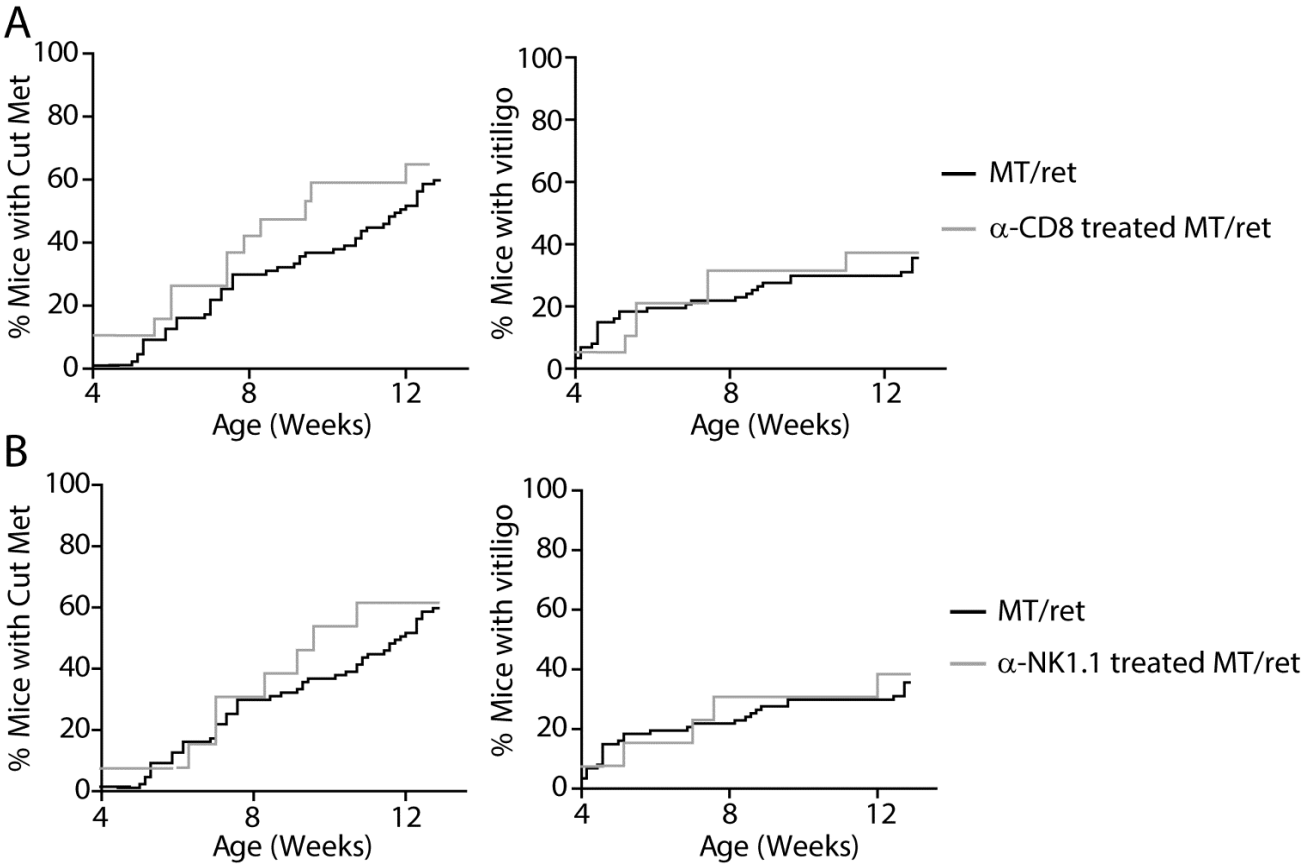


Figure S7: Effect of CD8$^+$ T-cell or NK-cell depletion on the development of vitiligo and tumor spread at cutaneous level in MT/ret mice. Incidence of vitiligo and cutaneous metastases (Cut met) in MT/ret mice treated with (*A*) anti-CD8 Ab (n=19) or (*B*) anti-NK1.1 Ab (n=13).

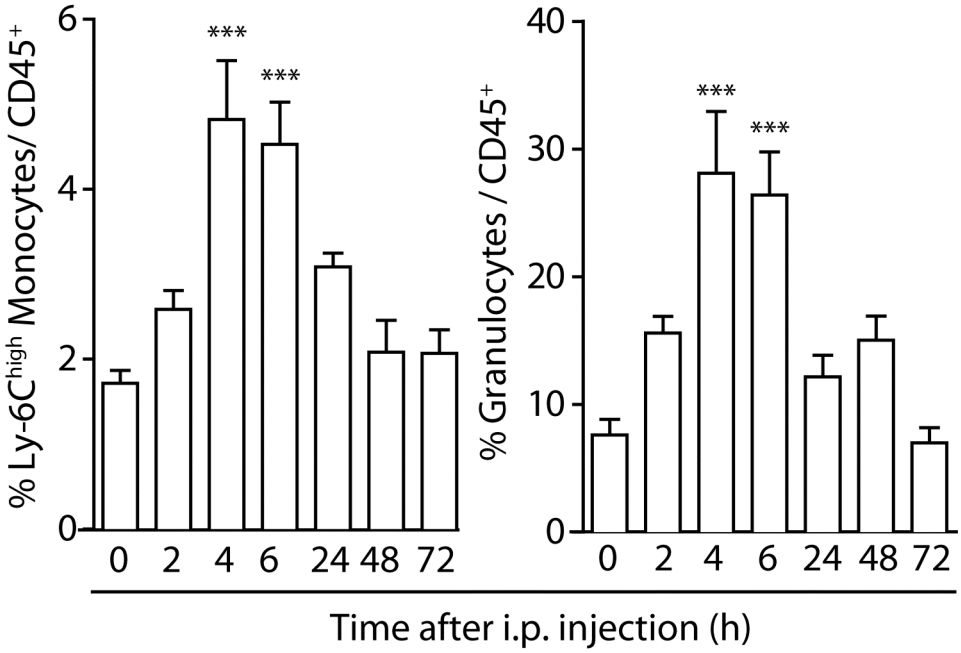


Figure S8: The proportion of circulating granulocytes and Ly-6C^{high} monocytes transiently increases after CCL2 injection. Proportion of Ly-6C^{high} monocytes (Left panel) and granulocytes (Right panel) in the blood of Ctrl mice 0, 2, 4, 6, 24, 48 and 72 hours after one intra-peritoneal injection of 400ng of CCL2.

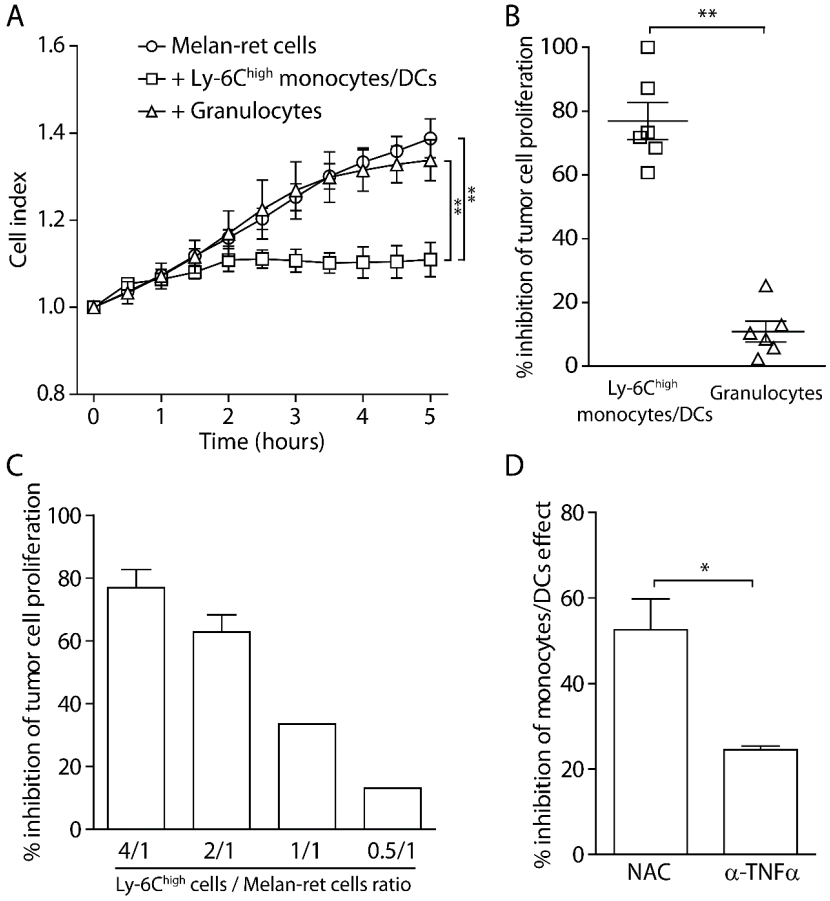


Figure S9: Ly-6C^{high} monocytes/DCs inhibit melanoma-cell proliferation *in vitro* in part through a ROS dependent mechanism. Melan-ret melanoma cells (5.10^3 cells) were seeded into wells of 96X E-Plates XCELLigence System (Roche Diagnostics). When cells were in their exponential phase of growth (24 h later), Ly6-C^{high} monocytes/DCs or Ly-6G$^+$ granulocytes ($1.5.10^5$ cells) purified from the spleen of C57BL/6 mice were added and tumor-cell proliferation was dynamically monitored every 30 min over a 5 hour period based on cell impedance. (*A*) Graph showing the normalized cell index (nCI) values obtained by the RT-CES system for one out of 6 representative experiments. (*B*) Percentage of inhibition of Melan-ret-cell proliferation 5 hours after the addition of myeloid cells = ((nCI (Melan-ret cells) - nCI (Melan-ret cells+Ly6-C^{high} or Ly6-G$^+$ cells)) / ((nCI (Melan-ret cells) -1)) x100. (*C*) Different numbers of Ly6-C^{high} monocytes/DCs ($1.5.10^5$, 8.10^4, 4.10^4, 2.10^4) were added corresponding respectively to Ly6-C^{high}/Melan-ret-cell ratios of 4/1, 2/1, 1/1 and 0.5/1. (*D*) Inhibition of the effect of Ly6-C^{high} monocytes/DCs in presence of NAC (1mM) or anti-TNFα Ab (20µg/ml). Both NAC or anti-TNFα Ab were added at the same time as Ly6-C^{high} monocytes/DCs.

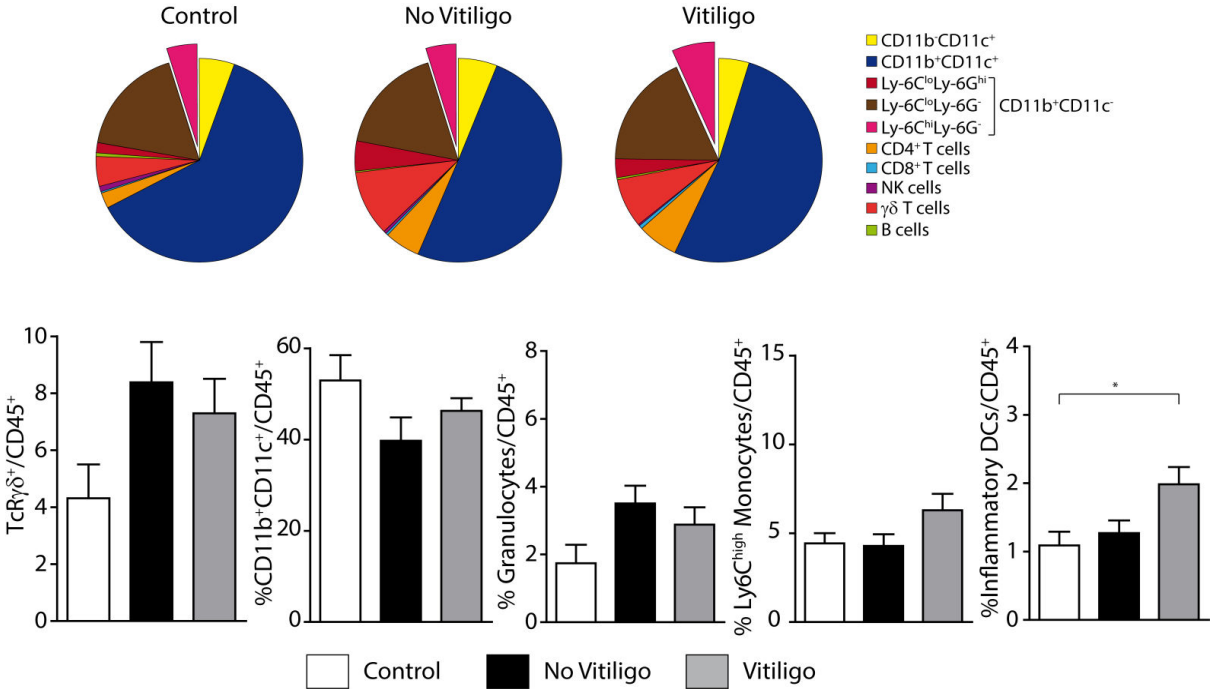


Figure S10: Characterization of immune cells infiltrating the skin of 6-week old MT/ret mice with or without vitiligo. (A) Characterization of immune cells infiltrating the skin of 6-week old Ctrl or MT/ret mice with or without vitiligo. The different immune populations were defined as shown in Fig. S2 and Fig. S3. Proportions are shown within $CD45^+$ cells. (B) Quantification of different immune-cell populations infiltrating the skin of 6-week old Ctrl or MT/ret mice with or without vitiligo.

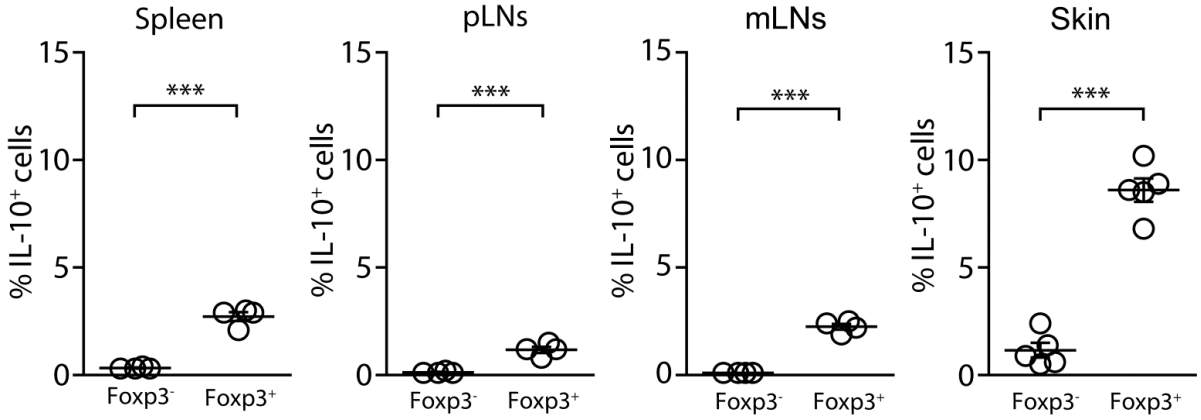


Figure S11: IL-10 production by CD4$^+$ T cells. Cell suspensions from the spleen, peripheral lymph nodes (pLNs), mesenteric lymph nodes (mLNs) and the skin of Foxp3-GFP mice were incubated for 4 hours at 37°C in PBS 1X, 10% SVF containing 0.5µg/ml PMA, 0.5µg/ml ionomycin, and 10µg/ml BrefeldinA (all from Sigma). Cells were then stained for surface markers, fixed in 2% paraformaldehyde in PBS, and permeabilized with 0.5% saponin, followed by labeling with PE anti-IL-10 Ab (clone JES5-16E3 from BD Bioscience). Percentages are expressed within CD4$^+$ T cells expressing or not Foxp3.