Rôle pronostique des infiltrats lymphocytaires T CD4 dans les cancers du sein

Marion Thibaudin

▶ **To cite this version:**

Marion Thibaudin. Rôle pronostique des infiltrats lymphocytaires T CD4 dans les cancers du sein. Santé. Université Bourgogne Franche-Comté, 2017. Français. NNT : 2017UBFCI014 . tel-02167634

HAL Id: tel-02167634
https://theses.hal.science/tel-02167634

Submitted on 28 Jun 2019

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

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

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

INSERM U1231

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Spécialité : Immunologie

Par

Marion THIBAUDIN

Présentée et soutenue publiquement

Le 27 Septembre 2017

ROLE PRONOSTIQUE DES INFILTRATS LYMPHOCYTAIRES T CD4 DANS LES CANCERS DU SEIN

Directeur de thèse

Pr. Sylvain LADOIRE

Membres du jury :

Pr. Frédérique PENAULT-LLORCA	Rapporteur
Pr. Jean-Yves PIERGA	Rapporteur
Dr. Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN	Examinateur
Pr. François GHIRINGHELLI	Examinateur
Dr. Nicolas ISAMBERT	Co-encadrant de thèse
Pr. Sylvain LADOIRE	Directeur de thèse

UNIVERSITE DE BOURGOGNE

INSERM U1231

THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne

Discipline : Biochimie, Biologie Cellulaire et Moléculaire

Spécialité : Immunologie

Par

Marion THIBAUDIN

Présentée et soutenue publiquement

Le 27 Septembre 2017

ROLE PRONOSTIQUE DES INFILTRATS LYMPHOCYTAIRES T CD4 DANS LES CANCERS DU SEIN

Directeur de thèse

Pr. Sylvain LADOIRE

Membres du jury :

Pr. Frédérique PENAULT-LLORCA	Rapporteur
Pr. Jean-Yves PIERGA	Rapporteur
Dr. Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN	Examinateur
Pr. François GHIRINGHELLI	Examinateur
Dr. Nicolas ISAMBERT	Co-encadrant de thèse
Pr. Sylvain LADOIRE	Directeur de thèse

« Je suis de ceux qui pensent que la science a une grande beauté »

Marie Curie

« La vie est un mystère qu'il faut vivre et non un problème à résoudre»

Gandhi

Je dédie cette thèse à Vincent, à ma sœur Julie et à mes parents.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury qui ont accepté de juger mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement les professeurs Frédérique Penault-Llorca et Jean-Yves Pierga d'avoir accepté d'examiner mon travail en tant que rapporteur. Merci pour le temps consacré à la lecture et à l'évaluation de mon manuscrit. Je remercie également le docteur Marie-Caroline Dieunosjean et le professeur François Ghiringhelli, membres examinateurs de ce jury. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos attentes.

Je souhaite à présent témoigner toute ma reconnaissance à mon directeur de thèse, Sylvain Ladoire. Merci Sylvain pour le soutien et la confiance que tu m'as accordé pendant ces trois années et plus particulièrement en cette fin de thèse. Merci de m'avoir transmis ta passion pour l'histologie, qui je l'espère ne me quittera plus et pour tes conseils précieux pour la mise au point et l'amélioration de nos marquages. Merci pour ton aide précieuse quant à la rédaction de ce manuscrit, qui, à coup sûr, a permis d'améliorer ce travail.

Je souhaite également exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à François Ghiringhelli. Merci François de m'avoir accueillie dans l'équipe et de m'avoir donné l'opportunité de travailler sur des projets tous plus passionnants et captivants les uns que les autres. Merci pour la confiance que tu me témoignes depuis le début de mon master 1 et pour le privilège de m'accueillir au sein de la plateforme du CGFL. Je souhaite de tout cœur que les deux années qui arrivent seront riches scientifiquement et à la hauteur de tes attentes.

Ma thèse aurait été beaucoup moins riche et épanouissante sans tous ceux qui ont partagé mon quotidien durant ces trois ans. Emeric, que te dire à part un énorme merci ! Tu as été un excellent compagnon de route et binôme qui a réussi à supporter mon stress, mes humeurs (surtout ces derniers temps..) et mes questionnements perpétuels. C'est une réelle chance de pouvoir travailler à tes côtés, dans la bonne humeur, l'écoute et la confiance réciproque. Tu m'as beaucoup appris, surtout en cytométrie, et je ne te remercierai jamais assez pour ta patience et ta pédagogie indéniables ! Merci d'avoir su me faire rire quand j'en avais besoin. Travailler à tes côtés a été source de bien-être et d'enrichissements scientifiques ! De belles aventures nous attendent et j'ai hâte d'avancer avec toi sur les projets qui sont et seront, je n'en doute pas, fructueux et fascinants !

Cotonou, mon Cotte, Cotylédon, (etc.. je ne vais pas faire la liste ici !!) à toi aussi un immense merci ! Merci pour ton énorme soutien, ta compagnie hors-norme, tes pétages de cable délirants qui nous ont permis de décompenser quand on en avait besoin ! L'aventure de la thèse a été plus simple

à tes côtés, nos nombreuses pauses cafés (fameuses pauses « toit » !) nous ont permis d'apprendre à nous connaître vraiment et je suis très heureuse de te compter parmi mes amies. Tu es une belle personne et malgré ce que tu crois, je ne vais pas te lâcher comme ça, peu importe où le vent te portera pour ton post-doc, fais en sorte d'avoir une chambre pour m'accueillir en vacances ! Je te souhaite le meilleur pour la suite, tu le mérites et tu vas faire de grandes choses, j'en suis sûre !

Mon Etienne, à toi aussi plus qu'un merci ! Être ta voisine de bureau n'a pas toujours été simple pour toi, il t'a fallu supporter les moments où je parlais toute seule, les moments où je n'arrivais plus à travailler et où je te regardais à travers les étagères séparant nos bureaux, les moments où je me moquais (gentiment !) de toi ! Je te tiens à te remercier pour ta présence, ton calme et ton énergie déployée pendant ta thèse ! Tu as été aussi un soutien important, tu as contribué au fait que j'avance sereinement pendant ces 3 ans ! Félicitations pour ta thèse, tu peux être fier du travail que tu as accompli et surtout bonne chance for the USA où tu vas gérer, je n'en doute pas une seconde !

Nanou, merci merci et encore merci ! Merci de m'avoir guidée, aidée, maternée à mes débuts au labo, tu m'as permis d'avoir un peu plus confiance en moi et c'est une réelle chance de t'avoir eu à mes côtés au labo au début de ma thèse et en dehors ensuite, vraiment ! Je te remercie aussi pour ta gentillesse sans faille, tes conseils avisés et ta douceur à tout égard. Que le nouveau chemin que tu prends, t'apporte épanouissement, bonheur et satisfaction car tu le mérites tellement !

Marie, un grand merci à toi aussi. On a commencé ensemble au labo, toi en M2, moi en M1, et ce fut pour moi une chance inouïe de commencer mon expérience scientifique à tes côtés et une grande joie de te rencontrer. Je te remercie pour ta présence, ton rire ravageur, les moments/soirées passés ensemble à refaire le monde. Je n'ai aucun doute sur notre capacité à continuer à nous voir malgré la distance, en tout cas je ferai en sorte que cela n'arrive pas ! Merci Marie pour ta patience et ton calme à mon égard, je ne l'oublierai pas.

Valentin, Valou, compagnon d'histologie et même plus que ça, merci également à toi. Pour ta gentillesse à toute épreuve, ta bonne humeur, tes imitations splendides (souvent en duo avec Emeric, pour notre plus grand plaisir à tous), tes blagues (pas toujours drôles…!) mais qui me font toujours rire. Merci de m'avoir guidé vers le chemin des histologistes et des marquages réussis (enfin, pas toujours… mais bon sinon ce n'est pas drôle !).

Je veux également te remercier Fanny. Merci pour ta douceur et ta bienveillance et merci de m'avoir remise au sport dès ton retour au labo, les moments squash nous ont fait du bien et nous ont permis de mieux nous connaître…surtout au moment du réconfort d'après squash ! Je te souhaite le

meilleur (concours ou pas, ton avenir sera lumineux j'en suis sûre) ainsi que de savourer chaque instant de la vie de ce petit bout de chou de Jules et rempli d'amour avec Guillaume. Merci à vous deux pour ces soirées jeux, qui m'ont permis de couper un peu, quand j'en avais grand besoin !

Nina, ma première « étudiante » en M2 et sûrement la plus haute en couleur que j'aurai eu ! Merci pour ton énergie indéfectible, ton optimisme surhumain et ta générosité sans bornes. Tu as la capacité de transmettre une motivation énorme, merci pour ça ! Et merci pour mon initiation à la dégustation de bières ; d'ailleurs elle est loin d'être terminée donc il va falloir que tu t'occupes de mon cas !

Mes remerciements sincères vont également à Romain et Fred. Merci pour vos nombreux conseils et pour l'intérêt que vous me témoignez depuis le début de ma thèse.

Un grand merci à Christel aussi. Merci pour ton aide, ton soutien et tes encouragements au quotidien. Merci pour l'affection que tu me témoignes depuis le début.

Aux autres membres de la team FG : un merci à vous tous pour votre présence au quotidien, de près ou de loin ! Lucie, merci pour tes chansons, ton rire, et des petites danses dans les couloirs ; Antoine et Romain, merci à vous aussi, force et courage à tous les trois pour la fin de votre thèse ! Cédric, Angélique, merci pour votre disponibilité, vos sourires et votre aide durant ma thèse ! Virginie, Popo, Flavie, merci pour votre gentillesse et aussi pour avoir supporté mes aller/retours quotidiens dans votre bureau. Je vous souhaite à tous pleins de bonnes choses pour les années futures !

Lionel, merci à toi également. C'est grâce à toi que j'ai intégré l'équipe et grâce à tes conseils avisés que j'ai pu acquérir une logique scientifique à mes débuts ! Merci également à toutes les filles qui t'entourent aujourd'hui : Aurélie, Carole, Andréa, Tiphanie et Isis.

Je tiens aussi à remercier mes nouveaux compagnons de bureau : Caroline, Coco, Courèche, Lisa, Quentin, Jean-David, Aodrenn, Fanny et Sandy. Merci pour vos sourires quotidiens, votre bonne humeur et votre sens de la camaraderie !

Un merci tout particulier à Victor, Pierre, Laetitia, Jennifer pour m'avoir intégrée à votre super groupe et pour m'avoir conviée à vos soirées pain/vin/fromage (et aux autres aussi… !) où les rires, la musique et la détente étaient toujours au rendez-vous. Vous êtes tous généreux et attentionnés, ce fut agréable de décompresser à vos côtés. Je vous souhaite tout pleins de bonnes choses à chacun pour la suite !

Je remercie également tous les membres de l'unité Inserm 1231 que j'ai pu côtoyer de près ou de loin durant ma thèse pour la bonne humeur qui règne au troisième étage et pour votre aide en

cas de besoin ! Je remercie tout particulièrement Catherine pour sa gentillesse et son écoute ainsi que Cindy et Lucile pour vos sourires qui donnent la pêche le matin !

Aux membres de la plateforme de cytométrie, Arlette, Serge et Annabelle, ce fut un grand plaisir de travailler avec vous ! Merci Serge pour ton calme et ces nombreux tris à n'en plus finir ! Et surtout un grand merci à Arlette, pour ton énergie, ta sympathie à mon égard mais aussi pour être le fournisseur de champagne de toute ma famille ! Et surtout profite profite profite de ta retraite méritée !

Sans vous, chers collègues, ma thèse aurait été moins douce, fun et agréable à vivre. Merci pour tout.

Je souhaite maintenant remercier l'ensemble de mes proches et ma famille, sans qui ce travail n'aurait pas été possible et qui ont largement contribué à la réussite de mon travail en m'apportant un soutien indéfectible au jour le jour.

Amandine, ma louloute, ça fait maintenant presque 9 ans que l'on se connait, depuis ces années médecine. Tu m'accompagnes depuis dans les moments clés de ma vie et sache que j'aurais aimé être plus présente pour toi à certains moments. Merci pour l'affection que tu me portes, le soutien que tu m'as apporté et la bonne humeur que tu transmets. Tu es une petite pépite de joie de vivre et de bonheur, merci d'être toi ! Je te souhaite de t'épanouir toujours un peu plus en tant que sage-femme et de partager pleins de moments heureux avec Alan, et qui sait peut-être que bientôt je pourrais apprendre à changer des couches avec toi…!

Mes poulfutes, 10 ans maintenant que nous nous sommes baptisés ainsi !! Merci à vous quatre mes amies au grand cœur : Pauline, Fanny, Cassou et Justine, merci pour vos encouragements rassurants au quotidien, nos soirées endiablées qui riment toujours avec partage, joie de vivre et franches rigolades. Justine, merci pour ta présence et ta positivité évidente. Fanny, merci pour ton écoute et ton sourire qui réchauffe le cœur, merci aussi à toi de nous avoir confiées le rôle de témoins à ton mariage, c'est une grande faveur pour moi d'être une des garantes de votre amour ! Cassou, merci pour ton humour évocateur et ton énergie débordante qui te redonne la pêche même quand tu crois que c'est impossible. Pauline, merci pour ton indéniable douceur et pour ton indiscutable bonne humeur. Merci pour ton cœur d'or ma Paulette. À chacune, je vous souhaite pleins de belles choses et surtout d'être heureuses dans vos vies et de profiter de toutes les petites choses qui vous épanouiront le plus possible. Love poulfutes !

Mes pépettes, mes confidentes, mes piliers, les douze dernières années ont été les meilleures puisque vous étiez à mes côtés. Merci de votre soutien indéfectible, pour vos paroles

réconfortantes, pour votre présence dans ma vie tout simplement. À toutes les 5, Zabou, Momo, Zoé, Rose et Manon, un énorme merci d'avoir contribué à devenir qui je suis aujourd'hui, la vie est plus douce et sucrée à vos côtés. Zabou, merci pour ton rire ravageur, ton optimisme transcendant et ton authentique douceur. Momo, merci pour ton sourire dévastateur et ton goût inestimable pour les voyages, merci de nous faire un peu voyager à travers toi ! Zozo, merci pour ta spontanéité et ta tendresse à mon égard, pour ta passion pour le chant et Nazca grâce à laquelle tu éclos un peu plus chaque jour. Rosou, merci pour ton incontestable et inestimable sens de l'écoute, tes regards rassurants et tes mots inspirés, ton extraordinaire joie de vivre. Ranou, merci d'être toi, pour ta bienveillance hors norme, ton véritable sens de l'amitié et aussi d'avoir été une colocataire fabuleuse, d'être une amie indispensable et d'être présente à mes côtés chaque fois que j'en ai besoin. La distance ne nous a pas éloignée, elle nous a encore plus rapprochée je pense ma belle. Je nous souhaite, mes pépettes, de traverser les douze prochaines années avec la même intensité pépettienne, voire plus, que les douze passées. À chacune, je vous souhaite le meilleur, je vous l'accorde c'est un peu cliché, mais vraiment je ne peux pas désirer moins pour vous ! Je vous aime mes pépettes.

Je souhaite maintenant remercier l'ensemble de ma famille pour leur présence et leur soutien et de me supporter depuis bientôt 27 années. À mes oncles et tantes, cousins et cousines, merci pour cette semaine passée chaque année dans un superbe chalet où l'on peut s'évader facilement des contraintes du quotidien et où l'on profite de chaque instant passé ensemble. À mon parrain, Sylvain, merci de m'avoir donné envie de goûter à la recherche et de t'intéresser à ce que je fais depuis le début, et à Johanne et Olivia, merci pour votre énergie et vos sourires qui regonflent à bloc et qui font du bien. À mon grand-père, André, malheureusement tu n'es plus là aujourd'hui pour le voir mais je suis sure que tu aurais été fier de ce que je suis devenue aujourd'hui. À mes grands-parents, Anna et Joseph, merci d'être vous tout simplement. Merci d'avoir été autant généreux avec moi et d'avoir toujours cru en moi. Je ne vous remercierai jamais assez pour votre bienveillance et votre amour délicat à mon égard.

À Julie, petite sœur, merci d'être toi c'est-à-dire entière, avec un mauvais caractère, grognon, mais aussi généreuse et attentionnée, douce et attentive aux autres. Je sais que je peux compter sur toi quand j'en ai besoin et tu sais que l'inverse est plus que vrai également. Nos différences (et il y en a !) font notre force et rend notre attachement l'une à l'autre encore plus fort.

À toi, Vincent, un simple merci n'est pas à la hauteur de la reconnaissance et de l'admiration que j'ai pour toi, merci d'être ce que tu es, humble, aimant et rempli d'attentions envers moi. Tu as du supporter les durs moments de ma thèse et tu n'as jamais rechigné, pesté même si cela a parfois

été compliqué pour toi. Tu as été mon soutien quotidien et ma force pour continuer et avancer quand l'envie de ralentir se faisait sentir. Merci pour ta patience et ta persévérance, tu m'as appris à maitriser un peu mieux (j'ai encore du travail !) mes émotions et mon stress. Merci Vincent, d'être mon compagnon de route, fidèle et amoureux. Je t'aime.

Pour finir, un grand merci à mes parents. Papa, Maman, c'est grâce à vous que j'en suis là aussi aujourd'hui. Vous avez toujours cherché à ce que nous soyons épanouies et heureuses avec Julie et vous nous avez pour cela toujours poussé à faire ce qu'on avait vraiment envie de faire, quel que soit les efforts à fournir pour y arriver. Je vous remercie pour la confiance que vous me témoignez dans mes choix et pour m'avoir transmis ce goût indéniable de la vie. Papa, grâce à toi, j'ai appris à m'intéresser vraiment aux choses et nos grands débats m'ont toujours enchanté et amusé. Maman, ton calme, ta sensibilité et tes conseils avisés, m'ont aussi rendu telle que je suis aujourd'hui. Merci pour votre amour pudique et votre bienveillance incontestable, vous avez contribué grandement à ce travail en chassant les moins bons moments pour se rappeler tout de suite des meilleurs. Je sais que je peux compter sur vous quoiqu'il arrive et cela me rassure au quotidien.

RÉSUMÉ

L'échappement des tumeurs à la surveillance du système immunitaire est une des raisons pour lesquelles le cancer parvient à se développer. Ainsi, les cellules cancéreuses parvenant à échapper au contrôle immunologique, ainsi qu'à l'éradication par les cellules effectrices de l'immunité peuvent former des tumeurs cliniquement décelables. L'échec de la réponse immunitaire anti-tumorale chez les patients qui vont développer une tumeur maligne est lié à des phénomènes d'immunosélection (consistant en la sélection de variants tumoraux capables d'échapper au système immunitaire du patient) mais également à des processus actifs d'immunosubversion au cours desquels la tumeur subvertit les cellules de l'immunité à son profit, l'ensemble conduisant donc progressivement à l'absence de réponse immunitaire anti-tumorale efficace. Les objectifs majeurs en immunologie des tumeurs sont donc de mieux comprendre la biologie, les mécanismes d'action, d'interaction, et les possibles interventions à visée thérapeutique concernant les différentes populations cellulaires qui participent efficacement ou non à la réponse immunitaire anti-tumorale.

Un des objectifs de notre travail au laboratoire consiste donc à étudier les populations lymphocytaires T $CD4^+$ et leurs rôles dans un contexte de cancer. De nombreuses études « preuves de concept » réalisées chez la souris dans notre équipe ont permis de démontrer l'implication et le rôle de différents sous-types T $CD4^+$ dans la progression tumorale. Mon travail de thèse a eu pour objectif de déterminer si les résultats obtenus chez la souris étaient transposables à l'Homme et nous nous sommes pour cela particulièrement intéressés à étudier deux nouvelles sous-populations lymphocytaires T distinctes que sont les lymphocytes Th17 et Th9, et plus particulièrement dans le cancer du sein. Ces travaux visent *in fine* à mieux comprendre la biologie et le rôle (notamment pronostique) de ces populations T $CD4^+$, et potentiellement de mettre en lumière de nouvelles voies d'immunothérapie en cancérologie.

Nous avons tout d'abord cherché à démontrer si les lymphocytes Th17 humains présentaient des fonctions immunosuppressives dépendantes des ectonucléotidases CD39 et CD73 dans le cancer du sein. Nous avons mis en évidence que les lymphocytes Th17 $CD25^+$ $CCR6^+$ infiltraient de manière importante les cancers du sein et que ces cellules exprimaient les ectonucléotidases. Nous avons également démontré que les lymphocytes Th17 humains inhibaient les fonctions effectrices des lymphocytes Th1 et T CD8 cytotoxiques de manière dépendante de CD39 et CD73 et que le microenvironnement tumoral, et plus précisément des cytokines telles que l'IL-6 et le TGF-β, polarisaient les lymphocytes Th17 vers un sous-type cellulaire immunosuppresseur. Enfin, nous

avons montré qu'une infiltration tumorale riche en cellules IL-17$^+$ est associée à un moins bon pronostic clinique des patientes atteintes de cancer du sein et que la présence d'une infiltration tumorale en cellules IL-17$^+$ pouvait gommer l'impact pronostique plutôt favorable d'une infiltration en lymphocytes T CD8$^+$.

Compte tenu de ces résultats sur un rôle plutôt défavorable des lymphocytes Th17, nous avons ensuite eu pour objectif de tenter de limiter la différenciation de ces cellules. Nous avons ainsi analysé l'effet d'une activation de la désacétylase SIRT1 sur la polarisation des lymphocytes Th17. Nous avons tout d'abord démontré que l'activation, par des agents pharmacologiques, de SIRT1 diminue l'acétylation de STAT3 et donc son rôle de facteur de transcription, et perturbe et limite ainsi la différenciation des lymphocytes Th17. L'activation de SIRT1 limite *in vivo* l'expansion des cellules Th17 et conduit à un ralentissement de la croissance tumorale dans plusieurs modèles de cancers murins. Nous avons validé ce concept chez l'Homme en montrant que l'activation de SIRT1 avec la metformine, un antidiabétique oral, induit une diminution de la proportion de lymphocytes Th17 circulants. Cette étude ouvre donc la possibilité d'association d'agonistes de SIRT1 d'autres traitements anti-tumoraux.

Le dernier projet porte sur les lymphocytes Th9 et leur impact pronostique dans les cancers du sein. Nous avons mis en évidence que les propriétés effectrices des lymphocytes Th9 humains pouvaient être augmentées en présence d'IFNα, et non d'IL-1β comme chez la souris, *via* l'activation du facteur de transcription IRF1, l'expression d'IL-21 et la sécrétion plus importante d'IL-9, cytokine caractéristique de ce sous-type lymphocytaire T CD4$^+$. Nous avons enfin démontré que la présence de lymphocytes CD4$^+$ PU.1$^+$ (phénotype Th9) intra-tumoraux était associée à un pronostic favorable chez des patientes atteintes de cancer du sein traitées par chirurgie et chimiothérapie adjuvante.

Mots clés : Lymphocytes T CD4, cancer du sein, ectonucléotidases, SIRT1, pronostic

ABSTRACT

Tumor escape to immune system surveillance is one of the reasons why human cancer achieves to grow. Thus, cancer cells escaping to immunological control and eradication by immune effector cells can lead to clinically detectable tumors. The failure of antitumor immune response in patients which will develop a malignant tumor is linked to: 1) immunoselection events that consist in tumor variants able to elude the patient's immune system, 2) active immunosubversion processes in which the tumor subverts immune cells to its benefit, leading gradually to the lack of effective antitumor immune response. It is of major concern to identify and limit the impact of immune populations which could promote tumor growth on one hand, and on the other hand to describe and amplify antitumor effector cells.

In my research team, we aim to study CD4 T cell populations and their functions in the context of cancer. Several mice proof-of-concept studies carried out in our laboratory demonstrated the involvement and the role of distinct CD4 T subtypes in tumor progression. My work was precisely to determine if the results obtained in mice could be transposable in humans and we were particularly interested in exploring two new distinct T lymphocyte subpopulations, namely Th17 and Th9 cells, in the context of breast cancer. This work aims to better understand the biology and the role (notably prognostic) of these $CD4^+$ T populations, and potentially to bring to light new immunotherapy ways in cancerology.

We first attempted to investigate if human Th17 lymphocytes had CD39 and CD73 ectonucleotidase-dependent immunosuppressive functions in breast cancer. We unraveled that $CD25^+$ $CCR6^+$ Th17 cells importantly infiltrate breast cancers and that these cells express ectonucleotidases. We explained that human Th17 lymphocytes could inhibit effector and cytotoxic functions of Th1 and CD8 T cells in an ectonucleotidase-dependent manner. Moreover, tumor microenvironment, and more precisely cytokines such as IL-6 and TGF-β, could polarize Th17 cells into an immunosuppressive cellular subtype. Finally, we showed that high tumor infiltration in $IL\text{-}17^+$ cells were significantly associated with a worse clinical prognosis for breast cancer patients even in a case of a high $CD8^+$ T cell infiltration, which is generally associated with a good clinical prognosis.

Then, in view of these results on the rather unfavourable role of Th17 lymphocytes, we aim to prevent Th17 cell differentiation. We analyzed the effect of an activation of SIRT1 deacetylase on Th17 polarization. We first established that SIRT1 activation by pharmacologic agents reduces STAT3 acetylation and indeed its transcription factor function, thus disrupting and limiting Th17 cell

differentiation. Activation of SIRT1 limits *in vivo* Th17 cell expansion and leads to the decrease of tumor growth in several mouse cancer models. This concept has been validated in humans and we unraveled that SIRT activation with metformin, an oral antidiabetic agent, induced the reduction of circulating Th17 lymphocytes proportion. This work gives the possibility to associate SIRT1 agonists with other anticancer treatments.

The last project concerns the role and the prognosis impact of Th9 lymphocytes in breast cancer. Unlike in mice where IL-1β promotes anticancer functions of Th9 lymphocytes, we highlighted that the effector properties of human Th9 cells could be increased by IFNα *via* IRF1 activation, IL-21 expression and a more important secretion of IL-9 which is the specific cytokine to this CD4 T cell subtype. Finally, we attested that the presence of tumor infiltrating $CD4^+$ $PU1^+$ lymphocytes (Th9 phenotype) was associated with a positive prognosis for breast cancer patients treated by surgery and adjuvant chemotherapy.

Keywords: CD4 T lymphocyte, breast cancer, ectonucleotidases, SIRT1, prognosis

SOMMAIRE

RÉSUMÉ 11

ABSTRACT 13

SOMMAIRE 15

LISTE DES TABLEAUX 17

LISTE DES FIGURES 18

LISTE DES ABRÉVIATIONS 20

INTRODUCTION 23

I. Le cancer face au système immunitaire 25

1. Le concept d'immunosurveillance des tumeurs 26

a) Naissance du concept de l'immunosurveillance des tumeurs 26

b) Arguments expérimentaux murins comme preuve de concept 27

c) Existence d'une immunosurveillance chez l'Homme ? 29

2. Évolution du concept vers l'immunoediting des tumeurs 31

a) La phase d'élimination : le combat de l'immunité innée et adaptative contre les cellules transformées 33

b) La phase d'équilibre : balance entre dormance tumorale et pression de sélection du système immunitaire adaptatif 39

c) La phase d'échappement : l'échec de la surveillance par le système immunitaire…. 40

II. Les lymphocytes T CD4 et leur implication dans le développement tumoral 48

1. Les lymphocytes Th17 53

a) Biologie des lymphocytes Th17 53

b) Plasticité et rôle ambivalent des lymphocytes Th17 60

c) Stratégies thérapeutiques permettant de cibler les lymphocytes Th17 64

2. Les lymphocytes Th9 66

a) Biologie des lymphocytes Th9 66

b) Stratégies thérapeutiques permettant de cibler les lymphocytes Th9 74

III. Importance pronostique et prédictive des lymphocytes T dans les cancers : le cas du cancer du sein 79

1. Épidémiologie et classification moléculaire des cancers du sein 86

a) Épidémiologie des cancers du sein 86

b) Classification moléculaire des cancers du sein 87

2. Impact du système immunitaire et des lymphocytes T infiltrant les tumeurs sur l'évolution des cancers du sein 90

3. Rôle prédictif de l'infiltration lymphocytaire dans les cancers du sein 95

IV. Objectifs des travaux de thèse 97

RÉSULTATS 99

Projet 1 100

Projet 2 134

Projet 3 – Article en préparation 175

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES 197

1. Le système immunitaire : une reconnaissance seulement récente d'un rôle dans le cancer 198

2. Les TILs : Une dimension pronostique considérable dans les cancers 199

3. Manipulation thérapeutique éventuelle des TILs comme stratégie thérapeutique 202

ANNEXES 205

BIBLIOGRAPHIE 230

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Susceptibilité de souris immunodéficientes au développement de tumeurs spontanées ou induites par un carcinogène. 34

Tableau 2. Association des infiltrats lymphocytaires avec le pronostic de différents types de cancer. 85

Tableau 3. Classification moléculaire transcriptomique des cancers triple-négatifs 89

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Les dix caractéristiques fondamentales des cellules tumorales 24

Figure 2. Arguments expérimentaux démontrant l'existence de l'immunosurveillance des tumeurs 28

Figure 3. Preuves expérimentales chez la souris de l'immunoediting des tumeurs..... 30

Figure 4. Les trois phases de l'immunoediting du cancer 32

Figure 5. La phase d'élimination du concept d'immunoediting..... 36

Figure 6. Preuve expérimentale de l'existence de la phase d'équilibre au cours de l'immunoediting des tumeurs..... 38

Figure 7. Les principaux mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire 41

Figure 8. La différenciation des lymphocytes T CD4 49

Figure 9. Historique de la découverte et de la biologie des lymphocytes Th17 52

Figure 10. Représentation schématique des voies de signalisation et de la régulation transcriptionnelle du programme de différenciation des lymphocytes Th17 54

Figure 11. Structure moléculaire du facteur de transcription STAT3 56

Figure 12. Les différents rôles du facteur HIF-1α dans la balance Th17/Treg 58

Figure 13. La plasticité des lymphocytes Th17..... 61

Figure 14. Représentation schématique des voies de signalisation et de la régulation transcriptionnelle du programme de différenciation des lymphocytes Th9 68

Figure 15. Voies de signalisation favorisant et réprimant la différenciation des lymphocytes Th9 73

Figure 16. Effets pléiotropiques des lymphocytes Th9 dans l'immunité anti-tumorale..... 76

Figure 17. Association de l'infiltration des cellules immunitaires avec le pronostic dans différents types de cancer 80

Figure 18. Schéma du microenvironnement immunitaire du cancer du sein..... 92

Figure 19. Influence du microenvironnement tumoral sur les fonctions des lymphocytes Th17 humains 132

Figure 20. Rôle de l'activation de SIRT1 dans la polarisation des lymphocytes Th17 et dans la progression tumorale. 172

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ac : Anticorps

ADCC : Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADP : Adénosine DiPhosphaste

Ag : Antigène

Ahr : Aryl hydrocarbon receptor

ARN : Acide RiboNucléique

ARNT : AhR Nuclear Translocator

ATP : Adénosine TriPhosphate

AMP : Adénosine MonoPhosphate

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

ARG1 : Arginase 1

Ascl-2 : Achaete-scute complex homolog 2

BATF : Basic leucine zipper transcription, ATF-like

Bcl6 : B-cell lymphoma 6

Bcl-xL : B-cell Lymphoma-extra large

CBP : CREB-Binding Protein

CCLx : Chemokine (C-C motif) Ligand x

CCRx : Chemokine (C-C motif) Receptor x

CD : Cluster de Différenciation

CK : CytoKératine

CLA : Cutaneous Lymphocyte Antigen

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentratrice d'Antigène

CTCs : Cellules Tumorales Circulantes

CTL : Cytotoxic T Lymphocyte

CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4

DAMPs : Damage-Associated Molecular Patterns

DC : Cellule Dendritique

DHA : Acide DocoHexaénoïque

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

Eno1 : Enolase 1

ETS : E26 Transformation-Specific

EZH2 : Enhancer of Zeste Homologue 2

FLIP : FLICE-Like Inhibitory Protein

Foxp3 : Forkhead box P3

GATA-3 : GATA-binding protein 3

Gfi-1 : Growth factor independent-1

GITR : Glucocorticoid-Induced TNFR-related protein

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor

GPI : Glucose-6-Phosphate Isomerase

HAT : Histone Acétyl-Transférase

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor 2

HES : Hématoxyline-Eosine-Safran

HIF-1α : Hypoxia Inducible Factor 1α

HK2 : HexoKinase 2

HLA : Human Leucocyte Antigen

HMGB1 : High Mobility Group Box 1

HSP : Heat Shock Protein

ICD : Immunogenic Cell Death

IDO : Indoléamine 2,3 DiOxygénase

IFNγ : InterFéroN gamma

Ig : Immunoglobuline

IL-x : InterLeukine x

IRFx : Interferon Regulatory Factor x

JAK : JAnus Kinase

KIR : Killer-cell Immunoglobulin-like Receptor

LAG-3 : Lymphocyte-Activation Gene 3

LDHα : Lactacte DesHydrogenase α

LMP : Low Molecular mass Polypeptide

LPBC : Lymphocyte-Predominant Breast Cancer

LXRα : Liver X Receptor α

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

MCA : MéthylChlorAnthène

MCT4 : MonoCarboxylate Transporter 4

MDSC : Myeloid Derived Suppressor Cell

MICA : MHC class I polypeptide-related Chain A

MICI : Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin

mTORC1 : mammalian Target Of Rapamycin Complex 1

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cell

NFκB : Nucleor Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B

NK : Natural Killer

NKG2D : Natural Killer Group 2D

NKT : Natural Killer T

NLRP3 : NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3

NO : Nitric Oxyde

PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Patterns

PKM : Pyruvate Kinase Muscle

PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2

PD-1 : Programmed cell Death protein 1

pDC : Cellules Dendritiques plasmacytoïdes

PDE4 : PhosphoDiEstérase 4

PD-L1 : Programmed cell Death Ligand 1

PGDF : Platelet-Derived Growth Factor

PGE2 : Prostaglandine E2

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PU.1 : Spi-1 proto-oncogene

RA : Récepteur aux Androgènes

RAG : Recombinant Activated Gene

RHC : Réponse Histologique Complète

RO : Récepteur aux Oestrogènes

RORα : Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor alpha

RORγt : Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor gamma t

RP : Récepteur à la Progestérone

iTh17 : Th17 inflammatoires

rTh17 : Th17 régulateurs

SGK1 : Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1

SIRT1 : Sirtuine 1

SMADx : Sma and MAD related protein 2

STATx : Signal Transducer and Activator of Transcription x

TAMs : Tumor Associated Macrophages

TAP1 : Transporter associated with Antigen Processing 1

T-bet : T box transcription factor

TCR : T Cell Receptor

TFh : T Folliculaire helper

TGF-β : Tumor Growth Factor β

Th : T helper

TILs : Tumor Inflitrating Lymphocytes

TLR : Toll Like Receptor

TLS : Tertiary Lymphoid Structures

TNFα : Tumor Necrosis Factor α

TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor

TPI : Triose-Phosphate Isomerase

TRAF6 : TNF-Receptor Associated Factor 6

TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand

Treg : T régulateurs

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEH : Veinules à Endothélium Haut

INTRODUCTION

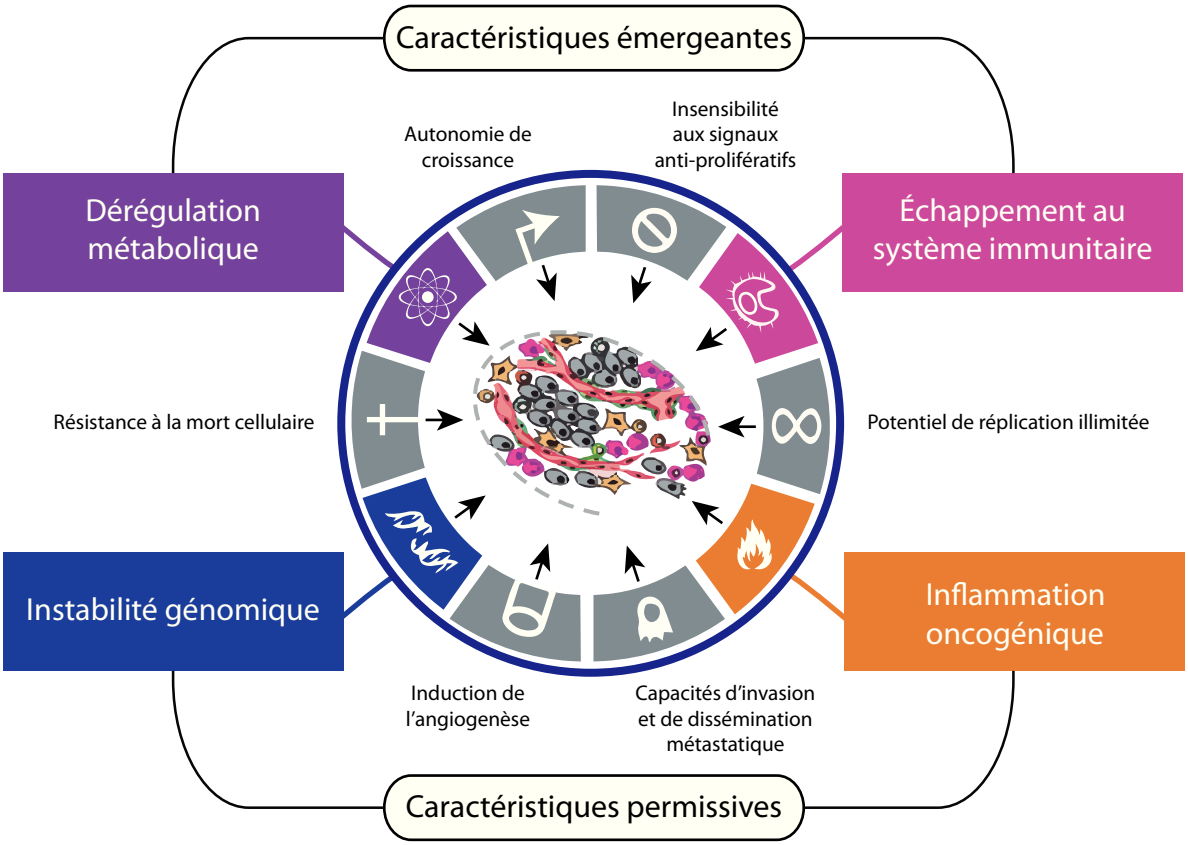


Figure 1. Les dix caractéristiques fondamentales des cellules tumorales.
Les cellules transformées se distinguent des cellules saines par l'acquisition d'anomalies fonctionnelles communes. Ces anomalies fonctionnelles sont l'aboutissement d'un processus multi-étapes, l'oncogenèse, au cours duquel l'environnement n'est pas neutre. Outre les capacités intrinsèques acquises par les cellules cancéreuses telles que la résistance à la mort cellulaire, l'autonomie de croissance, l'insensibilité aux signaux anti-prolifératifs ou encore le potentiel de réplication illimitée, des caractéristiques extrinsèques liées à l'environnement tumoral ont pu être décrites comme nécessaires à la formation d'une pathologie cancéreuse. L'inflammation chronique et l'échappement au système immunitaire ont été également admis comme deux des dix caractéristiques fondamentales régissant la transformation cellulaire maligne. Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011).

I. Le cancer face au système immunitaire

Les cellules tumorales dérivent de cellules du « soi » à la suite de séries de mutations qui vont altérer leur génome. Les cellules tumorales sont ainsi fréquemment caractérisées par une grande instabilité génétique, et vont au cours de l'oncogenèse acquérir des propriétés anormales qui vont les distinguer des cellules du « soi ». La caractérisation des altérations génétiques responsables de la formation des tumeurs malignes est maintenant permise par le développement des techniques biologiques de haut débit, et s'intègre désormais dans le paysage des grandes caractéristiques de la biologie des cancers résumées par Hanahan et Weinberg en 2000 (Hanahan and Weinberg, 2000). Ces « hallmarks » du cancer se résumaient initialement à six principales caractéristiques biologiques acquises par les cellules tumorales au cours de leur développement. La cellule cancéreuse est ainsi capable de produire et recevoir ses propres signaux de survie, d'échapper à la mort cellulaire et d'ignorer les signaux d'inhibition de croissance. Elle acquière en outre des capacités anormales de division, et va être capable de promouvoir une néoangiogenèse tumorale nécessaire au développement et à la pérennité d'une masse tumorale. La sixième caractéristique confère aux cellules tumorales des capacités d'invasion et de dissémination à distance, autrement dit l'envahissement de tissus à distance *via* la métastasogenèse. Ces grands concepts de biologie du cancer ont été révisés à la lumière de la mise à jour des connaissances en 2011 et quatre nouvelles caractéristiques ont été ajoutées aux six précédentes (Hanahan and Weinberg, 2011) (**Figure 1**, p. 24). L'instabilité génétique et l'apparition de mutations au sein des cellules tumorales induit la transformation oncogénique et la progression tumorale. Les cellules cancéreuses ont la capacité de modifier ou de reprogrammer leur métabolisme cellulaire, leur permettant de se répliquer indéfiniment, et donc de soutenir la prolifération néoplasique. Par ailleurs, le développement d'une tumeur n'est pas seulement permis par des modifications intrinsèques à la cellule tumorale, mais dépend également de la permissivité de l'environnement de la tumeur. C'est ainsi, qu'à côté de la nécessité d'une néoangiogenèse tumorale, l'échappement des cellules cancéreuses à la réponse immunitaire de l'hôte, ainsi que la mise en place d'une inflammation chronique ont été décrites comme des caractéristiques extrinsèques indispensables au développement tumoral.

Ce dernier concept, finalement assez nouvellement reconnu, repose en réalité sur nombre d'observations précliniques et cliniques relativement anciennes ayant forgé les notions d'immunosurveillance, d'immunosélection et d'immunosubversion lors du développement tumoral. C'est à ces notions que notre travail de thèse s'est intéressé, en tentant d'apporter de nouvelles

données descriptives, pronostiques et thérapeutiques concernant de nouvelles sous-populations de lymphocytes T dans les cancers, en particulier du sein.

1. Le concept d'immunosurveillance des tumeurs

a) Naissance du concept de l'immunosurveillance des tumeurs

L'aptitude du système immunitaire à reconnaitre et éradiquer des cellules subissant une transformation cancéreuse a été suggérée à la fin du XIX^{ème} siècle par William B. Coley, dont les observations ont permis de mettre en évidence un lien entre régression tumorale et infection. La survenue post-opératoire d'infections à streptocoque chez des patients atteints de sarcomes osseux s'était avérée décisive pour l'obtention de réponses complètes sans récidive (Coley, 1893). Ces données cliniques permettent de mettre en lumière la possibilité d'un contrôle de la progression tumorale *via* une réaction inflammatoire médiée par le système immunitaire. C'est sur ces constatations que reposent les premières approches d'immunothérapie par l'injection intra-tumorale de toxines bactériennes (toxines de Coley), ayant pour but de stimuler le système immunitaire pour induire une régression tumorale (Coley, 1891).

Ce n'est qu'au début du XX^{ème} siècle que Paul Ehrlich émet pour la première fois le concept d'immunosurveillance des tumeurs. L'hypothèse d'Ehrlich postulait la capacité du système immunitaire à inhiber le développement tumoral, expliquant ainsi la faible incidence des tumeurs malignes chez l'homme, en dépit d'un taux théorique de transformation cellulaire néoplasique élevé (Ehrlich, 1909). Cependant, le manque de connaissance en immunologie et de modèles appropriés pour valider expérimentalement cette hypothèse laissa ce concept d'immunosurveillance dans un oubli relatif. Ce n'est qu'à la fin des années 1950 que des études démontrent l'existence d'antigènes associés aux tumeurs, et capables d'être reconnus par le système immunitaire. Ces découvertes permettent à Macfarlane Burnett et Lewis Thomas d'établir les bases de la théorie de l'immunosurveillance du cancer, dans lesquelles le système immunitaire adaptatif serait en perpétuelle alerte contre les cellules cancéreuses émergentes pour inhiber la poursuite de leur développement (Burnet, 1957; Thomas, 1959). Cette théorie émet donc le postulat que les cellules effectrices du système immunitaire et plus précisément les lymphocytes T agiraient comme des sentinelles dans la reconnaissance et l'élimination constantes des cellules transformées naissantes (Burnet, 1970).

b) Arguments expérimentaux murins comme preuve de concept

Il a fallu attendre le développement et l'utilisation des modèles de souris syngéniques (c'est-à-dire des souris de fond génétique identique) pour que l'on puisse démontrer que les cellules tumorales possèdent des propriétés immunologiques différentes des cellules normales. Old et Boyse ont ainsi pu montrer que l'on pouvait empêcher la survenue d'un cancer viro-induit en vaccinant les souris avec un sérum issu de souris consanguines, porteuses de tumeur. Ces résultats mettaient en évidence la présence dans le sérum d'immunoglobulines « anti-cellules tumorales » c'est-à-dire dirigées contre des anti-antigènes tumoraux (Old and Boyse, 1964). La théorie de l'immunosurveillance proposée par Burnet et Thomas trouvait ainsi ses premières preuves expérimentales auprès de la communauté scientifique.

Cependant, d'autres études allaient à l'encontre de ces résultats initiaux, dans la mesure où d'autres équipes de recherche ayant développé des modèles de souris immunodéficientes, ne trouvèrent aucune différence de sensibilité à une carcinogenèse chimique en comparaison à celle induite chez des souris immunocompétentes (Rygaard and Povlsen, 1974; Stutman, 1974). Le concept d'immunosurveillance des tumeurs fut alors critiqué et relégué au second plan. D'autres théories antagonistes furent même alors avancées et proposèrent notamment que les cellules tumorales ne possédaient pas les signaux de danger appropriés pour alerter le système immunitaire (Matzinger, 1994) ou même que le système immunitaire favoriserait la progression tumorale (Prehn, 1971).

Il fallut attendre plus de 10 ans pour entrevoir les explications à ces résultats en apparente contradiction : la souche de souris immunodéficientes (*Nude* CBA/H) utilisée dans les expériences de Stutman était en réalité plus sensible que les souris sauvages au carcinogène utilisé (Heidelberger, 1975). Par ailleurs, la découverte des cellules Natural Killer (NK) qui ne se développent pas dans le thymus mais au niveau de la moelle osseuse (tout comme les lymphocytes B), a permis de prouver que cette souche de souris n'était pas complétement dépourvue de lymphocytes T (Ikehara et al., 1984; Maleckar and Sherman, 1987).

Les années 1990 représentent la reconnaissance par la communauté scientifique du concept d'immunosurveillance. En effet, le recours à des modèles murins immunodéficients plus purs, a permis de montrer que de tels animaux développaient des tumeurs plus rapidement, et en nombre plus importants que des souris immunocompétentes (**Figure 2**, p. 28). Parallèlement, au début des années 90, l'équipe de Robert D. Schreiber a clairement mis en évidence l'importance de l'interféron gamma (IFNγ) dans le rejet des tumeurs transplantées (Dighe et al., 1994) et que les souris déficientes pour le récepteur à l'IFNγ ou le facteur de transcription STAT1 (souris IFNGR1$^{-/-}$ ou

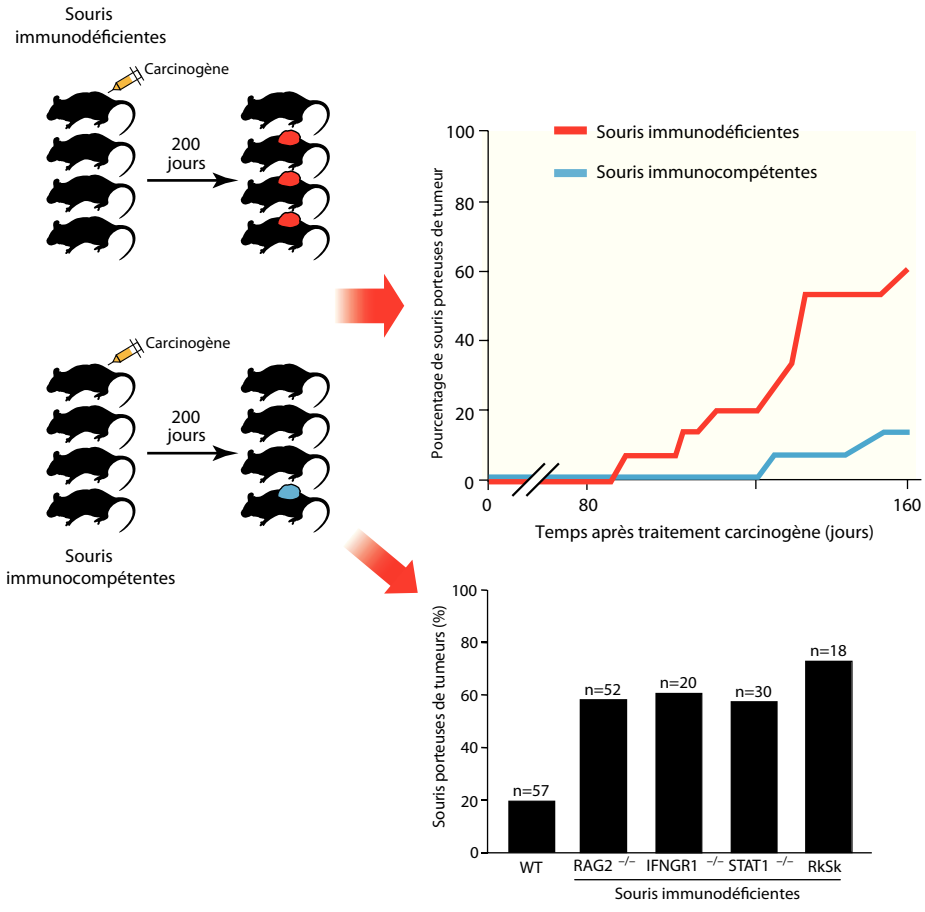


Figure 2. Arguments expérimentaux démontrant l'existence de l'immunosurveillance des tumeurs.
Le statut immunitaire des souris est un élément déterminant de leur susceptibilité à l'induction tumorale par un agent carcinogène. En effet, de nombreuses études ont établi qu'après un traitement avec un carcinogène les souris immunodéficientes développaient plus de tumeurs que des souris immunocompétentes. Ces expériences reposent sur l'utilisation de souris génétiquement modifiées présentant un déficit fonctionnel des immunités innée ou adaptative et sur l'utilisation de souris sauvages rendues immunodéficientes après l'administration d'anticorps monoclonaux déplétant par exemple les populations lymphocytaires T $CD4^+$ et T $CD8^+$ ou l'IFNγ. Adapté de (Shankaran et al., 2001) et (Schreiber et al., 2011).

STAT1$^{-/-}$), ou qui ne présentent plus de réponse immunitaire adaptative fonctionnelle du fait du déficit en cellules T, B et NK (souris RAG2$^{-/-}$) sont plus sensibles au développement de tumeurs chimio-induites (Kaplan et al., 1998; Shankaran et al., 2001). Ces dernières constatations ont pu être mises en évidence *via* la réinjection de tumeurs chimio-induites par le méthylcholanthrène (MCA) dans des souris immunodéficientes (RAG2$^{-/-}$) à des souris immunocompétentes, entrainant chez ces animaux un développement tumoral dans 40% des cas. À l'inverse, lorsque des cellules tumorales issues de souris immunocompétentes ont été réinjectées à des souris immunodéficientes (RAG2$^{-/-}$), 100% des souris immunodéficientes développèrent une tumeur (**Figure 2**, p. 28). Ceci met donc en évidence que la tumeur d'une souris qui ne possède pas de système immunitaire fonctionnel, comme les souris RAG2$^{-/-}$, est plus immunogène qu'une même tumeur qui s'est développée chez une souris immunocompétente (Shankaran et al., 2001).

Par ailleurs, l'identification dans le mélanome humain, par le groupe de Thierry Boon, du premier antigène tumoral (MZ2-E) capable d'induire une réaction lymphocytaire T cytotoxique spécifique va permettre, entre autre, de valider le potentiel immunogène des tumeurs et d'entrevoir de nouvelles possibilités d'immunothérapie du cancer (van der Bruggen et al., 1991).

c) Existence d'une immunosurveillance chez l'Homme ?

Si le concept d'immunosurveillance des tumeurs a été largement démontré et, dès lors, établi chez la souris, la question de l'existence d'une implication similaire du système immunitaire chez l'homme se pose.

Des études épidémiologiques avec un suivi à long terme de patients atteints d'immunodéficience primaire ont pu révéler que cette population présentait significativement plus de risque de développer diverses variétés de cancers solides (Penn, 1988). Ces patients sont effectivement plus particulièrement sensibles aux cancers viro-induits tels que les lymphomes non Hodgkiniens induits par le virus Epstein-Barr, les sarcomes de Kaposi (induits par le virus de l'herpès humain 8) ou encore les cancers génitaux induits par les papillomavirus humains (Pardoll, 2003). Néanmoins, il a été montré que des patients avec une immunodéficience sévère à la suite d'une transplantation d'organe présentent également une probabilité plus élevée de développer des cancers sans étiologie virale comme les cancers du côlon, du poumon, du rein, du pancréas ou encore le mélanome (Dunn et al., 2002). Par ailleurs, le suivi prospectif longitudinal de sujets indemnes de pathologie cancéreuse et présentant un polymorphisme des récepteurs NKG2D (*Natural Killer Group 2D*) ou encore des récepteurs KIRS (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*)

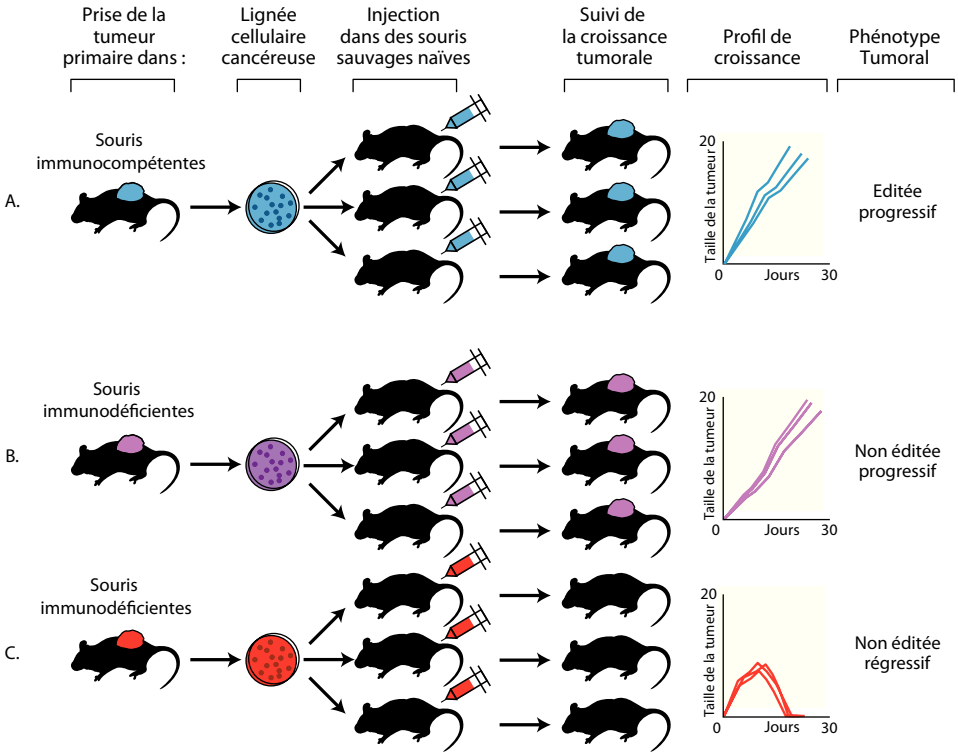


Figure 3. Preuves expérimentales chez la souris de l'immunoediting des tumeurs.
Les tumeurs des souris immunocompétentes sont qualitativement différentes de celles des souris immunodéficientes. En effet, le système immunitaire peut moduler et éditer les propriétés immunologiques des cellules cancéreuses. Ceci est démontré par la transplantation dans des souris immunocompétentes de tumeurs issues également de souris immunocompétentes et qui provoque dans 100% des cas l'apparition d'une tumeur (A). Le système imunitaire a déjà exercé une pression de sélection et les tumeurs ne sont plus immunogènes : ces tumeurs sont dites «éditées». À l'inverse, la transplantation dans des souris immunocompétentes de tumeurs issues de souris immunodéficientes n'induit pas dans 100% des cas la prise tumorale (B et C). Ces tumeurs peuvent encore être sensibles à l'action du système immunitaire et sont alors dites «non éditées». Ces observations ont permis l'évolution du concept d'immunosurveillance vers celui d'immunoediting des tumeurs. Adapté de (Schreiber et al., 2011).

contrôlant l'activation des cellules NK, montre un risque significativement accru de développer un cancer (Carrington et al., 2005; Hayashi et al., 2006).

Ces constatations cliniques constituent des arguments indirects pour penser qu'une immunosurveillance existe également chez l'Homme. Par ailleurs, les patients atteints de cancer peuvent développer des réponses immunitaires innée et adaptative, cellulaire et humorale, spontanées vis-à-vis de certains antigènes tumoraux. Enfin, il est désormais clairement montré dans de nombreuses variétés de tumeurs solides, que la présence de lymphocytes infiltrant les tumeurs pouvait présager un meilleur pronostic pour le patient (Dunn et al., 2004b). La présence d'une infiltration tumorale (très souvent au niveau du front d'invasion de la tumeur) par des cellules du système immunitaire du patient, peut ainsi être interprétée comme une tentative de réponse immunitaire anti-tumorale. Le caractère souvent pronostique de ce type d'infiltration tumorale, souligne en outre l'importance de la réaction immunitaire de l'hôte vis-à-vis du contrôle plus ou moins efficace du développement tumoral.

2. Évolution du concept vers l'immunoediting des tumeurs

Malgré les fortes preuves validant l'existence d'un processus fonctionnel d'immunosurveillance du cancer chez l'homme, des individus immunocompétents développent tout de même des tumeurs. Cette réalité clinique peut être expliquée par l'existence de mécanismes immunitaires qui vont faciliter la croissance de tumeurs constituées de cellules cancéreuses perdant petit à petit leur immunogénicité. L'équipe de Robert D. Schreiber a ainsi pu démontrer que des tumeurs induites par un carcinogène, le méthylcholanthrène, dans des souris immunocompétentes, puis réinjectées dans des souris immunodéficientes ($RAG2^{-/-}$) induisaient dans 100% des cas une prise tumorale puis un développement, alors que lorsque les tumeurs proviennent de souris immunodéficientes et qu'elles sont greffées à des souris immunocompétentes, ces dernières ne développent une tumeur que dans la moitié des cas (Shankaran et al., 2001) (**Figure 3**, p. 30). Ces observations indiquent que le système immunitaire de l'hôte, certes protège ce dernier contre l'émergence de cellules transformées, mais que cette réponse immunitaire anti-tumorale, par la pression Darwinienne de sélection qu'elle induit, favorise *in fine* l'émergence de clones tumoraux moins immunogènes (immunoediting) (Dunn et al., 2002).

Ce concept d'immunoediting des tumeurs est donc un processus dynamique qui s'établit dans le temps entre le système immunitaire de l'hôte et les cellules cancéreuses. Au cours du

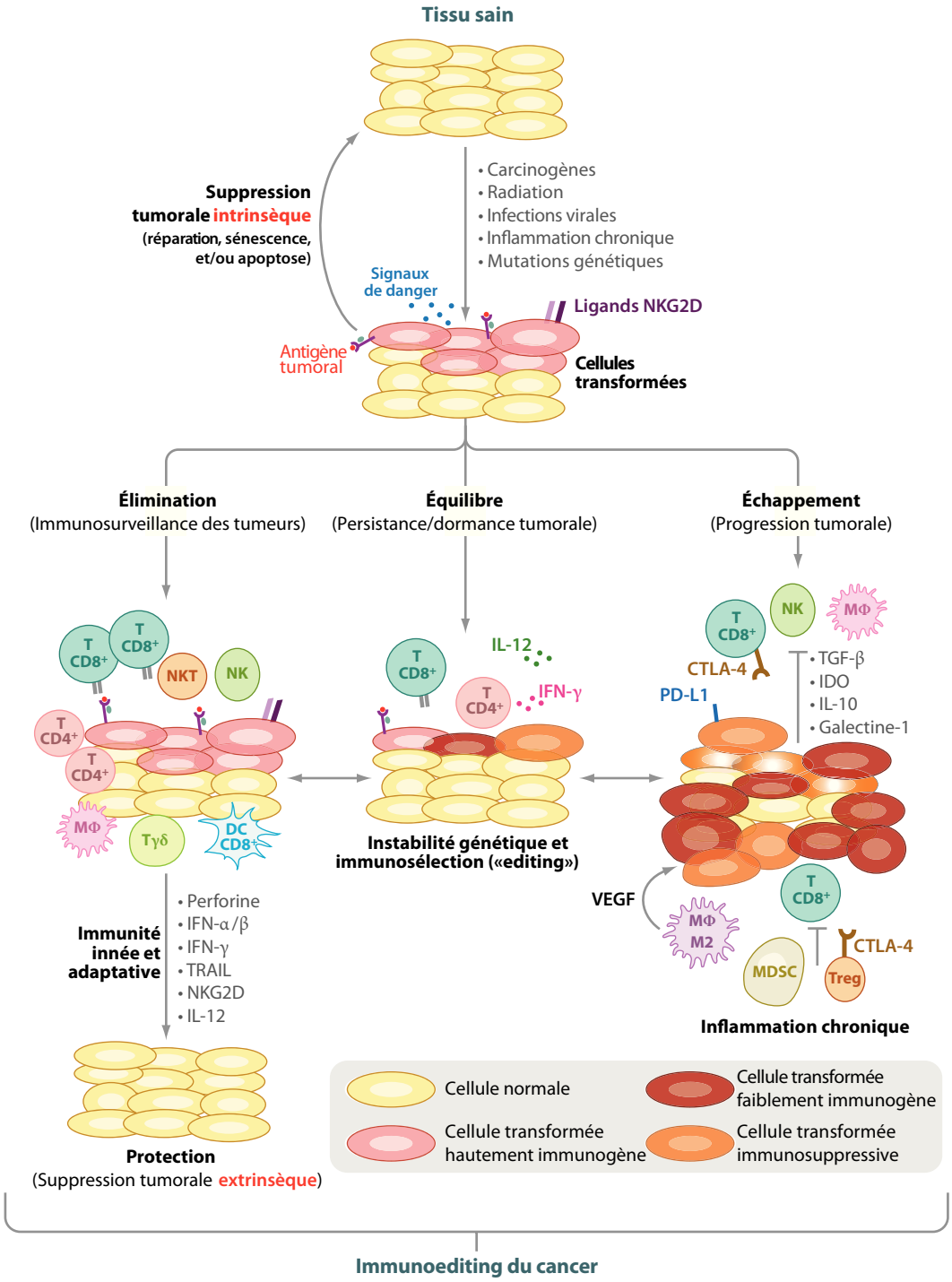


Figure 4. Les trois phases de l'immunoediting du cancer.
Ce concept est le résultat de trois étapes qui fonctionnent soit indépendamment soit de concert pour contrôler et façonner la tumeur. Quand les cellules normales se transforment en cellules tumorales sous l'effet d'agents mutagènes, le système immunitaire fonctionne comme un suppresseur de tumeur extrinsèque en éliminant les cellules tumorales. Dans la première phase, dite d'élimination, déjà connu sous le terme d'immunosurveillance des tumeurs, l'immunité innée et adaptative reconnait les cellules transformées et les détruit, résultant au retour du tissu à des conditions physiologiques. Cependant, si l'immunité anti-tumorale ne réussit pas à éliminer complétement les cellules transformées, des variants tumoraux peuvent entrer dans la deuxième phase, dite d'équilibre, où va s'engager un combat entre la destruction de clones immunogènes et l'apparition et la sélection de clones peu voire non immunogènes. Ces variants non immunogènes vont alors pouvoir échapper à l'action du système immunitaire, qui lui-même deviendra potentiellement promoteur de la croissance tumorale (infiltration de cellules immunosuppressives au sein de la tumeur). C'est lors de cette troisième phase, dite d'échappement que la maladie apparaît cliniquement décelable. Adapté de (Vesely et al., 2011).

développement tumoral, ces relations peuvent se décrire en 3 phases distinctes : l'élimination, l'équilibre et l'échappement (**Figure 4**, p. 32).

a) La phase d'élimination : le combat de l'immunité innée et adaptative contre les cellules transformées

La phase d'élimination représente la phase initiale de l'immunosurveillance des tumeurs. Au cours de celle-ci, les cellules du système immunitaire inné et adaptatif coopèrent pour localiser, reconnaître et détruire les cellules transformées naissantes. Ce processus n'a jamais été visualisé *in vivo* ; mais des modèles précliniques utilisant des souris génétiquement modifiées ou des anticorps monoclonaux neutralisants, ont permis de démontrer qu'un grand nombre de cellules effectrices du système immunitaire ainsi que des voies de signalisation nécessaires à la réponse immunitaire innée et adaptative, étaient nécessaires à la reconnaissance et à la suppression des cellules cancéreuses (**Tableau 1**, p. 34) (Dunn et al., 2004a; Mittal et al., 2014; Schreiber et al., 2011; Vesely et al., 2011).

Tableau 1. Susceptibilité de souris immunodéficientes au développement de tumeurs spontanées ou induites par un carcinogène. D'après (Vesely et al., 2011).

Génotype murin	Statut immunitaire	Sensibilité aux tumeurs chimio-induites ou spontanées (*versus* des souris sauvages)
Rag1$^{-/-}$ *ou Rag2*$^{-/-}$	Perte des cellules T, B et NKT	↗ sarcomes induits par MCA ↗ néoplasies intestinales et pulmonaires
Rag2$^{-/-}$ *Stat1*$^{-/-}$ *(Rksk)*	Perte des cellules T, B et NKT, insenbilité aux IFN-α/β/γ	↗ sarcomes induits par MCA ↗ néoplasies intestinales, adénocarcinomes coliques et mammaires
Tcrb$^{-/-}$	Perte des cellules Tαβ	↗ sarcomes induits par MCA
Tcrd$^{-/-}$	Perte des cellules Tγδ	↗ sarcomes induits par MCA ↗ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
Nude athymique	Perte de la plupart des cellules T	↗ sarcomes induits par MCA
Ifngr1$^{-/-}$	Insenbilité à l'IFN-γ	↗ sarcomes induits par MCA
Ifnar1$^{-/-}$	Insenbilité aux IFN-α/β	↗ sarcomes induits par MCA
Stat1$^{-/-}$	Insenbilité aux IFN-α/β/γ	↗ sarcomes induits par MCA
Ifng$^{-/-}$	Perte de la production d'IFN-γ	↗ sarcomes induits par MCA et lymphomes induits par MNU ↗ lymphomes (C57BL/6) et adénocarcinomes pulmonaires (BALB/c)
Pfp$^{-/-}$	Perte de la production de Perforine	↗ sarcomes induits par MCA ↗ lymphomes B
Pfp$^{-/-}$ *Ifng*$^{-/-}$	Perte de la production de Perforine et d'IFN-γ	↗ lymphomes B
Cd80$^{-/-}$ *Cd86*$^{-/-}$	Perte de l'expression de CD80 et CD86	↗ tumeurs cutanées induites par les UV
Trail$^{-/-}$	Perte de l'expression de TRAIL	↗ sarcomes induits par MCA ↗ lymphomes spontanés
Il12a$^{-/-}$	Perte de la production d'IL-12	↗ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA ↗ lymphomes induits par MNU
Il12b$^{-/-}$	Perte de la production d'IL-12 et d'IL-23	↗ sarcomes induits par MCA ↘ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
Il23a$^{-/-}$	Perte de la production d'IL-23	↘ sarcomes induits par MCA ↘ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
Tnf$^{-/-}$	Perte de la production de TNF-α	↗ sarcomes induits par MCA ↘ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA
Myd88$^{-/-}$	Perte de l'expression de Myd88	↗ tumeurs cutanées induites par les UV
Il10$^{-/-}$	Perte de la production d'IL-10	↘ sarcomes induits par MCA
Il1b$^{-/-}$	Perte de la production d'IL-1β	↘ sarcomes induits par MCA
Il17a$^{-/-}$	Perte de la production d'IL-17A	↘ tumeurs cutanées induites par DMBA/TPA

Neutralisation avec un anticorps	Statut immunitaire	Sensibilité aux tumeurs chimio-induites (*versus* des souris sauvages)
Anticorps anti-NK1.1	Perte des cellules NK et NKT	↗ sarcomes induits par MCA
Anticorps anti-IFN-γ	Neutralisation de l'IFN-γ	↗ sarcomes induits par MCA
Anticorps anti-TRAIL	Neutralisation de TRAIL	↗ sarcomes induits par MCA
Anticorps anti-CD4, anti-CD25 ou anti-FR4	Perte des cellules T régulatrices	↘ sarcomes induits par MCA

Lorsqu'une cellule normale se transforme sous l'effet de facteurs tels que l'exposition à des carcinogènes, ou des mutations génétiques, des mécanismes intrinsèques aux cellules peuvent intervenir pour limiter la transformation de celles-ci (Pestov et al., 2015). Dans le cas où la réparation des mutations génétiques induites est impossible, des voies de signalisation conduisant à la sénescence ou à la mort cellulaire programmée (apoptose) peuvent être engagées par les cellules.

Cependant, ces mécanismes ne sont pas infaillibles et peuvent être dans certains cas défectueux (Hanahan and Weinberg, 2011). C'est alors que la surveillance du système immunitaire devient indispensable pour bloquer l'oncogenèse et la progression tumorale.

Les cellules transformées sont ainsi susceptibles d'être identifiées comme des cibles par les cellules de l'immunité innée, lorsque la transformation néoplasique leur fait exprimer des molécules induites par le stress génotoxique. C'est ainsi que plusieurs familles de molécules peuvent être exprimées à la surface des cellules tumorales ou relarguées par celles-ci : ces signaux de danger pathogènes ou PAMPs (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) mais aussi endogènes ou DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) peuvent être détectés notamment par les *Toll-Like Receptors* (TLR). Ces récepteurs sont exprimés par les cellules sentinelles de l'immunité innée comme les cellules dendritiques (DC) ou les macrophages, et l'activation de ces récepteurs va déclencher la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires qui permettront entre autre la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative (Cui et al., 2014; Marshak-Rothstein, 2006; Marshak-Rothstein and Rifkin, 2007). Une autre ligne de défense, complémentaire à celle précédemment décrite, vis-à-vis des cellules cancéreuses sont les cellules NK (immunité innée) qui *via* les récepteurs NKG2D vont reconnaitre des signaux de danger à la surface des cellules transformées. Les cellules NK, ainsi activées, vont alors induire l'apoptose des cellules tumorales en relarguant le contenu de leurs granules cytotoxiques contenant des enzymes telles que la perforine et les granzymes ou des cytokines comme l'IFNγ ou le TNFα (*Tumor Necrosis Factor α*) (Moretta, 2002). L'activation des cellules NK permet en outre de recruter et d'activer les cellules dendritiques au site tumoral grâce à la production d'interféron de type I (IFNα/β) et de chimiokines. Les débris apoptotiques des cellules tumorales ainsi éliminées peuvent alors être phagocytés par les macrophages et les cellules dendritiques, et ces dernières vont ainsi pouvoir présenter de potentiels peptides antigéniques d'origine tumorale aux lymphocytes T (immunité adaptative) *via* le CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) de classe II et/ou le CMH de classe I. Les DC sont en effet les seules cellules capables de présenter les antigènes extracellulaires sur les molécules de CMH I (exprimées par les lymphocytes T $CD8^+$) normalement présentés sur les molécules de CMH II (exprimées par les lymphocytes T $CD4^+$) : cette propriété, appelée « cross présentation », est essentielle pour l'induction d'une réponse anti-tumorale spécifique. S'en suit alors une réponse immunitaire spécifique de la tumeur dite adaptative avec comme principaux acteurs les lymphocytes T, B et les cellules NKT (**Figure 5**, p. 36).

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), telles que les DCs, exposées aux signaux de danger, ou aux cytokines produites lors de la réponse immunitaire innée, expriment des molécules de costimulation, (comme B7) reconnues par des récepteurs sur les lymphocytes T (comme CD28), et

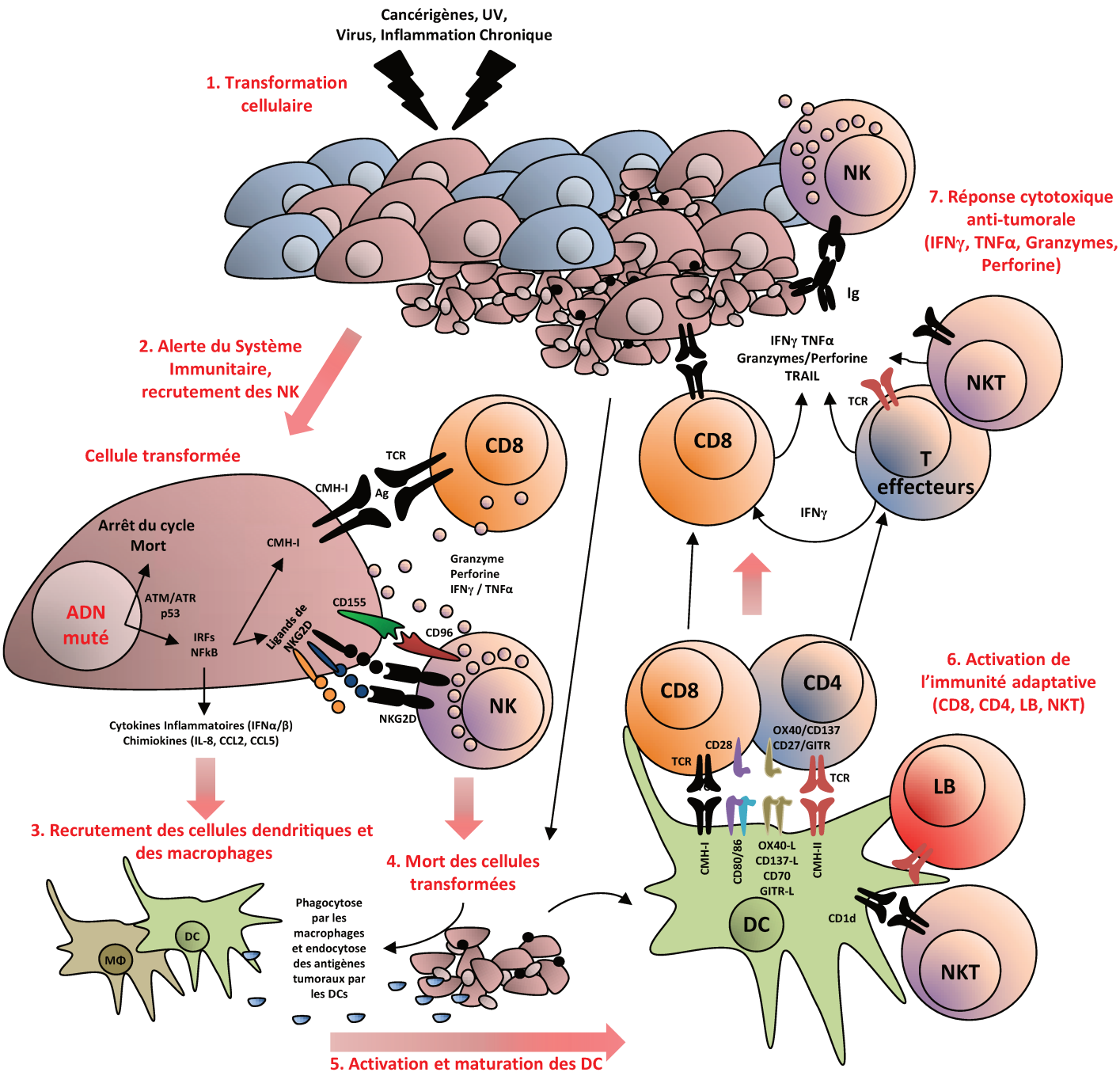


Figure 5. La phase d'élimination du concept d'immunoediting.

La phase d'élimination met en jeu la coopération des immunités innée et adaptative pour détecter et détruire les cellules transformées naissantes. Sous l'action de stress génotoxique, les cellules normales se transforment et les mécanismes intrinsèques de réparation peuvent échouer. Les cellules transformées vont alors exprimer des molécules de stress à leur surface telles que le CMH I ou les ligands de NKG2D. Ces derniers vont être reconnus par des cellules de l'immunité innée, les cellules NK. La fixation de NKG2D sur ses ligands va induire l'activation des cellules NK qui vont avoir une action cytotoxique sur les cellules tumorales *via* le relargage de perforine et de granzyme. L'activation des cellules NK va aussi permettre le recrutement des macrophages et des cellules dendritiques au site tumoral. L'endocytose des antigènes tumoraux libérés lors de la mort des cellules transformées va induire l'activation et la maturation des DCs et ensuite ces cellules vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour déclencher la réponse immunitaire adaptative en présentant les antigènes tumoraux aux lymphocytes T, B et NKT. Les cellules T effectrices vont alors sécréter une cytokine pro-inflammatoire, l'IFNγ, qui va participer à la réponse cytotoxique anti-tumorale en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses et l'angiogenèse. De plus, ces cellules effectrices vont exprimer des molécules de costimulation qui va favoriser leur prolifération et leur survie. Ce processus permettra l'élimination des cellules transformées.

délivrent ainsi les seconds signaux (en plus de la reconnaissance de l'antigène) nécessaires à l'activation des lymphocytes T (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998). En réponse à la reconnaissance de l'antigène (Ag) et à la costimulation, les lymphocytes T sécrètent des cytokines qui induisent leur prolifération (notamment l'IL-2) ou leurs fonctions effectrices. Les lymphocytes T CD4 peuvent se différencier en différentes populations effectrices qui produisent des ensembles limités de cytokines et exercent différentes fonctions. Ainsi, les lymphocytes T helper de type 1 (Th1) produisent de l'IFNγ et activent ainsi les phagocytes en plus de stimuler la sécrétion d'anticorps (Ac) opsonisant et fixant le complément. Ces lymphocytes T expriment des molécules comme le ligand de CD40 (CD40L) induisant, après liaison à CD40 sur la DC, la sécrétion par cette dernière de cytokines comme l'interleukine 12 (IL-12) (qui favorise alors la polarisation d'une réponse Th1), et l'expression de molécules de costimulation comme B7 dans une boucle d'auto-activation (Banchereau et al., 2000; Banchereau and Steinman, 1998).

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les DCs présentent donc les antigènes tumoraux aux cellules T, ce qui va induire leur activation et leur migration vers le site tumoral. Les cellules T effectrices (T $CD4^+$, T $CD8^+$ et NKT) vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires ; la plus importante d'entre elles lors de ce processus, l'IFNγ, va médier la réponse anti-tumorale en inhibant la prolifération des cellules cancéreuses et l'angiogenèse (Dunn et al., 2006). De manière similaire aux cellules NK, les cellules T $CD8^+$ cytotoxiques vont induire l'apoptose des cellules cancéreuses *via* la sécrétion de perforine et de granzymes mais aussi en interagissant avec les récepteurs de mort Fas et TRAIL (*Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand*) présents sur les cellules transformées (**Figure 5**, p. 36).

La coopération entre les immunités innée et adaptative va donc conduire à l'élimination des cellules cancéreuses et à la génération d'une mémoire immunologique spécifique des composants de la tumeur pour tenter d'empêcher la récurrence tumorale (Finn, 2012). Cependant, malgré les mécanismes engagés au cours de ces étapes initiales de l'immunosurveillance du cancer, certaines cellules tumorales sont susceptibles de s'adapter à la réponse immunitaire, peuvent résister et survivre à l'action cytotoxique du système immunitaire, sans pour autant pouvoir conduire immédiatement à l'émergence clinique d'une tumeur détectable : il s'agit de la phase d'équilibre.

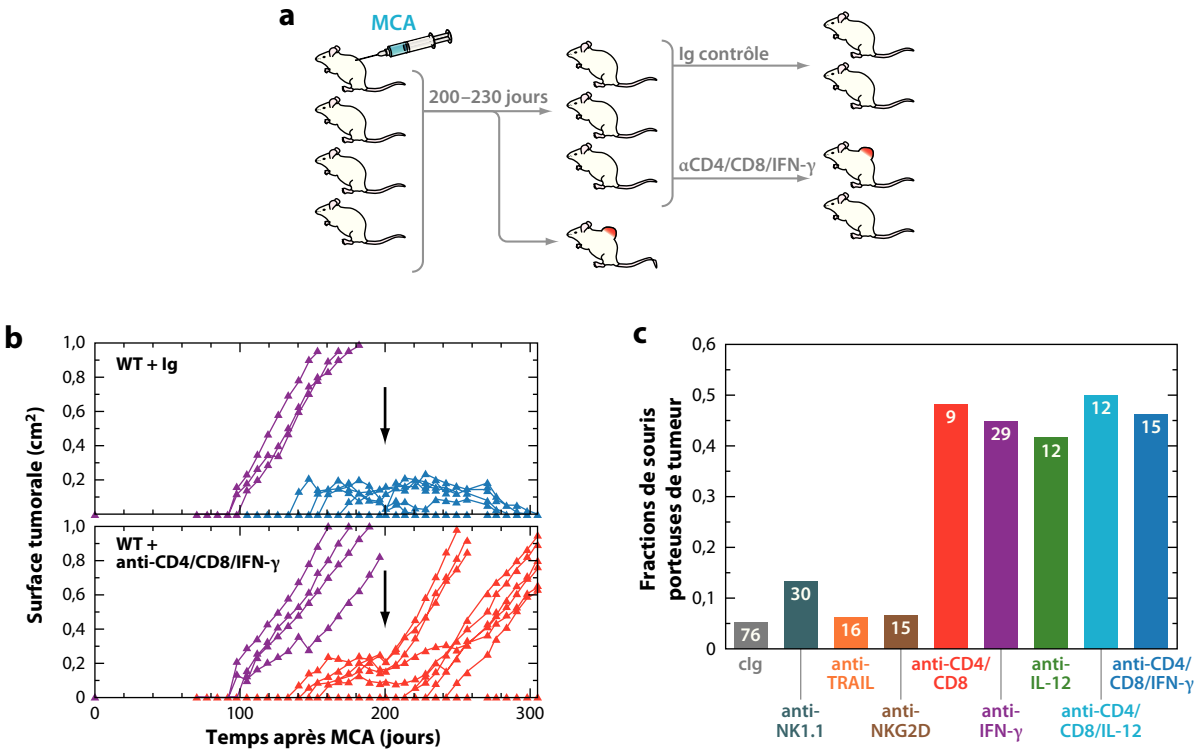


Figure 6. Preuve expérimentale de l'existence de la phase d'équilibre au cours de l'immunoediting des tumeurs.

a) Protocole expérimental mis en place pour tester l'hypothèse que les tumeurs sont maintenues dans un état de dormance par l'immunité adaptative au cours de la phase d'équilibre (Koebel et al., 2007).

b) Des souris C57Bl/6 immunocompétentes ont été traitées avec 25 µg de MCA et la croissance tumorale a été suivie. Au jour 200, les souris ne présentant pas de tumeurs (soit près de 80% des souris) ont reçu une injection hebdomadaire soit d'immunoglobulines (Ig) contrôles soit d'anticorps monoclonaux anti-CD4/CD8/IFNγ. Dès lors que les composants du système immunitaire adaptatif sont déplétés chez certaines souris, une augmentation du volume tumoral est observée tandis que celui-ci reste stable chez les souris traitées avec les Ig contrôles. Le maintien dans un état d'équilibre des cellules tumorales est mis en oeuvre par le système immunitaire adaptatif.

c) Histogramme représentant les fractions de souris initialement traitées par MCA développant des tumeurs tardives après déplétion sélective des composantes cellulaire et/ou moléculaire du système immunitaire inné et adaptatif. Les tumeurs d'abord maintenues à l'état d'équilibre (dormance cellulaire) évoluent uniquement sous forme de sarcome chez les souris traitées par MCA puis au jour 200 par des anticorps ciblant les effecteurs ou cytokines de l'immunité adaptative (IL-12, IFNγ et les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$). Ce phénomène n'est pas observé après déplétion des composants de l'immunité innée (NK1.1, TRAIL, NKG2D).

Adapté de (Vesely et al.,2011).

b) La phase d'équilibre : balance entre dormance tumorale et pression de sélection du système immunitaire adaptatif

Les mécanismes moléculaires qui régissent la phase d'équilibre, et plus particulièrement la dormance tumorale contrôlée par le système immunitaire, sont encore mal compris du fait de la difficulté de modéliser cette phase chez la souris, et de l'observer et de la décrire chez l'Homme.

Historiquement, le terme de dormance tumorale était utilisé pour décrire les tumeurs latentes présentes chez les patients pendant des années et qui pouvaient éventuellement se développer à l'échelle loco-régionale ou même former des métastases à distance (Aguirre-Ghiso, 2007). Une étude marquante réalisée en 2007 par l'équipe de Robert D. Schreiber a mis en évidence pour la première fois que le système immunitaire (en particulier la composante adaptative) pouvait durablement maintenir les premières lésions cancéreuses dans un état d'équilibre avec l'hôte (**Figure 6**, p. 38). Il s'agit d'une démonstration préclinique par la négative, dans la mesure où la déplétion des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ et/ou la neutralisation par des anticorps monoclonaux de l'IFNγ et de l'IL-12, favorise la progression tumorale chez des souris immunocompétentes traitées avec un agent carcinogène, le MCA, et qui n'avaient pas encore développé de tumeurs (Koebel et al., 2007). *A contrario*, l'utilisation d'anticorps monoclonaux neutralisant les cellules NK (anti-NK1.1), la reconnaissance des cellules NK (anti-NKG2D) ou les fonctions effectrices de ces cellules (anti-TRAIL) ne favorise pas l'émergence de tumeurs décelables chez ces souris. Le système immunitaire adaptatif (et non le système immunitaire inné) est donc responsable du contrôle des tumeurs en phase d'équilibre. Plus récemment, une étude a démontré que la balance entre l'IL-12 (qui promeut l'élimination des cellules transformées), et l'IL-23 (favorisant la persistance des variants tumoraux) permettait le maintien dans un état d'équilibre (Teng et al., 2012). Cependant, la déplétion de l'IL-4, de l'IL-17A, de l'IL-10, du TNFα et des IFNα/β n'induit pas de reprise tumorale, et ces cytokines ne semblent donc pas importantes au cours de cette phase. Une autre récente étude a montré que la forte proportion de cellules T $CD8^+$, de cellules NK et de cellules Tγδ et la faible proportion de cellules NKT, de cellules T régulatrices (Treg) $Foxp3^+$ et de cellules myéloïdes suppressives (MDSC) dans l'environnement cellulaire des cellules cancéreuses étaient associées au maintien de celles-ci dans la phase d'équilibre (Wu et al., 2013). Cette étude confirme donc qu'il existe une balance relative entre les cellules immunosuppressives et les cellules effectrices anti-tumorales de la réponse immunitaire pendant la phase d'équilibre.

Un certain nombre d'arguments cliniques viennent plaider pour l'existence d'une telle phase d'équilibre chez l'Homme : en effet, des observations cliniques suggèrent que les cancers peuvent rester dans un état de dormance pendant de nombreuses années avant que la tumeur ne progresse et devienne cliniquement détectable (Meng et al., 2004). Dans cette étude, chez 13 patientes sur 36

en rémission d'un cancer du sein, on observe des cellules tumorales circulantes (CTCs) entre 7 et 22 ans après chirurgie sans preuve clinique de récidive. Il existe donc une balance entre le développement de cellules tumorales et la mort cellulaire chez ces patientes entrainant un état de dormance tumorale. De plus, le phénomène de récidive métastatique tardive chez des patientes atteintes de cancers du sein survenant des années (voire des dizaines d'années) après traitement de la tumeur initiale peut s'expliquer par l'action du système immunitaire sur les cellules tumorales persistantes (Karrison et al., 1999). Enfin, un scénario clinique qui illustre l'existence de la phase d'équilibre chez l'Homme est l'observation de quelques cas de transmission de cellules tumorales de donneurs d'organes aux receveurs de la greffe. Les donneurs d'organes n'avaient soit aucune histoire clinique vis-à-vis du cancer soit étaient en rémission durable d'un cancer avant la transplantation (MacKie et al., 2003), et la situation d'immunodéficience des patients transplantés facilite la croissance rapide et l'émergence clinique du cancer maintenu en phase d'équilibre par un système immunitaire compétent chez le donneur.

Par ailleurs, il a été montré que la combinaison de l'IFNγ et du TNFα, cytokines produites par les lymphocytes Th1, permettrait de conduire les cellules cancéreuses dans un état de sénescence en induisant l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 après l'activation de la protéine p16INK4a résultant à l'hypo-phosphorylation de la protéine Rb sur la sérine 795 (Braumuller et al., 2013). De manière intéressante, il a été également montré qu'en l'absence du récepteur au TNFα (TNFR) et de réponse à l'IFNγ, les mêmes cellules productrices de ces deux cytokines pouvaient promouvoir l'angiogenèse et la carcinogenèse (Muller-Hermelink et al., 2008). Cette observation permet de mettre en évidence le rôle du système immunitaire pendant la phase d'équilibre en fonction des altérations et des mutations que présentent les cellules transformées. En effet, le système immunitaire peut éliminer des cellules tumorales résiduelles grâce à ces fonctions cytotoxiques mais il peut également appliquer une pression de sélection qui va pousser les cellules tumorales à acquérir des mutations et à perdre leur immunogénicité leur permettant d'échapper à l'action du système immunitaire.

c) La phase d'échappement : l'échec de la surveillance par le système immunitaire

Si la phase d'élimination ne permet pas l'éradication complète des cellules transformées, la pression de sélection exercée par l'immunité adaptative lors de la phase d'équilibre va permettre peu à peu l'émergence de clones tumoraux ayant les capacités d'échapper à la réponse immunitaire anti-tumorale. C'est à ce stade que la tumeur devient cliniquement décelable.

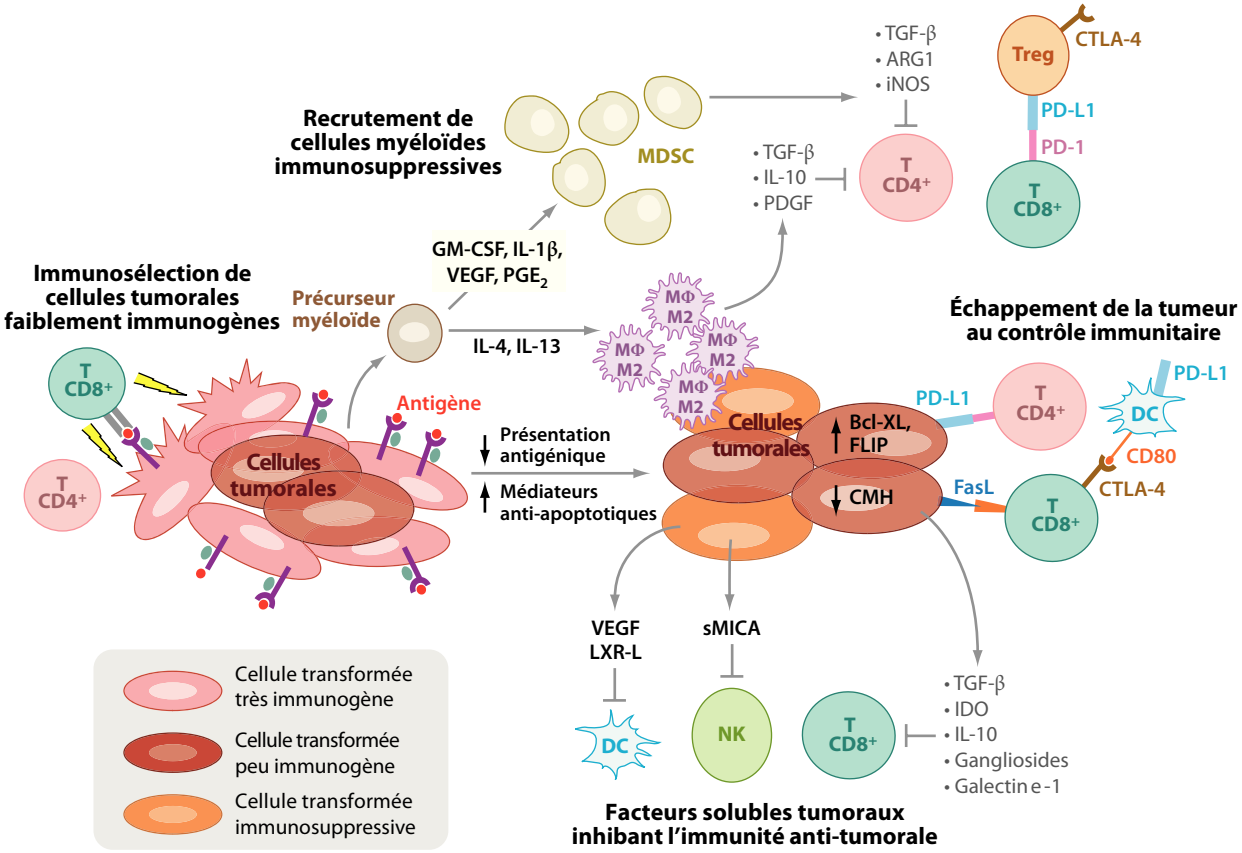


Figure 7. Les principaux mécanismes d'échappement de la tumeur à la réponse immunitaire.
Sous l'effet de la pression immunologique constante, l'équilibre établi entre le système immunitaire et les cellules immunitaires et tumorales évolue en faveur de la progression tumorale. Au cours de l'immunosélection, les cellules transformées immunogènes sont éliminées tandis que des variants tumoraux agressifs émergent. La tumeur va alors mettre en place des mécanismes intrinsèques et extrinsèques pour échapper et inhiber le système immunitaire. Des altérations génétiques vont promouvoir la perte d'expression du CMH-I, la surexpression de molécules anti-apoptotiques (FLIP, Bcl-XL) ou l'expression de molécules inhibitrices présentes à la surface des cellules tumorales (PD-L1, FasL) : ces altérations constituent les stratégies intrinsèques des cellules tumorales. De plus, les cellules transformées sécrètent des facteurs solubles immunosuppresseurs (TGF-β, IL-10, VEGF, LXR-L, IDO, gangliosides ou MICA soluble) ou recrutent également des cellules régulatrices (MDSC) pour générer un microenvironnement immunosuppresseur (IL-4, IL-13, GM-CSF, IL-1β, VEGF ou PGE2). Une foie recrutées, les MDSC inhibent l'immunité anti-tumorale en sécrétant des cytokines immunosuppressives comme l'IL-4 et l'IL-13 qui induisent le recrutement et la polarisation des précurseurs myéloïdes en macrophages de type 2 (MΦ M2). Ces MΦ M2 vont alors produire du TGF-β, de l'IL-10 et du PGDF qui inhibent les lymphocytes T. L'accumulation des MDSC conduit au blocage des fonctions effectrices des cellules T *via* l'expression du TGF-β, d'ARG1 et d'iNOS. Les cellules T régulatrices (Treg) peuvent également inhiber les lymphocytes T cytotoxiques *via* plusieurs mécanismes et notamment grâce à l'expression de CTLA-4. Adapté de (Vesely et al., 2011).

Comment les cellules tumorales acquièrent-elles la capacité à échapper à la surveillance du système immunitaire ? En réalité, la phase d'équilibre entre les cellules immunitaires et les cellules cancéreuses est rompue lorsque les cellules tumorales subissent des modifications génétiques ou épigénétiques et phénotypiques leur permettant de contourner et de résister aux réponses immunitaires innée et adaptative (immunosélection). De plus, la tumeur va également induire à l'encontre de certaines cellules du système immunitaire de l'hôte, un état de tolérance immunologique favorable à sa survie et à son expansion chez les individus immunocompétents (immunosubversion) (**Figure 7**, p. 41).

L'immunosélection

La pression immunologique constante imposée par le système immunitaire provoque la sélection Darwinienne de cellules tumorales aptes à élaborer des stratégies leur permettant de se soustraire à la détection et/ou à l'élimination par les cellules du système immunitaire : ce phénomène est appelé immunosélection.

Les cellules tumorales vont donc acquérir des modifications leur permettant d'échapper à la lyse induite par les lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Un mécanisme classique et relativement ubiquitaire mis en place par les cellules tumorales est la perte totale d'expression d'antigènes tumoraux, empêchant ainsi l'établissement d'une réponse immunitaire spécifique (Jager et al., 1996). De plus, la perte d'expression des molécules du complexe CMH de classe I/peptide a été décrite dans de nombreux cancers (Algarra et al., 2000) tels que le mélanome (Khong et al., 2004) ou le cancer du sein (Cabrera et al., 1996). Cette déficience d'expression du complexe de présentation antigénique peut être due à une anomalie de synthèse de la β2-microglobuline (Restifo et al., 1996) mais aussi à la perte des protéines de transport des peptides antigéniques tels que TAP1 (*Transporter associated with Antigen Processing 1*), LMP2 (*Low Molecular mass Polypeptide 2*) et LMP7 (Korkolopoulou et al., 1996). Par ailleurs, les cellules tumorales peuvent développer une moindre sensibilité ou une insensibilité à l'IFNγ et aux IFNα/β empêchant également l'élimination par les CTL (Dunn et al., 2006; Snyder et al., 2014; Zaretsky et al., 2016). Les cellules tumorales sont également capables de développer des mécanismes d'échappement aux systèmes de lyse cellulaire impliquant la voie perforine/granzyme (Medema et al., 2001). Cette étude a ainsi mis en évidence que la surexpression de l'inhibiteur de sérine protéase PI-9 inactive le granzyme B, permettant donc l'échappement à la lyse des tumeurs. De la même manière, les cellules tumorales peuvent échapper à la reconnaissance par les cellules immunitaires innées grâce à la perte des ligands de NKG2D à leur surface (Stern-

Ginossar et al., 2008) ou *via* l'arrêt de la production de signaux de dangers pro-inflammatoires perturbant donc la maturation des DCs (Wang et al., 2004).

Même si les antigènes tumoraux continuent à être exprimés, les cellules tumorales vont mettre en place d'autres stratégies d'échappement aux lymphocytes cytotoxiques. Il a, par exemple, été mis en évidence la diminution de l'expression ou la survenue de mutations des récepteurs de mort (Shin et al., 2001; Takahashi et al., 2006) mais aussi des mutations ou des phénomènes de méthylation de gènes impliqués dans l'apoptose comme par exemple pour le gène de la caspase 8, ou à l'inverse la surexpression de molécules anti-apoptotiques telles que FLIP (*FLICE-Like Inhibitory Protein*) (un inhibiteur de la caspase 8) (Kataoka et al., 1998) ou Bcl-xL (*B-cell Lymphoma-extra large*) (Hinz et al., 2000) ou encore l'expression de récepteur leurre de TRAIL (Giovarelli et al., 1999).

L'immunosubversion

En parallèle de ces phénomènes d'immunosélection, les cellules tumorales sont capables de développer des mécanismes actifs d'opposition à la réponse immunitaire anti-tumorale. Cette immunosubversion repose sur des mécanismes extrinsèques propres aux cellules cancéreuses et influençant le microenvironnement tumoral dans le sens d'une tolérance immunogène vis-à-vis de la tumeur.

Immunosubversion directement établie par les cellules tumorales

En effet, les cellules néoplasiques peuvent contrôler voire inhiber l'immunité anti-tumorale en exprimant à leur surface un certain nombre de molécules inhibitrices de la réponse immunitaire anti-tumorale, avec pour conséquence une diminution de la cytotoxicité des cellules immunes. Il a été ainsi mis en évidence que les cellules tumorales sont capables d'exprimer Fas-Ligand, capable d'induire la mort des lymphocytes T spécifiques de la tumeur (car exprimant Fas) (Hahne et al., 1996). D'autre part, il a été montré que l'expression de molécules comme B7-H1 (PD-L1 (*Programmed cell Death Ligand 1*)) (en réponse à l'IFNγ notamment), HLA-G (*Human Leucocyte Antigen G*) et HLA-E à la surface des cellules tumorales pouvait lier directement des récepteurs, tels que PD-1 (*Programmed cell Death protein 1)*, présents à la surface des lymphocytes T et induire ainsi leur anergie et/ou leur apoptose (Derre et al., 2006; Dong et al., 2002; Topalian et al., 2012; Tripathi and Agrawal, 2006). De plus, l'expression par la tumeur de HLA-G et HLA-E peut également conduire à l'inhibition des effets cytotoxiques des cellules NK (Tripathi and Agrawal, 2006).

Par ailleurs, la production de formes solubles des ligands des récepteurs NKG2D tels que MICA (*MHC class I polypeptide-related Chain A*) soluble (sMICA) a été décrit comme mécanisme d'immunosubversion. En effet, l'induction de sMICA s'amplifie progressivement à mesure que le volume tumoral augmente et est capable, (contrairement aux ligands membranaires de NKG2D), de provoquer l'internalisation du récepteur (Holdenrieder et al., 2006), avec pour conséquence l'inhibition de la cytotoxicité établie par les cellules NK et les lymphocytes T $CD8^+$ (Groh et al., 2002). De plus, la sécrétion de métabolites des stérols tels que des ligands de LXRα (*Liver X Receptor α*) semble à même de supprimer l'expression du récepteur CCR7 (*Chemokine (C-C motif) Receptor 7*) à la surface des DCs, les empêchant ainsi de migrer au niveau des ganglions lymphatiques afin d'assurer leur fonction de présentation antigénique aux cellules T naïves (Villablanca et al., 2010). La production tumorale de galectine peut, quant à elle, compromettre l'activité et la survie cellulaire T (Rubinstein et al., 2004). En outre, les cellules tumorales, mais aussi certaines cellules du microenvironnement tumoral, sont également capables de sécréter du monoxyde d'azote (NO) ou d'avoir une activité arginase 1 (ARG1) supra-physiologique, déplétant ainsi le milieu environnant en arginine (essentielle à la survie des cellules T), et conduisant ainsi à l'inhibition des principales fonctions lymphocytaires T (Bronte and Zanovello, 2005). De façon similaire, la dégradation du tryptophane par l'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO), enzyme constitutivement exprimée par certains variants tumoraux ou par des cellules du microenvironnement (comme des DCs subverties par des cellules immunorégulatrices), favorise la résistance de la tumeur à la réponse immunitaire (Uyttenhove et al., 2003). La carence en tryptophane localisée au site tumoral bloque ainsi la prolifération des lymphocytes T $CD8^+$ (Uyttenhove et al., 2003) et l'accumulation consécutive de kynurénines induit l'apoptose des lymphocytes T $CD4^+$ (Terness et al., 2002).

Certaines tumeurs sont également capables de produire des facteurs solubles immunosuppresseurs tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), le TGF-β (*Tumor Growth Factor β*) et l'IL-10 qui sont capables de supprimer les fonctions effectrices des DCs, d'inhiber les cellules T et NK et de favoriser la vascularisation et la néoangiogenèse tumorale (Aruga et al., 1997; Gabrilovich et al., 1999; Wrzesinski et al., 2007). Enfin, l'activation constitutive de STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) dans les cellules tumorales permet l'inhibition de plusieurs signaux de danger pro-inflammatoires tels que l'inhibition de la sécrétion d'IFNβ, de TNFα ou de la chimiokine CCL5 (*Chemokine (C-C motif) Ligand 5*) conduisant à l'altération de la maturation des cellules dendritiques (Wang et al., 2004).

Immunosubversion établie par le recrutement et l'activation de cellules immunosuppressives

En plus de ces mécanismes d'échappement à la réponse immunitaire anti-tumorale, directement établis par les cellules tumorales, des cellules immunitaires présentes au sein du microenvironnement tumoral peuvent également supprimer les fonctions effectrices du système immunitaire et conduire ainsi à l'échappement tumoral.

Les cellules tumorales produisent des molécules immunosuppressives telles que le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*), l'IL-1β, l'IL-6, le VEGF et la prostaglandine E2 (PGE2) qui vont favoriser l'expansion et l'accumulation de cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC) au niveau du site tumoral (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). Les MDSC, population cellulaire hétérogène constituée de progéniteurs myéloïdes et de cellules myéloïdes immatures, vont pouvoir inhiber les fonctions effectrices lymphocytaires par divers mécanismes. En effet, ces cellules produisent ainsi des cytokines immunosuppressives comme le TGF-β (Li et al., 2009), qui va favoriser entre autre l'induction des lymphocytes T régulateurs (Treg) (Huang et al., 2006) ; vont séquestrer l'arginine et la cystéine, acides aminés essentiels pour les fonctions cellulaires T (Srivastava et al., 2010) ; vont inhiber l'activation des lymphocytes T en nytrosylant leur TCR (*T Cell Receptor*) (Nagaraj et al., 2007). Les MDSC vont également sécréter de l'IL-6 et de l'IL-10 qui pourront agir de manière autocrine sur la phosphorylation de STAT3 permettant ainsi l'expansion et le maintien du phénotype MDSC, et établissant une boucle de rétrocontrôle positif qui est en partie responsable du potentiel d'immunosuppression de ces cellules (Chalmin et al., 2010).

Des cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) peuvent aussi être recrutées au sein de la tumeur et deviennent alors un acteur important des mécanismes d'immunosuppression. Bien que ces cellules en périphérie puissent stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale *via* la production d'IFNγ (Salio et al., 2003), celles retrouvées en quantité importante dans le microenvironnement tumoral sont phénotypiquement et fonctionnellement différentes, capables notamment d'induire la production d'IL-10 par les lymphocytes T, et même d'induire des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ régulateurs (Gilliet and Liu, 2002; Moseman et al., 2004; Zou et al., 2001). Il a également été mis en évidence que le GM-CSF produit par les cellules cancéreuses confère aux pDC la capacité d'activer une réponse immune de type Th2 et Treg qui s'oppose à une réponse anti-tumorale cytotoxique efficace (Ghirelli et al., 2015).

Les tumeurs sont par ailleurs fréquemment infiltrées par des macrophages ou TAMs (*Tumor Associated Macrophages*) et ceux-ci sont recrutés au niveau du lit tumoral par l'IL-4 et l'IL-13 présentes dans le microenvironnement. Les TAMs expriment plus volontiers un phénotype de type

M2, c'est-à-dire produisant du TGF-β, de l'IL-10, de la PGE2, de l'arginase 1, du VEGF mais peu d'IL-12 et d'IL-23. Ils favorisent donc ainsi une polarisation Th2 de la réponse immunitaire (Sica et al., 2000) et sont globalement tolérogènes, donc défavorables au rejet de la tumeur (au contraire des TAMs présentant un phénotype M1 qui gardent des propriétés tumoricides et la capacité d'induire une réponse Th1 et NK *via* la sécrétion d'IL-12) (Mantovani et al., 2008). De même, les TAMs de type M2 favorisent le développement d'un stroma inflammatoire, en particulier d'une néoangiogenèse tumorale *via* la sécrétion de facteurs de croissance comme le PGDF (*Platelet-Derived Growth Factor*) et le VEGF (Mantovani et al., 2002; Sica et al., 2008). La présence de macrophages au sein d'une tumeur est donc généralement associée à un pronostic défavorable (dans le cancer du sein par exemple) (Aspord et al., 2007; Bingle et al., 2002; Medrek et al., 2012).

Enfin, les lymphocytes T peuvent également être subvertis par la tumeur, et favoriser la progression tumorale. Le rôle des cellules Th2 dans le cancer est controversé mais leur production d'IL-4 et d'IL-13 va soutenir la polarisation des TAMs de phénotype M2 et va favoriser l'activation des MDSC par l'intermédiaire de la voie STAT6 (Aspord et al., 2007). Il a également été montré que l'IL-4 induisait une résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Cependant, le rôle des lymphocytes T régulateurs est quant à lui assez bien décrit. De manière générale, les Treg ont un rôle physiologique important puisqu'ils limitent les mécanismes liés à l'inflammation chronique et aux réactions d'auto-immunité. Ces cellules sont caractérisées par l'expression des récepteurs CD4 et CCR4, par une forte expression du récepteur CD25 et par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box P3*), facteur spécifique de la différenciation des lymphocytes Treg. Ces cellules peuvent être recrutées au niveau du site tumoral *via* le ligand de CCR4 (CCL22), qui est sécrété par les cellules dendritiques et les cellules tumorales. Après leur recrutement au niveau de la tumeur, les Treg peuvent induire une inhibition des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ entre autre par l'intermédiaire de la production d'IL-10 et de TGF-β et par une consommation importante d'IL-2 (Terabe and Berzofsky, 2004). La privation d'IL-2 a aussi pour conséquence d'induire une apoptose lymphocytaire CD4 (Pandiyan et al., 2007). Par ailleurs, l'expression d'un grand nombre de récepteurs inhibiteurs tels que PD-L1, CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated antigen 4*) ou encore LAG-3 (*Lymphocyte-Activation Gene 3*) favorise aussi l'inhibition de contact des lymphocytes T conventionnels (Huang et al., 2004; Terabe and Berzofsky, 2004). La production de TGF-β par les Treg a non seulement un rôle d'effecteur de tolérance en convertissant les cellules T effectrices en Treg mais est également impliquée dans le maintien de l'activité suppressive des Treg (Marie et al., 2005; Sakaguchi et al., 2009). Les cellules T régulatrices expriment également les ectonucléotidases CD39 et CD73 permettant la dégradation de l'ATP extracellulaire en adénosine, molécule immunosuppressive (ce point sera abordé et détaillé dans le prochain chapitre) (Deaglio et al., 2007). De la même façon

que les TAMs de type M2, ces cellules sont généralement associées à un pronostic défavorable dans un contexte tumoral, en particulier dans le cancer du sein (Bates et al., 2006; Gobert et al., 2009).

Les lymphocytes T CD4$^+$ sont donc le pivot de l'organisation de la réponse immunitaire anti-tumorale. Nous allons, dans un second temps, nous intéresser plus précisément aux cellules T CD4 helper, et aux différents rôles qu'elles peuvent jouer lors de l'échappement des cellules cancéreuses à la surveillance du système immunitaire.

II. Les lymphocytes T CD4 et leur implication dans le développement tumoral

La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative de type humorale ou cytotoxique est intimement liée à la fonctionnalité des lymphocytes T $CD4^+$ et à leur différenciation. Pendant plus de 20 ans, les cellules T helper étaient limitées à deux sous-types décrits : les lymphocytes Th1 et Th2. En effet, Mosmann et Coffman, en 1987, ont décrit le paradigme Th1/Th2, deux sous-types lymphocytaires T ayant des rôles complémentaires mais néanmoins antagonistes (Mosmann and Coffman, 1987). L'environnement cytokinique des cellules T helper permet en effet leur polarisation vers deux sous-types principaux, aux propriétés différentes : les lymphocytes Th1, induits par la sécrétion d'IL-12, qui favorisent la mort des bactéries et des virus intracellulaires et sont donc responsables de la réponse immunitaire à médiation cellulaire et cytotoxique par l'intermédiaire de la sécrétion d'IFNγ tandis que les lymphocytes Th2, induits par la sécrétion d'IL-4, favorisent plutôt une immunité à visée extracellulaire et sont de fait responsables de la réponse immunitaire à médiation humorale *via* la sécrétion d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Murphy and Reiner, 2002). Par ailleurs, ces deux sous-types lymphocytaires sont théoriquement mutuellement exclusifs puisque l'IL-4 sécrétée par les lymphocytes Th2 inhibe la génération de lymphocytes Th1 et l'IFNγ sécrétée par ces dernières inhibe la génération des lymphocytes Th2 (Yates et al., 2004). L'IFNγ et l'IL-4 sécrétées par les cellules Th1 et Th2, respectivement, induisent également l'expression des facteurs de transcription essentiels à la différenciation de ces deux sous-types lymphocytaires et à leur maintien dans le temps : T-bet (*T box transcription factor*) est le facteur de transcription spécifique des lymphocytes Th1 alors que GATA-3 (*GATA-binding protein 3*) est le facteur de transcription clé des lymphocytes Th2 (Szabo et al., 2000; Zheng and Flavell, 1997).

Très rapidement, des fonctions anti-tumorales ont été attribuées aux lymphocytes Th1 : leur sécrétion d'IFNγ prévient en effet l'angiogenèse tumorale, augmente l'immunogénicité des cellules tumorales en augmentant l'expression des molécules de CMH I et II, favorisent le recrutement au site tumoral des lymphocytes T $CD8^+$ et des cellules NK et augmente également l'activité anti-tumorale des macrophages (Bruno et al., 2014; Burkholder et al., 2014; Kennedy and Celis, 2008). À l'inverse, les lymphocytes Th2 sont plutôt associés à une augmentation de la croissance tumorale. Cette activité pro-tumorale semble principalement liée à la sécrétion d'IL-4 et d'IL-13 qui vont favoriser la survie des cellules tumorales (Li et al., 2008; Terabe et al., 2004).

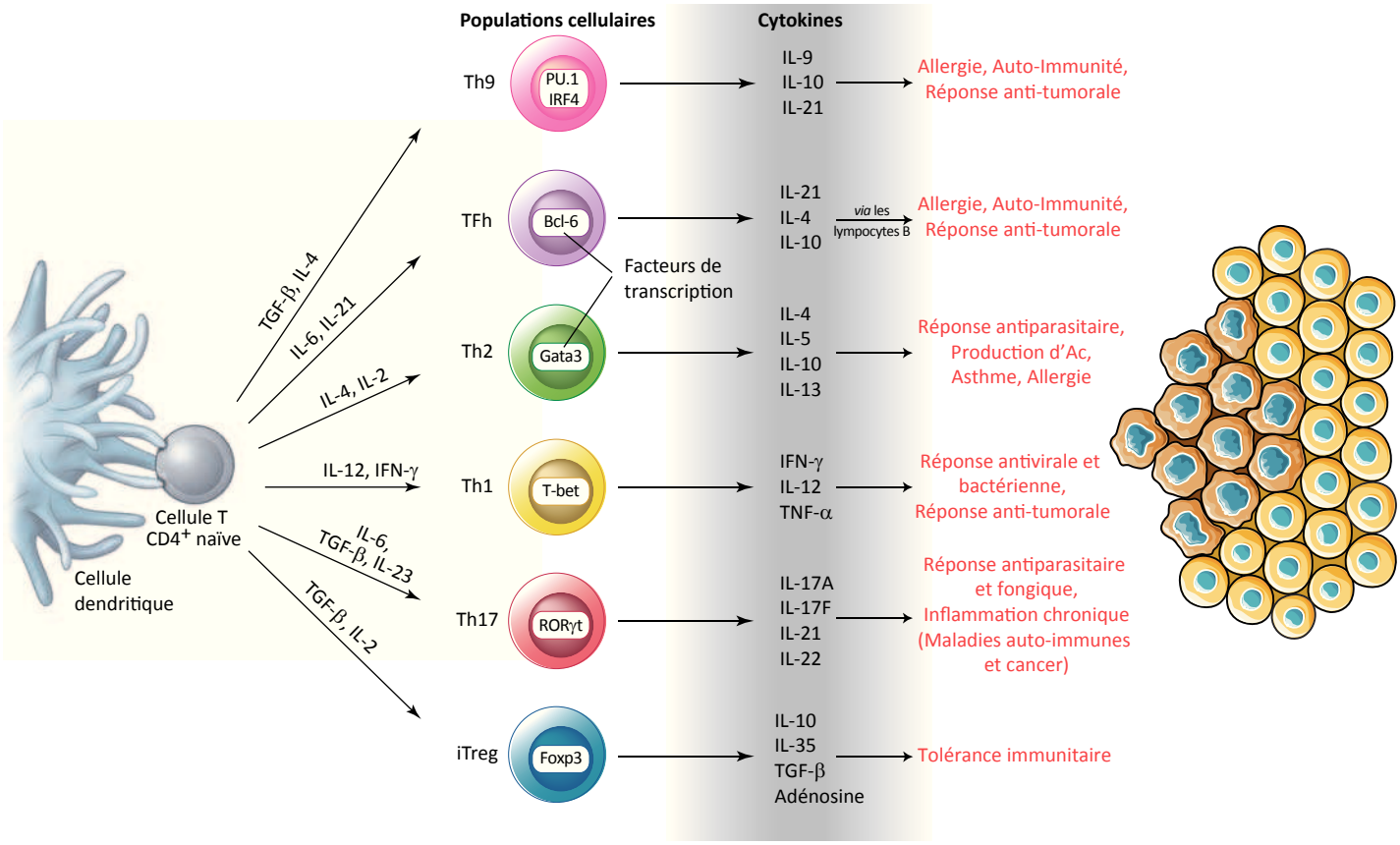


Figure 8. La différenciation des lymphocytes T CD4.
Après stimulation antigénique, l'engagement du TCR associé à la costimulation médiée par CD28 concourent à l'activation et à la prolifération d'un lymphocyte T $CD4^+$. L'orientation de la différenciation cellulaire T CD4 est alors fonction de l'environnement cytokinique façonné par les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. La spécialisation fonctionnelle des lymphocytes T $CD4^+$ est finalement coordonnée par un programme génétique, lui-même placé sous le contrôle de facteurs de transcription spécifiques. Chaque sous-type lymphocytaire T $CD4^+$ aura un rôle au sein de la réponse immunitaire déterminé, entre autre, par les cytokines qu'ils produisent. Adapté de (O'Shea and Paul, 2010).

Cependant, certaines observations expérimentales ne pouvaient être expliquées par ce clivage dichotomique Th1/Th2, et suggéraient l'existence d'autres sous-types lymphocytaires T $CD4^+$ (**Figure 8**, p. 49).

C'est ainsi qu'en 2005, une nouvelle population de lymphocytes T $CD4^+$ a été décrite : les lymphocytes Th17 (Harrington et al., 2005). Ces cellules sont caractérisées par leur sécrétion d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21, d'IL-22 (Park et al., 2005), par leur expression du récepteur à l'IL-23 (IL-23R) et par un programme transcriptionnel orienté par le facteur de transcription RORγt (*Retinoic acid receptor-related orphan receptor gamma t*) (Ivanov et al., 2006). Ce nouveau sous-type lymphocytaire T est décrit pour avoir un rôle important durant les réponses immunitaires engagées contre les bactéries extracellulaires et les champignons (Weaver et al., 2007). En ce qui concerne le rôle des lymphocytes Th17 dans le cancer, celui-ci reste jusqu'à présent controversé (Bailey et al., 2014) : l'IL-17A sécrétée par ces cellules favoriserait la progression tumorale et la néoangiogenèse ainsi que l'activation de STAT3 au sein des cellules tumorales (Wang et al., 2009). Mais, il a été également montré que ces cellules pouvaient diminuer la progression tumorale dans des modèles de mélanome murins (Martin-Orozco et al., 2009).

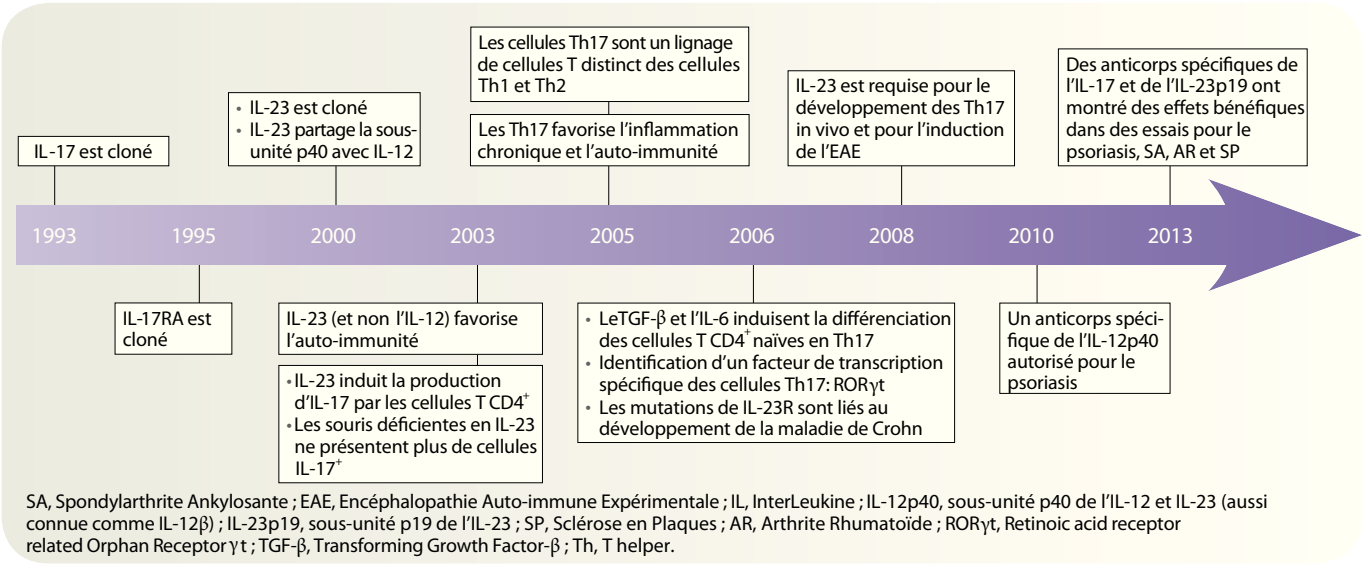
Au même moment, il a été mis en évidence que des cellules T $CD4^+$ naïves pouvaient, en présence d'une stimulation du TCR, de TGF-β et d'IL-2 se différencier en lymphocytes T régulateurs inductibles (iTreg) (Chen et al., 2003). Ces cellules sont caractérisées, comme les cellules T régulatrices naturelles (nTreg), par l'expression du facteur de transcription Foxp3 (Fontenot et al., 2003). Ces lymphocytes T régulateurs sont impliqués dans les phénomènes de maintien de la tolérance, d'auto-immunité et de suppression de la réponse immunitaire (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Dans un contexte de tumeur maligne, ces cellules contribuent également à la progression tumorale dans une grande variété de cancers (Adeegbe and Nishikawa, 2013; Whiteside et al., 2012).

C'est également au début des années 2000 qu'ont été identifiés les lymphocytes T Folliculaires helper (TFh), initialement décrits au niveau des organes lymphoïdes secondaires chez l'Homme (Breitfeld et al., 2000; Schaerli et al., 2000). Ces lymphocytes expriment le récepteur CXCR5 qui leur permet d'être maintenus au niveau des follicules lymphoïdes B où ils jouent un rôle dans la différenciation et la maturation des cellules B. Les cellules TFh favorisent ainsi, par l'intermédiaire des lymphocytes B, la production d'anticorps de très haute affinité *via* le processus de commutation de classe des immunoglobulines (Ig). Les lymphocytes TFh sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription Bcl6 (*B cell lymphoma 6*) et d'Ascl-2 (*Achaete-scute complex homolog 2*) et par la sécrétion d'IL-21 (Johnston et al., 2009; Liu et al., 2014; Tangye et al., 2013). Le rôle des lymphocytes TFh dans le cancer est encore mal connu. Cependant, deux études récentes ont montré

qu'ils étaient associés à un bon pronostic dans les cancers du côlon et du sein (Bindea et al., 2013; Gu-Trantien et al., 2013).

Les lymphocytes Th9 ont, quant à eux, été identifiés et décrits plus récemment, en 2008, comme nouveau sous-type lymphocytaire T $CD4^+$ car l'IL-9, une des principales cytokines qu'ils sécrètent, a longtemps été reliée à la production des lymphocytes Th2 (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Les lymphocytes Th9 sont induits en présence de TGF-β et d'IL-4 et leur différenciation repose sur l'expression des facteurs de transcription PU.1 (*Spi-1 proto-oncogene*) et IRF4 (*Interferon Regulatory Factor 4*) (Chang et al., 2010; Staudt et al., 2010). Ces cellules produisent ainsi de grandes quantités d'IL-9 mais aussi de l'IL-21. Les lymphocytes Th9 sont principalement connus pour leur capacité à induire de fortes réponses pro-inflammatoires *in vivo*. Elles jouent également un rôle très important dans certaines maladies auto-immunes comme la sclérose en plaque (Stassen et al., 2012) et dans des phénomènes de réponse allergique tels que rencontrés au cours de l'asthme (Staudt et al., 2010). Même si le rôle de l'IL-9 dans ces pathologies n'a pas encore été expliqué, des études ont mis en évidence l'implication de cette cytokine puisque l'utilisation d'anticorps bloquant l'IL-9 *in vivo* ou de souris déficientes pour cette cytokine retarde l'apparition de l'EAE (*Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*) et limite les effets de l'asthme. Dans un contexte de cancer, le rôle de ces cellules n'est pas encore très clair. Néanmoins, il semblerait que les cellules Th9 aient des propriétés anti-tumorales chez la souris grâce à leur capacité à recruter les cellules T $CD8^+$ cytotoxiques et les cellules dendritiques *via* l'axe CCL20/CCR6 (Lu et al., 2012; Purwar et al., 2012). Notre équipe de recherche a par ailleurs récemment mis en évidence l'implication de ces cellules dans l'immunité anti-tumorale *via* la production d'IL-21 sous l'effet de l'IL-1β (Vegran et al., 2014).

Lors de mes travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à deux sous-types lymphocytaires T $CD4^+$: les lymphocytes Th17 et Th9. Les principales caractéristiques biologiques de ces deux populations lymphocytaires seront donc explicitées plus en détails dans cette deuxième partie.



SA, Spondylarthrite Ankylosante ; EAE, Encéphalopathie Auto-immune Expérimentale ; IL, InterLeukine ; IL-12p40, sous-unité p40 de l'IL-12 et IL-23 (aussi connue comme IL-12β) ; IL-23p19, sous-unité p19 de l'IL-23 ; SP, Sclérose en Plaques ; AR, Arthrite Rhumatoïde ; RORγt, Retinoic acid receptor related Orphan Receptor γ t ; TGF-β, Transforming Growth Factor-β ; Th, T helper.

Figure 9. Historique de la découverte et de la biologie des lymphocytes Th17.
Adapté de (Gaffen et al., 2014).

1. Les lymphocytes Th17

a) Biologie des lymphocytes Th17

i) Découverte et mise en évidence

La découverte des lymphocytes Th17 a eu lieu environ 20 ans après l'établissement du paradigme Th1/Th2. L'existence des lymphocytes Th17 a été supposée suite à des observations faites dans un modèle expérimental murin d'encéphalopathie auto-immune ou « EAE ». Ce modèle était à l'origine décrit pour être un modèle dépendant des lymphocytes Th1 puisque des expériences de déplétion cytokinique ciblant la sous-unité p40 de l'IL-12 (composée de deux sous-unités : p40 et p35) ont montré qu'en déplétant cette sous-unité la gravité de la maladie était atténuée. Comme l'IL-12 est la cytokine indispensable à la polarisation des cellules Th1, les scientifiques étaient donc d'accord sur le fait que ces lymphocytes étaient intimement liés à la pathogénie de l'EAE. Cependant, cette théorie fut rediscutée avec les travaux de l'équipe d'A. Rostani qui montraient que des souris déficientes pour la sous-unité p40 de l'IL-12 (IL-12p40$^{-/-}$) étaient résistantes à l'induction de l'EAE alors que les souris IL-12p35$^{-/-}$ étaient, quant à elles, sensibles et développaient la maladie. Or, dans les deux cas, l'IL-12 n'était pas fonctionnelle et cette cytokine ne pouvait donc pas induire la polarisation de cellules T CD4^{+} naïves en lymphocytes Th1. L'absence d'IL-12p40 rendant les souris résistantes à l'EAE, les chercheurs en ont conclu qu'il existait une redondance fonctionnelle pour la sous-unité p40 (Gran et al., 2002). La possibilité que cette sous-unité soit partagée par deux cytokines distinctes avait été envisagée et fut démontrée en 2003 par l'équipe de J.D. Sedgwick : l'IL-12 et l'IL-23 partagent cette sous-unité et c'est l'IL-23, et non l'IL-12, qui est impliquée dans la survenue de l'EAE (Cua et al., 2003; Oppmann et al., 2000). L'IL-23 fut ensuite décrite pour avoir un rôle central dans la production d'IL-17A, cette cytokine jouant alors un rôle plus important que l'IFNγ dans le modèle d'EAE. Ces résultats ont donc conduit à revoir la classification des lymphocytes T helper, alors uniquement composée des lymphocytes Th1 et Th2, et les cellules T CD4^{+} sécrétrices d'IL-17A formèrent un nouveau sous-groupe T helper : les lymphocytes Th17 (Harrington et al., 2005; Langrish et al., 2005) (**Figure 9**, p. 52).

ii) Caractéristiques biologiques et fonctionnelles

Les lymphocytes Th17 ont ensuite été décrits pour leurs propriétés biologiques et fonctionnelles. Il a été ainsi mis en évidence que ce sous-type lymphocytaire était impliqué dans la protection de l'organisme face aux pathogènes extracellulaires tels que *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. rodentium* ou encore *B. fragilis* mais également face à certaines espèces de champignons pathogènes (Annunziato et al., 2008; Ouyang et al., 2008).

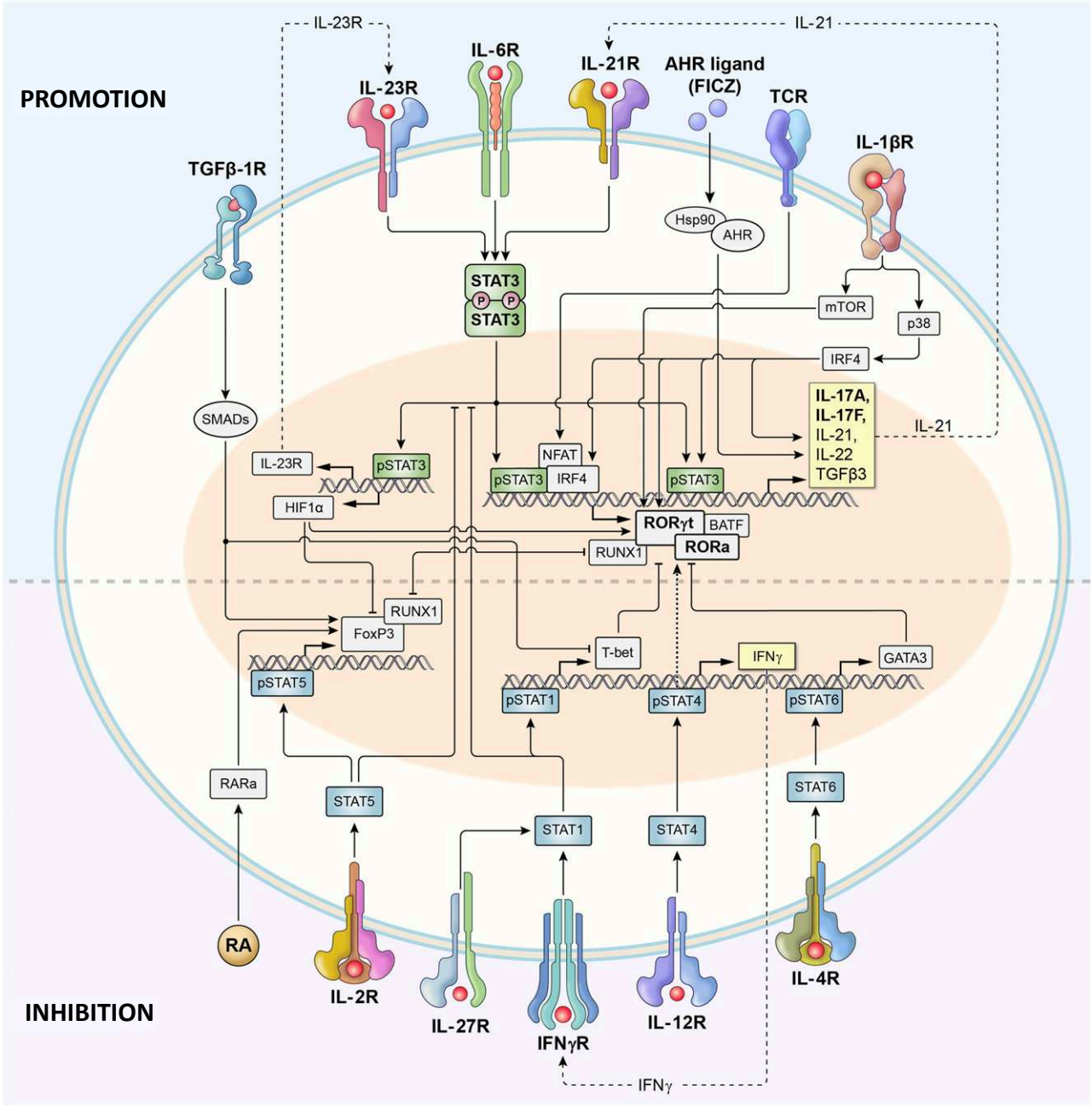


Figure 10. Représentation schématique des voies de signalisation et de la régulation transcriptionnelle du programme de différenciation des lymphocytes Th17.
Adapté de (Muranski & Restifo, 2013).

Les lymphocytes Th17 présentent des propriétés pro-inflammatoires biologiques provenant de leur capacité à produire plusieurs types de cytokines : IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21, IL-22 et TNFα (Harrington et al., 2005; Liang et al., 2006; Park et al., 2005). Ces cytokines exercent un rôle prépondérant dans le recrutement et l'activation des neutrophiles mais elles présentent également des fonctions importantes dans l'activation des cellules NK, des lymphocytes T $CD8^+$ et dans la différenciation des cellules B (Korn et al., 2009; Leonard and Spolski, 2005). Cependant, les propriétés pro-inflammatoires des lymphocytes Th17 sont dépendantes de l'environnement cellulaire et cytokinique dans lequel ils se trouvent. Par ailleurs, nous allons voir que dans un contexte tumoral, ces cellules peuvent également acquérir des fonctions immunorégulatrices et impliquant une cytokine majeure du microenvironnement tumoral : le TGF-β (Martin et al., 2012).

iii) Différenciation des cellules Th17 d'un point de vue moléculaire

La polarisation des lymphocytes Th17 nécessite l'expression et l'activation d'un grand nombre de facteurs de transcription interdépendants et exprimés de manière séquentielle. Le programme de différenciation de ces cellules est initié par les signaux induits par le TGF-β et l'IL-6 après fixation sur leurs récepteurs respectifs : les TGFβ-RI et -RII et l'IL-6R (**Figure 10**, p. 54).

Le signal induit après fixation du TGF-β sur le TGFβ-RI va favoriser l'activation des protéines SMAD2/3 par phosphorylation avec pour conséquence la répression de l'expression du facteur de transcription *Tbx21* (T-bet). La répression de *Tbx21* permet d'inhiber la mise en place du profil de différenciation Th1 et de lever la répression transcriptionnelle de *Rorc*. L'activation du TGFβ-RII après fixation du TGF-β va, quant à elle, permettre d'induire la voie PI3K (*Phosphoinositide 3-Kinase*)/AKT et ainsi favoriser l'action du complexe mTORC1 (*mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*). Ce complexe est impliqué dans la régulation de la synthèse protéique et de la prolifération cellulaire et permet également l'expression du facteur HIF-1α (*Hypoxia inducible factor 1α*) (Kim et al., 2013; Shi et al., 2011). L'activation de cette voie de signalisation, qui sera amplifiée par le signal induit par l'IL-6, permet également de limiter l'expression protéique de Foxp3 en induisant sa dégradation par le protéasome (Dang et al., 2011). L'IL-6, quant à elle, induit l'activation du facteur de transcription STAT3, qui est un facteur essentiel à la mise en place correcte du programme de différenciation et fait partie des « master regulator » des lymphocytes Th17 (Ciofani et al., 2012) (**Figure 10**, p. 54).

Pour jouer son rôle de facteur de transcription, STAT3 doit migrer dans le noyau et doit donc subir plusieurs modifications post-transcriptionnelles : une phosphorylation de la tyrosine 705 par l'intermédiaire de la kinase JAK2 et une acétylation de plusieurs lysines (K679, K685, K707 et K709) par la protéine CBP/p300 (*CREB-binding protein/p300*) (Yuan et al., 2005). Aucune donnée dans la

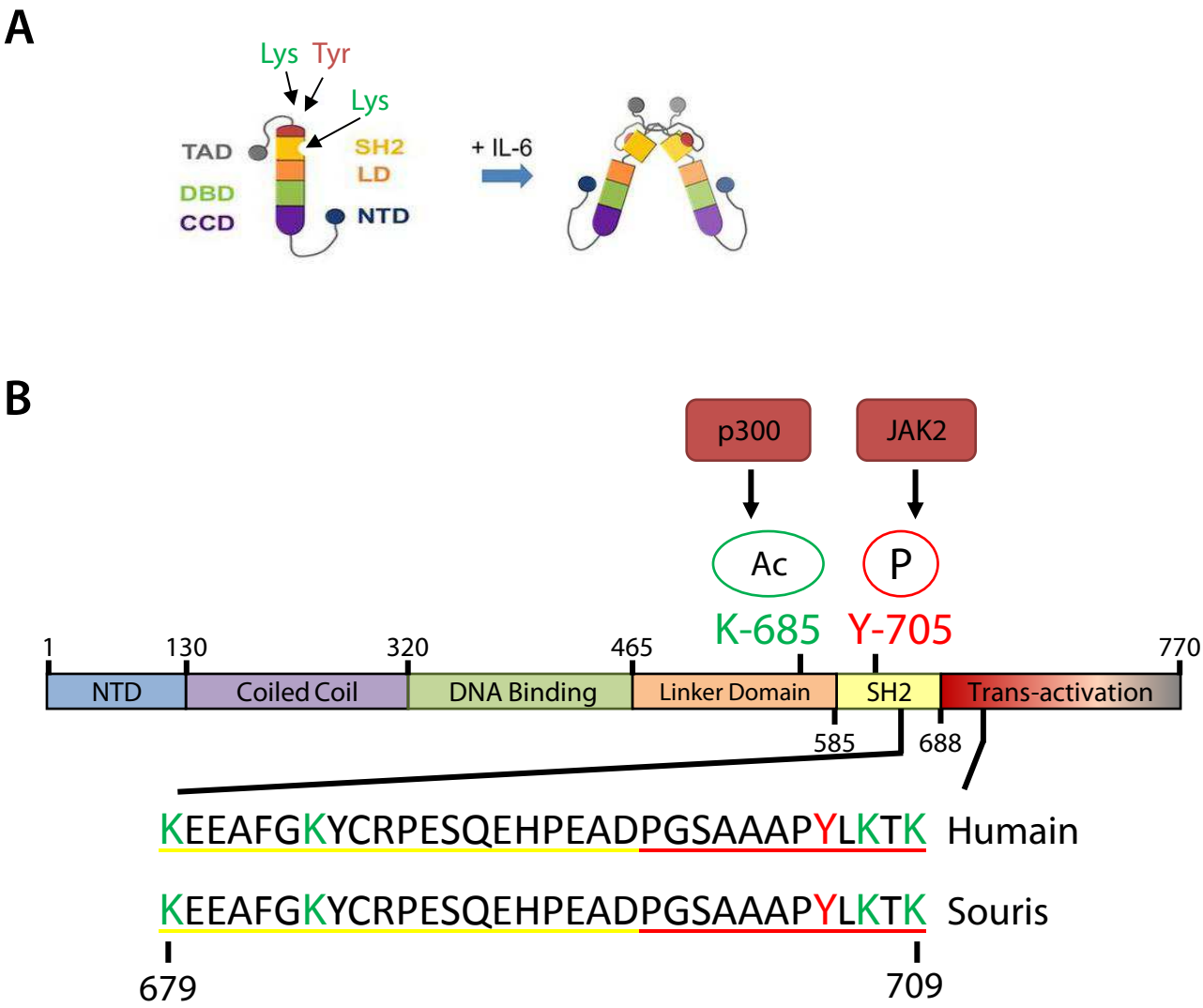


Figure 11. Structure moléculaire du facteur de transcription STAT3.
A) STAT3 est un facteur de transcription composé de différents domaines lui permettant de jouer son rôle de facteur de transcription. Il est principalement composé d'un domaine N-terminal (NTD), d'un domaine « Coiled Coil » et d'un domaine d'interaction avec l'ADN (DNA Binding). Il possède également un domaine Linker qui permet de faire le lien avec le domaine SH2 permettant la fixation de JAK2 et de CBP/p300 et qui possède deux sites d'acétylation : K679 et K685. Le domaine de transactivation permet quant à lui la dimérisation de STAT3 (induite après stimulation par l'IL-6). Ce domaine possède un site de phosphorylation (Y705) et deux sites d'acétylation (K707 et K709).
B) Schéma détaillant la séquence peptidique de STAT3 au niveau des sites d'acétylation et de phosphorylation.
Adapté de (Domoszlai et al., 2014) et de (Nie et al., 2009).

littérature n'a pu montrer, jusqu'à aujourd'hui, l'importance de l'acétylation de STAT3 dans le bon déroulement de la polarisation des cellules Th17. Cependant, plusieurs études ont pu mettre en évidence que l'activation par phosphorylation de STAT3 nécessite au préalable son acétylation dans plusieurs modèles pathologiques. Il semble, en effet, que la fixation de JAK2 au niveau du domaine SH2 de STAT3 nécessite en amont l'acétylation des lysines présentes dans ce domaine (la lysine 685 en particulier) (Nie et al., 2009) (**Figure 11**, p. 56).

L'activation de STAT3 permet son homodimérisation et la formation des complexes multi-protéiques (CBP/p300, BATF (*Basic leucine zipper transcription, ATF-like*), IRF4, NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cell*) nécessaires à sa migration dans le noyau et à son activité de régulateur transcriptionnel. Une fois transloqué dans le noyau, STAT3 va pouvoir induire l'expression génique de différentes cytokines et facteurs de transcription qui auront pour rôle de soutenir et de poursuivre le programme de différenciation. STAT3 va permettre, entre autre, d'induire l'expression du récepteur à l'IL-23 (IL-23R) qui captera alors l'IL-23 produite par les cellules dendritiques ou les macrophages. L'expression de ce récepteur est fondamentale puisqu'elle va favoriser le maintien d'une activation paracrine de la voie de signalisation STAT3 et par voie de conséquence le phénotype Th17 (Iwakura and Ishigame, 2006).

En ce qui concerne les facteurs de transcription HIF-1α, BATF, RORα (*Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor alpha*) et RORγt, l'expression génique de ces facteurs est directement régulée par STAT3. Comme nous l'avons vu précédemment, le facteur HIF-1α joue un rôle important dans la répression de *Foxp3* et dans l'induction de *Rorc* ; mais il contribue également à la régulation et à l'adaptation métabolique des lymphocytes Th17. Comparativement aux autres sous-types T helper et plus particulièrement aux Treg, les cellules Th17 présentent un flux glycolytique très important et produisent *via* cette voie métabolique principalement l'ATP nécessaire à leur prolifération. HIF-1α intervient ainsi comme un régulateur de l'expression génique d'un grand nombre de transporteurs tels que le transporteur du glucose *Glut1* ou le transporteur d'acides monocarboxyliques *MCT4* (*MonoCarboxylate Transporter 4*) et d'enzymes glycolytiques comme *HK2* (*HexoKinase 2*), *GPI* (*Glucose-6-Phosphate Isomerase*), *TPI* (*Triose-Phosphate Isomerase*), *Eno1* (*Enolase 1*), *PKM* (*Pyruvate Kinase Muscle*) ou encore *LDH-α* (*Lactate DesHydrogenase α*) impliqués dans la glycolyse (Shi et al., 2011). L'absence d'HIF-1α perturbe complétement la régulation métabolique des lymphocytes Th17 et rend ainsi résistantes les souris à l'EAE (Shi et al., 2011). Dans un contexte de cancer, cette propriété métabolique dépendante du facteur HIF-1α est à prendre en compte. En effet, ce facteur de transcription est stabilisé par le manque d'oxygène et l'hypoxie tumorale peut donc jouer un rôle dans le maintien du phénotype Th17 et la balance Treg/Th17 en

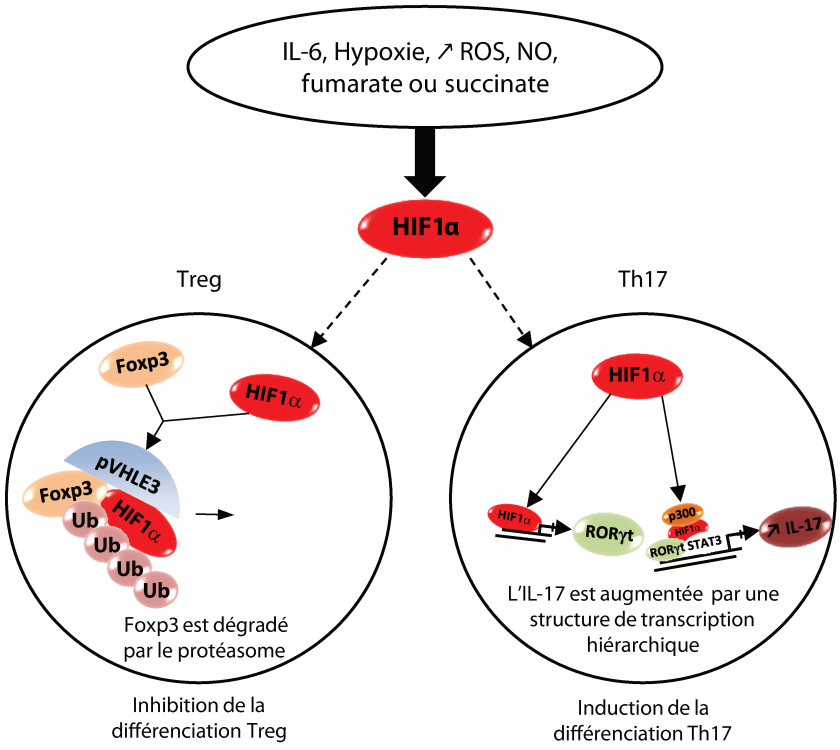


Figure 12. Les différents rôles du facteur HIF-1α dans la balance Th17/Treg.
L'activation de STAT3, induite entre autre par l'IL-6, permet l'activation transcriptionnelle du facteur de transcription HIF-1α. Les niveaux d'expression de ce facteur sont également régulés par le manque d'oxygène et d'autres métabolites. HIF-1α induit directement la transcription du gène *Rorc* et recrute également la protéine p300 au niveau du complexe de transcription impliquant la protéine RORγt sur les promoteurs des gènes Th17 tels que le gène *Il17a*. Ceci va donc favoriser la différenciation des lymphocytes Th17. Dans le même temps, le facteur HIF-1α induit la dégradation du facteur de transcription Foxp3 en provoquant son ubiquitinylation et ainsi sa dégradation. Le facteur HIF-1α inhibe donc la différenciation des lymphocytes T régulateurs. Adapté de (Dang et al., 2011).

réprimant l'expression du facteur de transcription Foxp3 (Barbi et al., 2013; Dang et al., 2011) (**Figure 12**, p. 58).

Par ailleurs, BATF est un facteur de transcription également impliqué dans la polarisation des lymphocytes Th17. Lorsque BATF est absent, le déroulement de la maturation des cellules Th17 est complétement perturbé : des études montrent ainsi que ce facteur est capable de réguler positivement l'expression génique de cytokines caractéristiques de ces cellules telles que l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-21 et l'IL-22 mais également l'expression du gène *Rorc* codant pour le facteur de transcription clé des Th17 (Schraml et al., 2009).

Le facteur de transcription RORγt est particulièrement important dans la différenciation des lymphocytes Th17 puisqu'il permet à la fois de réguler négativement l'expression des cytokines ou des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation lymphocytaire Th1 (*Tbx21*, *Stat4*, *Ifng*) ou Th2 (*Il4*, *Il13*, *Ccl5*) et d'induire l'expression des cytokines caractéristiques du phénotype Th17 (*Il17a*, *Il17f*, *Il21*, *Il22*, *Ccl20*) (Ciofani et al., 2012). L'expression de RORγt permet également le maintien du profil Th17 grâce à la stimulation autocrine (*via* l'IL-21 et l'IL-22) et paracrine (*via* l'IL-23 produite par les cellules dendritiques et les macrophages) de la voie de signalisation STAT3. L'équipe de Dan R. Littman et bien d'autres ont mis en évidence le rôle central de RORγt dans la différenciation des lymphocytes Th17 et dans l'inhibition des autres profils lymphocytaires T helper (Ivanov et al., 2006; Yang et al., 2008). Ainsi, l'absence de ce facteur permet de limiter, à elle seule, l'apparition de presque tous les signes cliniques de l'EAE. Néanmoins, elle ne permet pas d'abolir complétement la maladie puisqu'un autre facteur de transcription faisant partie de la même famille que RORγt, RORα, contribue également à l'expression des cytokines du phénotype Th17 (Yang et al., 2008).

D'autres facteurs de transcription sont impliqués dans la polarisation des lymphocytes Th17 mais ne sont pas directement régulés par STAT3. Nous pouvons citer Ahr (*Aryl hydrocarbon Receptor*) qui est un facteur de transcription activé par la présence d'hydrocarbures aromatiques. La présence des ligands d'Ahr permet à ce facteur de se dissocier de la protéine de choc thermique HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) et de lier le facteur ARNT (*Ahr Nuclear Translocator*) afin de se transloquer dans le noyau pour induire l'expression de l'IL-22 (Monteleone et al., 2011). Enfin, nous pouvons également évoquer le rôle des facteurs de transcription NFAT et SGK1 (*Serum and Glucocorticoid-regulated Kinase 1*), qui sont tous deux sensibles au stress osmotique. C'est ainsi que de récents travaux publiés dans la revue *Nature* ont montré qu'un régime riche en chlorure de sodium avait pour conséquence d'amplifier la polarisation Th17 et de sensibiliser les souris à l'EAE. Cette étude a notamment pu mettre en évidence que l'excès de sel provoque une activation de la voie p38/MAPK (*Mitogen-*

Activated Protein Kinase) et donc l'activation des facteurs de transcription NFAT et SGK1 qui favorise l'expression de l'IL-17A (Kleinewietfeld et al., 2013).

Enfin, il faut citer les cytokines et les facteurs de transcription qui vont réguler négativement la différenciation et la polarisation Th17 : les cytokines de type Th1, l'IL-12 et l'IFNγ, qui, par l'intermédiaire de STAT1 et de STAT4, permettent la répression du gène *Rorc via* l'activation de l'expression de *T-bet* et en modulant l'activité de STAT3 (Mukasa et al., 2010). L'IL-27 est également impliquée dans la régulation de la balance Th1/Th17 puisque comme l'IFNγ, elle va conduire à l'activation de STAT1 et donc à l'expression de T-bet (Villarino et al., 2010). En outre, l'IL-4, cytokine de type Th2, permet également de contrecarrer le programme de différenciation Th17 en provoquant une déstabilisation des complexes STAT3/IRF4 au profit des complexes STAT6/IRF4 pour induire le facteur de transcription GATA3. Ce facteur agira ensuite comme un répresseur transcriptionnel des gènes du programme Th17 (Cooney et al., 2011; Hirahara et al., 2010). L'IL-2 est également une cytokine importante dans la régulation du programme de différenciation Th17. Elle va ainsi moduler l'expression génique de l'*Il17a* et de l'*Il17f via* l'activation de STAT5 qui va alors rentrer en compétition avec STAT3 au niveau des promoteurs de ces deux gènes (Yang et al., 2011).

b) Plasticité et rôle ambivalent des lymphocytes Th17

Il a en effet été mis en évidence chez l'Homme et chez la souris que les lymphocytes Th17 pouvaient présenter des caractéristiques phénotypiques et des propriétés fonctionnelles différentes en fonction des cytokines présentes au moment de la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en Th17, et ce même après leur maturation effectuée. Comme explicité précédemment, l'induction de la polarisation des cellules T $CD4^+$ naïves en Th17 nécessite la présence d'IL-6 et de TGF-β. La présence dans le milieu environnant d'IL-1β et d'IL-23 permet, quant à elle, de maintenir le phénotype Th17 à long terme. La polarisation Th17 dépend donc d'un grand nombre de cytokines, dont les quantités et les proportions évoluent de manière différente dans l'organisme : la signalisation induite par une cytokine présente en quantité importante dans l'environnement du lymphocyte aura donc l'ascendant sur les signaux provoqués par des cytokines présentes en plus faible quantité dans ce même environnement.

i) Capacités d'immunosuppression des lymphocytes Th17 :

Tout d'abord, il a été démontré chez la souris que les lymphocytes Th17 au sein de la tumeur étaient fonctionnels et donc sécréteurs d'IL-17A suite à l'activation de RORγt. L'IL-17A peut stimuler

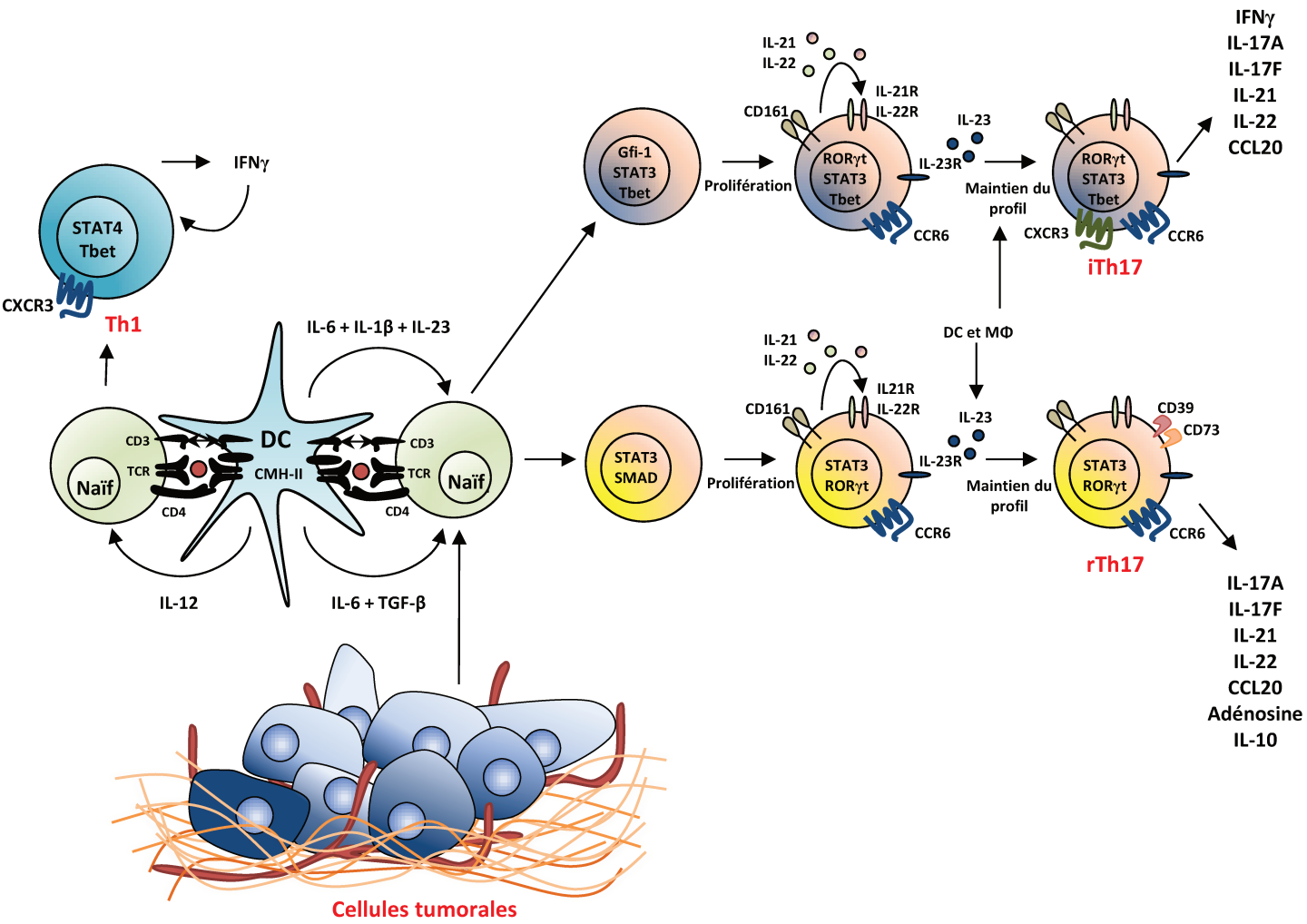


Figure 13. La plasticité des lymphocytes Th17.
Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs peuvent se différencier en lymphocytes Th17 de type inflammatoire (iTh17) ou régulateur (rTh17). La présence d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-23 au début de la polarisation dans le milieu environnant les lymphocytes favorise le phénotype inflammatoire caractérisé par l'expression des facteurs de transcription T-bet, STAT3, Gfi-1 et RORγt. Ces Th17 inflammatoires sécrètent des quantités importantes d'IL-17A, d'IL-21, d'IL-22 et d'IFNγ. Les lymphocytes Th17 régulateurs sont, quant à eux, induits en présence d'IL-6 et de TGF-β et ils expriment les facteurs de transcription STAT3 et RORγt. L'immunosuppression induite par ces cellules est établie principalement par l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 et par la production d'IL-10, cytokine immunosuppressive. Les lymphocytes Th17 régulateurs peuvent également exprimer le facteur de transcription Foxp3, facteur de transcription caractéristique des lymphocytes T régulateurs, certainement sous l'influence du TGF-β.

la production de facteurs angiogéniques, comme le VEGF, par les cellules stromales et les fibroblastes qui favorisent alors la construction d'un réseau vasculaire alimentant la tumeur (Berger et al., 2013; Chung et al., 2013). De plus, la stimulation de la sécrétion de facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques comme le VEGF a également un effet sur les cellules du système immunitaire puisque ces facteurs peuvent inhiber le développement des cellules dendritiques, favorisant donc l'immunosubversion et la croissance tumorale (Gabrilovich et al., 1998). Il a également été mis en évidence que l'IL-17 permettait le recrutement de macrophages au site tumoral ; ces cellules constituent une source d'IL-6 capable d'activer la voie oncogène STAT3 favorisant ainsi la progression tumorale (Fossiez et al., 1996).

Dans le cadre de la polarisation des lymphocytes Th17, il est clairement montré que l'intensité des signaux induits par le TGF-β peut modifier complètement la destinée biologique des Th17. Ceci est particulièrement vrai dans un contexte de cancer, puisque la grande majorité des tumeurs malignes se développent au sein d'un microenvironnement riche en TGF-β (Martin et al., 2012). Notre équipe a pu montrer, chez la souris, que la présence dans l'environnement cellulaire d'IL-6 et de TGF-β au moment de la polarisation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en Th17, permettait d'induire l'expression de deux enzymes à la surface de ces cellules : les ectonucléotidases CD39 (*Entpd1*) et CD73 (*Nt5e*). Ces deux enzymes permettent la dégradation de l'ATP et de l'ADP extracellulaires en AMP puis en adénosine. Elles contribuent ainsi à transformer l'ATP, molécule immunostimulante (car ligand du récepteur P2X7 et activateur de l'inflammasome NLRP3) en molécule immunosuppressive : l'adénosine, qui constitue le ligand du récepteur A2Ar entre autre, et qui se comporte comme une molécule inhibitrice de la réponse cytotoxique par des effets suppressifs multiples sur les lymphocytes T, les cellules NK ou les cellules dendritiques (Beavis et al., 2012). Le TGF-β joue un rôle important dans l'expression de ces deux enzymes puisqu'il permet d'inhiber le facteur Gfi-1 (*Growth factor independent-1*) qui est un répresseur transcriptionnel des gènes *Entpd1* et *Nt5e*. L'IL-6 permet, quant à elle, d'induire l'expression de ces gènes *via* l'activation de STAT3. De plus, le TGF-β a plutôt un rôle inhibiteur en ce qui concerne la sécrétion d'IFNγ par les lymphocytes Th17 tandis que la présence d'IL-1β et d'IL-23 favorise sa sécrétion. Les signaux induits précocement sont donc le fondement des fonctions immunologiques que présenteront les lymphocytes Th17 et il est clairement montré que le TGF-β joue un rôle important dans l'orientation des cellules Th17 vers un sous-type régulateur ou bien inflammatoire (Chalmin et al., 2012) (**Figure 13**, p. 61). Les cellules Th17 régulatrices (rTh17) vont présenter des caractéristiques communes aux lymphocytes Treg, qui eux aussi expriment les ectonucléotidases à leur surface contribuant ainsi à une part de leurs fonctions immunosuppressives (Deaglio et al., 2007). Par ailleurs, il a été mis en évidence que les lymphocytes Th17 peuvent également se repolariser en lymphocytes Treg (correspondant alors à des

cellules IL-17A$^+$ Foxp3$^+$). Les mécanismes moléculaires associés à cette repolarisation sont encore mal compris mais impliquent certainement le TGF-β présent au niveau de la tumeur (Du et al., 2014).

ii) Propriétés inflammatoires des lymphocytes Th17 :

D'autres travaux de recherche ont mis en évidence un rôle anti-tumoral des lymphocytes Th17. En effet, l'IL-21 sécrétée par les Th17 active les fonctions anti-tumorales des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques et induit notamment la production d'IFNγ pouvant expliquer la mobilisation des lymphocytes Th1 au niveau de la tumeur (Nunez et al., 2013).

Par ailleurs, des études récentes montrent que les lymphocytes Th17 peuvent se convertir en cellules « *Th1-like* ». Il a été ainsi suggéré que l'expression de protéines de surface comme CD161 et CCR6 permettaient de discriminer les cellules Th1-like dérivant de cellules Th17, des lymphocytes Th1 classiques. En effet, les cellules polarisées par l'IL-6 et le TGF-β en lymphocytes Th17 immatures expriment CD160, CCR6 et le récepteur à l'IL-23 mais elles ne produisent pas d'IL-17A. Lorsqu'elles sont en présence d'IL-1β et d'IL-23, elles commencent alors à produire de l'IL-17A et acquièrent un profil phénotypique de Th17 matures (c'est-à-dire production d'IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 et TNFα). Le phénotype Th17 typique est maintenu si l'environnement est favorable (c'est-à-dire riche en IL-23). Néanmoins, dans un contexte cytokinique favorable aux lymphocytes Th1 (riche en IL-12), les cellules Th17 matures peuvent se transdifférencier en cellules Th17/Th1 : ces cellules sont faiblement productrices d'IL-17A et sécrètent comme les lymphocytes Th1 de grandes quantités d'IFNγ. Les caractéristiques phénotypiques de ces cellules sont alors modifiées puisqu'elles exprimeront en plus des marqueurs de surface Th17 (CCR6, CD161, IL-23R) un marqueur typique des lymphocytes Th1 : le marqueur CXCR3 (Acosta-Rodriguez et al., 2007) (**Figure 13**, p. 61).

La littérature laisse donc à penser que la plasticité des lymphocytes Th17 permet la polarisation de deux phénotypes Th17 en fonction du contexte cytokinique : d'une part les cellules Th17 régulatrices immunosuppressives générées plutôt en présence de TGF-β et d'IL-6 et exprimant les ectonucléotidases CD39 et CD73, et d'autre part les cellules Th17 inflammatoires et anti-tumorales générées en présence d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-23, productrices d'IL-17A mais également d'IFNγ. Les cellules Th17 régulatrices sécrètent également de l'IL-10 ce qui va abolir la fonction pro-inflammatoire des Th17 et réduire leur pathogénicité (McGeachy et al., 2007).

c) Stratégies thérapeutiques permettant de cibler les lymphocytes Th17

À l'heure actuelle, les stratégies thérapeutiques envisagées pour cibler les cellules Th17 reposent principalement sur la neutralisation des cytokines que produisent ces cellules. Des études cliniques réalisées dans le cadre de maladies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde ou le psoriasis ont montré que cibler avec des anticorps l'IL-17A (Secukinumab) (Langley et al., 2014), l'IL-17F, l'IL-23 (Tildrakizumab) (Kopp et al., 2015), le TNFα (Adalimumab) (Pope et al., 2013) ou encore le récepteur à l'IL-17A/F (IL-17RA, Brodalumab) (Mease et al., 2014) peut constituer des stratégies efficaces dans ces maladies inflammatoires. Certains anticorps thérapeutiques sont ainsi déjà utilisés dans le traitement de ces pathologies auto-immunes ; cependant il est, à l'heure actuelle, difficile de connaître l'efficacité de ces traitements en oncologie puisque les essais cliniques en oncologie avec de telles molécules sont encore assez rares et que le rôle pathogène des lymphocytes Th17 semble variable d'un type tumoral à l'autre. Néanmoins, l'utilisation de ces traitements pourrait avoir un intérêt dans la prise en charge des cancers pour lesquels les Th17 semblent jouer un rôle néfaste, comme les cancers du sein, du côlon ou encore du poumon. À titre d'exemple, les inhibiteurs de l'IL-23 pourraient permettre de limiter la différenciation et la polarisation des lymphocytes Th17 et ainsi plutôt favoriser la polarisation des cellules en lymphocytes Th1.

Certaines stratégies thérapeutiques reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux capables de neutraliser les cytokines impliquées dans la mise en place du profil des lymphocytes Th17. L'IL-1β et l'IL-6 sont les cytokines les plus ciblées parce qu'elles sont toutes deux impliquées dans l'activation des propriétés inflammatoires et angiogéniques des lymphocytes Th17. Le Tocilizumab, qui est un anticorps neutralisant le récepteur de l'IL-6, et le Siltuximab, anticorps neutralisant quant à lui la cytokine IL-6, sont deux médicaments utilisés dans le traitement des maladies auto-immunes et inflammatoires et engendrent une diminution du profil Th17 au profit du phénotype Treg (Mesquida et al., 2014; Saggini et al., 2014). La neutralisation de l'IL-1β est également envisagée pour limiter la polarisation Th17 et cette neutralisation est testée en oncologie dans la prise en charge du cancer colorectal en association avec le 5-Fluorouracile (5-FU) (étude clinique en cours, NCT02090101).

Des inhibiteurs de kinases peuvent être également utilisés pour cibler de manière plus ou moins spécifique les lymphocytes Th17. Citons, par exemple, le Tofacitinib et l'Apremilast. Le Tofacitinib va inhiber la kinase JAK2, ce qui permet de limiter l'activation du facteur STAT3 et donc d'inhiber en partie le programme de différenciation Th17. Une réelle efficacité de ce médicament a été montrée dans le traitement du psoriasis et l'amélioration des lésions cutanées a été associée à une chute des marqueurs des cellules Th17 (expression génique de l'*Il17a* et de l'*Il22*) (Krueger et al.,

2016). L'Apremilast est, quant à lui, un inhibiteur de la phosphodiestérase 4 (PDE4) : c'est une enzyme qui permet la conversion de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) en AMP. L'inhibition de la PDE4 avec l'utilisation de l'Apremilast induit une élévation de la concentration intracellulaire d'AMPc qui va en retour freiner la réponse inflammatoire (*via* une chute de l'activation des voies de signalisation dépendante de NFκB et de JNK). Cet inhibiteur n'est donc pas spécifiquement utilisé pour moduler et limiter la différenciation des lymphocytes Th17 ; cependant plusieurs études ont mis en évidence chez l'Homme, que l'efficacité du médicament était corrélée à une chute de la concentration plasmatique des cytokines sécrétées par les lymphocytes Th17 telles que le TNFα, l'IL-6 et l'IL-17A (Gottlieb et al., 2013; Schafer et al., 2015).

2. Les lymphocytes Th9

a) Biologie des lymphocytes Th9

i) Découverte et mise en évidence

Les lymphocytes Th9 ont été découverts et caractérisés en 2008 simultanément par deux laboratoires différents (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). Jusqu'alors, l'IL-9 était considérée comme une cytokine produite uniquement par les lymphocytes Th2. Cependant, l'équipe de M. Veldhoen a mis en évidence que le TGF-β était capable de détourner le programme de différenciation Th2 vers un programme de différenciation induisant la production d'IL-9 par un sous-type lymphocytaire T $CD4^+$ (Veldhoen et al., 2008). Dans le même temps, l'équipe de V. Dardalhon a démontré que l'IL-4 était capable de bloquer l'induction du facteur de transcription Foxp3 au sein des lymphocytes Treg, aboutissant ainsi à l'émergence d'une population T helper produisant de façon prédominante de l'IL-9 (Dardalhon et al., 2008). Ces deux études ont permis de mettre en évidence un nouveau sous-type T $CD4^+$ caractérisé par la sécrétion d'IL-9 : les lymphocytes Th9. La découverte de cette nouvelle population lymphocytaire T helper illustre clairement la plasticité existante au sein des lymphocytes T $CD4^+$: alors que le TGF-β favorise la différenciation vers un-sous type Treg et que l'IL-4 induit la différenciation d'un sous-type Th2, la présence concomitante d'IL-4 et de TGF-β dans le milieu environnant les cellules T $CD4^+$ naïves aboutit à la génération d'un profil lymphocytaire Th9. L'effet synergique de l'IL-4 et du TGF-β sur la production d'IL-9 par les lymphocytes T $CD4^+$ avait déjà été montré, presque quinze ans plus tôt, sans pour autant permettre l'identification d'une sous-population T helper à part entière (Schmitt et al., 1994).

ii) Caractéristiques biologiques et fonctionnelles

Les lymphocytes Th9 sont donc caractérisés biologiquement par la sécrétion d'IL-9 et d'IL-21 et par la très faible expression de cytokines considérées comme des marqueurs d'autres sous-populations T helper comme l'IFNγ (Th1), l'IL-4 (Th2) et l'IL-17A (Th17). En effet, l'IL-9 ne peut pas être considérée comme cytokine spécifique des cellules Th9 puisqu'elle peut aussi être produite par d'autres lymphocytes tels que les lymphocytes Th2, Th17 et Treg en moindre quantité (Nowak et al., 2009).

Les lymphocytes Th9 constituent une population faible dans des conditions physiologiques, expliquant la complexité initiale à travailler sur ce sous type-cellulaire. C'est ainsi que le rôle et les fonctions des lymphocytes Th9 sont restés assez durablement méconnus. Ces rôles commencent progressivement à être décrits dans des modèles expérimentaux depuis le début des années 2010,

avec des travaux mettant en évidence un rôle des lymphocytes Th9 dans la défense contre les parasites et dans leur capacité à induire *in vivo* de fortes réponses pro-inflammatoires (Kaplan et al., 2015). Ces cellules favorisent en effet le développement de maladies auto-immunes : encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris (Jager et al., 2009) et sclérose en plaque chez l'Homme (Stassen et al., 2012). Dans cette pathologie, l'IL-9 induit la sécrétion de CCL20 par les astrocytes favorisant ainsi le recrutement dans le système nerveux central des lymphocytes Th17 qui présentent le récepteur à cette chimiokine (CCR6) (Zhou et al., 2011). Ceci va également stimuler l'inflammation et l'angiogenèse associées. Il a été montré, dans des modèles murins d'encéphalite comme l'EAE, que des souris ayant subi un transfert adoptif de lymphocytes Th9 développent une pathologie sévère et des lésions importantes du système nerveux central (Jager et al., 2009). Elles contribuent également au développement des réponses allergiques et sont particulièrement impliquées dans l'asthme (Staudt et al., 2010). Une récente étude a mis en évidence l'augmentation significative du nombre de cellules Th9 dans le sang de patients atteints de dermatite atopique (Ma et al., 2014). En ce qui concerne la maladie asthmatique, l'IL-9 produite par les lymphocytes Th9 stimule la production du mucus, l'infiltration de leucocytes tels que les éosinophiles et la production d'immunoglobulines E (IgE) par les lymphocytes B (Longphre et al., 1999). Cette cytokine active également la production d'histamines par les mastocytes ce qui leur confère un rôle dans l'allergie chronique (Forbes et al., 2008).

Dans un contexte de cancer, le rôle de ces cellules n'est pas encore véritablement établi. Néanmoins, il semblerait que ces cellules présentent chez la souris des propriétés anti-tumorales, dépendantes de l'IL-9, grâce à leur capacité à recruter les cellules T $CD8^+$ et les cellules dendritiques par l'axe CCL20/CCR6 et à activer les mastocytes (Lu et al., 2012; Purwar et al., 2012). Au sein de la tumeur, les lymphocytes Th9 vont en effet induire la production de la chimiokine CCL20, qui est reconnue par le récepteur CCR6 exprimé par les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ ainsi que par les DC, leur servant ainsi de chimioattractant. L'effet anti-tumoral des cellules Th9 est aboli après déplétion des lymphocytes T $CD8^+$ et aucune accumulation de mastocytes n'est alors observée. Par ailleurs, si les propriétés effectrices des lymphocytes Th9 ont été dans un premier temps uniquement reliées à leur capacité à produire de l'IL-9, notre équipe a récemment démontré l'implication dans l'immunité anti-tumorale de ces cellules *via* la sécrétion d'IL-21 sous l'effet de l'IL-1β (Vegran et al., 2014). La stimulation de ces cellules par l'IL-1β permet ainsi l'activation de la voie STAT1/IRF1, favorisant la production de grandes quantités d'IL-9 et d'IL-21, ainsi que le recrutement de cellules cytotoxiques. Pour le moment, aucune étude chez l'Homme n'a permis de confirmer un rôle anti-tumoral potentiel des lymphocytes Th9.

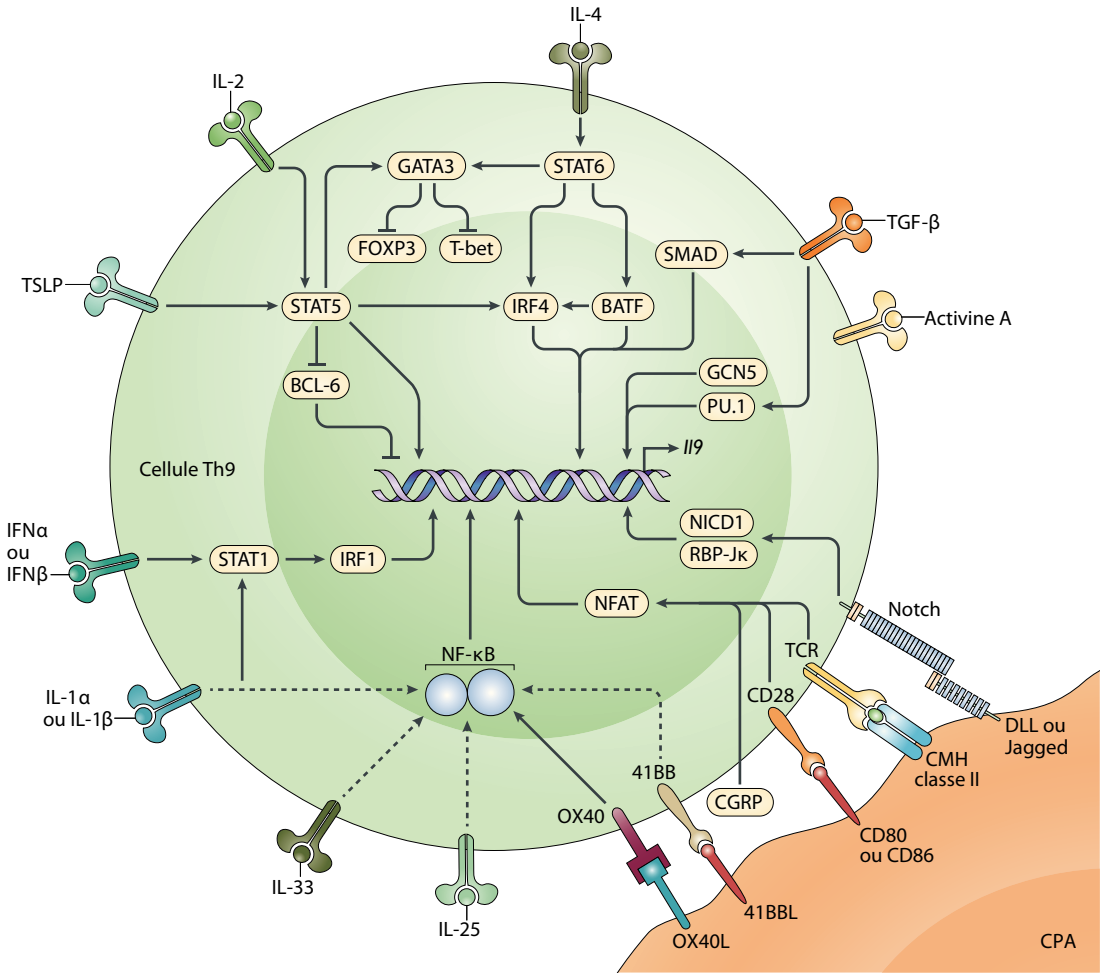


Figure 14. Représentation schématique des voies de signalisation et de la régulation transcriptionnelle du programme de différenciation des lymphocytes Th9.
La différenciation des lymphocytes T sécrétant de l'IL-9 nécessite l'activation des voies de signalisation dépendante de STAT5/IL-2 et de STAT6/IL-4 aussi bien que du TGF-β qui permet la diversion de la différenciation cellulaire Th2. Bien que cette combinaison de cytokines soit suffisante pour la polarisation Th9, d'autres voies de signalisation ont été mises en évidence comme favorisant l'augmentation de la production d'IL-9 par ces cellules. Des cytokines accessoires telles que l'IL-1, l'IL-25 ou l'IL-33 induisent la signalisation dépendante de NF-κB mais aussi les interférons de type I ou l'IL-1β déclenche un signal *via* STAT1 permettant ainsi l'expression d'IRF1. Le TCR et les molécules de costimulation ont également un rôle important dans la transcription de l'*Il9*, principalement *via* l'activation du facteur NFAT par le TCR ou dans le cas d'une costimulation dépendante de CD28 et *via* l'activation de NF-κB par le TCR ou par la costimulation établie par OX40 et 41BB. Adapté de (Kaplan et al., 2015).

iii) Aspects moléculaires de la différenciation Th9

Le programme transcriptionnel des lymphocytes Th9 n'est pas encore complétement décrit ; cependant des facteurs de transcription ont pu être caractérisés comme essentiels pour la polarisation Th9. La polarisation de ces cellules nécessite ainsi, comme pour les lymphocytes Th17, l'expression et l'activation d'un grand nombre de facteurs de transcription interdépendants (**Figure 14**, p. 68). Le programme de différenciation des lymphocytes Th9 est initié par les signaux induits par l'activation du TCR et les facteurs de co-stimulation puis par le TGF-β et l'IL-4 après fixation sur leurs récepteurs respectifs : les TGFβ-RI et -RII et l'IL-4R.

L'activation du TCR par les cellules présentatrices d'antigènes *via* le CMH II va induire la production d'IL-2 par les lymphocytes T. L'IL-2 en se fixant sur son récepteur, l'IL-2RA, également appelé CD25, va activer une voie de signalisation dépendante de STAT5. Pour jouer son rôle de facteur de transcription, STAT5 doit migrer dans le noyau et doit donc subir une modification post-transcriptionnelle : une phosphorylation de la tyrosine 694 par l'intermédiaire de la kinase JAK3. L'activation de STAT5 par phosphorylation permet sa translocation dans le noyau et son activité de régulateur transcriptionnel : STAT5 va ainsi pouvoir interagir directement avec le promoteur du gène *Il9*, permettant alors la production de cette cytokine (Bassil et al., 2014). L'activation de STAT5 est essentielle à la différenciation Th9, puisqu'en absence de ce facteur les lymphocytes T sont incapables de sécréter de l'IL-9 (Bassil et al., 2014). STAT5 va également induire l'expression d'autres facteurs de transcription qui vont favoriser la production d'IL-9. STAT5 permet en effet l'activation et l'expression d'IRF4 et de PU.1, deux facteurs de transcription indispensables à la différenciation des lymphocytes Th9 (Chang et al., 2010; Jabeen et al., 2013; Staudt et al., 2010). Cependant, la voie de signalisation établie par l'IL-2 et STAT5 est également la cible de régulateurs négatifs de la différenciation lymphocytaire Th9. Le facteur de transcription Bcl6, facteur indispensable à la différenciation des lymphocytes TFh (Nurieva et al., 2009; Yu et al., 2009), semble capable d'inhiber la différenciation Th9, dans la mesure où l'expression de ce facteur est inversement corrélée au niveau d'expression génique de l'*Il9* (Bassil et al., 2014; Liao et al., 2014). En effet, Bcl6 empêche la fixation de STAT5 sur le promoteur du gène de l'*Il9* et inhibe ainsi l'activation de la transcription de ce gène. Cependant, une production précoce d'IL-2 induit l'activation et la fixation de STAT5 sur le promoteur de l'*Il9* induisant donc la répression de l'expression de Bcl6, et permettant donc l'établissement de la polarisation Th9 (Bassil et al., 2014; Liao et al., 2014).

Le signal induit après fixation de l'IL-4 sur son récepteur, l'IL-4R, va permettre l'activation par phosphorylation du facteur de transcription STAT6 qui est indispensable à la polarisation des lymphocytes Th9 (Dardalhon et al., 2008). Une fois activé, STAT6 peut migrer dans le noyau et peut se fixer directement sur le promoteur de l'*Il9* (Goswami and Kaplan, 2012; Yang et al., 2013) mais il

est également responsable de l'induction de l'expression de deux facteurs de transcription essentiels à la différenciation des cellules Th9 : IRF4 et BATF (Jabeen et al., 2013). Bien que STAT6 ait un effet direct sur la polarisation Th9, il est également capable de bloquer l'expression de facteurs de transcription répresseurs de cette polarisation tels que T-bet et Foxp3, qui contrôlent, quant à eux, la maturation des lymphocytes T $CD4^+$ vers d'autres sous-populations lymphocytaires (Goswami et al., 2012).

Le facteur de transcription IRF4 est crucial pour la différenciation Th9 mais n'est pas spécifique et caractéristique des lymphocytes Th9 puisqu'il est également impliqué dans la différenciation des cellules Th2 et Th17 (Brustle et al., 2007; Lohoff et al., 2002; Staudt et al., 2010). IRF4 joue toutefois un rôle direct sur la transcription de l'IL-9 au sein des lymphocytes Th9 puisqu'il va se fixer sur le promoteur du gène de l'*Il9* ce qui va favoriser la sécrétion de cette cytokine (Jabeen et al., 2013; Staudt et al., 2010). Par ailleurs, IRF4 est également capable de bloquer, tout comme STAT6, l'expression des facteurs associés à la différenciation Th1 tels que le facteur de transcription T-bet et l'IFNγ qui vont quant à eux inhiber la polarisation Th9 (Jabeen et al., 2013; Staudt et al., 2010).

Le facteur de transcription BATF est également indispensable à la polarisation Th9, mais là encore, ce facteur n'est pas spécifique des lymphocytes Th9, puisqu'il est également requis pour la différenciation Th17 (Jabeen et al., 2013; Schraml et al., 2009). En effet, IRF4 et BATF s'hétérodimérisent et favorisent la génération des cellules Th17 (Ciofani et al., 2012; Glasmacher et al., 2012; Li et al., 2012). De la même façon qu'IRF4, BATF va se fixer directement sur le promoteur du gène de l'*Il9* et permettra ainsi la transcription de ce gène et la production d'IL-9 (Jabeen et al., 2013). Ces deux facteurs s'hétérodimérisent également au sein des lymphocytes Th9 puisque la perte d'un de ces deux facteurs entraîne une diminution de la fixation de l'autre facteur sur le promoteur de l'IL-9 (Jabeen et al., 2013). Cependant, à l'inverse d'IRF4, BATF régule l'expression de presque tous les gènes associés aux lymphocytes Th9 ce qui suggère donc que ces deux facteurs de transcription fonctionnent de concert pour l'établissement du phénotype Th9 (Jabeen et al., 2013).

En ce qui concerne le facteur de transcription GATA-3, spécifique des lymphocytes Th2 et induit après fixation de l'IL-4 sur son récepteur, celui-ci est également impliqué dans la différenciation Th9. Bien que l'expression de GATA-3 soit plus faible dans les lymphocytes Th9 que dans les Th2, ce facteur semble essentiel à la polarisation Th9 (Goswami et al., 2012; Veldhoen et al., 2008). L'équipe de V.K. Kuchroo a ainsi montré qu'en absence du facteur de transcription GATA-3 les lymphocytes Th9 sont en effet incapables de produire de l'IL-9 (Dardalhon et al., 2008). GATA-3 ne semble pas directement impliqué dans la régulation transcriptionnelle de l'IL-9 mais pourrait

interagir avec le facteur de transcription Foxp3 et ainsi réprimer la différenciation (induite par le TGF-β) des cellules T $CD4^+$ en lymphocytes T régulateurs (Dardalhon et al., 2008).

Quant au facteur de transcription STAT1, celui-ci semble avoir des effets dépendants du contexte cytokinique, au sein duquel se trouvent les lymphocytes T, sur la production d'IL-9. Des études ont ainsi mis en évidence que l'activation de STAT1 par l'IFNγ ou l'IL-27 induisait une diminution de la production d'IL-9 par les cellules Th9 (Murugaiyan et al., 2012; Schmitt et al., 1994). Cependant, notre équipe a récemment montré que l'IL-1β avait la capacité d'activer la voie STAT1/IRF1 dans les lymphocytes Th9 et que cela amplifie à la fois la sécrétion d'IL-9 et d'IL-21 (Vegran et al., 2014). Il a également été montré que des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs humains cultivés en présence d'IL-4 et de TGF-β et de cytokines induisant l'activation de STAT1 telles que l'IL-6, l'IL-21, l'IFNα ou encore l'IFNβ augmentaient leur capacité à produire de l'IL-9 (Wong et al., 2010).

Le dernier signal indispensable à la différenciation Th9 est celui induit par le TGF-β sur ses récepteurs, TGFβ-RI et -RII. Il a ainsi été montré que le TGF-β était capable de « reprogrammer » les lymphocytes Th2 en cellules sécrétant de l'IL-9, alors identifiées comme des lymphocytes Th9 (Dardalhon et al., 2008; Veldhoen et al., 2008). La fixation du TGF-β sur son récepteur va entrainer l'activation des protéines SMAD2 (*Sma and Mad related protein 2*), SMAD3 et SMAD4 qui ont été caractérisées comme essentielles pour une polarisation optimale des lymphocytes Th9 (Tamiya et al., 2013; Wang et al., 2013). L'absence de SMAD2 ou SMAD4 au sein des lymphocytes T résulte en effet en l'augmentation de l'expression des gènes associés à la polarisation Th2 et en la perte d'expression de l'IL-9 (Wang et al., 2013). Ces trois protéines sont à l'origine de modifications de la structure de la chromatine, au niveau du locus de l'*Il9*, notamment en bloquant le recrutement de protéines comme EZH2 (*Enhancer of Zeste Homologue 2*), appartenant au complexe multi-protéique PRC2 (*Polycomb Repressive Complex 2*), responsable de la méthylation de l'ADN et entrainant une moindre accessibilité par les facteurs de transcription pouvant réguler l'expression de ce gène (Wang et al., 2013). Par ailleurs, SMAD2 et SMAD3 ont la capacité d'interagir avec IRF4, en lui permettant une fixation optimale au promoteur de l'*Il9*. Les protéines SMAD, activées *via* le signal induit par le TGF-β et IRF4, induit après activation de STAT6 par l'IL-4, coopèrent donc pour transactiver le gène de l'*Il9* et permettre une polarisation optimale des cellules Th9.

La stimulation des cellules par le TGF-β active également des voies de signalisation, indépendantes des SMAD, qui induisent l'expression de PU.1, facteur de transcription de la famille ETS (*E26 transformation-specific*). Ce facteur de transcription a été le premier facteur décrit comme étant essentiel et caractéristique de la différenciation des lymphocytes Th9 (Chang et al., 2010). Il a en effet été mis en évidence que l'expression ectopique de PU.1 augmente la production d'IL-9 tandis que la déficience en PU.1 au sein des lymphocytes T entraîne une diminution significative de la

production d'IL-9 (Chang et al., 2010). De façon similaire aux autres facteurs de transcription décrit précédemment, PU.1 se fixe au promoteur de l'*Il9* et augmente la transcription du gène en recrutant des histones acétyl-transférases (HAT) telles que Gcn5 et PCAF qui vont alors faciliter l'accessibilité à la chromatine (Goswami and Kaplan, 2012; Ramming et al., 2012). Cependant, PU.1 a aussi la capacité de réprimer l'expression des cytokines Th2 ainsi que des gènes importants pour la différenciation TFh (Awe et al., 2015; Chang et al., 2009; Chang et al., 2005). Par ailleurs, il est important de noter que l'expression de PU.1 est significativement plus importante au sein de cellules différenciées en condition Th9 (en présence d'IL-4 et de TGF-β) qu'en condition Th2 (en présence d'IL-4). Par ailleurs, avant l'identification précise du sous-type Th9, il a été montré que les lymphocytes Th2 exprimant PU.1 sécrétaient de l'IL-9 et qu'ils ne présentaient donc pas les caractéristiques fonctionnelles de Th2 mais plutôt celles de lymphocytes Th9 (Chang et al., 2005). Ces différentes données suggèrent donc que PU.1 est un facteur critique pour la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ en un lignage Th9 et que celui-ci régule le développement des cellules Th9 (Chang et al., 2010). Une étude a ainsi récemment utilisé le marquage $CD4^+$ $PU.1^+$ en immunohistochimie pour identifier et caractériser les lymphocytes Th9 sur des coupes de peau humaines et plus spécifiquement au sein d'infiltrats cutanés inflammatoires (Cortelazzi et al., 2013).

Par ailleurs, des facteurs de co-stimulation semblent également impliqués dans la polarisation des lymphocytes Th9. En effet, l'activation du récepteur de co-stimulation OX40 par la fixation de son ligand OX40L présent à la surface des cellules présentatrices d'antigène est impliquée dans l'induction de la polarisation Th9 (Xiao et al., 2012). La stimulation de ce récepteur va activer l'ubiquitine ligase TRAF6 (*TNF-receptor associated factor 6*) qui va ensuite déclencher l'activation de la voie de signalisation dépendante de NFκB (*Nuclear Factor-kappa B*). Ce dernier va ainsi pouvoir interagir avec le promoteur du gène de l'*Il9* et induire la production de cette cytokine (Xiao et al., 2012). À noter également que l'activation des lymphocytes T naïfs par l'intermédiaire des récepteurs GITR (*Glucocorticoid-Induced Tumor necrosis factor receptor (TNFR) Related protein*) favorise la différenciation Th9 par la voie de signalisation impliquant TRAF6 et NFκB (Kim et al., 2015; Xiao et al., 2015).

Enfin, il faut noter les cytokines et les facteurs de transcription qui sont à même de réprimer la polarisation Th9. Comme vu précédemment, les facteurs de transcription Bcl6, T-bet et Foxp3 vont agir comme répresseurs transcriptionnels de la polarisation Th9 (Bassil et al., 2014; Goswami et al., 2012). Le facteur de transcription RORγt joue également sans doute un rôle de répresseur transcriptionnel lors de la différenciation Th9 puisqu'il a été mis en évidence que l'expression d'IL-9 est augmentée chez des souris déficientes pour RORγt (Purwar et al., 2012). Des cytokines peuvent également réprimer la différenciation des lymphocytes Th9 : l'IFNγ et l'IL-23 vont ainsi inhiber la

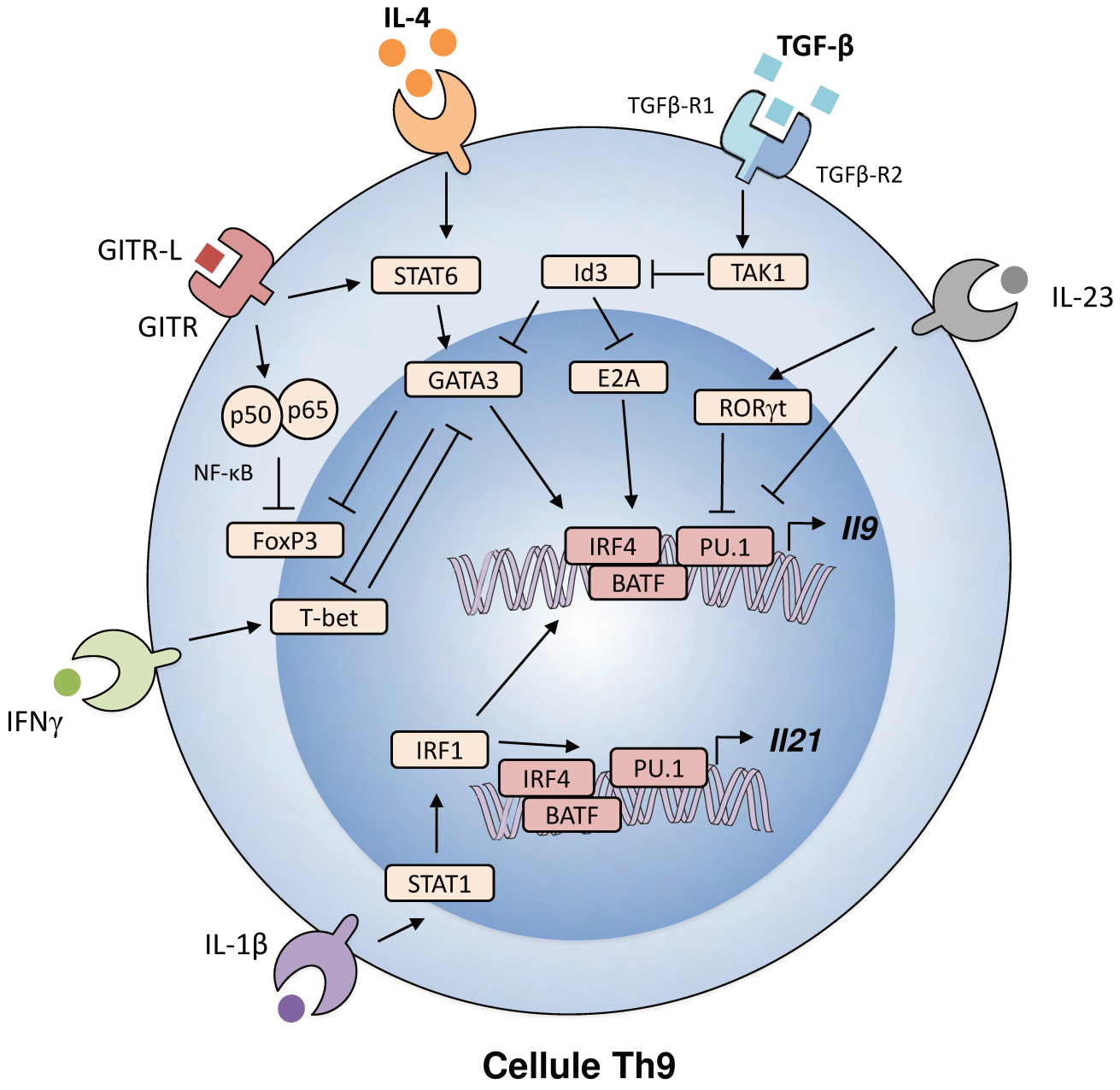


Figure 15. Voies de signalisation favorisant et réprimant la différenciation des lymphocytes Th9.
Adapté de (Rivera Vargas et al., 2017).

production d'IL-9 des lymphocytes T afin d'orienter respectivement la différenciation vers les sous-populations Th1 et Th17 (Jager et al., 2009; Purwar et al., 2012; Schmitt et al., 1994) (**Figure 15**, p. 73).

b) Stratégies thérapeutiques permettant de cibler les lymphocytes Th9

Les connaissances sur la biologie des lymphocytes Th9 se sont progressivement forgées à partir de modèles murins de maladies inflammatoires mais également à partir de modèles de maladies humaines. Il est maintenant admis que, à l'instar d'autres sous-populations T helper comme les lymphocytes Th17 et les Treg, les cellules Th9 peuvent avoir à la fois des fonctions bénéfiques et néfastes lors des processus physiopathologiques les impliquant. Des données récentes suggèrent que les lymphocytes Th9 sont retrouvés en grand nombre au niveau de la peau et que l'expression de certains récepteurs de surface faciliterait leur recrutement au niveau des muqueuses (Jabeen et al., 2013; Kara et al., 2013; Purwar et al., 2012; Schlapbach et al., 2014). On retrouve ainsi des cellules Th9 au niveau de l'épiderme de volontaires sains (Schlapbach et al., 2014) mais également chez des patients atteints d'infection de la peau par des champignons tels que *C. albicans*, de dermatite atopique ou encore de psoriasis (Cortelazzi et al., 2013; Ma et al., 2014). Il a en effet été mis en évidence, grâce à une analyse par cytométrie de masse des lymphocytes T sanguins ou retrouvés dans les tissus, que les lymphocytes Th9 étaient de façon prédominante des cellules recrutées au niveau de la peau et des cellules résidentes de la peau (Schlapbach et al., 2014; Wong et al., 2016). Ainsi, les lymphocytes Th9 sont attirés au niveau des muqueuses *via* la présence d'antigènes spécifiques des tissus : les Th9 résidents de la peau expriment pour la plupart l'antigène des lymphocytes cutanés ou CLA (*Cutaneous Lymphocyte Antigen*) tandis que les cellules Th9 recrutées au niveau de l'intestin expriment, quant à elle, l'intégrine α4β7 (Clark et al., 2006; Nalleweg et al., 2015). L'expression de ces molécules de surface permet donc aux lymphocytes Th9 d'être attirés et recrutés au niveau de la peau puisque la présence de l'antigène des lymphocytes cutanés leur permet de se lier à l'endothélium exprimant la E-sélectine (Clark et al., 2006).

Les lymphocytes Th9 semblent capables d'initier une réponse immunitaire contre les parasites et d'engager une réponse immunitaire anti-tumorale dans des modèles de cancer murins comme par exemple des modèles de mélanome sous-cutané ou pulmonaire (Lu et al., 2012; Purwar et al., 2012; Vegran et al., 2014). En revanche, les cellules Th9 favorisent l'inflammation allergique et sont impliquées dans la physiopathologie de plusieurs maladies auto-immunes. Ce rôle potentiellement préjudiciable chez l'Homme pose donc la question de la pertinence du ciblage thérapeutique des lymphocytes Th9 et/ou de l'IL-9. C'est dans ce but qu'a été développé

l'Enokizumab ou MEDI-528, un anticorps humanisé neutralisant l'IL-9. Cet anticorps semble prometteur dans la diminution des symptômes de patients adultes atteints d'asthme léger à modéré (Parker et al., 2011; White et al., 2009). Cependant, aucun effet positif du traitement par MEDI-528 n'a été montré chez des patients atteints d'asthme sévère (Oh et al., 2013), semblant indiquer une dépendance moins forte à l'IL-9 de l'asthme sévère. Le ciblage de l'IL-9 n'a, à l'heure actuelle, pas d'autre indication en médecine humaine. Cependant, comme des niveaux augmentés d'IL-9 ont été constatés précocement chez des enfants atteints de maladie atopique et que son augmentation est associée avec des changements rapides de la sensibilité des voies respiratoires (Sarria et al., 2014; Yao et al., 2013), le profil d'innocuité acceptable des anticorps anti-IL-9 pourrait constituer une alternative thérapeutique précoce chez les enfants à haut risque pour limiter le développement des maladies atopiques. Par ailleurs, la récente description des lymphocytes Th9 dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ouvre de nouvelles voies de développement du ciblage pharmacologique de l'IL-9 pour la prise en charge de la maladie de Crohn ou de la rectocolite hémorragique (Gerlach et al., 2014; Nalleweg et al., 2015).

Dans le cancer, la récente mise en évidence dans des modèles précliniques d'une activité anti-tumorale accrue des lymphocytes Th9 par rapport aux autres sous-types T helper tels que les lymphocytes Th1 (jusqu'ici considérés comme les champions dans la lutte immunitaire contre le cancer), constitue un fait nouveau et surprenant (Lu et al., 2012; Purwar et al., 2012; Vegran et al., 2014). Les effets anti-tumoraux des cellules Th9 semblent directement provenir de l'effet de l'IL-9, dans la mesure où cette cytokine est capable d'induire l'apoptose des cellules cancéreuses comme par exemple les cellules de mélanome (Purwar et al., 2012). Parallèlement, une action indirecte de l'IL-9 a également été mise en évidence puisque l'administration d'IL-9 recombinante ralentit la croissance du mélanome B16-F10 chez des souris immunocompétentes mais aussi chez des souris *RAG1*$^{-/-}$ (dépourvues de lymphocytes T et B) suggérant donc que l'IL-9 peut avoir une action sur d'autres cellules, non lymphocytaires, comme les mastocytes (perte de l'effet anti-tumoral de l'IL-9 chez des souris déficientes en mastocytes). Par ailleurs, dans un modèle de métastases pulmonaires, l'administration d'anticorps neutralisant l'IL-9 induit une diminution significative de l'infiltration tumorale par des lymphocytes T CD4^{+} et CD8^{+} et par des cellules dendritiques. Au sein de la tumeur, les lymphocytes Th9 induisent en effet la production de la chimiokine CCL20 reconnue par le récepteur CCR6 exprimé par les cellules T CD4^{+}, CD8^{+} et par les DC favorisant ainsi leur chimioattraction au niveau du site tumoral (Lu et al., 2012). D'autre part, les lymphocytes Th9 générés *in vitro* produisent de grandes quantités d'IL-3, cytokine impliquée dans l'induction de la prolifération de la lignée myéloïde. L'IL-3 sécrétée par les cellules Th9 pourrait donc favoriser l'augmentation de la survie des cellules dendritiques. Il a été ainsi montré que lorsque ces cellules

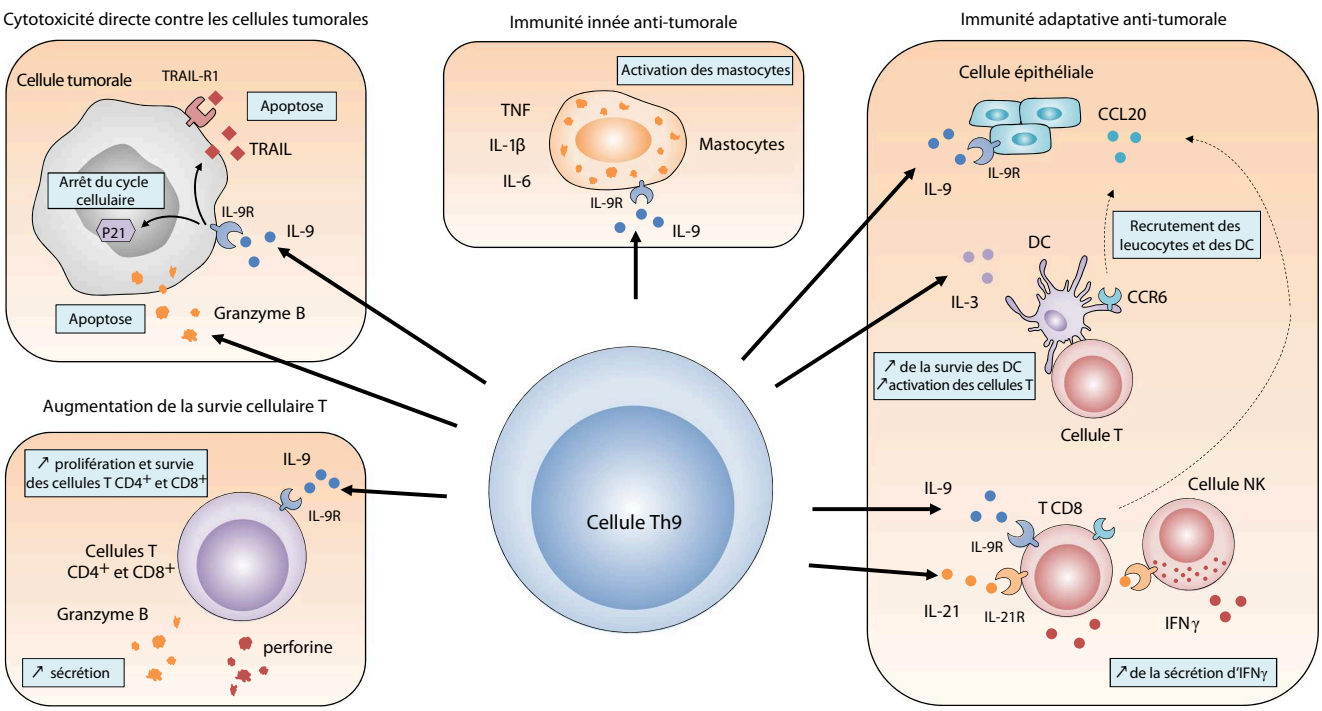


Figure 16. Effets pléiotropiques des lymphocytes Th9 dans l'immunité anti-tumorale.
Adapté de (Rivera Vargas et al., 2017).

myéloïdes sont cultivées en présence de surnageant de lymphocytes Th9 (et donc activées par l'IL-3 produite et contenue dans le surnageant) puis transférées à des souris porteuses de tumeurs, elles induisent une augmentation de la production d'IFNγ par les lymphocytes T de ces souris (Park et al., 2014) (**Figure 16**, p. 76).

On retrouve également un effet inhibiteur de l'IL-9 sur la progression tumorale chez l'Homme, comme par exemple dans le cas du mélanome HTB-72, où l'IL-9 induit une augmentation de l'expression de p21 (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) et de TRAIL dans ces cellules (Fang et al., 2015; Rivera Vargas et al., 2017). Cependant, dans les leucémies et les lymphomes comme dans certains modèles animaux, l'IL-9 produite par les lymphocytes Th9 peut avoir un rôle pro-tumoral *via* la stimulation des cellules cancéreuses et en réduisant également l'efficacité de la réponse immunitaire anti-tumorale (Lemoli et al., 1997). Ces résultats apparaissant contradictoires avec ceux évoqués précédemment, et pourraient dépendre de la nature de la tumeur étudiée et d'autres facteurs qui restent encore aujourd'hui à déterminer.

Enfin, la polarisation murine Th9 par les cytokines conventionnelles, TGF-β et IL-4, en présence de la cytokine pro-inflammatoire IL-1β, induit une production accrue d'IL-9 mais également une sécrétion abondante d'IL-21. Il a été mis en évidence que la présence d'IL-1β lors de la différenciation Th9 permet d'augmenter significativement l'activité anti-tumorale des lymphocytes Th9 ainsi différenciés par rapport à celle de Th9 conventionnels. Cette activité anti-tumorale dépend ainsi de la production d'IL-21 puisque l'adjonction d'anticorps bloquant l'IL-21 la neutralise totalement contrairement à celle des Th9 conventionnels, qui reste dépendante de la présence d'IL-9 (Vegran et al., 2014). L'IL-21 est en effet une cytokine pléiotropique qui influence l'activité et la fonctionnalité de nombreux types cellulaires : les lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, les cellules Th17 et Treg, les cellules NK et NKT, les lymphocytes B ainsi que les cellules dendritiques et les macrophages (Davis et al., 2015). Cette cytokine potentialise ainsi l'activité anti-tumorale des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et des cellules NK en stimulant leur capacité de sécrétion d'IFNγ et en augmentant leur capacité tumoricide (Croce et al., 2015) (**Figure 16**, p. 75). L'expression d'IL-21 dans les Th9 humains a déjà été observée, indépendamment de leur activité anti-tumorale, dans une étude où ces lymphocytes ont été différenciés en présence de cytokines inflammatoires telles que l'IL-1β, les interférons de type I (IFNα et β), l'IL-10 mais aussi l'IL-21 (Wong et al., 2010).

Cependant, de nombreux points restent à confirmer et à approfondir : on peut en effet se demander si les observations obtenues avec les lymphocytes Th9 murins sont transposables aux Th9 humains, et si d'autres cytokines inflammatoires, comme les interférons de type 1, ont un effet supérieur à celui de l'IL-1β sur la promotion de l'activité anti-tumorale des Th9. Il serait donc intéressant vu les capacités anti-tumorales des lymphocytes Th9 décrites chez la souris de définir les

caractéristiques de ces cellules chez l'Homme et d'envisager de développer et de tester des stratégies thérapeutiques visant à stimuler voire à amplifier les effets anti-tumoraux de ces cellules.

On le voit donc, les différents sous-types lymphocytaires T CD4$^+$ peuvent avoir des rôles très différents voire opposés dans un contexte de cancer. De nombreux travaux cliniques menés chez des patients porteurs de cancer vont d'ailleurs dans ce sens. Dans cette troisième partie, nous illustrerons ce point en prenant l'exemple des cancers du sein, sur lesquels nous avons travaillé lors de cette thèse.

III. Importance pronostique et prédictive des lymphocytes T dans les cancers : le cas du cancer du sein

Le microenvironnement d'une tumeur se définit comme un ensemble de compartiments cellulaires associés aux cellules cancéreuses : vasculaire, stromal, épithélial, neuro-endocrine et immunitaire. Ces compartiments forment ainsi un ensemble hétérogène, dynamique et communicant (Hanahan and Weinberg, 2011), dont l'importance sur le développement tumoral est progressivement mis en évidence depuis les quinze dernières années.

Des analyses phénotypiques précises des populations immunitaires extraites de tumeurs ont permis de montrer que les tumeurs solides humaines présentent une infiltration immunitaire polymorphe et variable d'un patient à l'autre, et d'un type tumoral à l'autre. Globalement, toutes les populations de cellules immunitaires peuvent être retrouvées dans l'infiltrat tumoral : granulocytes, macrophages, cellules NK, MDSC, mastocytes, cellules dendritiques, lymphocytes T et lymphocytes B. Tous ces types cellulaires peuvent être localisés au sein de la tumeur, au niveau du front d'invasion tumoral ou dans des structures adjacentes telles que les structures lymphoïdes tertiaires (TLS : *Tertiary Lymphoid Structures*). L'impact de ce microenvironnement immunitaire sur l'évolution tumorale est donc progressivement mis en lumière depuis quelques années, avec plusieurs niveaux de complexité pour interpréter les résultats. Parmi toutes les populations immunes infiltrant les tumeurs, c'est incontestablement vers les lymphocytes que la majorité des travaux de recherche précliniques et cliniques se sont dirigés, d'abord dans des variétés tumorales comme le mélanome, le cancer de l'ovaire et du colon. Progressivement, les interactions significatives de ces lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs : *Tumor Infiltrating Lymphocytes*) avec le pronostic, et même avec la sensibilité aux traitements anti-cancéreux, a été mis en lumière dans d'autres types de tumeurs, supposées initialement non « immunogènes », au premier rang desquelles le cancer du sein.

Un grand nombre de publications attestent depuis les années 1980 de la valeur pronostique favorable de la présence au site tumoral d'une forte densité en TILs. Dès 1986, J.R. Jass démontrait pour la première fois qu'une forte densité lymphocytaire évaluée sur coupe histologique dans le front d'invasion de tumeurs rectales était un facteur pronostique indépendant de la classification TNM qui est le système international de classification des cancers selon leur extension anatomique sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N) et à distance pour d'éventuelles métastases (M) (Jass, 1986). La connaissance du niveau d'infiltration immunitaire

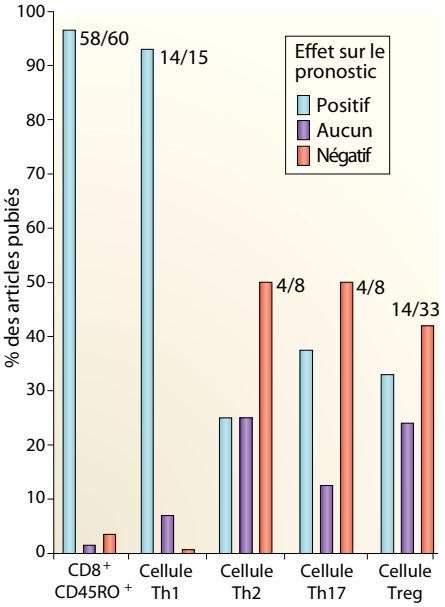


Figure 17. Association de l'infiltration des cellules immunitaires avec le pronostic dans différents types de cancer.

Graphique représentant l'analyse de 124 articles publiés étudiant l'impact des cellules T $CD8^+$ cytotoxiques, des cellules T mémoires, des lymphocytes T régulateurs et des sous-types T $CD4^+$ (Th1, Th2 et Th17) sur le pronostic des patients (Notons que 20 types de cancers différents ont été analysés). Cette étude montre un rôle positif des lymphocytes T $CD8^+$, des cellules T mémoires ainsi que des lymphocytes Th1. Cependant, elle met en évidence que les cellules Th2, Th17 et Treg ne sont pas clairement associées à un bon ou à un mauvais pronostic. Adapté de (Fridman et al., 2012).

tumoral permettait ainsi de préciser le pronostic des patients en complément des critères d'extension tumoraux. C'est également ainsi que les études pionnières menées sur les tumeurs issues de patients pris en charge pour des mélanomes malins, ont montré à la fin des années 1980, sur de grosses cohortes de patients, une meilleure survie globale et sans rechute chez les patients dont la tumeur était fortement infiltrée par les TILs (Chaitchik et al., 1987; Clark et al., 1989; Clemente et al., 1996; Mihm et al., 1996; Shimokawara et al., 1982). Progressivement, parallèlement à la description successive et à la meilleure connaissance des différentes populations composant le système immunitaire, ces constatations sont venues s'enrichir par la description du rôle pronostique respectif de ces différentes populations, et ont donc apporté une dimension qualitative et non plus seulement quantitative au rôle pronostique de ces stigmates d'immunosurveillance au sein des tumeurs humaines. L'ensemble des populations T $CD4^+$ helper ainsi que les lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs cytotoxiques peuvent s'observer au sein du microenvironnement tumoral. Les différentes orientations fonctionnelles lymphocytaires T sont associées à des significations pronostiques différentes, parfois opposées pour une même orientation fonctionnelle suivant le type histologique de la tumeur, voire même pour un même cancer suivant le stade d'évolution tumoral (Fridman et al., 2012). À l'inverse, il est par exemple maintenant assez bien établi que la présence de cellules myéloïdes suppressives et de macrophages de type 2 dans l'infiltrat tumoral favorise la progression tumorale quel que soit le sous-type et le stade de tumeur considéré (Gabrilovich et al., 2012; Longphre et al., 1999).

Ces corrélations entre les niveaux d'infiltration des cellules immunitaires et le devenir clinique des patients a été investiguée chez l'Homme dans la plupart des variétés tumorales : c'est ainsi que la forte valeur pronostique favorable associée à la présence de TILs a été confirmée dans les cancers de l'ovaire (Zhang et al., 2003), de la tête et du cou (Badoual et al., 2006), de la vessie (Nakakubo et al., 2003), du sein (Mahmoud et al., 2011a), du foie (Wada et al., 1998), de la prostate (Karja et al., 2005), du poumon (Dieu-Nosjean et al., 2008) et du côlon (Tao et al., 2012) (Résumé dans (Becht et al., 2016)).

Concernant le phénotype des TILs, il est maintenant admis que tous les composants lymphocytaires T ne présentent pas tous la même signification pronostique. Une revue récente a en effet synthétisé l'impact des lymphocytes T sur l'issue clinique des patients à partir de 124 articles publiés et analysant 20 types de cancers différents (Fridman et al., 2012) (résumé dans **Figure 17**, p. 80). Ainsi, une forte infiltration intra-tumorale en lymphocytes T $CD3^+$ et T $CD8^+$ cytotoxiques et en cellules T $CD45RO^+$ mémoires est en général corrélée dans la littérature à un meilleur pronostic (en termes de survie sans rechute, voire de survie globale) (Fridman et al., 2012). Il est en de même pour l'infiltration intra-tumorale des lymphocytes Th1 qui est, dans la majorité des cas, associée à une

meilleure survie des patients dans le cancer colorectal (Galon et al., 2006; Tosolini et al., 2011), de l'ovaire (Kusuda et al., 2005; Marth et al., 2004), du sein (Gu-Trantien et al., 2013; Kristensen et al., 2012) et le carcinome hépatocellulaire (Chew et al., 2012; Gao et al., 2011) entre autre. Il faut tout de même noter que la densité des cellules T $CD8^+$ semble corrélée à un mauvais pronostic dans les cancers du rein hormis lorsque l'on prend en compte les lymphocytes T $CD8^+$ prolifératifs ou présentant une faible expression de points de contrôle immunologique, également appelés « *Immune checkpoints* » tels que PD-1 et LAG-3 (Giraldo et al., 2015; Nakano et al., 2001). Il s'agit là d'une illustration parmi tant d'autres, de la complexité des processus d'immunosurveillance, d'immunoédition et d'immunosubversion, et de leur impact pronostique potentiel en fonction du type de tumeur considéré.

Depuis cette revue de littérature de 2012, les connaissances sur l'impact clinique d'une infiltration en lymphocytes T $CD8^+$ au sein de la tumeur ont été implémentées avec plus de 60 nouveaux articles publiés sur ce sujet. C'est ainsi que la corrélation entre l'augmentation de l'infiltration en cellules T $CD8^+$ et un meilleur pronostic des patients a récemment été décrit dans des cancers non étudiés jusqu'à présent comme les tumeurs des voies biliaires (Goeppert et al., 2013), mais également au niveau de sites métastatiques tels que le poumon (série de métastases pulmonaires) (Remark et al., 2013) ou le système nerveux central (série de métastases cérébrales) (Kluger et al., 2015).

Contrairement aux effets plutôt favorables d'une forte infiltration lymphocytaire T $CD8^+$ cytotoxique, Th1 ou T mémoire, l'impact des autres populations lymphocytaires T ($CD4^+$ helper notamment) sur le pronostic clinique des patients a été beaucoup moins fréquemment caractérisé, ou donne lieu éventuellement à des résultats discordants en fonction du contexte tumoral (**Tableau 2**, p. 85). Le cas des lymphocytes T régulateurs est un parfait exemple de résultats en apparence contradictoires. Une étude pionnière, menée par l'équipe de W. Zou en 2004, a démontré que la présence d'un nombre élevé de cellules T $CD3^+$ $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ dans les ascites malignes de carcinome ovarien était positivement corrélée au degré d'extension tumoral et à une survie réduite (Curiel et al., 2004). Le constat que des cellules T suppressives étaient susceptibles d'avoir un effet délétère sur le pronostic clinique des patients fut adopté par la communauté scientifique et fut renforcé par des études menées sur le mélanome (Miracco et al., 2007; Mougiakakos et al., 2010), le cancer du poumon (Petersen et al., 2006; Tao et al., 2012), du pancréas (Hiraoka et al., 2006), du foie (Fu et al., 2007; Gao et al., 2007) et du sein (Merlo et al., 2009) avec des résultats allant dans le même sens. Cependant, d'autres études ont par la suite mis en évidence une valeur pronostique favorable de la présence des lymphocytes T $CD3^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$ dans le cancer colorectal (Michel et al., 2008; Salama et al., 2009; Tosolini et al., 2011), ovarien (Leffers et al., 2009; Milne et al., 2009),

de la tête et du cou (Badoual et al., 2006; Zhang et al., 2010), de la vessie (Winerdal et al., 2011) et dans les lymphomes de Hodgkin (Carreras et al., 2006; Tzankov et al., 2008). Les raisons pouvant expliquer ces résultats contradictoires sont sans doute multiples : l'infiltrat en lymphocytes T régulateurs est souvent concomitant à celui des cellules T effectrices et la valeur pronostique positive associée aux Treg pourrait être en partie un reflet indirect de la présence bénéfique des cellules effectrices au site tumoral (non forcément étudiées dans ces travaux). Par ailleurs, l'impact positif sur le pronostic des lymphocytes Treg dans les cancers ORL et du colon pourrait aussi être la conséquence d'un meilleur contrôle de l'inflammation chronique pro-tumorale (et de mauvais pronostic) souvent retrouvée au sein du microenvironnement de ces cancers (Badoual et al., 2006; Ladoire et al., 2011a). De façon plus générale, les marqueurs histologiques phénotypiques utilisés pour identifier les cellules suppressives sont très souvent imparfaits, ne reflétant que partiellement la fonctionnalité des différents sous-types de populations.

En ce qui concerne les lymphocytes Th2, ces cellules ont pour rôle de favoriser l'activation des lymphocytes B, la production d'anticorps et la synthèse d'IL-10, qui est une cytokine plutôt immunosuppressive. Ceci semble être plutôt en accord avec les travaux relatifs aux liens Th2/agressivité des tumeurs et mauvais pronostic, conduits dans le cancer de l'ovaire (Kusuda et al., 2005), du pancréas (De Monte et al., 2011) et de l'estomac (Ubukata et al., 2010). Cependant, là encore, il a été montré qu'une infiltration immunitaire de type Th2 est associée à un devenir clinique plus favorable dans les lymphomes de Hodgkin et le cancer du sein (Schreck et al., 2009; Yoon et al., 2010). Il faut tout de même garder à l'esprit que les lymphocytes Th1 et Th2 ont initialement été décrits comme mutuellement antagonistes, c'est-à-dire que les cytokines Th2, et surtout l'IL-4, inhibent le développement d'une réponse Th1. Ainsi, une forte réponse immunitaire polarisée Th2 au site tumoral va altérer le développement d'une réponse Th1 cytotoxique et les chimiokines présentes dans le microenvironnement tumoral ne seront pas propices à l'attraction de lymphocytes Th1.

Bien que le rôle des lymphocytes Th17 dans les maladies auto-immunes et les infections ait été largement décrit, l'impact des Th17 au cours du processus tumoral reste compliqué à établir (Ye et al., 2013). Une infiltration tumorale par des lymphocytes Th17 a été détectée dans de nombreuses variétés de cancers : ovaire, pancréas, prostate, cancers gastriques ou colorectaux et la valeur pronostique associée à cet infiltrat est variable en fonction du cancer et du stade de la maladie. Ainsi, il a été montré chez les patients atteints de cancer de la prostate qu'une forte infiltration en lymphocytes Th17 est associée à une progression plus lente de la maladie (Sfanos et al., 2008), alors qu'un résultat inverse est observé si le cancer de prostate est résistant à la castration (Derhovanessian et al., 2009). Les cellules Th17 semblent également limiter la progression du cancer de l'ovaire (Kryczek et al., 2009; Redjimi et al., 2012), du cancer de l'œsophage (Lv et al., 2011) et des

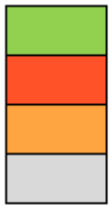
cancers gastriques (Chen et al., 2011). À l'inverse, les lymphocytes Th17 sont classiquement associés à un mauvais pronostic dans le cancer colorectal (Tosolini et al., 2011), du poumon (Chen et al., 2010) et le carcinome hépatocellulaire (Zhang et al., 2009). L'observation d'une telle dichotomie peut être liée à la nature versatile des lymphocytes Th17. La plasticité de ces cellules leur confère ainsi la capacité de se redifférencier en lymphocytes T régulateurs suppresseurs ou de façon alternative en lymphocytes Th1-like pro-inflammatoires capables d'activer les cellules effectrices cytotoxiques du système immunitaire (Bettelli et al., 2006). Le phénotype fonctionnel des lymphocytes Th17 pourrait ainsi être diversement influencé par la nature variable du microenvironnement tumoral et donc par le type et le stade de cancer étudié (Guery and Hugues, 2015).

L'impact pronostique des lymphocytes TFh n'a été jusqu'alors que peu étudié et caractérisé. Il a tout de même été observé qu'une forte densité de lymphocytes TFh au niveau des structures lymphoïdes tertiaires était corrélée avec une survie prolongée dans le cancer colorectal (Bindea et al., 2013) et dans le cancer du sein (Gu-Trantien et al., 2013).

Enfin, l'implication directe des lymphocytes Th9 humains dans les cancers reste incertaine. Il a été montré que le nombre de cellules Th9 était augmenté dans les épanchements pleuraux malins comparé au niveau sanguin et que l'augmentation de cellules Th9 au niveau pleural pouvait prédire une diminution de la survie des patients atteints d'épanchements pleuraux malins (Ye et al., 2012). Cette observation apparait en opposition avec les autres études suggérant les fonctions anti-tumorales des lymphocytes Th9. Il a en effet été mis en évidence la présence de Th9 dans des lésions métastatiques de patients atteints de mélanome. Cependant, les lymphocytes Th9 s'avèrent être moins abondants au niveau des lésions métastatiques qu'au niveau de parties saines de la peau et une diminution de la sécrétion d'IL-9 au niveau de ces zones est également observée (Purwar et al., 2012). Les lymphocytes Th9 humains pourraient donc jouer un rôle protecteur dans le développement de mélanome. De manière intéressante, il a été récemment montré que l'IL-9 favorisait la survie et les fonctions des cellules T $CD4^+$ et $CD8^+$ double positives retrouvées au niveau des TILs de mélanome, supportant donc l'hypothèse que cette cytokine pourrait amplifier les réponses immunitaires anti-tumorales en favorisant la croissance et la survie des lymphocytes T dans le mélanome chez l'Homme (Parrot et al., 2016).

Tableau 2. Association des infiltrats lymphocytaires avec le pronostic de différents types de cancer. D'après (Fridman et al., 2012).

	CD45RO$^+$	T CD8$^+$	Th1	Th2	Th9	Th17	Treg	Tfh
Cancer du poumon								
Cancer de la vessie								
Cancer de l'ovaire								
Cancer colorectal								
Carcinome hépatocellulaire								
Cancer gastrique								
Mélanome								
Cancer de l'œsophage								
Cancer de la prostate								
Cancer du pancréas								
Cancer de la tête et du cou								
Cancer rénal								
Lymphome de Hodgkin								
Cancer du sein								



Bon pronostic
Mauvais pronostic
Bon ou mauvais pronostic
Non déterminé

Il semble donc établi chez l'Homme que l'infiltration tumorale en cellules immunitaires (et particulièrement les lymphocytes T) constitue un stigmate d'immunosurveillance, mais également pour certaines sous-populations, d'immunosubversion.

Nous allons dans ce cadre nous intéresser plus particulièrement aux cancers du sein et voir l'importance de ces signes de réponse immunitaire in situ *pour le pronostic, mais aussi pour la prédiction de la réponse aux traitements des cancers du sein.*

1. Épidémiologie et classification moléculaire des cancers du sein

a) Épidémiologie des cancers du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier chez la femme à l'échelle mondiale. Toutefois, son incidence et sa mortalité diminuent d'année en année. La prévalence mondiale est de 99,7 cas pour 100 000 femmes (soit 0,99%) et on estime le taux de mortalité à 16 cas (soir 0,16%) par an.

En France, 54 062 nouveaux cas de cancer du sein ont été diagnostiqués en 2015 et on estime le nombre de décès à 11 913 soit 18,2% des décès par cancer chez la femme. L'âge moyen au diagnostic était de 60 ans et l'âge médian au moment du décès était de 73 ans avec une survie nette standardisée sur l'âge à 5 ans de 87% et à 10 ans de 76% pour les patientes diagnostiquées entre 2005 et 2012.

On constate cependant une diminution du taux d'incidence (- 1,5 par an en moyenne entre 2005 et 2012) ainsi qu'une diminution du taux de mortalité équivalent à celle du taux d'incidence. Le taux de mortalité diminue donc d'année en année et cela peut être expliqué en partie par l'amélioration des traitements et surtout par un dépistage du cancer du sein de plus en plus adapté au niveau de risque de chaque femme, qui permet de diagnostiquer ces cancers à un stade précoce. Ainsi, la prise en charge est de plus en plus efficace et repose entre autre sur la classification des différents sous-types tumoraux, permettant de définir les thérapeutiques les plus adaptées pour chaque type de cancer du sein.

Les facteurs de risque non génétiques identifiés dans le cancer du sein sont : des menstruations précoces (avant 15 ans) et/ou une ménopause tardive (après 55 ans), l'absence de grossesse ou une première grossesse tardive (après 35 ans), l'utilisation de traitements hormonaux de substitution ou de contraceptifs oraux, l'alcool, l'inactivité physique et l'obésité ou le surpoids après 50 ans (Danaei et al., 2005; Lacey et al., 2009).

On estime à environ 15% des cancers du sein présentant un apparenté du premier degré atteint. Parmi ces 15% de cancers à risque familial, on retrouve des facteurs de risque d'origine génétique à forte pénétrance (c'est-à-dire avec une probabilité de cancer si une mutation est présente) tels que les mutations des locus de BRCA1 et BRCA2 et les mutations de p53, PTEN, LKB1 et CDH1, permettant d'expliquer les syndromes familiaux associés au cancer du sein (Couch et al., 2014). Cependant, les syndromes familiaux restent minoritaires (22 cas de mutations BRCA1/2 pour 1000 cancers du sein par exemple) par rapport au nombre de cas de cancer du sein se développant chez des patientes ne présentant pas de facteurs de risque génétiques héréditaires connus.

b) Classification moléculaire des cancers du sein

Avant les années 2000, l'hétérogénéité des cancers du sein était essentiellement basée sur une classification anatomo-pathologique de l'OMS avec 21 types de carcinomes infiltrants. Cette classification morphologique où les carcinomes canalaires infiltrants sont prédominants (environ 80%) ne tient pas compte de la biologie et de ce fait a une utilité limitée pour la prise en charge thérapeutique. Néanmoins, l'expression des récepteurs hormonaux (RO (Récepteurs aux Oestrogènes) & RP (Récepteur à la Progestérone)) et de HER2 sont pris en compte pour le choix thérapeutique (facteurs pronostiques et prédictifs).

Le développement des analyses génomiques (analyses des niveaux d'expression des ARN complétées par les analyses ADN pan génomiques) permet d'analyser simultanément l'expression de nombreux gènes, de faire un « portait » de chaque tumeur et de mettre ainsi en lumière l'hétérogénéité biologique des tumeurs du sein. T. Sorlie et C.M. Perou (Sorlie et al., 2001) ont été les premiers, en 2001, à subdiviser les cancers du sein en fonction du profil d'expression génique et ainsi à décrire à partir d'une liste de gènes différents exprimés entre les types tumoraux et nommée « signature intrinsèque » le sous-type luminal A (25 à 40% des cas) et B (20 à 25% des cas), le sous-type HER2 (15 à 18% des cas), le sous-type basal-like (15 à 18% des cas) et le sous-type normal-like, ce dernier sous-type étant vraisemblablement un artéfact lié à une forte contamination des premiers profils d'expression génique et n'ayant pas de réelle traduction en pathologie. Les sous-types Claudin-low (Perou et al., 2000), HER2-enriched (Prat et al., 2014) et apocrines (Farmer et al., 2005) ont été ensuite individualisés. Cette signature intrinsèque en sous-types apporte des informations pertinentes en termes de pronostic, d'épidémiologie, de réponse à l'hormonothérapie et à la prédiction de réponse aux traitements ciblés anti-HER2.

- **Luminal A** ; ce sous-type est caractérisé par le niveau d'expression le plus élevé des RO et des gènes régulés par les RO (GATA-3, FOXA1) et une faible expression des gènes liés à la prolifération (expression de Ki-67 faible). La mutation de p53 est de l'ordre de 15%. En pratique clinique, il s'agit des carcinomes exprimant les récepteurs aux œstrogènes, de grade I ou II et avec un index de prolifération faible.

- **Luminal B** ; ce sous-type est caractérisé par un niveau d'expression plus faible des RO & RP, des gènes régulés par les RO et une forte expression des gènes liés à la prolifération (expression de Ki-67 élevée). La mutation de p53 est de l'ordre de 65%. En pratique clinique, il s'agit des carcinomes exprimant les récepteurs aux œstrogènes, de grade II ou III et avec un index de prolifération élevé.

- **HER2** ; ce sous-type est caractérisé par une expression forte de l'amplicon de HER2, dont HER2 et GR7 avec une expression des RO (RO+) ou non (RO-). Il existe le plus souvent une expression élevée des gènes liés à la prolifération et une mutation de p53 de l'ordre de 70%.

- **HER2-enriched** ; ce sous-type décrit par A. Prat et ses collègues avec une expression nulle des RO (RO-) correspond à 45% des tumeurs HER2+ et est caractérisé par une expression élevée des protéines HER2/EGFR et phospho-(p)-HER2/p-EGRF (Prat et al., 2014). Ce sous-type est un facteur prédictif important d'une réponse avec un double blocage anti-HER2 en l'absence de chimiothérapie.

- **Claudin-low** ; ce sous-type décrit par C.M. Pérou et ses collègues correspond à 5-10% des cancers du sein, caractérisé par RO- RP- HER2- avec un enrichissement important des marqueurs de la transition épithélio-mésenchymateuse, des gènes en rapport avec la réponse immunitaire et des profils de cellules souches.

- **Basal-like** ; ce sous-type est caractérisé par un très faible niveau d'expression des gènes des RO, HER2 associé à une forte expression des gènes tels que les cytokératines (CK) 5,6,17, EGFR, laminine, FAB7 et des gènes liés à la prolifération tumorale. En complément sur le plan génomique, ces carcinomes basal-like présentent de nombreuses altérations génomiques avec plusieurs gains et pertes de segments chromosomiques, des mutations de p53 dans presque 100% des cas et très souvent une inactivation somatique du gène BRCA1. Sur le plan morphologique, ils sont de type canalaire, le plus souvent de grade III avec un index mitotique élevé. Sur le plan immunophénotypique, il s'agit le plus souvent de cancers du sein dit triple-négatifs (RO-, RP-, HER2-) avec l'expression des cytokératines de haut poids moléculaire (5, 6, 17 et/ou EGFR). La majorité des carcinomes (environ 85%) survenant dans un contexte de mutation constitutionnelle héréditaire BRCA1 partage les caractéristiques moléculaires, morphologiques et immunophénotypiques de ce sous-type basal-like.

- **Les carcinomes apocrines** ; ce sous-type RO- et RP- présente une signature avec activation de la voie de signalisation des récepteurs androgéniques (RA).

- **Les cancers du sein triple-négatifs : RO-, RP-, HER2-** ; il ne s'agit pas d'un sous-type issu d'une classification moléculaire mais d'une individualisation issue d'une définition immunophénotypique : l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et d'HER2. De plus les cancers basal-like ne sont pas à 100% triple-négatifs et inversement tous les cancers triple-négatifs ne sont pas tous du sous-type basal-like.

B.D. Lehman et al. ont ainsi proposé une classification moléculaire transcriptomique des cancers triple-négatifs avec 6 sous-types et de potentielles implications cliniques (**Tableau 3**, p. 89) (Lehmann et al., 2016).

Tableau 3. Classification moléculaire transcriptomique des cancers triple-négatifs. D'après (Lehman et al., 2016).

Sous-type	Génomique	Potentielles applications cliniques
Basal-like 1 **BL1**	Altération de la réparation de l'ADN Prolifération cellulaire	Sels de platine Inhibiteurs de PARP
Basal-like 2 **BL2**	Signalisation p53, EGFR, MET	Inhibiteurs de mTor Inhibiteurs de la transmission du signal
Immunomodulatory **IM**	Signalisation immunologique	Sels de platine Inhibiteurs de PARP Inhibiteurs de PD-1, PD-L1
Mesenchymal **M**	EMT, Wnt, TGFbeta, IRFR, Notch Prolifération cellulaire	Inhibiteurs de mTor Inhibiteurs de la transmission du signal Inhibiteurs de Src
Mesenchymal **MSL**	EMT, Wnt, TGFbeta, MAPK, PI3K, PGDF	Inhibiteurs de mTor Inhibiteurs de la transmission du signal Inhibiteurs de PI3K et de MEK
Luminal Androgen Receptor **LAR**	Signalisation AR, FOXA1, HER4	Anti-androgènes

Les mêmes auteurs ont effectué, à partir de 374 échantillons, une comparaison directe entre les sous-types intrinsèques PAM50 et cette classification moléculaire en sous-types des cancers du sein triple-négatifs. Comme anticipé, la majorité des cancers du sein triple-négatifs est classée basal-like par le PAM50 (80,6%). Cependant un nombre significatif est classé dans d'autres catégories : normal-like (14,6%), luminal B (3,5%), luminal A (1,1%), et HER2 (0,2%). À l'exception des sous-types MSL et LAR, tous les autres sous-types sont classé basal-like. Pour le sous-type MSL, environ 50% sont basal-like, 27,8% sont normal-like, 13,9% sont luminal B, et le reste, 8%, est HER2 et luminal A. Au contraire des autres sous-types, le sous-type LAR est classé comme HER2 (74,3%) et luminal B (14.3%).

En conclusion, le consensus de St Gallen propose la classification suivante :

1. Luminal A: RO et/ou RP positif, HER2-, Ki-67 bas ; *hormonothérapie*
2. Luminal B (HER2-): RO et/ou RP positif, HER2-, Ki-67 élevé ; *hormonothérapie – chimiothérapie*
3. Luminal (HER2+): RO et/ou RP positif, HER2+, Ki-67 bas/élevé ; *anti-HER2, chimiothérapie*

4. HER2+ enriched (non luminal): RO et/ou RP négatif, HER2+ ; *anti-HER2 (double blocage), chimiothérapie*
5. Triple-négatif: RO et/ou RP négatif, HER2- ; *chimiothérapie*

2. Impact du système immunitaire et des lymphocytes T infiltrant les tumeurs sur l'évolution des cancers du sein

À l'inverse du mélanome ou du carcinome rénal, le rôle de la réponse immunitaire dans les cancers du sein a longtemps recueilli peu de considération ; ce type de tumeur était historiquement considéré comme faiblement immunogénique. Toutefois, comme dans beaucoup d'autres variétés de cancers, le système immunitaire est, comme nous l'avons vu, susceptible de jouer un double rôle dans les différentes et successives étapes du développement tumoral des cancers du sein. Il existe en effet des preuves précliniques et également en clinique humaine, d'une immunosurveillance, capable d'éviter l'émergence ou de limiter le développement des cancers du sein : la présence d'un infiltrat immun plus ou moins important dans les cancers du sein peut logiquement être interprétée comme l'un des stigmates le plus évident de cette tentative d'immunosurveillance. La réponse immunitaire anti-tumorale peut également être compromise soit *via* un phénomène d'immunosélection soit lors des processus actifs d'immunosubversion. Ces deux phénomènes permettront alors l'échappement de la tumeur à la reconnaissance et à l'éradication des cellules tumorales par le système immunitaire de l'hôte.

Par ailleurs, des observations cliniques au niveau du sang périphérique permettent également d'illustrer l'impact du système immunitaire dans le cancer du sein : des patientes porteuses de tumeurs mammaires (notamment à un stade avancé) montrent des signes biologiques d'immunosuppression. La lymphopénie a constitué historiquement une des premières observations cliniques reflétant une interaction tumeur/système immunitaire délétère au cours de l'évolution des cancers du sein (Caras et al., 2004). Il a d'ailleurs été montré que la profondeur de la lymphopénie constituait un facteur indépendant de survie plus courte, au cours de la maladie métastatique (Ray-Coquard et al., 2009). Par ailleurs, il a été également observé une diminution marquée du nombre de NKT circulants ainsi que de l'activité de la voie de signalisation STAT1 et de la production d'IFNγ par les lymphocytes T ou les cellules NK du sang circulant de patientes atteintes d'un cancer du sein (Konjevic et al., 2011; Molling et al., 2005). En faveur de processus actifs d'immunosubversion, il est montré depuis plusieurs années que les patientes porteuses d'un cancer du sein ont un nombre de cellules immunorégulatrices, telles que les lymphocytes T régulateurs ou les MDSC, plus important dans le sang périphérique que les sujets sains ; ce nombre est d'autant plus élevé plus la masse

tumorale est importante (Diaz-Montero et al., 2009; Wolf et al., 2003). Il existe donc un faisceau d'arguments cliniques en faveur de la réalité des phénomènes d'immunosurveillance/ immunosubversion chez des patientes porteuses d'un cancer du sein, et certains de ces phénomènes peuvent donc être captés au niveau du sang périphérique.

Parallèlement, l'étude récente de signatures transcriptomiques tumorales a permis de mettre en évidence un pronostic plus favorable pour les patientes avec une tumeur exprimant plutôt une signature Th1 ou de cytotoxicité (Desmedt et al., 2008; Finak et al., 2008; Kristensen et al., 2012). Il a également été mis en évidence qu'une signature moléculaire de 8 gènes, correspondant à une signature TFh permet de prédire la survie des patientes (Gu-Trantien et al., 2013). *A contrario*, le recrutement de cellules myéloïdes suppressives au niveau du site tumoral ainsi que l'augmentation des niveaux d'ARN et de protéines spécifiques de ces cellules sont associés à une diminution de la survie globale (Drews-Elger et al., 2014). Il a également été décrit que les formes agressives de cancer du sein (triple-négatif ou HER2+) présentent ainsi plus fréquemment une signature immunologique Th2, que Th1 (Kristensen et al., 2012). Cependant, pour ces deux sous-types moléculaires, l'existence d'une signature immunologique favorable semble avoir une valeur pronostique particulièrement importante lorsqu'elle est présente (Desmedt et al., 2008; Ignatiadis et al., 2012; Schmidt et al., 2008; Teschendorff et al., 2007). Les cancers du sein triple-négatifs ou HER2+ semblent donc être les formes dans lesquelles le système immunitaire tient la plus grande importance pronostique, par rapport au sous-type luminal.

Très récemment, l'équipe de l'institut Jules Bordet a réalisé des études *in silico* sur les profils d'expression génique provenant de 7270 échantillons de tumeurs mammaires pour lesquelles le suivi clinique était connu. Cette étude met en évidence l'augmentation de l'infiltration tumorale en macrophages de type M0 et M1, en lymphocytes Treg et TFh comparativement à du tissu mammaire sain (Bense et al., 2017). Par ailleurs, en termes de survie sans récidive, il est montré qu'une infiltration en mastocytes activés, en macrophages de type M0, en lymphocytes Treg est associée à une moins bonne survie, tandis que la présence au niveau tumoral de macrophages de type M1, de lymphocytes T$\gamma\delta$ et de cellules T $CD4^+$ mémoires activées ou de plasmocytes est quant à elle associée à un meilleur pronostic (Bense et al., 2017). Il faut tout de même noter qu'aucune de ces études que ce soit sur des tumeurs fraiches, ou inclues en paraffine, n'a jusqu'alors décrit un rôle pronostique significatif des lymphocytes Th17 ou Th9.

Ces méthodes d'évaluation de l'infiltration immunitaire par des techniques d'expression génique sont de plus en plus utilisées, et ont pour avantage d'assez bien refléter le phénotype et la fonctionnalité des différentes populations de TILs, mais restent du domaine de la recherche, car non standardisées et reposant sur une infrastructure bio-informatique non disponible de façon large. Les

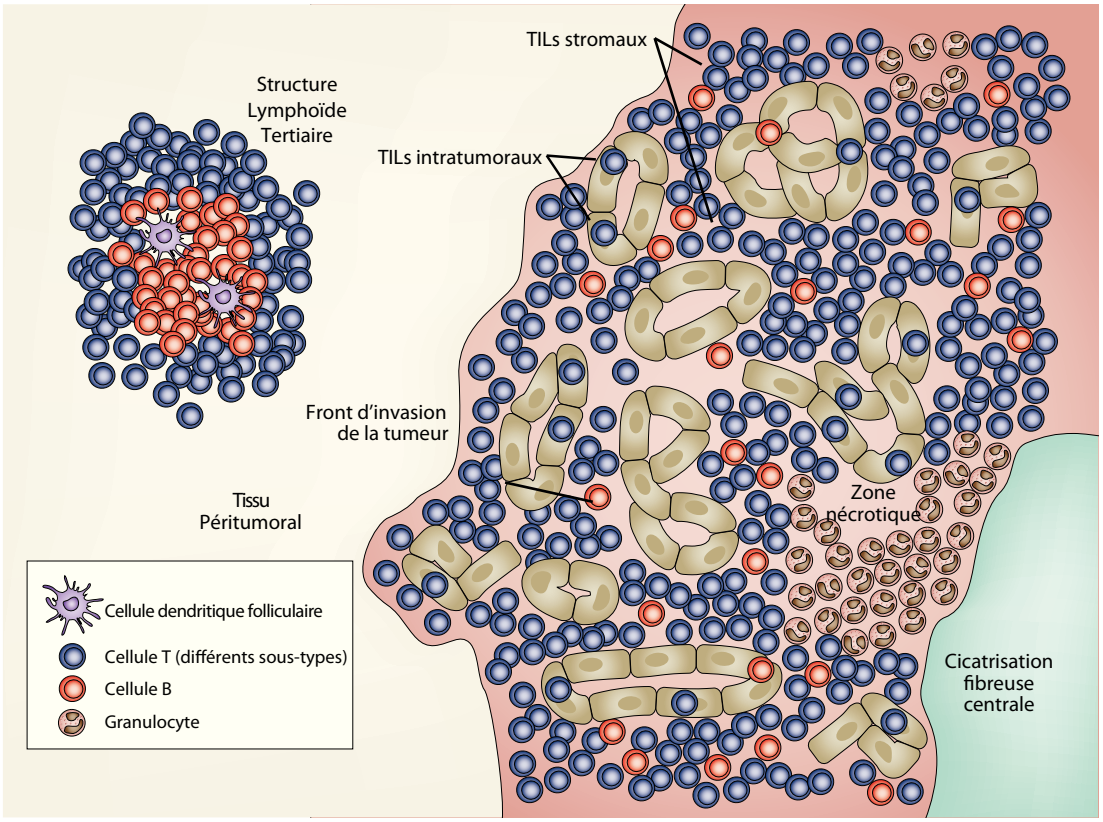


Figure 18. Schéma du microenvironnement immunitaire dans le cancer du sein.
Les lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs) peuvent être détectés dans les tumeurs du sein dans le tissu stromal adjacent à la tumeur (appelés dans ce cas les TILs stromaux) ou infiltrant activement des zones tumorales et en contact direct avec des cellules tumorales (appelés alors TILs intratumoraux). Les TILs sont composés de lymphocytes cytotoxiques ($CD8^+$) et de lymphocytes T helper ($CD4^+$), de cellules B, de cellules dendritiques folliculaires et de granulocytes. Adapté de (Savas et al., 2016).

méthodes morphologiques *in situ* (historiquement les premières utilisées) gardent donc tout leur intérêt, notamment pour la mise en lumière de l'organisation spatiale de la réponse immunitaire au sein de la tumeur, et des interactions entre les différentes populations composant la tumeur. Par ailleurs, dans le cancer du sein, ces méthodes morphologiques histo-pathologiques ont fait l'objet d'un récent consensus visant à standardiser les méthodes d'évaluation de l'infiltration en TILs (Salgado et al., 2015b).

En ce qui concerne l'infiltration lymphocytaire des cancers du sein et plus particulièrement les TILs, cette infiltration est donc le plus souvent quantifiée par une analyse morphologique *in situ* sur coupe de tissu tumoral inclus en paraffine et colorée par l'hématoxyline-éosine-safran (HES). Les TILs regroupent les lymphocytes matures, les cellules lymphoplasmocytoïdes et les plasmocytes infiltrant les tumeurs. Dans les cancers du sein, ils peuvent s'organiser, en fonction de la tumeur étudiée, au sein du stroma tumoral, soit en formant un infiltrat diffus, soit des foyers de forte densité. Rarement ils sont au contact des cellules cancéreuses, disséminés entre elles (TILs intra-tumoraux), mais le plus souvent ils infiltrent le stroma entre les foyers de cellules cancéreuses (TILs stromaux), voire très souvent à distance du tissu tumoral (soit entourant celui-ci en couronne périphérique, ou bien formant des amas dans le tissu sain péri-tumoral) (**Figure 18**, p. 92).

Le rôle pronostique favorable d'une forte infiltration en TILs est suspecté dans le cancer du sein depuis l'individualisation anatomo-pathologique des carcinomes médullaires du sein, tumeurs rares, mais d'excellents pronostics spontanés (malgré leur haut grade histologique), et très fortement infiltrées en lymphocytes. La relation entre ce bon pronostic et un haut niveau en TILs a depuis toujours été évoqué (à l'instar des tumeurs colorectales de phénotype MSI). Il faut toutefois attendre les années 2000 pour que d'autres travaux morphologiques évaluant les TILs dans le cancer du sein, viennent réveiller ce concept, et l'élargir aux carcinomes non médullaires : ainsi, en 2009, sur une grande cohorte de patientes traitées par chirurgie seule, E.A. Rakha et ses collègues montrent que les patientes traitées pour un cancer du sein de haut grade mais riche en TILs présentaient une meilleure survie sans rechute et une meilleure survie globale que celles avec un cancer de grade intermédiaire mais avec peu de TILs (Rakha et al., 2009). L'absence de traitement adjuvant permet ici de démontrer le rôle typiquement pronostique positif d'une forte densité en TILs dans l'histoire naturelle du cancer du sein.

Par la suite, plusieurs larges études rétrospectives menées sur le matériel biologique de patientes inclues dans des essais prospectifs en situation adjuvante ont permis après 2010, d'une part de confirmer l'impact pronostique de la densité en TILs (tout spécialement en TILs stromaux) corrélée quantitativement linéairement dans ces études à la survie sans rechute, voire à la survie globale (Adams et al., 2014; Dieci et al., 2015; Loi et al., 2014; Loi et al., 2013; Perez et al., 2016), et

d'autre part de mettre en lumière que l'importance pronostique des TILs dans les cancers du sein localisés était significatif quasi exclusivement dans les sous-types triple-négatifs et HER2+ (avec des résultats plus hétérogènes dans ce dernier sous-type). Ces résultats significatifs dans les sous-types triple-négatifs et HER2+ corroborent d'ailleurs les données transcriptomiques préalablement décrites. Ces grandes études prennent en compte les TILs de façon globale, évalués quantitativement sur coupe de tissu tumoral colorée par l'HES. D'autres études se sont intéressées à l'influence pronostique de différents sous-types de TILs (détectés en général à l'aide d'un marquage immunohistochimique). L'équipe d'A.R. Green a ainsi montré, sur une large série de patientes, que la présence de lymphocytes T $CD8^+$ au niveau de la tumeur avait une valeur pronostique favorable indépendante sur la survie des patientes suggérant donc la capacité de ces cellules cytotoxiques à promouvoir une réponse immunitaire anti-tumorale au site tumoral (Mahmoud et al., 2011a). Ces données CD8 ont été confirmées récemment par la publication de l'analyse du matériel tumoral provenant de 4 essais adjuvant et incluant plus de 12 000 patientes : la présence d'un infiltrat T $CD8^+$ stromal est associée à une réduction importante du risque de décès par cancer du sein, là encore de façon très significative dans les sous-types triple-négatifs et HER2+. Les TILs $CD8^+$ stromaux n'ont par contre pas d'impact pronostique dans les formes RH+/HER2-. De la même manière, il a été mis en évidence qu'une forte infiltration tumorale en lymphocytes B ou en cellules NK avait également un impact pronostique favorable en termes de survie (Mahmoud et al., 2012a; Mamessier et al., 2011). La présence sur les pièces opératoires de cancers du sein de veinules à endothélium haut (VEH, qui sont les vaisseaux où siège la diapédèse leucocytaire et qui permettent ainsi l'infiltration lymphocytaire au niveau des tumeurs) est significativement associée à une forte infiltration lymphocytaire T et B, et à une meilleure survie sans récidive de la maladie (Martinet et al., 2011). À l'inverse, la présence d'une forte infiltration tumorale en lymphocytes T régulateurs $Foxp3^+$ (Bates et al., 2006; Gobert et al., 2009; Mahmoud et al., 2011b) ou en macrophages $CD68^+$ (DeNardo et al., 2009; Mahmoud et al., 2012b) ont été décrites comme significativement associée à un moins bon pronostic clinique dans le cancer du sein. De façon intéressante, dans l'étude princeps de Bates sur le rôle pronostique péjoratif des lymphocytes Treg $Foxp3^+$, la densité en Treg était significativement associée à des critères clinico-pathologiques de mauvais pronostic, mais surtout l'effet pronostique négatif était restreint aux sous-types RH+. Par la suite, des résultats contradictoires sur le rôle des Treg dans le cancer du sein sont venus complexifier les analyses pronostiques en révélant une étroite corrélation entre la densité en T $CD8^+$ et en Treg $Foxp3^+$, et donc par là même, l'existence de formes de cancers du sein fortement infiltrés en Treg mais aussi en T $CD8^+$ et de bon pronostic (West et al., 2013). Dans ce cadre d'études des différents sous-types de TILs, la balance entre densité de cellules immunitaires favorables à la réponse immunitaire anti-tumorale, et densité en cellules

immunorégulatrices, pourrait être importante à prendre en considération (ratio $CD8^+/Foxp3^+$ par exemple, à l'instar de ce qui est publié pour d'autres sous-types tumoraux).

Ainsi, il existe actuellement un grand engouement scientifique pour étudier les TILs dans les cancers du sein. Les données publiées sur de larges séries sont en effet convergentes dans les sous-types HER2+ et surtout triple-négatifs, qui sont des sous-types agressifs pour lesquels les cliniciens manquent de facteurs de stratification pronostique pour adapter les traitements. Ces études ont ainsi pu mettre en lumière le caractère probablement immunogénique de ces sous-types de cancers du sein, ouvrant la voie au développement de nouvelles immunothérapies (inhibiteurs de checkpoints de la réponse immunitaire) dans ces variétés de mauvais pronostic. Par ailleurs, à l'heure de la biologie moléculaire, la quantification des TILs apparait être une méthode peu couteuse, robuste et reproductible d'un laboratoire à l'autre, notamment grâce à l'important effort de standardisation de cette évaluation qui a été fait par les pathologistes impliqués dans le diagnostic des cancers du sein (Salgado et al., 2015b).

3. Rôle prédictif de l'infiltration lymphocytaire dans les cancers du sein

Au-delà d'un rôle purement pronostique, l'étude de prélèvements issus de tumeurs du sein traitées par chimiothérapie néoadjuvante a également permis de mettre en évidence un rôle prédictif des TILs dans le cancer du sein. Le groupe de pathologistes allemands mené par C. Denkert a en effet montré une interaction significative entre l'importance de la densité en TILs et la qualité de la réponse tumorale à un traitement néoadjuvant (Denkert et al., 2010) : la probabilité d'obtention d'une réponse histologique complète (RHC) à la chimiothérapie était en effet d'autant plus grande que la présence de TILs était importante. La RCH était ainsi particulièrement fréquente (plus de 40%) pour les tumeurs du sein dans lesquelles le stroma tumoral était occupé à plus de 50-60% par des TILs (concept de *Lymphocyte Predominant Breast Cancer* : LPBC), faisant ainsi apparaitre un sous-type de cancer du sein particulièrement sensible à la chimiothérapie. D'autres publications sont venues étayer ce concept en montrant à chaque fois un lien significatif entre réponse au traitement néoadjuvant et densité en TILs (Denkert et al., 2015; Issa-Nummer et al., 2013; Ono et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012). Encore une fois, et par analogie au setting pronostique en adjuvant, ce concept apparait particulièrement valide pour les cancers du sein triple-négatifs, mais pas pour les tumeurs luminales (sauf peut-être pour les rares patientes avec une tumeur RH+ de phénotype LPBC). Les résultats sont quant à eux contrastés pour les tumeurs HER2+, avec un caractère prédictif inconstant, parfois non retrouvé (Bianchini et al., 2015; Salgado et al., 2015a; Schneeweiss et al.,

2013), peut être en rapport avec l'utilisation de plusieurs thérapies ciblées anti-HER2 qui pourraient moduler différemment la réponse immunitaire *in situ*. À cet égard, il faut signaler que les études morphologiques (densité en TILs) ou transcriptomiques (signature « réponse immunitaire » fortement exprimée) menées sur des tumeurs HER2+ et traitées en néoadjuvant par chimiothérapie seule retrouvent clairement un lien avec l'obtention d'une RHC (Ignatiadis et al., 2012; Yamaguchi et al., 2012).

Concernant le type de TILs et leur aspect prédictif en néoadjuvant, il existe beaucoup moins d'étude que concernant l'aspect pronostique en adjuvant, mais là encore la littérature laisse apparaitre qu'un fort ratio initial $CD8^+/Foxp3^+$ constitue un facteur prédictif d'obtention de la RHC (Miyashita et al., 2014; Nabholtz et al., 2014; Nabholtz et al., 2016).

Une autre preuve des interactions chimiothérapie/réponse immunitaire *in situ* réside dans les études qui se sont intéressées à la modification de la densité en TILs dans les tumeurs avant et après chimiothérapie néoadjuvante. Il apparait en effet dans certaines tumeurs un recrutement des TILs après application d'une chimiothérapie néoadjuvante, particulièrement dans le cas de forte réduction tumorale sous traitement (Demaria et al., 2001), ce qui pourrait suggérer la contribution d'une réponse immunitaire induite par la chimiothérapie dans l'efficacité du traitement et donc peut être dans le pronostic à plus long terme. Ainsi, en dépit de l'absence de RCH, plusieurs études ont montré que l'existence d'un fort infiltrat en TILs sur la pièce opératoire après chimiothérapie néoadjuvante constituait un facteur pronostique de meilleure survie sans rechute (Dieci et al., 2014). Là encore, qualitativement parlant, ce meilleur pronostic est retrouvé si un ratio $CD8^+/Foxp3^+$ élevé est retrouvé sur la pièce opératoire après chimiothérapie néoadjuvante (Ladoire et al., 2011b; Miyashita et al., 2014).

Ainsi, la situation néoadjuvante permet de recourir au biomarqueur TILs pour avoir une information prédictive quant à l'efficacité de la chimiothérapie à venir (sur la biopsie tumorale initiale), et une information pronostique (sur le reliquat tumoral de la pièce opératoire). L'année dernière, une étude a démontré que les TILs sont un marqueur prédictif fort de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante dans tous les sous-types moléculaires du cancer du sein sur une cohorte de plus de 3500 patientes. Cet effet prédictif se traduit par une survie sans récidive augmentée dans les tumeurs HER2+ et triple-négatives. À l'inverse, ce bénéfice sur la survie n'est pas observé dans les cancers du sein de type luminal suggérant ainsi une biologie différente de l'infiltrat immunologique dans ce sous-type moléculaire (Denkert et al., SABCS 2016, S1-09).

IV. Objectifs des travaux de thèse

Le travail de recherche de l'équipe du Pr. Ghiringhelli a pour objectif de mieux caractériser les liens entre système immunitaire et cancer, et plus particulièrement de mieux comprendre le rôle des lymphocytes T helper dans la progression tumorale. De précédents résultats obtenus dans notre équipe ont ainsi démontré le rôle majeur joué par le système immunitaire dans l'effet thérapeutique de traitements anti-cancéreux tels que la chimiothérapie (Bruchard et al., 2013; Limagne et al., 2016; Vincent et al., 2010). Par ailleurs, un autre axe développé dans l'équipe consiste à étudier l'implication des lymphocytes T helper $CD4^+$ dans les réponses immunitaires anti-tumorales. Mon travail de thèse s'inscrit précisément au sein de cet axe puisque nous nous sommes tout particulièrement intéressés à étudier l'infiltration tumorale de différents sous-types de lymphocytes T helper ainsi qu'à déterminer leur rôle pronostique dans les cancers du sein.

L'équipe a mis en évidence que le contexte cytokinique jouait un rôle majeur sur les fonctions suppressives des lymphocytes Th17 murins. En effet, la présence de TGF-β lors de la différenciation des cellules Th17 réprime l'expression du facteur Gfi-1 qui inhibe, quant à lui, l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 à la surface de ces cellules. Ainsi, les lymphocytes Th17 différenciés en présence d'IL-1β, d'IL-6 et d'IL-23 et en absence de TGF-β n'expriment pas les ectonucléotidases et ne sont pas immunosuppresseurs. Par ailleurs, le transfert adoptif de lymphocytes Th17 murins différenciés en présence de TGF-β et d'IL-6 favorise la progression tumorale de manière CD39 dépendante, confirmant donc que l'expression des ectonucléotidases leur confère *in vivo* des capacités immunosuppressives dans un contexte de cancer (Chalmin et al., 2012). Les objectifs de mon premier travail de thèse ont été de déterminer si les résultats obtenus chez la souris étaient transposables à l'Homme. Il nous a donc paru intéressant d'étudier chez l'Homme les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des lymphocytes Th17 dans les cancers du sein, d'explorer un éventuel effet immunosuppressif adénosine dépendant, et d'évaluer si ces cellules peuvent être impliquées dans le pronostic des patientes traitées à visée curative pour un cancer du sein.

Le projet suivant s'est inscrit dans la continuité de ce premier travail et des résultats obtenus au sein de l'équipe sur la mise en évidence de cibles pharmacologiques permettant d'inhiber la polarisation des lymphocytes Th17. Comme nous avons démontré que les lymphocytes Th17 différenciés en présence d'IL-6 et de TGF-β présentaient des propriétés immunosuppressives dépendantes des ectonucléotidases CD39 et CD73 chez la souris et chez l'Homme (Chalmin et al., 2012; Thibaudin et al., 2016), nous avons tenté de mettre en évidence de potentielles cibles pharmacologiques qui conduiraient à l'inhibition de la différenciation Th17. Nous nous sommes donc

intéressés à étudier le rôle de l'activation pharmacologique de la désacétylase SIRT1, qui en désacétylant STAT3 pourrait limiter sa fonction de facteur de transcription et ainsi avoir un impact sur la polarisation des lymphocytes Th17 *in vitro* et *in vivo,* et à évaluer son potentiel thérapeutique chez la souris. Nous avons également cherché à déterminer *ex vivo* chez l'Homme l'impact d'une telle activation afin de proposer l'utilisation d'agents thérapeutiques capables de limiter la différenciation des lymphocytes Th17 dans un contexte de cancer.

Enfin, les recherches que nous menons actuellement sont orientées sur l'étude des lymphocytes Th9 dans les cancers du sein. Des résultats obtenus très récemment dans l'équipe ont démontré que les propriétés effectrices des lymphocytes Th9 murins pouvaient être potentialisées en présence d'IL-1β et de manière IRF1 dépendante et que ces cellules présentaient des propriétés anti-tumorales *in vivo* (Vegran et al., 2014). L'objectif de ce dernier projet est de déterminer si le phénotype Th9 est retrouvé chez l'Homme et d'étudier le rôle de l'IL-1β dans la potentialisation des propriétés effectrices de ces cellules. Pour finir, nous avons étudié le rôle pronostique des lymphocytes Th9 dans les cancers du sein afin d'envisager une utilisation potentielle en immunologie anti-tumorale.

RÉSULTATS

Projet 1

Human ectonucleotidase-expressing CD25^{high} Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions

Depuis leur caractérisation phénotypique et fonctionnelle, de nombreux travaux précliniques ont montré l'importance des lymphocytes Th17 dans la pathogénie de maladies inflammatoires ou auto-immunes (maladie de Crohn, sclérose en plaque, psoriasis ou encore spondylarthropathies), notamment *via* le rôle pro-inflammatoire de l'IL-17 (van den Berg and Miossec, 2009). En revanche, le rôle potentiel des lymphocytes Th17 dans le développement des cancers et la réponse immunitaire anti-tumorale reste à l'heure actuelle largement méconnu. Toutefois, alors qu'il s'agit d'une sous-population lymphocytaire quantitativement rare chez l'animal ou le sujet sain, la proportion de Th17 parmi le pool des lymphocytes T est significativement plus importante dans le sang, la moelle osseuse et la rate d'animaux porteurs de tumeur maligne. De récents travaux chez l'Homme semblent confirmer ces résultats : ainsi, la proportion de Th17 est plus importante chez les patients porteurs de cancer ORL ou de mélanome malin que chez les individus sains (Su et al., 2010).

Malgré ces observations préliminaires, le rôle fonctionnel et éventuellement pronostique des lymphocytes Th17 dans les cancers reste débattu, essentiellement en raison de résultats précliniques contradictoires. Il a en effet été montré que les lymphocytes Th17 sont reliés à au mauvais pronostic et pourraient favoriser la progression tumorale dans le cancer de l'estomac et dans le myélome multiple (Iida et al., 2011; Prabhala et al., 2010). À l'inverse, ces cellules semblent limiter la progression tumorale dans le cancer de la prostate grâce à une action anti-tumorale (Sfanos et al., 2008).

Plus récemment, il a été démontré chez la souris l'existence de deux sous-types lymphocytaires Th17 : les lymphocytes Th17 générés en présence d'IL-6 et de TGF-β qui expriment, sous la dépendance de ces deux cytokines majeures du microenvironnement tumoral, les ectonucléotidases CD39 et CD73 qui sont capitales pour la génération d'adénosine et favorisent ainsi la diminution des fonctions effectrices des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$, et qui sont alors capables de favoriser la croissance tumorale alors que les lymphocytes Th17 différenciés en absence de TGF-β n'expriment pas les ectonucléotidases CD39 et CD73 et n'ont alors aucun rôle sur la croissance tumorale (Chalmin et al., 2012).

Des recherches menées chez l'Homme ont montré que les cellules Th17 humaines se distinguent des cellules Th1 et Th2 par leur expression du récepteur de chémokine CCR6 (Sallusto et al., 2012). En outre, il a été observé que parmi les cellules $CCR6^+$ sécrétrices d'IL-17A, certains lymphocytes T $CD4^+$ étaient également sécréteurs d'IFNγ alors que d'autres ne sécrétaient que de l'IL-17A. Ainsi, deux sous-types lymphocytaires T $CD4^+$ $CCR6^+$ sécréteurs d'IL-17A ont été identifiés, l'un exprimant également le récepteur CXCR3 (qui est le récepteur spécifique des cellules Th1) et sécrétant de l'IFNγ et l'autre exprimant seulement le récepteur CCR6 (Acosta-Rodriguez et al., 2007).

Dans ce contexte, il nous a paru important d'étudier chez l'Homme les caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques des lymphocytes Th17 chez des patients porteurs de cancer. Nous avons choisi d'étudier les Th17 humains chez des patientes porteuses de cancer du sein (rôle non exploré jusqu'à présent dans la littérature sur les TILs et le cancer du sein), afin de déterminer si ces cellules peuvent présenter des propriétés immunosuppressives dépendantes des ectonucléotidases CD39 et CD73 et enfin d'évaluer si les cellules Th17 peuvent jouer un rôle pronostique chez les patientes atteintes de cancer du sein localisés.

OncoImmunology 5:1, e1055444; January 2016; © 2016 Taylor & Francis Group, LLC

Human ectonucleotidase-expressing CD25^{high} Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions

Marion Thibaudin[1,2,4], Marie Chaix[3,4], Romain Boidot[1,2,3], Frédérique Végran[1,2,3], Valentin Derangère[1,2], Emeric Limagne[1,2], Hélène Berger[1,2], Sylvain Ladoire[1,2,3], Lionel Apetoh[1,2,3,5,*], and François Ghiringhelli[1,2,3,5,*]

[1]UMR866; INSERM; Dijon, France; [2]Faculté de Médecine; Université de Bourgogne; Dijon, France; [3]Department of Medical Oncology; Centre Georges François Leclerc; Dijon, France

[4]MT and MC share first co-authorship.
[5]LA and FG share senior co-authorship.

Keywords: breast cancer, Th17, prognosis, ectonucleotidase

Th17 cells contribute to the development of some autoimmune and allergic diseases by driving tissue inflammation. However, the function of Th17 cells during cancer progression remains controversial. Here, we show that human memory CD25^{high} Th17 cells suppress T cell immunity in breast cancer. Ectonucleotidase-expressing Th17 cells accumulated in breast cancer tumors and suppressed CD4$^+$ and CD8$^+$ T cell activation. These cells expressed both Rorγt and Foxp3 genes and secreted Th17 related cytokines. We further found that CD39 ectonucleotisase expression on tumor-infiltrating Th17 cells was driven by TGF-βand IL-6. Finally, immunohistochemical analysis of localized breast cancer revealed that high-tumor infiltration by IL-17$^+$ cells was associated with a poor clinical outcome and impeded the favorable effect of high CD8$^+$ infiltration. Altogether, these findings suggest that intratumoral Th17 cells compromise anticancer immune responses in breast cancer patients.

Introduction

Th17 cells are a new population of CD4$^+$ T cells involved in cancer immunomodulation.[1] These cells are characterized by their capacity to produce IL-17A and IL-17F, but also IL-10, IL-21, IL-22 and TNFα and require the transcription factors RORγt and RORα for their development.[2] In humans, Th17 cells are characterized by the expression of the chemokine receptor CCR6.[3] While Th17 cells were initially identified in the context of autoimmune responses, we and others have demonstrated that these cells were present in mouse and human cancers.[4-7] However, their role in cancer still remains controversial. Adoptive transfer of tumor specific Th17 cells in mouse models demonstrated their potent anticancer activity.[8] In human ovarian cancer high expression of IL-17 is also associated with a favorable clinical outcome.[9] In contrast, other reports have shown that Th17-derived IL-17A could favor cancer progression because of its capacity to promote vascular endothelial growth factor (VEGF) production and tumor angiogenesis.[10,11] We have also previously reported the immunosuppressive functions and the protumorigenic role of murine Th17 lymphocytes.[4] We found that TGF-β and IL-6 drove the differentiation of naive mouse CD4$^+$ T cells into Th17 cells that expressed the ectonucleotidases CD39 and CD73.[4] These enzymes degrade extracellular ATP into the immunosuppressive molecule adenosine. Accordingly, we found that Th17 could suppress T cell immune responses and promote tumor growth through adenosine. Whether this immunosuppressive pathway is also relevant in human cancer has however remained elusive.

In the present study, we focused our interest on human localized breast cancer (LBC). We observed a specific accumulation of ectonucleotidase-expressing Th17 cells in breast tumors. These cells were found to suppress T cell activation and are associated with poorer prognosis.

Results

Foxp3$^+$ Th17 cells accumulate in locally advanced breast cancer

We analyzed the frequency of helper memory CD4$^+$ T cells that were isolated from periheral blood mononuclear cells (PBMCs) of patients with breast cancers and healthy individuals (**Table S1** summarizes the clinical characteristic of the patients). Frequency of memory T cell subpopulations was determined using their chemokine receptor expression[12] (**Fig. S1**). In the CD25^{high} population, we observed CCR6 negative and positive populations that respectively shared Treg and Th17 profiles based on expression of transcription factor and cytokine

*Correspondence to: Lionel Apetoh; Email: lionel.apetoh@inserm.fr; fghiringhelli@cgfl.fr
Submitted: 02/20/2015; Revised: 05/21/2015; Accepted: 05/22/2015
http://dx.doi.org/10.1080/2162402X.2015.1055444

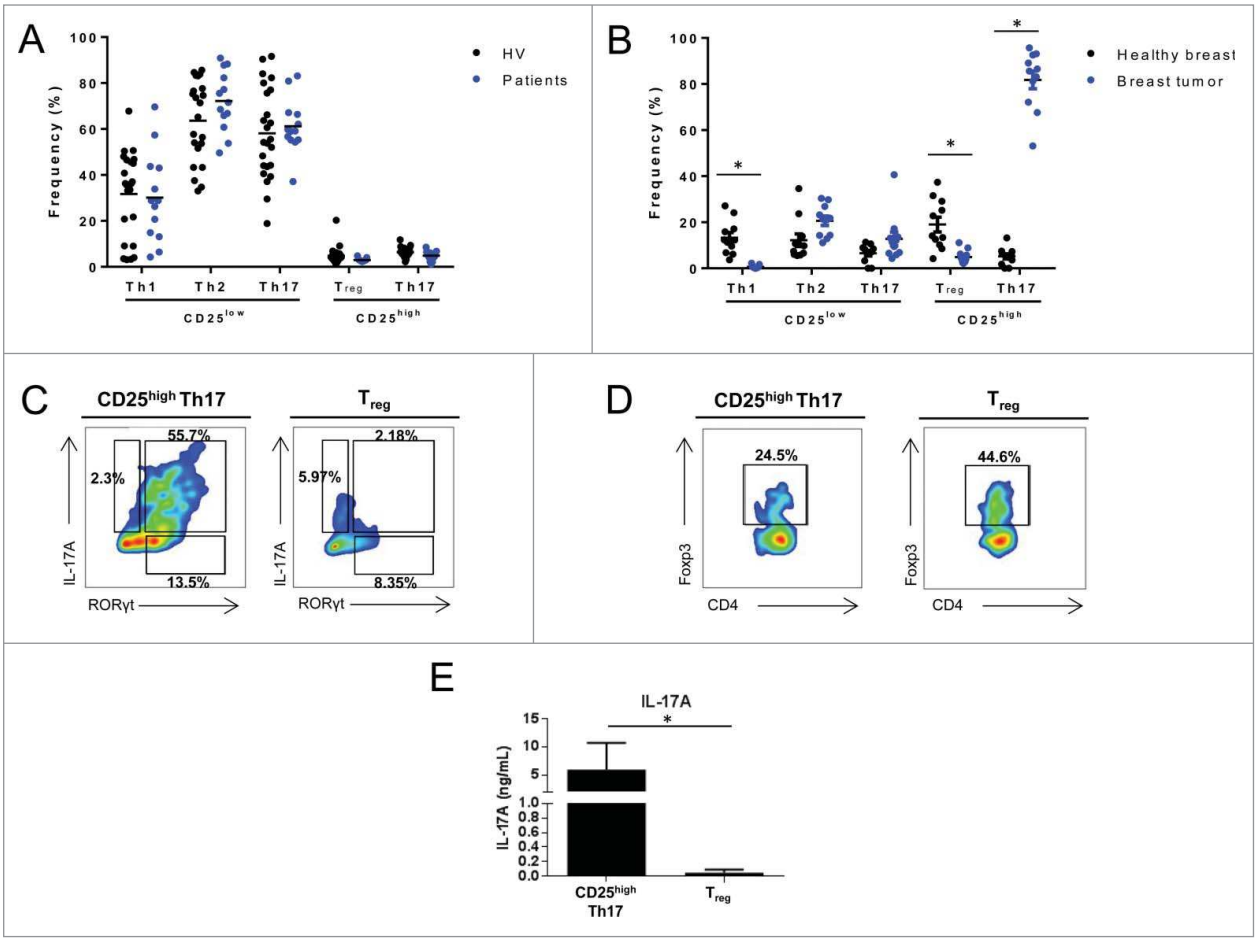


Figure 1. Th17 cells accumulate in locally invasive breast cancer. (**A**) PBMCs from HV or breast cancer patients (patients) were stained with anti-CD4$^+$, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CCR4, anti-CXCR3, anti-CD25 antibodies and analyzed by flow cytometry. The frequency of memory CD4$^+$ (CD45RA$^-$, CD4$^+$) Th1 (CD25^{low}, CCR6$^-$, CXCR3$^+$), Th2 (CD25^{low}, CCR6$^-$, CXCR3$^-$, CCR4$^+$), Th17 (CD25^{low}, CCR6$^+$, CXCR3$^-$), CD25^{high} Th17 (CD25^{high}, CCR6$^+$, CXCR3$^-$) and Treg (CD25^{high}, CCR6$^-$, CXCR3$^-$) cells is depicted. The data presented represent the analyses performed on 23 HVs and 13 breast cancer patients. (**B**) CD4$^+$ lymphocytes from breast tumors (n =13) or normal breast tissue (n = 12) were analyzed as in (**A**). The frequency of memory CD4$^+$ T cells is depicted. (**C**) Tumor infiltrating CD25^{high} Th17 cells and Treg cells were analyzed for IL-17 and RORγt expression by intracellular staining. Numbers beside outlined areas indicate percent cells in gate. (**D**) Tumor infiltrating CD25^{high} Th17 cells and Treg cells were analyzed for Foxp3 expression by intracellular staining. Numbers beside outlined areas indicate percent cells in gate. (**E**) Tumor infiltrating CD25^{high} Th17 and Treg cells sorted from breast tumors were restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies and IL-17A secretion was assessed by ELISA after 3 d. Representative data from one of at least three independent experiments are shown (**C–F**). *$p < 0.05$

production (**Fig. S2**). In CD25^{low} population, we isolated CCR6$^-$ CXCR3$^+$, CCR6$^-$ CXCR3$^-$ CCR4$^+$ and CCR6$^+$ CXCR3$^-$ populations that respectively shared Th1, Th2 and Th17 profiles (**Fig. S2**). We did not detect frequency variation of memory helper CD4$^+$ T cell population in PBMCs (**Fig. 1A**). We then analyzed the frequency of T helper cell populations in 12 samples of normal breast tissue and 13 breast tumors (**Table S1**). We observed an enrichment of CD4$^+$ T cell infiltration in tumor compared to non-tumor breast tissue. In addition, we observed an accumulation of CD25^{high} expressing Th17 cells in the tumor tissues in comparison to normal breast tissue (**Fig. 1B**) or blood (**Fig. S3**). We confirmed that these CD25^{high} CCR6$^+$ tumor-infiltrating cells are Th17 cells, as they express RORγt and IL-17A (**Fig. 1C**). These cells also co-expressed Foxp3, and are hereafter referred to as CD25^{high} Th17 cells (**Fig. 1D**). After restimulation CD25^{high} Th17 cells but not Treg produce IL-17A (**Fig. 1E**). We confirmed that CD25^{high} Th17 cells from PBMCs produce and express other Th17 related cytokines such as IL-17F, IL-21, IL-22, IL-10 and TNFα (**Fig. S4**). Together, these data demonstrate a specific accumulation of CD25^{high} Th17 cells in the tumor bed of human breast cancer.

CD25$^+$ Th17 cells express ectonucleotidases

We have tested the expression of ectonucleotidases in CD4$^+$ memory subsets in PBMC from healthy volunteers (HV). We observed that more than 50% of Foxp3$^+$ Treg and CD25^{high} Th17 cells but less than 15% of Th1, Th2 and CD25^{low} Th17 cells expressed CD39 (**Figs. 2A, B**). We also observed that tumor-infiltrating Th17 cells expressed high levels of CD39 (**Figs. 2C,D**). CD73 expression could not be detected on Treg and Th17 cells using flow cytometry, however immunofluorescence revealed its submembrane location on both cell types[13,14]

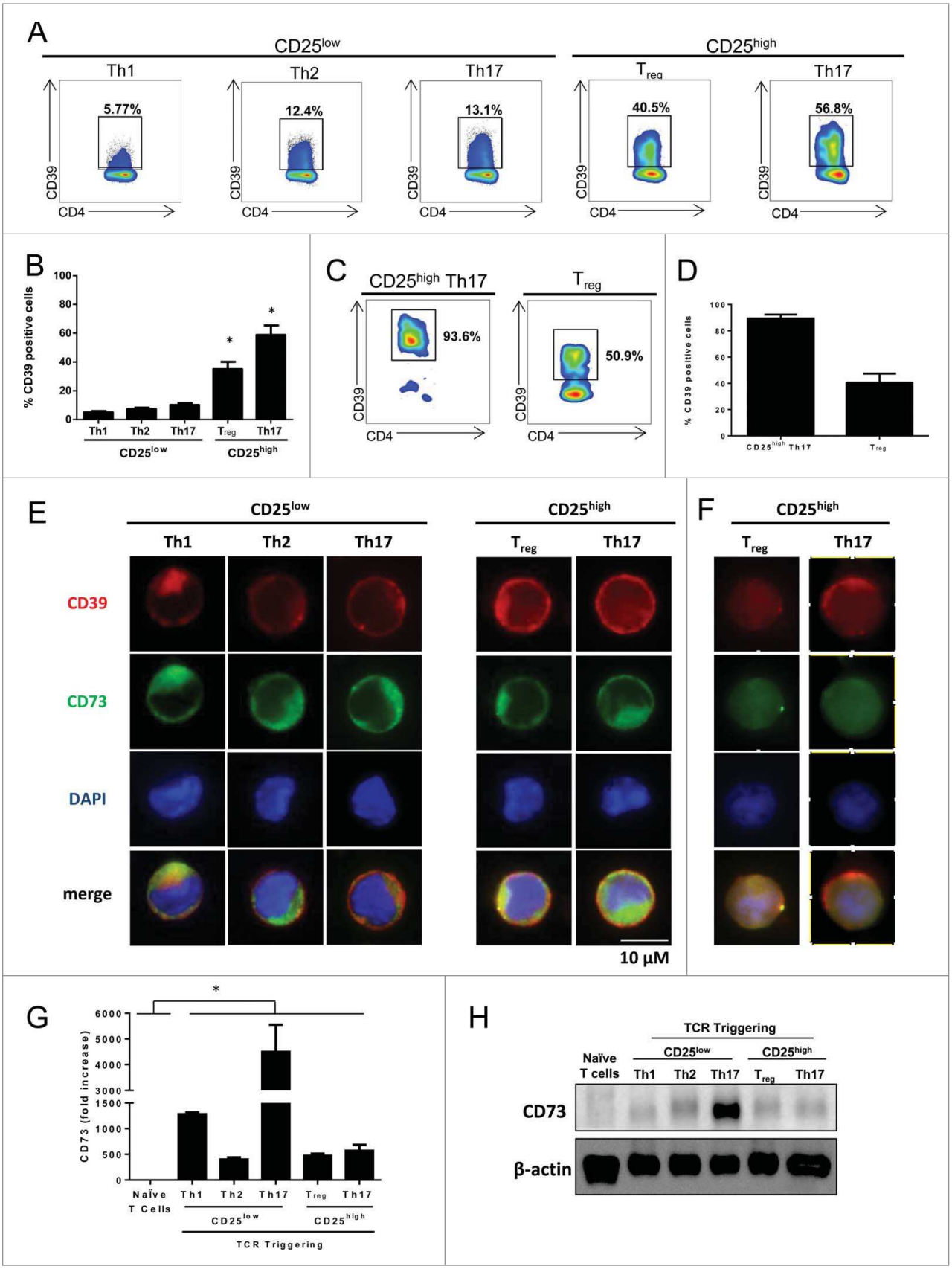


Figure 2. For figure legend, see page 4.

(**Fig. 2E**). Moreover, we confirmed that tumor-infiltrating $CD25^{high}$ Th17 cells express ectonucleotidases (**Fig. 2F**). We confirmed CD73 expression on all activated $CD4^+$ T cell subsets using q-PCR and Western Blotting (**Figs. 2G, H**). Together these data indicate that human blood and tumor infiltrating Th17 cells express CD39.

Human Th17 cells exert adenosine dependent suppression

The expression of CD39 and CD73 ectonucleotidases catalyzes the transformation of extracellular ATP into adenosine, which dampens T cell responses.[15] Th17 cells had a nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity comparable to Treg cells (**Fig. 3A**). CD39 mAb blunted adenosine production by both Th17 and Treg subsets (**Fig. S5A**). Adenosine requires expression of its receptor on the target cell to mediate its effect. We observed that human $CD8^+$ T cells and Th1 $CD4^+$ T cells express selectively the A2A receptor (**Fig. 3B**). We observed that $CD25^{high}$ Th17 cells decrease the ability of Th1 and $CD8^+$ T cells to produce IFNγ or TNFα in a dose dependent manner (**Figs. 3C, D**). These cells exert comparable immunosuppressive functions to Treg cells. However, we showed that $CD25^{low}$ Th17 cells do not suppress IFNγ secretion (**Fig. S5B**). Importantly, we observed that the immunosuppressive effect of Th17 cells is decreased by the addition of CD39 blocking antibody or A2A receptor inhibitor (**Fig. 3E**). We have tested additional doses of the inhibitor A2A receptor inhibitor. While we noted a dose-dependent effect, doses higher than 10μM fail to be more efficient to revert the effect of $CD25^{high}$ Th17 cells (**Fig. S5C**).

Together these data demonstrate that Th17 cells suppressed both $CD8^+$ and Th1 cell ability to produce IFNγ in an adenosine and A2A receptor dependent manner.

Additionally we observed that $CD4^+$ TILs depleted from $CD25^{high}$ Th17 are able to produce more IFNγ than total $CD4^+$ TILs (**Figs. 3F, G**), confirming that tumor-infiltrating $CD25^{high}$ Th17 cells suppress T cell responses.

Th17 cell accumulation in breast cancer is due to both proliferation and recruitment

Local accumulation of Th17 cells in breast tumor could be due to their proliferation *in situ* or to their recruitment. We measured Ki67 expression in $CD25^{high}$ and $CD25^{low}$ tumor infiltrating memory $CD4^+$ T cells. Ki67 was shown to be expressed only during the first 24h after TCR triggering.[16] We observed a specific proliferation of $CD25^{high}$ memory $CD4^+$ T cells in tumor bed compared to $CD25^{low}$ tumor infiltrating memory T cells and PBMCs memory T cells (**Fig. 4A**). Interestingly this proliferation is specifically observed in the $CD25^{high}$ Th17 cells subset and not in Treg (**Fig. 4B**).

Th17 cells are characterized by the specific expression of CCR6,[17] a receptor for the chemokine CCL20.[18] CCL20 expression at the tumor site could be involved in the accumulation of Th17 cells. We obtained mRNA from 36 locally advanced breast cancers (**Table S2**) and observed a strong correlation between mRNA *CCL20* expression in tumor bed and *IL17* mRNA expression (**Fig. 4C**). As a control, *CCL22* expression which is known to recruit Treg cells and *CCL19*, which is known to recruit $CCR7^+$ T cells are not associated with *IL17* mRNA and protein expression (**Fig. 4D**). Together these data suggest that $CD25^{high}$ Th17 cells accumulate in breast tumor because of both recruitment via CCL20/CCR6 pathway and *in situ* proliferation.

Ectonucleotidase expression on Th17 cells is driven by tumor-derived TGF-β and IL-6

We previously reported in mouse models that *ENTPD1* and *NT5E* (encoding CD39 and CD73 respectively) expression in Th17 cells is due to the stimulation by TGF-β and IL-6, which are frequently expressed in breast tumor tissue. We thus speculated that after recruitment in the tumor bed via the CCR6/CCL20 axis, Th17 cells could be locally stimulated to acquire ectonucleotidase immunosuppressive functions.

Using a series of 36 locally advanced breast cancers we observed a correlation between *IL17* mRNA expression in tumor and *ENTPD1* and *NT5E* mRNA expression (**Fig. 5A**). In addition, we noted a correlation between *RORC* and *IL6* as well as *RORC* and *TGFb1* expression (**Fig. 5B**), thus suggesting that these two cytokines could are involved in accumulation of immunosuppressive Th17 cells. In contrast, neither *IL6* nor *ENTPD1* and *NT5E* were correlated with *FOXP3* expression (**Fig. S6**). We cell sorted $CD25^{low}$ Th17 from healthy donor PBMCs and stimulated these cells with TCR triggering and TGF-β or IL-6 or the combination of both cytokines. Using flow cytometry we found that TCR triggering is sufficient to induce CD25 expression and that TGF-β or the combination of TGF-β and IL-6 induced Foxp3 expression in Th17 cells (**Fig. 5C**). As a control, Treg cells could not be differentiated into $CD25^{high}$ Th17 cells by TGF-β and IL-6 (**Fig. 5D**). TCR triggering induced *CD25* and *NT5E* but not *ENTPD1* mRNA expression. *NT5E* expression is boosted by cytokine stimulation. In contrast, only cytokine stimulation with TGF-β and IL-6 enhanced *ENTPD1* mRNA expression (**Fig. 5E**). We observed that IL-17 secretion was maintained in these conditions (**Fig. 5F**). As a control, TGF-β or IL-6 or the combination of both cytokines did not enhance ectonucleotidase expression in Treg cells (**Fig. 5G**). These data

Figure 2 (See previous page). Human $CD25^{high}$ Th17 cells express ectonucleotidases.Memory blood-derived (**A, B**) or breast-tumor infiltrating (**C, D**) Th1, Th2, Th17 as well as $CD25^{high}$ Th17 and Tregs were analyzed for CD39 expression using flow cytometry (representative dot plot (A,C) and mean ± SD percentage of cells of 3 independent experiments (**B, D**). (**E**) Memory blood-derived Th1, Th2, Th17 as well as $CD25^{high}$ Th17 and Tregs were stained, permeabilized and analyzed for CD39 and CD73 expression using immunofluorescence. Memory blood-derived Th1, Th2, Th17 as well as $CD25^{high}$ Th17 and Tregs were analyzed for CD73 expression using. (**F**) Breast tumor infiltrating Treg or Th17 $CD25^{high}$ lymphocytes were sorted out and restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. After 3 d, Entpd1 and Nt5e expression were analyzed using immunofluorescence. (**G**) q-PCR (mean ± SD percentage of cells of three independent experiments) and (**H**). Western blotting (One representative of three independent experiments) after 24 and 72 h of *in vitro* stimulation respectively.

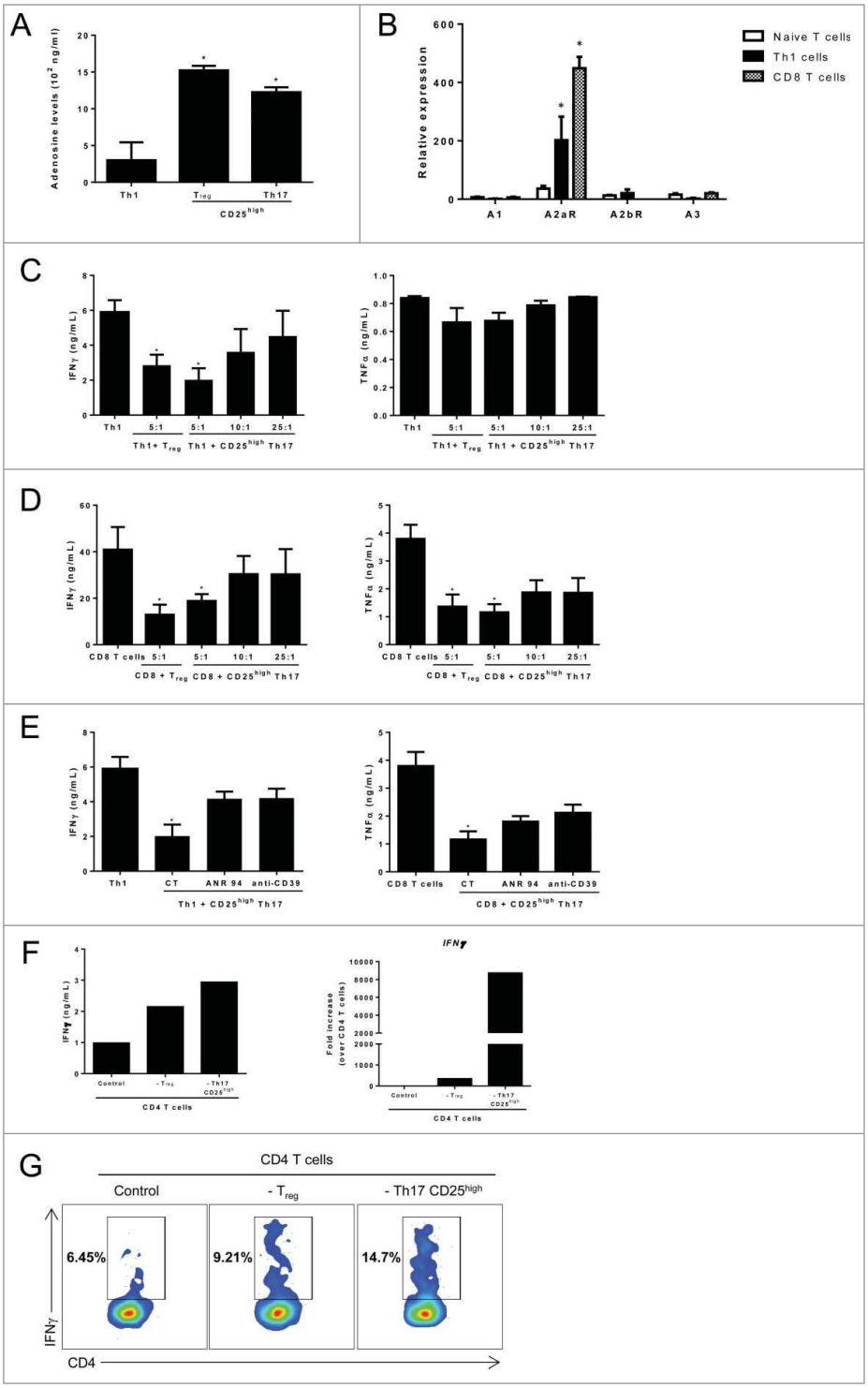


Figure 3. CD25^{high} Th17 cells exert adenosine dependent suppressive functions. (**A**) Blood-derived memory Th1, CD25^{high} Th17 cells and Tregs were cocultured for 72 h with 2 μM ATP. The concentration of adenosine in the supernatant was determined by enzymatic assay.[25] (**B**) Blood-derived memory Th1 cells and CD8$^+$ T cells were cell sorted using flow cytometry, reactivated using anti-CD3 and anti-CD28. *A1, A2AR, A2BR* and *A3* mRNA expression level was assessed after 72 h by RT-qPCR analysis. CD25^{high} Th17 cells or Tregs were cocultured with (**C**) CD4$^+$ or (**D**) CD8$^+$ T cells at different ratios (1,00,000 Th1 or CD8$^+$ T cells to 20,000 (5:1), 10,000 (10:1) or 2,500 (25:1) suppressive cells) for 3 d. IFNγ and TNFα secretion was assessed using ELISA. (**E**) Same as in (**C**) and (**D**) using neutralizing anti-CD39 antibody or an adenosine A_{2A} receptor inhibitor ANR 94. (**F**) Breast tumor infiltrating lymphocytes (TILs) were sorted out and either total CD4$^+$ TILs or TILs depleted from immunosuppressive populations (Treg or Th17 CD25^{high} cells) were restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 3 d. IFNγ secretion was assessed by ELISA and *IFN*γ expression was analyzed by RT-qPCR (**G**) same as in (**F**) but IFNγ secretion was assessed by intracellular staining 3. Data are mean ±SD of three independent experiments. *$p < 0.05$.

suggest that tumor production of TGF-β and IL-6 could promote differentiation of conventional Th17 cells into CD25^{high} Th17 cells that expressed CD39 and CD73.

IL-17-infiltrating cells drive immunosuppression in human breast cancer

We evaluated the functional characteristics of immune cell infiltrates using low array immune gene expression in our series of 36 patients with local breast cancer. In this population we performed IL-17 immunohistochemistry and observed that 15 tumors are highly infiltrated by IL-17$^+$ cells, and 21 were poorly infiltrated by IL-17$^+$ cells. Upon gene expression we observed that gene related to the Th17 cluster (IL17, IL21, RORC, TNFα) and CD39 were significantly overexpressed among IL-17^{Hi} tumors (**Fig. 6A**), thus demonstrated that IL-17 labeling is a valuable surrogate marker of Th17 infiltration.

To test the global immune response, we constructed a correlation matrix for that we submitted to hierarchical clustering. We determined two major clusters of genes displaying similar correlation profile. One cluster contained genes coregulated with *CD3e* (black rectangle) and associated with T cell density. The other one contained genes coregulated with CD33 (red rectangle) and associated with myeloid derived suppressor cells (MDSC) infiltration and immune suppression (**Fig. S7A**). We performed analysis using ClueGO software to determine interconnection between each gene clusters. We identified a network of intercorrelated genes associated with a coordinated CD4$^+$ and CD8$^+$ T cell response associated with a Th17 immune response (**Fig. S7B**). Together these data underscore that in

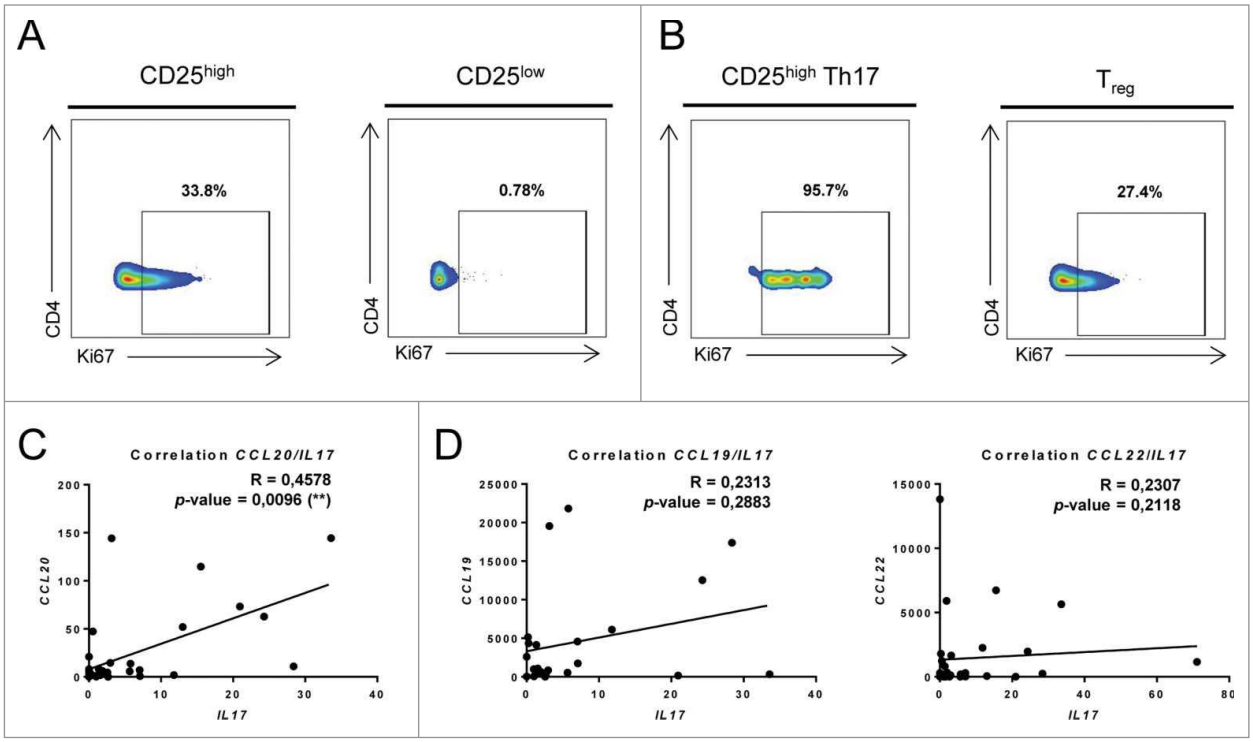


Figure 4. Th17 cell accumulation in breast cancer is due to both proliferation and recruitment. (**A**) Ki67 expression in CD25^{high} and CD25^{low} tumor-infiltrating memory CD4^{+} T cells was determined by flow cytometry using intracellular staining. (**B**) Ki67 expression was determined as in (**A**) in CD25^{high} Th17 and Tregs. Representative data from one of three experiments are shown. mRNA was extracted from 36 breast cancer tumor samples and the expression of *IL17, CCL19, CCL20* and *CCL22* was determined using RT-qPCR. The correlation between (**C**) *IL17* and *CCL20* as well as (**D**) *IL17* and *CCL19* or *IL17* and *CCL22* expression was determined using RT-qPCR.

breast cancer a coordinated immune response is present with a T cell immune response drift toward Th17 polarization in association with a myeloid immunosuppressive pathway.

In a retrospective series of 145 patients with node positive breast cancer homogenously treated by surgery followed by anthracycline-based adjuvant chemotherapy (**Table S3**), we quantified by immunohistochemistry stromal and tumor nest CD8^{+} and IL-17^{+} cells. We then separated patients into two groups (high vs. low), using median as a cut-off for each marker (**Fig. 6B**). We observed that only high stromal IL-17^{+} cells were significantly associated with poor relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) in both univariate and multivariate models (**Fig. 6C and Tables S4 and S5**). Upon testing the prognostic role of CD8^{+} cells in the two IL-17 groups we observed no imbalance between prognosis factors (**Table S6**). High infiltration in CD8^{+} cells is associated with a better survival only in the group of low IL-17^{+} infiltrates (**Fig. 6D**). Taken together, these data suggest that Th17 presence in human breast cancer is associated with ectonucleotidase expression, and with poorer outcome.

Discussion

Tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) have been shown to profoundly affect breast cancer prognosis. However, the nature and functions of TILs in breast cancer microenvironment remains incompletely defined. Here, we found that CD25^{high} Th17 cells accumulated in human breast cancer. These cells express CD39 and CD73 and suppress CD4^{+} and CD8^{+} T cell activation through adenosine release. Breast cancer patients featuring high IL-17^{+} cell infiltration had a poor clinical prognosis; even in case of a high CD8^{+} T cell infiltration. These novel human data underscore the clinical relevance of this immunosuppressive pathway in breast cancer.

In contrast to the well-defined contributions of the effector T cells in breast cancer, the role of Th17 cells in this disease remains elusive. Tumor infiltration by IL-17-producing cells has been proposed to be a negative prognostic factor,[19] suggesting that Th17 cells may be detrimental in this context. However, the underlying biological mechanisms have not yet been reported. In breast cancer, CCR6^{+} Foxp3^{+} cells were proposed to dampen CD8^{+} T cell activation, leading to poorer clinical prognosis.[20] However, whether these cells presented Th17 cell features was unclear, and the immune suppression mechanism was not documented. Our findings here revealed that in the breast tumor microenvironment, CD25^{high} Th17 cells that expressed both Foxp3 and RORc are Th17 cells characterized by their ability to express Th17 cytokines, but are also immunosuppressive cells that contribute to tumor escape.

We had previously reported that mouse Th17 cells could harbor immunosuppressive functions that relied primarily on their expression of ectonucleotidases.[4] The expression of the ectonucleotidases CD39 and CD73 allow the conversion of ATP into adenosine,

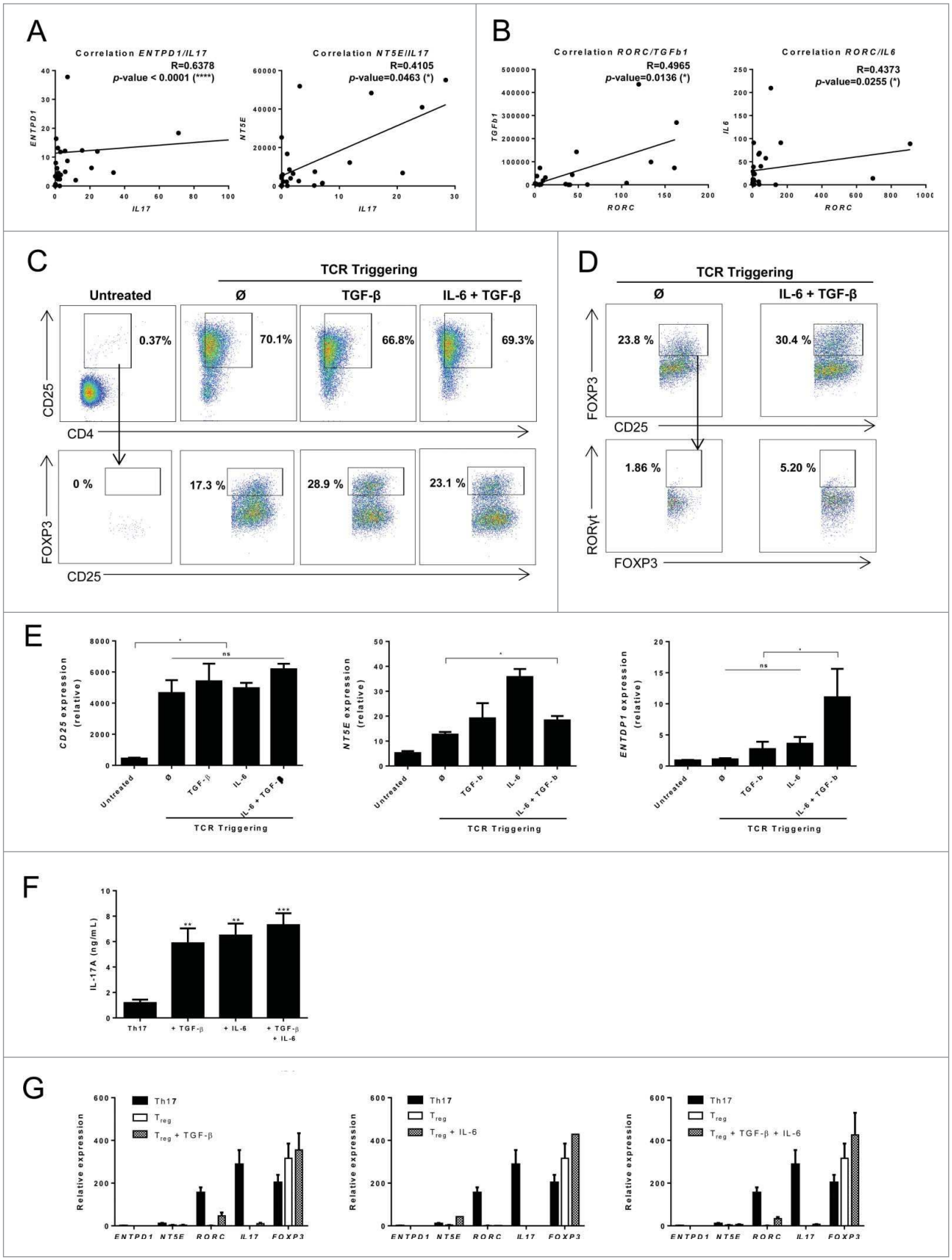


Figure 5. For figure legend, see page 8.

which dampens T cell activation through binding to A2A receptors. Unlike effector T cells, Treg express high levels of CD39, which contributes to immune suppression. Our findings here report for the first time in breast cancer the existence of ectonucleotidase-expressing $CD25^{high}$ Th17 cells. These cells expressed CD39 and CD73 ectonucleotidases at comparable levels to Treg cells. Interestingly, in ulcerative colitis, CD39 expression was similarly found comparable between immunosuppressive $Foxp3^+$ Th17 cells and *bona fide* Treg from patients, confirming the ability of $CD25^{high}$ Th17 cells to suppress immune activation in various contexts.[21] However, as effector Th1 cells or $CD8^+$ T cells expressed CD73 (**Fig. 2E** and data not shown) we cannot exclude a possible cooperation between $CD25^{high}$ Th17 cells and effector cells to induce adenosine production.

Our findings indicating the predominance of $CD25^{high}$ Th17 cells over Treg in the breast cancer tumor microenvironment suggest that these cells primarily drive immune suppression at the tumor site. In addition our observations indicate that $CD25^{high}$ Th17 cells are able to proliferate at the tumor site, and are recruited via the CCR6/CCL20 axis. In addition, we identified here that TGF-β and IL-6 favor the conversion of conventional $CCR6^+$ peripheral Th17 into $CD25^{high}$ immunosuppressive Th17 cells. Together these results support the hypothesis that $CD25^{low}$ $CCR6^+$ peripheral Th17 cells could be recruited in the tumor bed by CCL20, and then activated by local antigen stimulation, thus suggesting local priming and a coordinated Th17 derived immune response. While the ability of Treg to differentiate into Th17 cells in proinflammatory environments has been thoroughly studied,[22] the conversion of conventional Th17 cells into suppressive Th17 has not been yet explored, and the influence of the tumor microenvironment on Th17 cells remains incompletely understood.

The prognostic value of $CD8^+$ and Treg tumor infiltration has been established in large cohorts of breast cancer patients.[23,24] Our retrospective analysis of $CD8^+$ and $IL17^+$ breast cancer infiltration by immunohistochemistry indicates that the combined analysis of these two cell populations refines breast cancer patient's prognosis. The observation that high $CD8^+$ T cell infiltration is associated with favorable outcome only in the presence of low associated-$IL\text{-}17^+$ cell infiltration further suggests an important immunosuppressive role of CD39-expressing Th17 cells on $CD8^+$ dependent breast anticancer immunity. These results also support the use of therapies designed to neutralize ectonucleotidases in breast cancer.

Materials and Methods

Patients and healthy donors

Between January, 2013 and December 2013, we collected PBMCs and tumor samples from patients with breast cancer in the Centre Georges François Leclerc. The study group (n = 14) comprised patients who underwent surgery for an invasive ductal non-metastatic breast carcinoma. The control group (n = 23) consisted of sex and age matched HV. Tumor stage was determined according to the 2002 International Union against Cancer TNM classification system. All patients gave informed consent approved by the local Ethics Committee. Review of pathology reports confirmed the diagnosis. Information regarding clinical pathological characters of patients is presented in **Table S1**.

Cohort 1: We retrospectively studied frozen cancer-tissue specimens from 36 consecutive patients who underwent surgery for an invasive ductal non-metastatic breast carcinoma at the Georges Francois Leclerc Cancer Centre, Dijon France from January 2010 to June 2010.

A second cohort of 145 consecutive patients, treated by surgery and adjuvant therapy by anthracycline-based chemotherapy for HER2-negative invasive ductal non-metastatic breast carcinoma between 2002 and 2004 at the Georges Francois Leclerc Cancer Centre. The study was approved by the ethical local committee, and patients gave written informed consent for the use of samples from their tumors for future investigations at the time of the diagnosis. Histoprognostic grade was defined according to the modified Bloom and Richardson method. The steroid hormone receptor status was determined using enzyme immunoassays (Abbott Diagnostics, Rungis, France).

T cell isolation from tumors

Tumors were removed aseptically and minced with scissors into 1–2 mm^3 pieces. The minced tumors were then stirred in 40 mL complete RPMI 1640 containing 40 mg collagenase, type IV (Sigma), 4 mg deoxyribonuclease (Sigma) for 3 h at room temperature. The tumor cell suspension was filtered through a nylon-mesh screen with pores of 50 μm to remove cell clumps, and the

Figure 5 (See previous page). Th17 cell ectonucleotidase expression is driven by tumor-derived TGF-β and IL-6. (**A**) mRNA was extracted from 36 breast cancer tumor samples and the expression of *IL17, ENTPD1* and *NT5E* was determined using RT-qPCR. The correlation between *IL17* and *ENTPD1* as well as *IL17* and *NT5E* expression was determined using RT-qPCR. (**B**) mRNA was extracted from 36 breast cancer tumor samples and the expression of *RORC, TGFb1* and *IL6* was determined using RT-qPCR. The correlation between *RORC* and *TGFb1* as well as *RORC* and *IL6* expression was determined using RT-qPCR. (**C**) $CD25^{low}$ memory Th17 cells were cell sorted from PBMCs and restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 3 d in the presence of TGF-β, IL-6 or TGF-β and IL-6. After 3 d, the expression of CD25 and FOXP3 were determined by flow cytometry. Representative data from one of three independent experiments are shown. (**D**) Tregs were cell sorted from PBMCs and restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 3 d in the presence of TGF-β and IL-6. After 3 d, the expression of CD25, FOXP3 and RORC were determined by flow cytometry. Representative data from one of three independent experiments are shown. (**E**) $CD25^{high}$ memory Th17 cells were cell sorted from PBMCs and restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 3 d in the presence of TGF-β, IL-6 or TGF-β and IL-6. After 3 d, mRNA was extracted and the expression of *CD25* (left panel), *NT5E* (middle panel) and *ENTPD1* (right panel), was determined. (**F**) $CD25^{low}$ memory Th17 cells were cell sorted from PBMCs and were restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 3 d in the presence of TGF-β, IL-6 or TGF-β and IL-6. After 3 d, IL-17A secretion was assessed by ELISA. ***$p < 0.001$.(**G**) Treg were cell sorted from PBMCs and restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for 3 d in the presence of TGF-β (left panel), IL-6 (middle panel) or TGF-β and IL-6(right panel). After 3 d, mRNA was extracted and the expression of *ENTPD1, NT5E, RORC, IL17* and *FOXP3* was determined. Th17 cells were used as control. Data are mean ± SD of two independent experiments (**E, F**). * $p < 0.05$ (unless otherwise indicated).

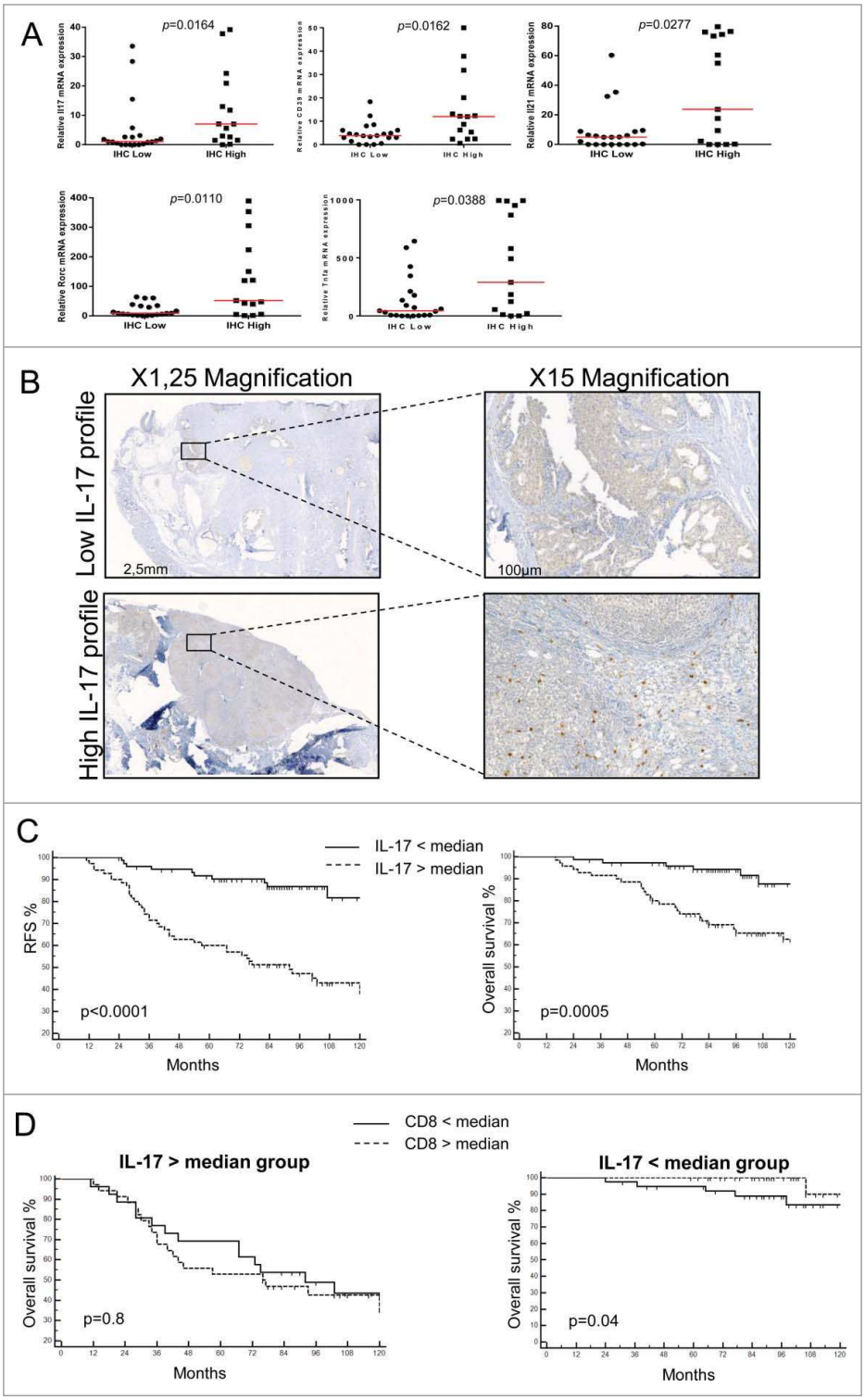


Figure 6. IL-17-infiltrating cells drive immunosuppression in human breast cancer/IL-17-infiltrating cells negatively affect human breast cancer prognosis. (**A**) IL-17 expression in 36 breast cancer tumor samples was determined by immunohistochemistry (IHC). Samples were then classified as IL-17^{high} and IL-17^{low} based on IHC results and the expression of *IL17, ENTPD1, IL21, RORC* and *TNFA* was determined using RT-qPCR. (**B**) Representative picture of IL-17+ staining of breast tumor using immunhistochemistry. We represent a tumor with a low (upper panel) and high (lower panel) IL-17 infiltrates. $N = 145$ patients. (**C**) Kaplan–Meier curves of relapse free survival (left panel) and overall survival (right panel) for patients with local breast cancer according to the presence of a high or low density of IL-17+ cells in the tumor stroma. $N = 145$ patients. (**D**) Kaplan–Meier curves of overall survival according to the presence of a high or low density of CD8$^+$ cells in the tumor stroma in the group of a high (left panel) or low (right panel) density of IL-17+ cells infiltrate. $N = 70$.

filtrate was then centrifuged (250×g, 10 min). The cell pellet was washed twice with serum-free RPMI 1,640 and resuspended in complete RPMI 1,640.

T cell culture

Memory CD4$^+$ T cells (CD4$^+$ CD45RA$^-$) were first enriched from blood PBMCs using the Human CD4$^+$ T Cell Enrichment Cocktail (Stemcell, 50 µl/mL) and then cell-sorted. Isolated CD4$^+$ T cells were stimulated with plate-bound antibodies against CD3 (OKT3, 2 µg/mL, BioXcell) and CD28 (CD28.2, 2 µ g/mL, BioXcell) with or without cytokines. Human IL-6 (20 ng/mL) and TGF-β (5 ng/mL) were all purchased from MiltenyiBiotec. Cells were classically harvested on day three (unless otherwise specified) for detection of cytokines by ELISA and real-time quantitative PCR analysis.

Suppression assays

To test CD4$^+$ CD25^{high} Th17 cell suppressive activity, 10^5 Th1 or CD8$^+$ T cells were activated with 2 µg/mL anti-CD3 (BioXcell) and anti-CD28 (BioXcell) as effector cells and cocultured with or without Treg or CD4$^+$ CD25^{high} Th17 cells at ratios of 5:1, 10:1 and 25:1 for 72 h in complete medium (XVivo 15, gibco). IFNα and TNFα secretion was assessed subsequently after 3 d. In some experiments, an anti-CD39 antibody (A1, 10 µg/mL, AbD serotec) or an adenosine A_{2A} receptor inhibitor ANR94 (10 µmol/L) was added.

Quantification of adenosine levels

Adenosine levels were assessed as previously described.[25] Briefly, 30 µL of conditioned medium after reactivation of different CD4$^+$ T cell subsets were transferred into separate wells in

96-well microplates containing combinations of the following enzymes in a final volume of 170 μL buffer: 0.3 U/mL adenosine deaminase (type IX from bovine spleen), 0.25 U/mL bacterial purine nucleoside phosphorylase and 0.15 U/mL microbial xanthine oxidase (all from Sigma). After 20 min at room temperature, 30 μL of H_2O_2-detecting mixture containing HRP (1 U/mL, Invitrogen, Molecular Probes) and Amplex Red reagent (60 μM, Invitrogen, Molecular Probes) was added to the microwells, followed by measurement of the fluorescence intensity at the emission and excitation wavelengths of 545 and 590 nm, respectively. Two different enzymatic cocktails were used: mix A containing the complete enzymatic cascade and mix B containing the same mixture without adenosine deaminase. For adenosine sensing, the background fluorescence determined in the absence of adenosine deaminase (mix B) has been substracted from the fluorescence in well containing the complete adenosine-converting cascade.

Flow cytometry

Antibodies anti-CXCR3 (G025H7), anti-CCR6 (G034E3), anti-CCR4 (TG6), anti-CD25 (BC96), anti CD45RA (HI100) and anti-$CD4^+$ (OKT4) were purchased from Biolegend. All events were acquired by a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, Oregon).

Measurement of cytokines

Cell culture supernatants were assayed by ELISA for human IFNγ, IL-4, IL-10, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 and TNF-α (Biolegend, St Quentin, France) according to manufacturer's protocol.

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 4 h at 37°C in culture medium containing PMA (50 ng/mL; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 μg/mL; Sigma-Aldrich) and monensin (GolgiStop; 1 μl/mL; BD Biosciences). After staining for surface markers and 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) to exclude dead cells, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Cytofix/Cytoperm kit, BD Biosciences), then stained for intracellular products. Antibodies used for intracellular staining were as follows: Allophycocyanin-conjugated anti-RORγt (REA278, Miltenyi), phycoerythrin (PE)-conjugated anti-Foxp3 (PCH101, eBioscience) or PE-conjugated anti-RORγt (Miltenyi) or Brilliant Violet 421-conjugated anti-IL-17A (eBio64DEC17, eBioscience).

Real-time quantitative PCR

Total RNA from T cells was extracted with TriReagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen) and was analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) with the Sybr Green method according to the manufacturer's instructions using the 7,500 Fast Real Time PCR system (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of human *ACTB*. Primers designed to assess gene expression are as reported in **Table S1**.

Western blotting

Purified naive T cells were differentiated for 72 h into Th1, Th2, Th17, Treg or $CD25^{high}$ Th17 cells, then collected and pelleted by centrifugation (5 min, 1,500 × g). Cells were lysed in boiling buffer [1% SDS, 1 mmoL/L sodium orthovanadate, and 10 mmoL/L Tris (pH 7.4)] containing protease inhibitor cocktail for 20 min at 4°C. Cell lysates were subjected to sonication (10 s at 10%) and protein concentrations were assessed using a Bio-Rad DC Protein Assay Kit. Proteins were then denaturated, loaded, and separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell). After blockade of nonspecific binding with 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline containing 0.1% tween 20 (TBST), membranes were incubated overnight with primary antibody diluted in TBST containing 1% BSA, washed and incubated for 1 h with secondary antibody diluted in TBST–1% BSA. After additional washes, membranes were incubated with Luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology) and exposed to X-ray films. The following human monoclonal antibody was used: anti-CD73 (NBP1-85740, Novus).

Immunohistochemical labeling

Immunohistochemistry used monoclonal antibodies against the T-cell marker $CD8^+$ (Dako, Trappes, France), and IL-17 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA). Antigen retrieval was carried out by heating slides for 15 min at 95°C in 1 mmoL/l EDTA. Labeling was detected using the Dako Envision system (Dako). The stained arrays were counterstained with haematoxylin and mounted in Aquamount (Dako). Positive and negative staining controls were carried out with paraffin tonsil sections using IL-17 and $CD8^+$ monoclonal antibody and an isotype-matched negative control antibody.

Levels of lymphocytic infiltration were evaluated by two independent physicians (FG and SL). All samples were previously anonymized and blinded to the clinicopathological data. On the slide, the number of stained cells was analyzed by enumeration of positive cells in three high-power fields (40×) in the adjacent stromal area and in the tumor bed. The mean count of the three fields was used for statistical analysis. The results of the analyses conducted by each independent pathologist were subsequently compared. Discrepancies between the two observers were reviewed jointly to reach a consensus when the mean count differ from more than 1%. The kappa coefficient of correlation between the observers was 95%.

Immunofluorescence microscopy

Double immunofluorescence staining was performed for CD39 and CD73 markers. The following primary antibodies were used: mouse anti-CD39 (Abcam) and rabbit anti-CD73 (Novus). Secondary antibodies were a goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (A11034, Invitrogen) and a donkey anti-mouse Alexa Fluor 564(A10037, Invitrogen). Images were acquired using a Z-stac acquisition (x63) (AxioImager M2, Zeiss, Germany).

Cluego analysis

To further understand the biological relevance of the hub genes and their regulators in breast tumor, we performed functional enrichment analysis using ClueGO.[26] ClueGO facilitates the visualization of functionally related genes displayed as a clustered network and chart. The statistical test used for the enrichment was based on right-sided hypergeometric option with a Benjamini–Hochberg correction and kappa score of 0.3.

Correlation matrix analysis

Correlations were performed using the Spearman test. Correlation matrix was represented using Treeview viewer. Unsupervised hierarchical clustering of samples was performed by using Gene Cluster 3.0 software. The hierarchical clustering was performed using Euclidean distance measure and complete linkage analysis. Positive correlation appears in red and negative correlation in green.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Prism software (Graph Pad software, La Jolla, CA, USA) for biological studies. For the analysis of experimental data, comparison of continuous data was achieved by the Mann–Whitney U test and comparison of categorical data by Fisher's exact test, as appropriate. All p values are two tailed. P values < 0.05 were considered significant. Data are represented as mean $\pm$ SD.

Regarding the analysis of clinical data, patient or disease characteristics were examined using the χ^2 test or Fisher's exact test for qualitative variables, and the Student t or Mann–Whitney tests for continuous variables, as appropriate. All patients were followed up until death or the end of data recording (September 1st, 2014). OS was calculated from the date of diagnosis until the date of death (all causes). Alive patients were censored at the last follow-up. RFS was calculated from the date of diagnosis until the date of relapse (local or metastatic). Alive or dead patients without relapse were censored at the last follow-up. Follow-up was calculated using the reverse Kaplan–Meier method. OS and RFS probabilities were estimated using the Kaplan–Meier method and were compared by the log-rank test. Hazards ratios (HRs) with a 95% confidence interval (CI) were calculated using univariate Cox proportional hazards regression modeling. All variables with a univariate Cox p value ≤ 0.20 were eligible for multivariate analyses. Correlations between co-variables were firstly tested for eligible variables. To prevent collinearity, when two variables were significantly correlated, one variable was retained according to its clinical relevance or to the value of the likelihood ratio. Finally, multivariate Cox proportional hazards regression modeling was applied to assess the independent prognosis effect for OS and RFS. Analyses were performed using MedCalc Software.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Funding

The authors are supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (F.Gh., F.V.), the Fondation de France (L.A.), the Institut National du Cancer (F.Gh.), the Association pour la recherche sur le cancer (F.Gh., G.M.), the Conseil Régional Bourgogne/INSERM (M.T., H.B., L.A.), the CNRS, FEDER, Le Studium, Orléans and Fondation pour la Recherche Médicale (F.Gh., B.R.), the French National Research Agency [ANR-13-JSV3-0001] (L.A.) and [ANR-11-LABX-0021], the Ligue Régionale contre le cancer Comité Grand-Est (L.A., S.L), the Cancéropole Grand Est (Emergence) (L.A.), and the European Community (Marie Curie Fellowship PCIG10-GA-2011-303719) (L.A.). We thank members from the Dijon flow cytometry facility for cell sorting.

Supplemental Material

Supplemental data for this article can be accessed on the publisher's website.

References

1. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. J Exp Med 2005; 201:233-40; PMID:15657292; http://dx.doi.org/10.1084/jem.20041257
2. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol 2009; 27:485-517; PMID:19132915; http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132710
3. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, Sallusto F, Napolitani G. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. Nat Immunol 2007; 8:639-46; PMID:17486092; http://dx.doi.org/10.1038/ni1467
4. Chalmin F, Mignot G, Bruchard M, Chevriaux A, Vegran F, Hichami A, Ladoire S, Derangère V, Vincent J, Masson D et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppres activity via the regulation of ectonucleotidase expression. Immunity 2012; 36:362-73; PMID:22406269; http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.12.019
5. Zhang JP, Yan J, Xu J, Pang XH, Chen MS, Li L, Wu C, Li SP, Zheng L. Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. J Hepatol 2009; 50:980-9; PMID:19329213; http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2008.12.033
6. Chen X, Wan J, Liu J, Xie W, Diao X, Xu J, Zhu B, Chen Z. Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. Lung Cancer 2010; 69:348-54; PMID:20022135; http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2009.11.013
7. Tosolini M, Kirilovsky A, Mlecnik B, Fredriksen T, Mauger S, Bindea G, Berger A, Bruneval P, Fridman WH, Pagès F et al. Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer Res 2011; 71:1263-71; PMID:21303976; http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2907
8. Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, Sukumar M, Reger RN, Yu Z, Kern SJ et al. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. Immunity 2011; 35:972-85; PMID:22177921; http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.09.019
9. Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, Vatan L, Szeliga W, Wei S, Huang E, Finlayson E, Simeone D, Welling TH et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. Blood 2009; 114:1141-9; PMID:19470694; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2009-03-208249
10. Bruchard M, Mignot G, Derangere V, Chalmin F, Chevriaux A, Vegran F, Boireau W, Simon B, Ryffel B, Connat JL et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat Med 2013; 19:57-64; PMID:23202296; http://dx.doi.org/10.1038/nm.2999
11. Chung AS, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Kasman I, Zhang J, Vernes JM, Jiang Z, Meng YG, Peale FV et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. Nat Med 2013; 19:1114-23; PMID:23913124; http://dx.doi.org/10.1038/nm.3291
12. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. Clin Lab Med 2007;

27:469-85, v; PMID:17658403; http://dx.doi.org/10.1016/j.cll.2007.05.002

13. Saze Z, Schuler PJ, Hong CS, Cheng D, Jackson EK, Whiteside TL. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. Blood 2013; 122:9-18; PMID:23678003; http://dx.doi.org/10.1182/blood-2013-02-482406
14. Schuler PJ, Saze Z, Hong CS, Muller L, Gillespie DG, Cheng D et al. Human CD4 CD39 regulatory T cells produce adenosine upon co-expression of surface CD73 or contact with CD73 exosomes or CD73 cells. Clin Exp Immunol 2014; 177(2):531-43; PMID:24749746; http://dx.doi.org/10.1111/cei.12354
15. Deaglio S, Dwyer KM, Gao W, Friedman D, Usheva A, Erat A, Harasymczuk M, Mandapathil M, Lang S, Jackson EK et al. Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. J Exp Med 2007; 204:1257-65; PMID:17502665; http://dx.doi.org/10.1084/jem.20062512
16. Lopez F, Belloc F, Lacombe F, Dumain P, Reiffers J, Bernard P, Boisseau MR. Modalities of synthesis of Ki67 antigen during the stimulation of lymphocytes. Cytometry 1991; 12:42-9; PMID:1999122; http://dx.doi.org/10.1002/cyto.990120107
17. Singh SP, Zhang HH, Foley JF, Hedrick MN, Farber JM. Human T cells that are able to produce IL-17 express the chemokine receptor CCR6. J Immunol 2008; 180:214-21; PMID:18097022; http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.214
18. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. Cytokine Ggrowth Factor Rev 2003; 14:409-26; PMID:12948524; http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6101(03)00049-2
19. Chen WC, Lai YH, Chen HY, Guo HR, Su IJ, Chen HH. Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. Histopathology 2013; 63:225-33; PMID:23738752; http://dx.doi.org/10.1111/his.12156
20. Xu L, Xu W, Qiu S, Xiong S. Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer. Clin Immunol 2010; 135:466-75; PMID:20181533; http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2010.01.014
21. Longhi MS, Moss A, Bai A, Wu Y, Huang H, Cheifetz A, Quintana FJ, Robson SC. Characterization of human CD39+ Th17 cells with suppressor activity and modulation in inflammatory bowel disease. PloS One 2014; 9:e87956; PMID:24505337; http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0087956
22. Valmori D, Raffin C, Raimbaud I, Ayyoub M. Human RORgammat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 107:19402-7; PMID:20962281; http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1008247107
23. Ladoire S, Arnould L, Apetoh L, Coudert B, Martin F, Chauffert B, Fumoleau P, Ghiringhelli F. Pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy of breast carcinoma is associated with the disappearance of tumor-infiltrating foxp3+ regulatory T cells. Clin Cancer Res 2008; 14:2413-20; PMID:18413832; http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-4491
24. Ladoire S, Mignot G, Dabakuyo S, Arnould L, Apetoh L, Rebe C, Coudert B, Martin F, Bizollon MH, Vanoli A et al. In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. J Pathol 2011; 224:389-400; PMID:21437909; http://dx.doi.org/10.1002/path.2866
25. Helenius M, Jalkanen S, Yegutkin G. Enzyme-coupled assays for simultaneous detection of nanomolar ATP, ADP, AMP, adenosine, inosine and pyrophosphate concentrations in extracellular fluids. Biochim Biophys Acta 2012; 1823:1967-75; PMID:22967714; http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2012.08.001
26. Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, Charoentong P, Tosolini M, Kirilovsky A, Fridman WH, Pagès F, Trajanoski Z, Galon J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. Bioinformatics 2009; 25:1091-3; PMID:19237447; http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btp101

Human ectonucleotidase-expressing CD25high Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions

Marion Thibaudin[1,2,4], Marie Chaix[3,4], Romain Boidot[1,2,3], Frédérique Végran[1,2,3], Valentin Derangère[1,2], Emeric Limagne[1,2], Hélène Berger[1,2], Sylvain Ladoire[1,2,3], Lionel Apetoh[1,2,3,5,*], and François Ghiringhelli[1,2,3,5,*]

 # Correspondance to : fghiringhelli@cgfl.fr

Supplementary figure 1: Flow cytometry gating strategy to identify memory CD4 T cell subpopulations through chemokine receptor expression.

Supplementary figure 2: Chemokine receptor expression allows the distinction between Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells.

Supplementary figure 3: Accumulation of $CD25^{high}$ expressing Th17 cells in breast tumor tissue.

Supplementary figure 4: $CD25^{high}$ $CCR6^{+}$ cells secrete Th17 cell related cytokines.

Supplementary figure 5: $CD25^{high}$ Th17 cells exert adenosine dependent suppressive functions.

Supplementary figure 6: The expression of ectonucleotidases is not correlated to Foxp3 expression.

Supplementary figure 7: IL-17-infiltrating cells drive immunosuppression in human breast cancer.

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1: Patients and tumor characteristics (N=13)

Supplementary Table 2: Patients and tumor characteristics (N=36) (Missing data for 4 patients)

Supplementary Table 3: Patients and tumor characteristics (N=145)

Supplementary Table 4: Uni and multivariate* analysis (Cox regression) for factors associated with RFS

Supplementary Table 5: Uni and multivariate* analysis (Cox regression) for factors associated with OS

Supplementary Table 6: Frequency of clinicopathological characteristics of according to the IL-17 infiltration in the peritumoral area

Supplementary figure 1: Flow cytometry gating strategy to identify memory CD4 T cell subpopulations through chemokine receptor expression.

Supplementary figure 2: Chemokine receptor expression allows the distinction between Th1, Th2, Th17 and regulatory T cells. PBMCs from healthy volunteers (HV) were stained with anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CCR4, anti-CXCR3, anti-CD25 antibodies and cell sorted. The frequency of memory CD4 ($CD45RA^-$, $CD4^+$) Th1 ($CD25^{low}$, $CCR6^-$, $CXCR3^+$), Th2 ($CD25^{low}$, $CCR6^-$, $CXCR3^-$, $CCR4^+$), Th17 ($CD25^{low}$, $CCR6^+$, $CXCR3^-$), $CD25^{high}$ Th17 ($CD25^{high}$, $CCR6^+$, $CXCR3^-$) and Treg ($CD25^{high}$, $CCR6^-$, $CXCR3^-$) cells were then stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies for three days. *TBX21* (a), *GATA3* (b), *RORC* (c), *FOXP3* (d) expression was assessed by RT-qPCR after 72 hours and IFN-γ (e), IL-17A (f) and IL-4 (g) levels were assessed by ELISA. The data presented represent the analyses performed on 4 healthy volunteers.

Supplementary figure 3: Accumulation of $CD25^{high}$ expressing Th17 cells in breast tumor tissue. PBMCs from breast cancer patient blood (Patients) or breast tumor TILs were stained with anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CCR4, anti-CXCR3, anti-CD25 antibodies and analyzed by flow cytometry. The frequency of memory CD4 ($CD45RA^-$, $CD4^+$) Th1 ($CD25^{low}$, $CCR6^-$, $CXCR3^+$), Th2 ($CD25^{low}$, $CCR6^-$, $CXCR3^-$, $CCR4^+$), Th17 ($CD25^{low}$, $CCR6^+$, $CXCR3^-$), $CD25^{high}$ Th17 ($CD25^{high}$, $CCR6^+$, $CXCR3^-$) and Treg ($CD25^{high}$, $CCR6^-$, $CXCR3^-$) cells is depicted. The data presented represent the analyses performed on 13 breast cancer patients and 13 breast tumors.

Supplementary figure 4: $CD25^{high}$ $CCR6^+$ cells secrete Th17 cell related cytokines. $CD25^{high}$, $CCR6^+$, $CXCR3^-$ memory CD4 T cells were cell sorted from healthy volunteers PBMC and restimulated with anti-CD3 and anti-CD28 for three days. *IL17F*, *IL10*, *IL21*, *IL22* and *TNFα* expression were assessed by RT-qPCD after three days and IL-17F, IL-10, IL-21, IL-22 and TNFα levels were measured by ELISA.

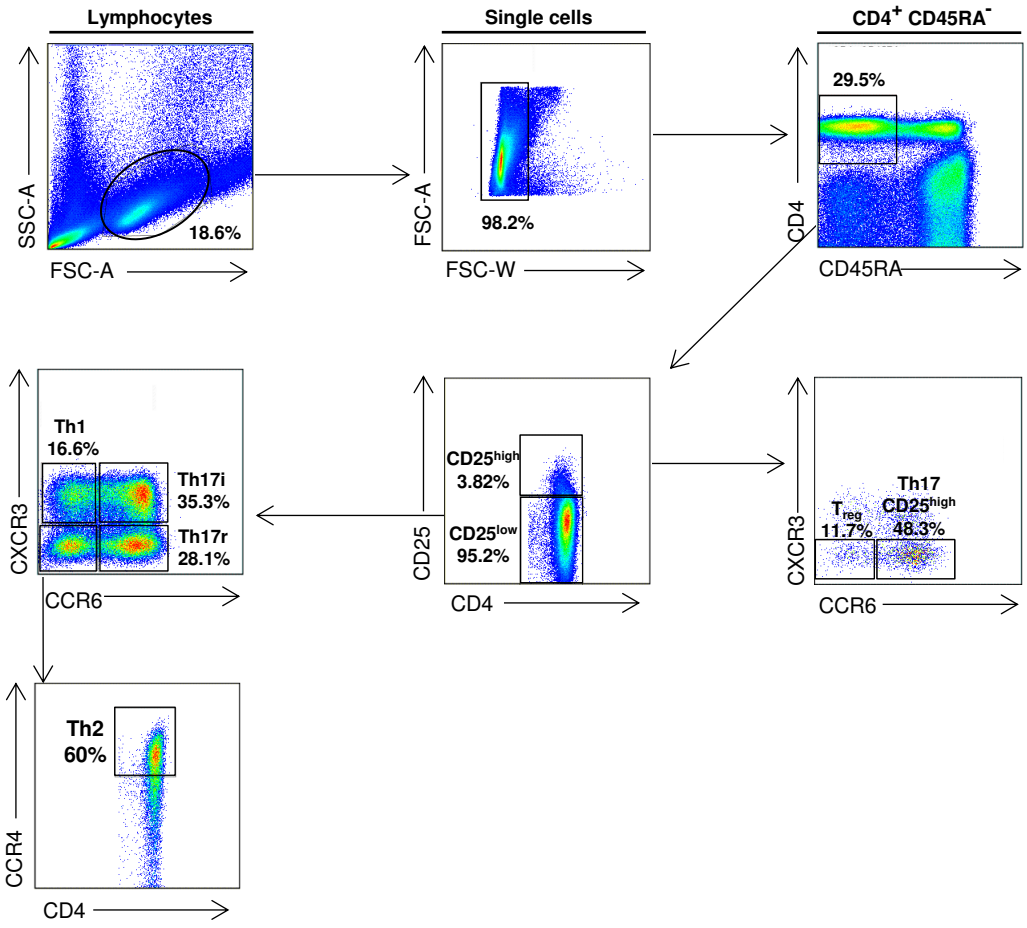
Supplementary figure 5: $CD25^{high}$ Th17 cells exert adenosine dependent suppressive functions. (A) Blood-derived memory Th1, $CD25^{high}$ Th17 cells and Tregs were cocultured for 72 hours with 2µM ATP and with anti-CD39 mAb. The concentration of adenosine in the supernatant was determined by enzymatic assay. (B) Blood-derived memory $CD25^{low}$Th17 cells or $CD25^{high}$ Th17 cells were cocultured with Th1 cells at different ratios for three days. IFNγ secretion was assessed using ELISA. One representative experiment is shown. Data are mean ± SD of 3 replicates of one experiment. *$p<0.05$. (C) Blood-derived memory $CD25^{high}$ Th17 cells or Tregs were cocultured with Th1 cells for three days with increasing concentrations of adenosine A2A receptor inhibitor ANR94 (0.4, 2, 10 or 50 µM). IFNγ secretion was assessed by ELISA after three days. One representative experiment is shown. Data are mean ± SD of 3 replicates of one representative experiment. **$p<0.005$.

Supplementary figure 6: The expression of ectonucleotidases is not correlated to Foxp3 expression. mRNA was extracted from 36 breast cancer tumor samples and the expression of *IL6*, *TGFb1 ENTPD1, NT5E* and *FOXP3* was determined using RT-qPCR. The correlation between *FOXP3* and *IL6* as well as *FOXP3* and *ENTPD1* as well as *FOXP3* and *NT5E* as well as *FOXP3* and *TGF-β* expression was determined using RT-qPCR.

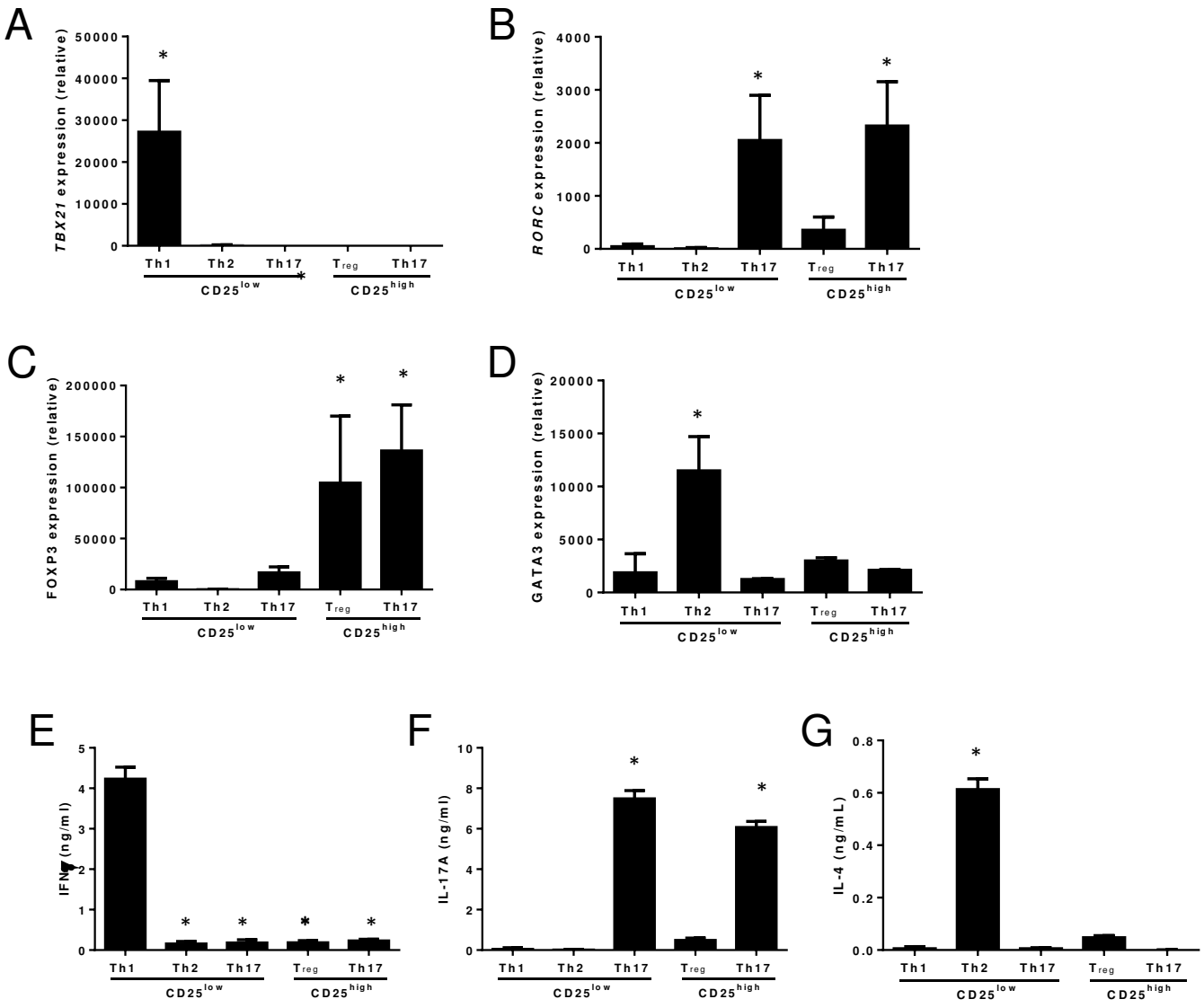
Supplementary figure 7: IL-17-infiltrating cells drive immunosuppression in human breast cancer. **A**) A correlation matrix of gene expression in breast tumors was constructed and submitted to unsupervised hierarchical clustering using complete linkage. Each dot represents a correlation coefficient, in which sign is represented by the color of the dot (green for negative correlation, red for positive correlation). The cluster containing CD3e gene is delimited by a black line, and the cluster containing CD33 gene is

delimited with a red line. **B**) Genes positively correlated with CD3e (blue border) were analyzed by using ClueGO software. Circles represent significantly enriched gene groups with p value corrected with Bonferroni step down (green, p=0.000047 and blue, p=0.00014).

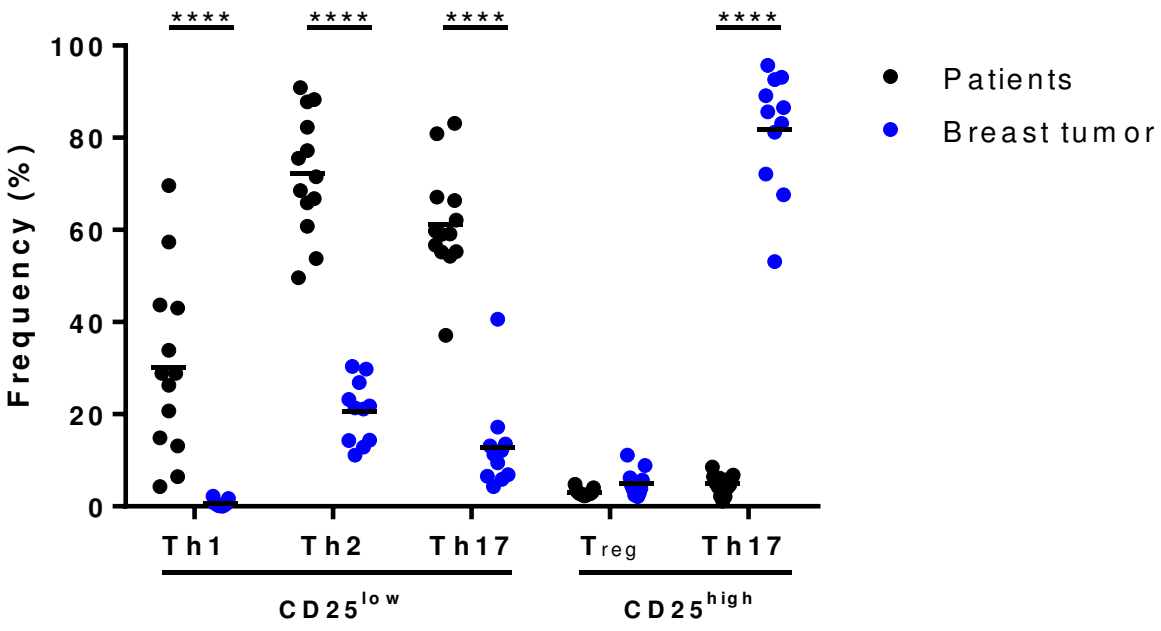
Supplementary figure 1



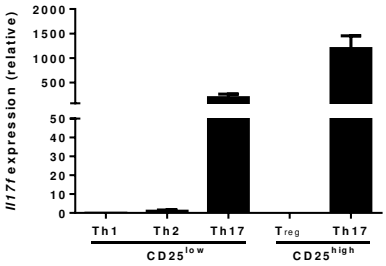
Supplementary figure 2

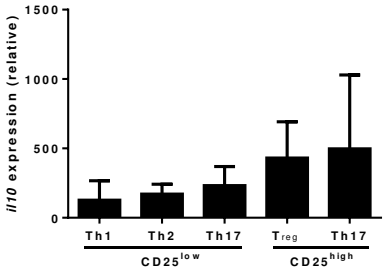


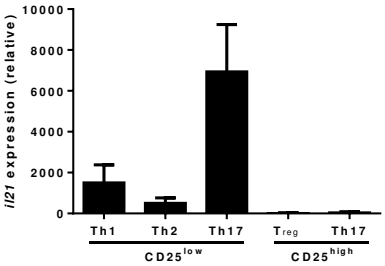
Supplementary figure 3

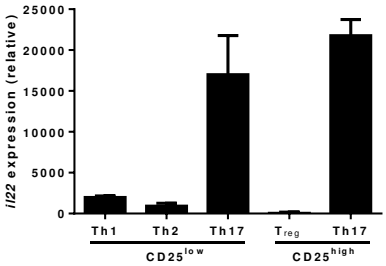


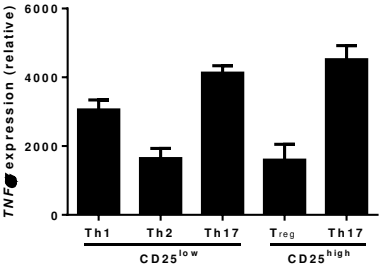
Supplementary figure 4

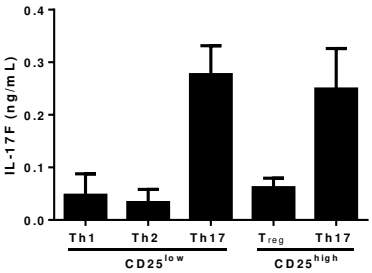


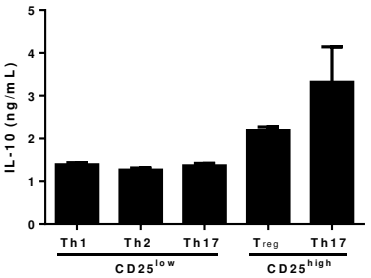


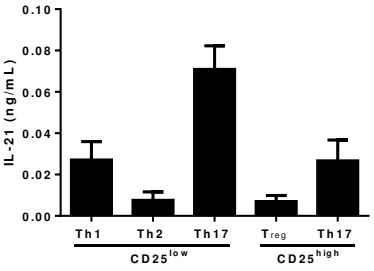


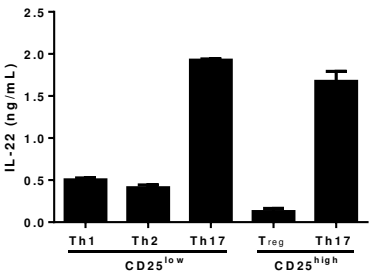


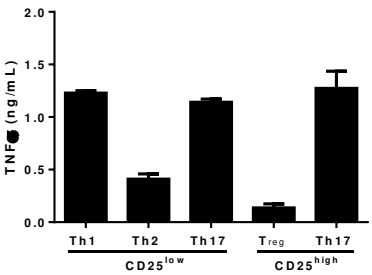






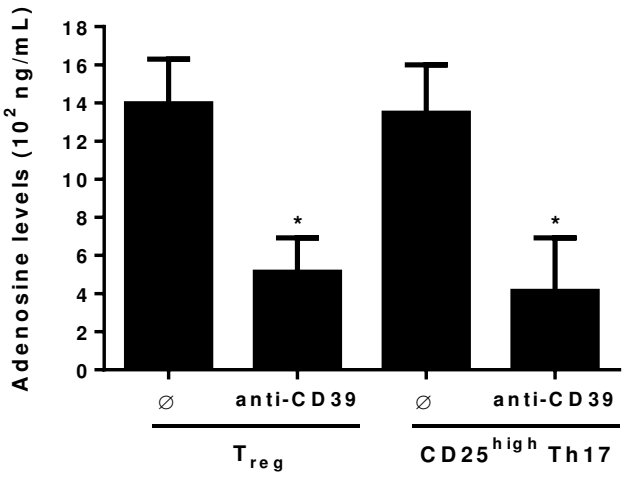




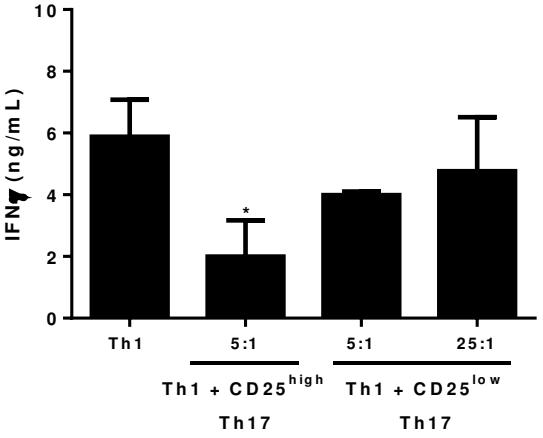


Supplementary figure 5

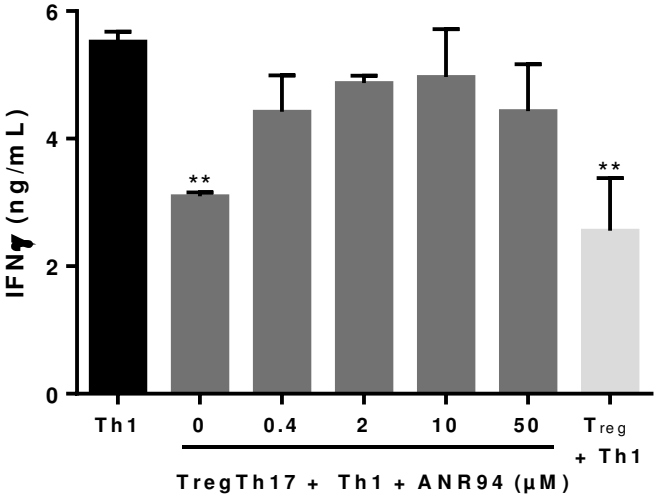
A



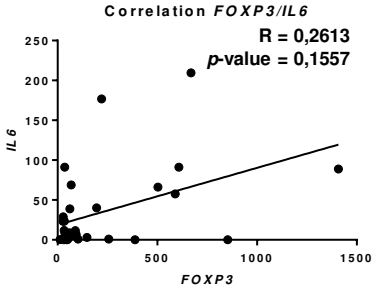
B

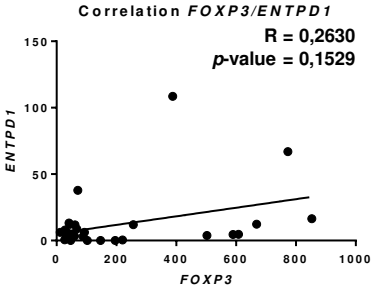


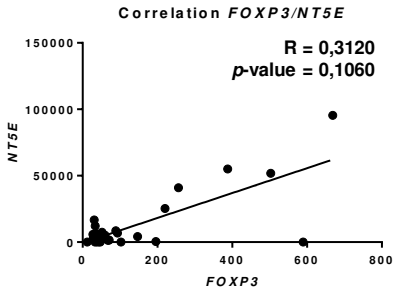
C

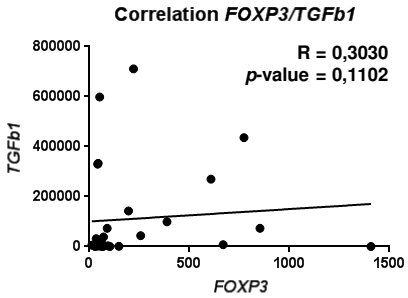


Supplementary figure 6



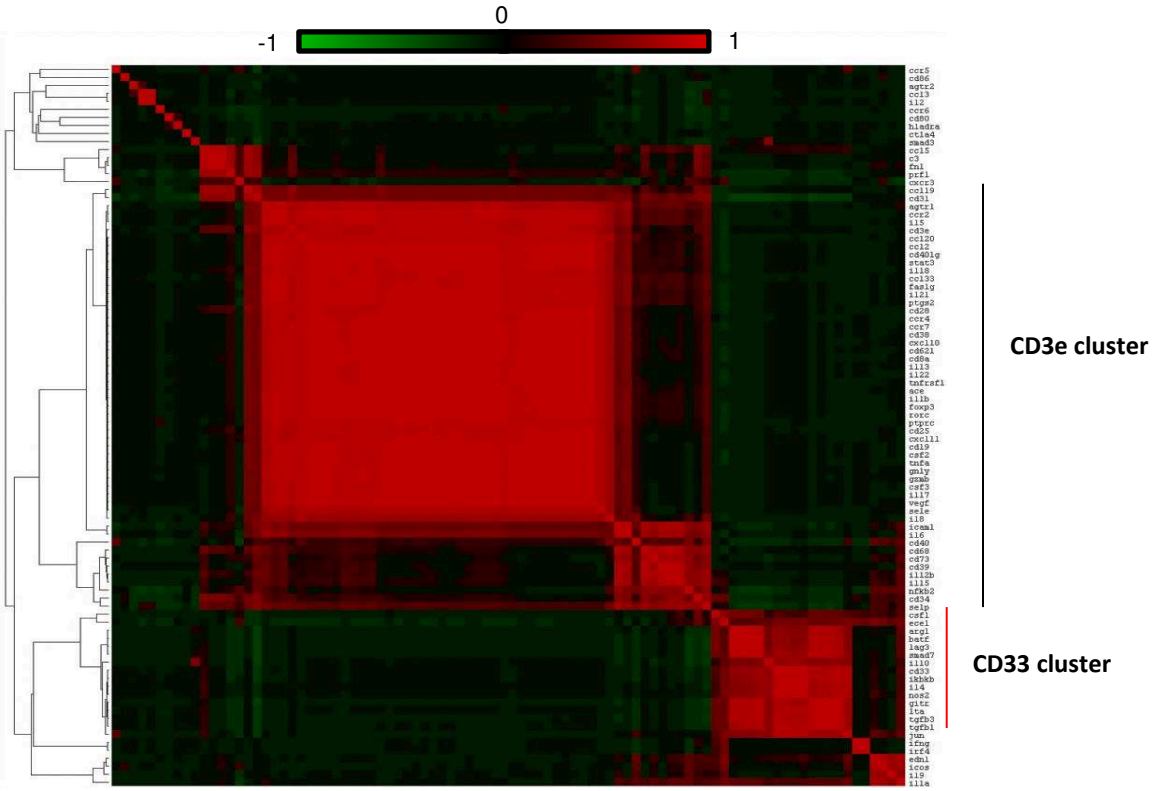




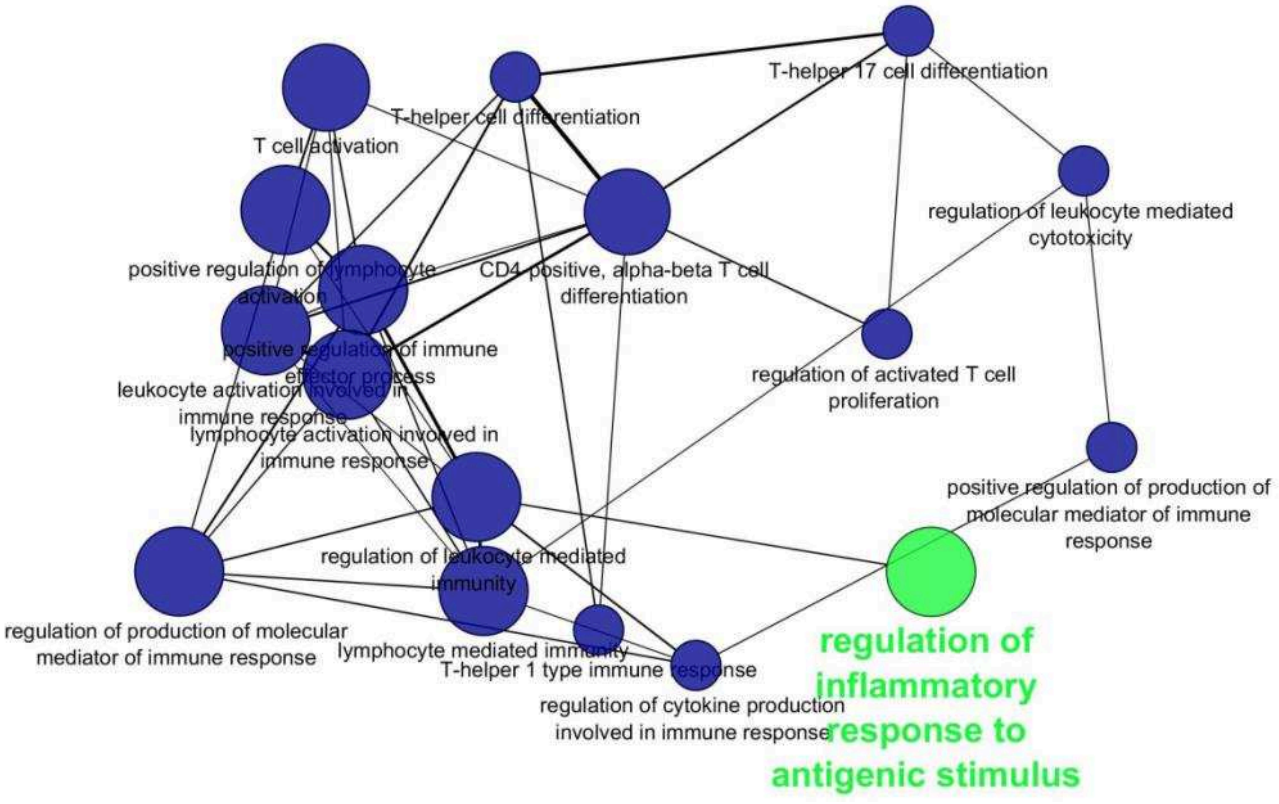


Supplementary figure 7

A



B



Supplementary Table 1: Patients and tumor characteristics (N=13)

Age (years)		
	< 50 years	4 (30.8%)
	>= 50 years	9 (69.2%)
	median (min;max)	51 [29;82]
	mean (SD)	58.08 (12.72)
pTumor size (mm)		
	<=20 mm	1 (7.7%)
	20 - 50 mm	9 (69.2%)
	> 50 mm	3 (23.1%)
Lymph node involvement		
	N0 :	3 (23.1%)
	N1 :	4 (30.8%)
	N2 :	6 (46.1%)
Tumor grade		
	1/2	10 (76.9%)
	3	3 (23.1%)
Estrogen receptors		
	Negative	4 (30.8%)
	Positive	9 (69.2%)
Progesterone receptors		
	Negative	4 (30.8%)
	Positive	9 (69.2%)
HER2 overexpression		
	No	12 (92.3%)
	Yes	1 (7.7%)
Breast cancer subtype		
	HER2+++	1 (7.7%)
	Triple negative	3 (23.1%)
	ER+ or PR+ & HER2-	9 (69.2%)

Supplementary Table 2: Patients and tumor characteristics (N=36) (Missing data for 4 patients)

Age (years)		
	< 50 years	6 (16.7%)
	>= 50 years	26 (72.2%)
	median (min;max)	63.5 [30;87]
	mean (SD)	61.03 (14.52)
pTumor size (mm)		
	<=20 mm	20 (55.6%)
	20 - 50 mm	10 (27.8%)
	> 50 mm	2 (5.5%)
Lymph node involvement		
	N0 :	(%)
	N1 :	(%)
	N2 :	(%)
Tumor grade		
	1/2	30 (83.4%)
	3	2 (5.5%)
Estrogen receptors		
	Negative	3 (8.3%)
	Positive	29 (80.6%)
Progesterone receptors		
	Negative	11 (30.6%)
	Positive	21 (58.3%)
HER2 overexpression		
	No	29 (80.6%)
	Yes	3 (8.3%)
Breast cancer subtype		
	HER2+++	3 (8.3%)
	Triple negative	3 (8.3%)
	ER+ or PR+ & HER2-	26 (72.3%)

Supplementary Table 3: Patients and tumor characteristics (N=145)

Age (years)		
	< 50 years	80(50.4%)
	>= 50 years	65 (49.7%)
	median (min;max)	48 [23;72]
	mean (SD)	49 (21)
pTumor size (mm)		
	<=20 mm	83 (57%)
	20 - 50 mm	56 (39%)
	> 50 mm	6 (4%)
Lymph node involvement		
	N0 :	43 (29%)
	N1 :	85 (59%)
	N2 :	19 (12%)
Tumor grade		
	1/2	76 (52%)
	3	69 (48%)
Estrogen receptors		
	Negative	115 (79%)
	Positive	30 (21%)
Progesterone receptors		
	Negative	120 (83%)
	Positive	25 (17%)
HER2 overexpression		
	No	145 (100%)
	Yes	0 (0%)
Breast cancer subtype		
	HER2+++	0 (0%)
	Triple negative	107 (74%)
	ER+ or PR+ & HER2-	38(26%)

Supplementary Table 4: Uni and multivariate* analysis (Cox regression) for factors associated with RFS

	Univariate HR	95% CI	p	Multivariate HR	95% CI	p
Age						
<50	1		0.9			
>50	1.”	0.7-1.8				
T stage						
T1	1		0.18	1		0.1
>T1	1.4	0.8-2.5		1.65	0.9-3	
N stage:						
N0	1		0.9			
N1 or N2	1.02	0.5-1.9				
Hormone receptor status						
Positive	1		0.17	1		0.04
Negative	0.6	0.3-1.3		0.46	0.2-0.97	
Tumor grade						
1 or 2	1		0.0001	1		0.03
3	2.8	1.6-5.1		2.2	1.05-4.7	
Intratumoral CD8 infiltrate						
>median	1		0.1	1		0.48
<median	1.62	0.9-2.9		0.78	0.4_1.5	
Peritumoral CD8 infiltrate						
>median	1		0.52			
<median	1.2	0.47-1.48				
Intratumoral IL-17 infiltrate						
>median	1		0.06	1		0.25
<median	1.7	0.98-2.9		1.45	0.77-2.77	
Peritumoral IL-17 infiltrate						
>median	1		<0.0001	1		<0.0001
<median	0.19	0.11-0.34		0.13	0.06-0.29	

Supplementary Table 5: Uni and multivariate* analysis (Cox regression) for factors associated with OS

	Univariate HR	95% CI	p	Multivariate HR	95% CI	p
Age						
<50	1		0.8			
>50	1.2	0.6-1.4				
T stage						
T1	1		0.3			
>T1	1.4	0.74-2.7				
N stage:						
N0	1		0.5			
N1 or N2	1.22	0.6-2.5				
Hormone receptor status						
Positive	1		0.06	1		0.43
Negative	0.55	0.4-1.02		0.71	0.3-1.6	
Tumor grade						
1 or 2	1		0.0001	1		0.001
3	3.4	1.8-6.6		4.2	1.7-10.3	
Intratumoral CD8 infiltrate						
>median	1		0.2	1		
<median	1.5	0.75-2.9		0.62	0.3_1.4	0.25
Peritumoral CD8 infiltrate						
>median	1		0.17	1		0.01
<median	1.6	0.8-3.1		2.7	1.2-6	
Intratumoral IL-17 infiltrate						
>median	1		0.24			
<median	1.5	0.8-2.8				
Peritumoral IL-17 infiltrate						
>median	1		0.0005	1		0.05
<median	0.28	0.15-0.5		0.3	0.13-0.71	

Supplementary Table 6: Frequency of clinicopathological characteristics of according to the IL-17 infiltration in the peritumoral area					
	IL-17 infiltrates above mediane		**IL-17 infiltrates below mediane**		P
	N	**%**	**N**	**%**	
Age					
<50	39	55	41	55	0.9
>50	31	45	34	45	
T stage					
T1	41	58	42	56	0.86
>T1	29	42	33	44	
N stage:					
N0	20	29	23	31	0.85
N1 or N2	50	71	52	69	
Hormone receptor status					0.25
Positive	15	21	23	31	
Negative	55	79	52	52	
Tumor grade					
1 or 2	34	49	42	56	0.4
3	36	51	33	44	
Intratumoral CD8 infiltrate					0.86
>median	29	48	37	51	
<median	31	52	35	49	
Peritumoral CD8 infiltrate					0.22
>median	26	43	40	55	
<median	34	57	32	45	
Intratumoral IL-17 infiltrate					0.71
>median	36	51	41	55	
<median	34	49	34	45	

*13 missing data for CD8 marker. Data were compared using Fisher exact test.

Ce projet nous a permis de mettre en évidence plusieurs points :

1. **Les lymphocytes Th17 CD25$^+$ CCR6$^+$ s'accumulent dans les tumeurs du sein et sont immunosuppresseurs :**

✓ Aucune différence de proportion des lymphocytes Th1, Th2, Th17 et Treg n'est observée entre le sang de volontaires sains et le sang de patientes atteintes de cancer du sein tandis qu'on retrouve une augmentation significative des lymphocytes Th17 exprimant le récepteur CD25 dans des tumeurs mammaires comparées à du tissu mammaire sain.

✓ Ces lymphocytes Th17 CD25$^+$ expriment les facteurs de transcription RORγt et Foxp3, sécrètent de l'IL-17A et expriment les ectonucléotidases CD39 et CD73.

✓ Ces cellules infiltrant les tumeurs du sein ont des capacités immunosuppressives dépendantes des ectonucléotidases, de fait elles inhibent les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD4$^+$ et CD8$^+$.

2. **Les lymphocytes Th17 sont attirés au niveau de la tumeur et acquièrent des fonctions immunosuppressives *via* les cytokines présentes dans le microenvironnement tumoral :**

✓ L'axe CCR6/CCL20 recrute les lymphocytes Th17 au niveau du site tumoral.

✓ L'IL-6 et le TGF-β, cytokines du microenvironnement tumoral, façonnent les lymphocytes Th17 et leur permettent d'acquérir des propriétés immunosuppressives.

3. **L'infiltration des lymphocytes Th17 a un rôle sur le pronostique des patientes atteintes de cancer du sein :**

✓ La présence d'une forte infiltration tumorale en cellules IL-17$^+$ est associée à un moins bon pronostic clinique des patientes.

✓ La présence d'une forte infiltration tumorale en cellules IL-17$^+$ compromet l'impact favorable d'une forte infiltration en lymphocytes T CD8$^+$ chez les patientes atteintes de cancer du sein.

La nature et les fonctions des différents sous-types de TILs dans les cancers du sein restent jusqu'à maintenant mal compris. Nous avons mis en évidence que les lymphocytes Th17 $CCR6^+$ s'accumulent dans les tumeurs mammaires et que le contexte cytokinique du microenvironnement tumoral modèle ces cellules de façon à ce qu'elles expriment les ectonucléotidases CD39 et CD73 ainsi que le récepteur CD25. Ainsi, *via* l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73, les lymphocytes Th17 intra-tumoraux suppriment les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$. Ainsi, une forte infiltration en cellules IL-17^+ chez des patientes atteintes de cancer du sein est associée à un moins bon pronostic clinique (**Figure 19**, p. 132).

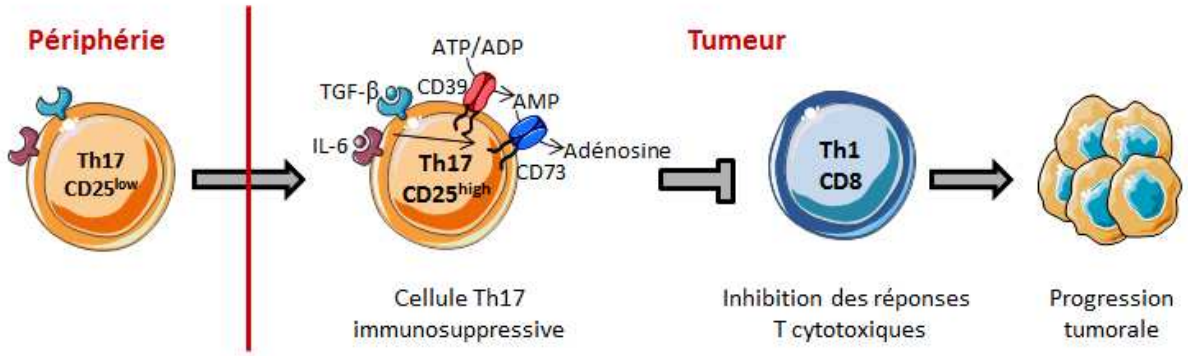


Figure 19. Influence du microenvironnement tumoral sur les fonctions des lymphocytes Th17 humains.

Jusqu'à présent, les recherches sur les TILs dans le cancer du sein se sont axées essentiellement sur l'impact quantitatif de l'infiltrat global comme facteur pronostique, avec pour objectif final de pouvoir déceler précocement les patientes porteuses de tumeurs non immunogènes, afin de pouvoir éventuellement leur proposer des traitements compensateurs en association avec la chimiothérapie. Toutefois, comme nos travaux le montrent, la complexité qualitative et fonctionnelle des cellules composant le microenvironnement immunitaire des cancers du sein impose à notre sens, la nécessité d'avoir une vision qualitative et non pas seulement quantitative des cellules immunitaires présentes au sein du microenvironnement tumoral.

Bien qu'il ait été proposé qu'une infiltration tumorale en cellules sécrétant de l'IL-17 dans le cancer du sein puisse être de mauvais pronostic, les mécanismes biologiques soutenant ce rôle dommageable n'ont pas été démontrés dans ce contexte (Chen et al., 2013). Nous avons mis en évidence que les lymphocytes Th17 atténuent voire inhibent les réponses T cytotoxiques *via* la conversion de l'ATP extracellulaire en adénosine, qui est une molécule immunosuppressive puisqu'elle inhibe l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ *in situ*. Il a déjà été démontré que les

lymphocytes T régulateurs exercent des fonctions immunosuppressives dépendantes des ectonucléotidases CD39 et CD73 (Dwyer et al., 2010). Nos observations pourraient donc renforcer la pertinence clinique de bloquer les ectonucléotidases CD39 et CD73 pour neutraliser simultanément les lymphocytes Th17 et T régulateurs intra-tumoraux qui les expriment avec pour but une restauration des réponses immunitaires cytotoxiques anti-tumorales.

Des anticorps anti-CD39 murins et humains tels que le BY40 sont actuellement en cours de développement et de test afin d'inhiber les cellules régulatrices pro-tumorales et de favoriser l'action des lymphocytes Th17 anti-tumoraux. Ces résultats confirment ainsi la pertinence clinique de cette approche et montrent l'intérêt potentiel d'un tel ciblage thérapeutique dans les cancers, notamment le cancer du sein et par extension dans le traitement des maladies auto-immunes.

Projet 2

Sirtuin-1 (SIRT1) activation controls tumor growth by impeding Th17 differentiation *via* STAT3 deacetylation

Notre équipe s'est toujours intéressée au rôle ambivalent des lymphocytes Th17 dans un contexte de cancer. En effet, l'intérêt de l'équipe du Pr. Ghiringhelli était déjà porté sur l'identification de stratégies permettant d'inhiber la polarisation des lymphocytes Th17 par des agents pharmacologiques. Ainsi, il a été mis en évidence que l'acide docohexaénoïque (DHA) *via* l'activation de PPARγ inhibe la polarisation Th17 en diminuant l'expression de RORγt et la sécrétion d'IL-17 (Berger et al., 2013). Mon premier travail sur le cancer du sein a permis de soutenir l'intérêt d'inhiber les fonctions suppressives des lymphocytes Th17 pro-tumoraux en bloquant les ectonucléotidases CD39 et CD73. Cependant, l'inhibition directe de la différenciation Th17 pourrait également être une cible thérapeutique puisqu'il est envisageable que les lymphocytes Th17, tout comme les lymphocytes T régulateurs, puissent présenter des propriétés immunorégulatrices indépendantes des ectonucléotidases CD39 et CD73.

Ce deuxième projet a donc eu pour but de déterminer la meilleure cible pour l'inhibition de la différenciation Th17 et de tenter de démembrer les mécanismes moléculaires sous-jacents. Un article a attiré notre attention lors des recherches bibliographiques réalisées afin d'identifier une cible capable de bloquer la polarisation Th17 : une étude montrait que le jeûne et les agonistes de Sirtuine 1 (SIRT1) permettaient d'activer la néoglucogenèse par la désacétylation de STAT3 (Nie et al., 2009). STAT3 s'avère être une cible parfaite puisque ce facteur de transcription est indispensable à la différenciation Th17 et qu'il permet surtout l'expression du facteur de transcription RORγt, facteur de transcription clé de la polarisation Th17. Ainsi, STAT3 étant indispensable à la différenciation Th17, nous avons décidé de déterminer si des agonistes de SIRT1 tels que le resvératrol, pourraient bloquer la polarisation des lymphocytes Th17 en activant SIRT1, ce qui empêcherait la différenciation Th17 *via* la désacétylation de STAT3. Pour être davantage pertinent d'un point de vue thérapeutique et translationnel, nous avons également entrepris de tester plusieurs agonistes de SIRT1, en particulier la metformine, un antidiabétique oral largement utilisé et qui a monté un rôle préventif dans l'apparition de plusieurs cancers digestifs, dont le cancer colorectal (Zhang et al., 2011).

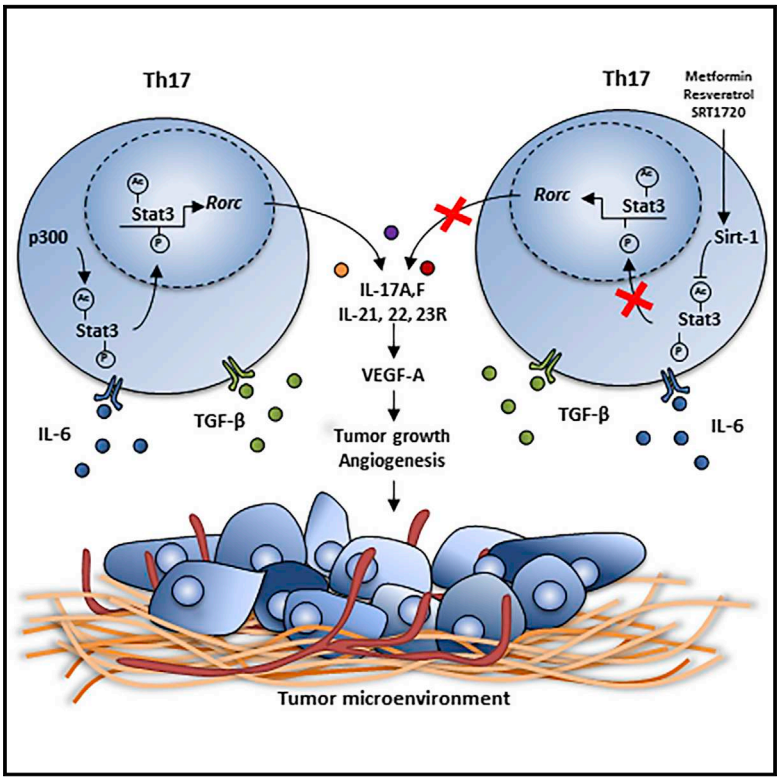
Ainsi, nous avons porté un grand intérêt à étudier le rôle des activateurs de SIRT1 sur les lymphocytes Th17 et l'impact biologique qui en résulte dans un contexte de cancer.

Article

Cell Reports

Sirtuin-1 Activation Controls Tumor Growth by Impeding Th17 Differentiation via STAT3 Deacetylation

Graphical Abstract



Highlights

- SIRT1 activation impedes Th17 cell differentiation through STAT3 deacetylation
- STAT3 deacetylation reduces its capacity to bind to the *Rorc* promoter
- SIRT1 activation limits tumor growth in mice and reduces Th17 frequency in patients
- SIRT1 activators might be used to target IL-17A protumor functions in cancer patients

Authors

Emeric Limagne, Marion Thibaudin, Romain Euvrard, ..., Lionel Apetoh, Dominique Delmas, François Ghiringhelli

Correspondence

elimagne@cgfl.fr (E.L.), fghiringhelli@cgfl.fr (F.G.)

In Brief

Limagne et al. use drugs to activate SIRT1 and find that this leads to STAT3 deactylation and reduced mouse and human Th17 cell differentiation. SIRT1 agonists reduce tumor growth in mice and the frequency of Th17 cells in cancer patients. This study suggests that activating SIRT1 may target IL-17A protumor functions.

Limagne et al., 2017, Cell Reports *19*, 746–759
April 25, 2017 © 2017 The Author(s).
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.004

OPEN ACCESS
CellPress

Cell Reports
Article

Sirtuin-1 Activation Controls Tumor Growth by Impeding Th17 Differentiation via STAT3 Deacetylation

Emeric Limagne,[1,2,3,5,*] Marion Thibaudin,[1,2,5] Romain Euvrard,[1,2] Hélène Berger,[1,2] Pauline Chalons,[1,2] Frédérique Végan,[1,2,3] Etienne Humblin,[1,2] Romain Boidot,[1,2,3] Cédric Rébé,[1,2,3] Valentin Derangère,[1,2,3] Sylvain Ladoire,[1,2,3,4] Lionel Apetoh,[1,2,4,6] Dominique Delmas,[1,2,6] and François Ghiringhelli[1,2,3,4,6,7,*]
[1]University Bourgogne Franche-Comté, LNC UMR866, 21000 Dijon, France
[2]INSERM, LNC UMR866, 21000 Dijon, France
[3]Platform of Transfer in Oncology, University Bourgogne Franche-Comté, Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France
[4]Department of Medical Oncology, Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France
[5]These authors contributed equally
[6]Senior author
[7]Lead Contact
*Correspondence: elimagne@cgfl.fr (E.L.), fghiringhelli@cgfl.fr (F.G.)
http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.004

SUMMARY

Sirtuin-1 deacetylates proteins and has emerged as a critical regulator of different cellular processes, particularly inflammation. Basal SIRT1 activity was previously found to limit Th9 and enhance Th17 differentiation in mice, but the effect of pharmacological SIRT1 activation on T cell differentiation and antitumor responses remains unclear. Here, we find that SIRT1 pharmacological agonists selectively impede mouse and human Th17 cell differentiation. SIRT1 activation induces STAT3 deacetylation, thus reducing its ability to translocate into the nucleus, bind to *Rorc* promoter, and induce its transcription. SIRT1 agonists reduce tumor growth in mice by blocking Th17 cell differentiation. In cancer patients, the SIRT1 agonist metformin reduced the frequency of Th17 cells and STAT3 acetylation levels. Altogether, these data underscore that SIRT1 activation impedes Th17 cell differentiation and thereby limits tumor growth and suggest that SIRT1 activators may directly target IL-17A functions.

INTRODUCTION

Th17 cells develop from naive $CD4^+$ T cells in the presence of TGF-β and IL-6 and are maintained long-term in the presence of IL-21 and IL-23 (Stritesky et al., 2008). Th17 cells are characterized by their capacity to secrete IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, and CCL20 (Dong, 2008; Liang et al., 2006). The initiation of their transcriptional program is dependent on STAT3, IRF4, and BATF and also is controlled by the master transcription factors retinoic acid-related orphan receptors *RORγt* and *RORα* (Ciofani et al., 2012; Ivanov et al., 2006). The role of Th17 cells in cancer is controversial with positive and negative effects described in both mouse and human cancers. Th17 cells can be separated into two different subsets with either regulatory or inflammatory properties depending on the stimuli they encounter. These divergent phenotypes may explain why Th17 cells have potent antitumor properties in some experimental settings while promoting tumor growth in others (Martin et al., 2012). In the context of human colorectal cancer, Th17 cells that infiltrate the tumor bed are often associated with a poor prognosis, suggesting that targeting such cells may have clinical relevance in this disease (Liu et al., 2011). Two main mechanisms explain why Th17 cells can favor tumor outgrowth. IL-17A is known to promote tumor angiogenesis and stimulate VEGF-A production (Martin-Orozco et al., 2009; Numasaki et al., 2003). In addition, IL-17A induces STAT3 activation in cancer cells, thus enhancing their resistance to apoptosis and promoting their proliferation (Loncle et al., 2015). We and others have shown that targeting IL-17A or Th17 in vivo restrains tumor growth (Berger et al., 2013; He et al., 2010; Wang et al., 2009), thus supporting the development of pharmacological tools that could limit Th17 cell induction.

The transcription factor STAT3 is essential for Th17 cell differentiation. STAT3 is required for the initiation of the Th17 cell transcriptional program and regulates the expression of several essential genes for Th17 cell development (Ciofani et al., 2012). STAT3 directly binds to the promoters of *Il17a* and *Il17f* and also controls chromatin accessibility at these loci. STAT3 activation, which is driven by the Th17-differentiating cytokines, requires STAT3 phosphorylation on tyrosine 705 and serine 727 (Wen et al., 1995). In addition to phosphorylation, it was observed in different cell types that the transcriptional activity of STAT3 can be regulated by acetylation on lysine 685, mediated by the acetyltransferase p300 and inhibited by Sirtuin 1 (SIRT1). This modification is required for STAT3 dimerization, phosphorylation of tyrosine 705, and transcriptional function (Nie et al., 2009; Yuan et al., 2005). However, the role of STAT3 acetylation and its regulation in T cells is elusive. Here, we found that pharmacological SIRT1 activation selectively impedes Th17 development by limiting STAT3 acetylation in mouse and human,

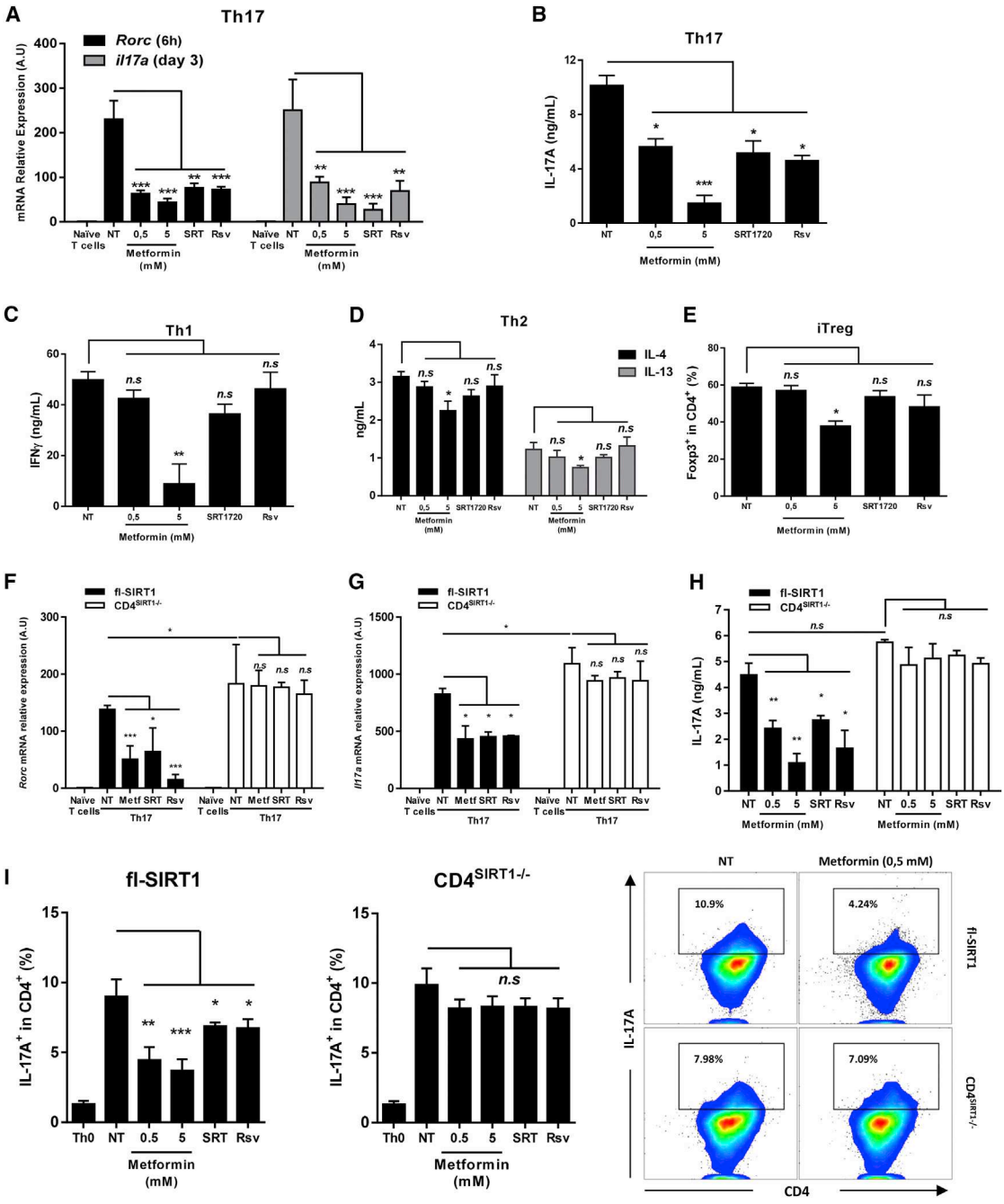


Figure 1. SIRT1 Activation Selectively Blunts Th17 Differentiation

Cell-sorted naive CD4$^+$ CD62L^{hi} T cells were isolated from naive or fl-CD4/SIRT1-Cre C57BL/6 mice and differentiated into Th1, Th2, iTreg, or Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hr and required cytokines in the presence or not of 0.5 or 5 mM metformin, 10 μM Rsv, or 1 μM SRT1720.

(A) qRT-PCR analysis of *Rorc* and *il17a* mRNA expression was assessed after 6 hr (*Rorc*) or 3 days (*il17a*) of culture, and expression is presented relative to *Actb* expression.

(B–D) ELISA analysis of IL-17A (B), IFN-γ (C), and IL-4 and IL-13 (D) in supernatants of CD4$^+$ T cells differentiated for 3 days.

(E) Flow cytometry analysis of intracellular staining for Foxp3 in naive CD4$^+$ T cells polarized in iTreg in the presence or not of metformin, Rsv, or SRT1720 assessed on day 3 of culture.

(F and G) qRT-PCR analysis of *Rorc* (F) and *il17a* (G) mRNA expression of CD4$^+$ T cells isolated from fl-SIRT1 or CD4$^{SIRT1-/-}$ mice polarized in Th17 in the presence or not of SIRT1agonists assessed on day 3 of culture.

(H) Same as in (F) and (G), ELISA analysis of IL-17A in supernatants of CD4$^+$ T cells differentiated for 3 days.

(legend continued on next page)

thus demonstrating the role of STAT3 acetylation for Th17 differentiation. Such an observation has clinical relevance as illustrated by limitation of Th17-dependent tumor growth in mouse models upon SIRT1 activation.

RESULTS

SIRT1 Activation Selectively Blunts Th17 Differentiation

To test the role of pharmacological SIRT1 activation on $CD4^+$ T cell differentiation in mice, we generated in vitro Th1, Th2, Th17, and induced regulatory T (iTreg) cells from naive CD4 T cells with T cell receptor (TCR) triggering and the appropriate cytokine cocktail in the presence or not of SIRT1 activators. We used resveratrol (Rsv), low-dose metformin, and SRT1720 as classical activators of SIRT1 (Chauhan et al., 2011; Chini et al., 2015; Harikumar et al., 2010; Harper et al., 2007; Hung et al., 2016; Tyack et al., 2015; Zhang et al., 2015). We validated that low-dose metformin induced SIRT1 activation as demonstrated by a global deacetylation of protein without AKT/mTor inhibition (Figure S1A). As a control, high doses of metformin induced both inhibition of AKT/mTor pathway (demonstrated by dephosphorylation of p70-S6K) and activation of SIRT1 (demonstrated by global deacetylation of protein) (Figure S1A). We observed using qPCR that SRT1720, Rsv, and low dose of metformin specifically reduced *il17a* and *Rorc* mRNA expression in CD4 T cells during Th17 differentiation (Figure 1A) but did not affect *Ifng* and *Tbx21* mRNA expression during Th1 differentiation or *il4*, *il5*, *il13*, and *Gata3* mRNA expression during Th2 differentiation, or *Ctla4*, *Gitr*, and *Foxp3* mRNA expression during iTreg differentiation (Figure S1B). Using ELISA, we confirmed that only IL-17A production is reduced by the three SIRT1 activators (Figure 1B), whereas they did not affect IFN-γ production by Th1 (Figure 1C) or IL-4 and IL-13 production by Th2 (Figure 1D). Intracellular staining also showed that SIRT1 activators did not affect Foxp3 expression at the protein level in iTreg cells (Figure 1E). A lower dosage of metformin of 10 μM equivalent to the dosage classically found in mouse serum (Chandel et al., 2016) also impedes the in vitro Th17 differentiation (Figure S1B). As a control, we observed that a high dose of metformin, which affects both SIRT1 and AKT/mTor pathway, partially impeded Th1, Th2, Th17, and iTreg CD4 T cell differentiation (Figure S1C and Figures 1A–1E). To confirm that the effect of SIRT1 activators is specifically driven by SIRT1 activation, we used CD4 T cells from transgenic mice with conditional invalidation of SIRT1 in CD4 T cells by crossing CD4-Cre mice with SIRT1-Flox mice. Such CD4 T cells were named $CD4^{SIRT1-/-}$ in the manuscript. These cells did not express SIRT1 protein upon western blotting analysis (Figure S1D). Sirt1 deficiency completely blunts the ability of the three SIRT1 activators to blunt Th17 polarization as demonstrated by their inability to reduce *Rorc* and *il17a* mRNA expression (Figures 1F and 1G) and IL-17A protein expression using ELISA (Figure 1H) and intracellular staining by flow cytometry (Figure 1I). Such data are surprising considering the previous report from Lim et al. (2015) showing that SIRT1 deletion blunts Th17 differentiation. In our setting, we also observed that genetic or pharmacological inactivation of SIRT1 modestly but significantly reduces Th17 differentiation (Figures 1F–1I), thus suggesting a biphasic role of Sirt1 on Th17 differentiation.

Together, these data show that SIRT1 agonists selectively blunt murine Th17 polarization in vitro.

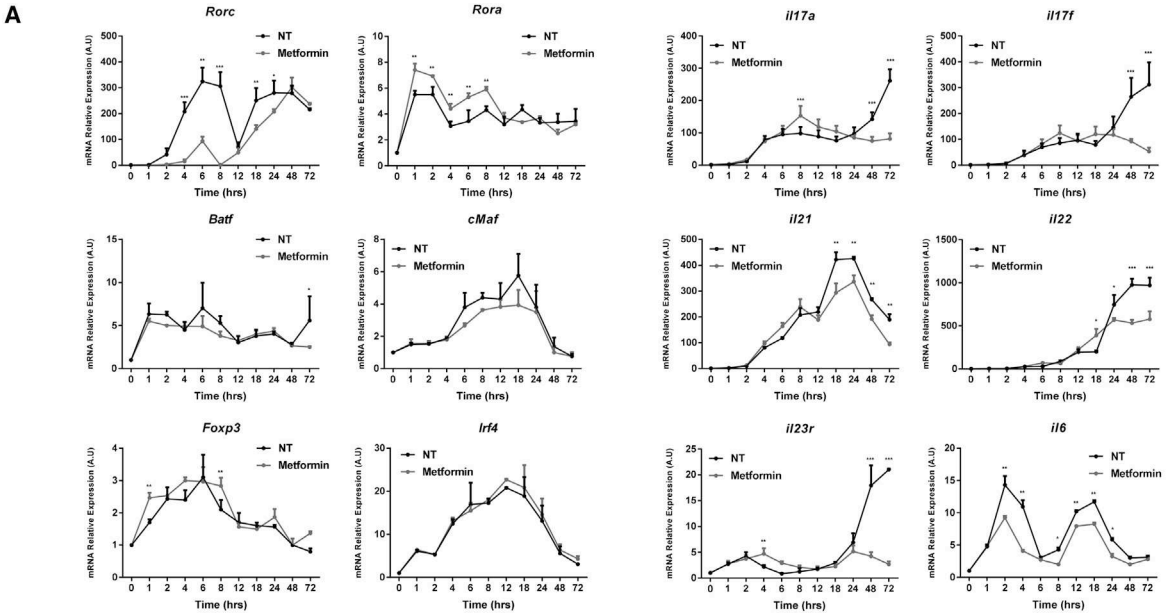
SIRT1 Regulates IL-17A and RORγt Expression by Deacetylation of STAT3

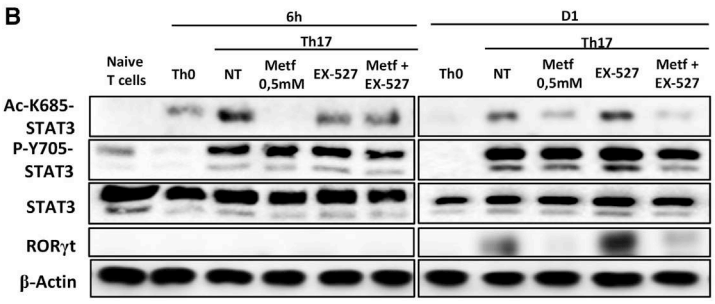
To determine the effect of SIRT1 agonists on Th17 transcriptional profile, we performed kinetic analysis of Th17-related gene mRNA expression by qPCR in Th17 cells differentiated in the presence or not of SIRT1 agonist. We observed that expression of all Th17-related cytokines is impeded by addition of SIRT1 agonist (Figure 2A). Interestingly, in addition to cytokines, the gene that is the most rapidly affected by SIRT1 agonist is *Rorc*, with a significant downregulation after 2 hr of differentiation (Figure 2A). We confirmed that the rapid decrease in *Rorc* mRNA expression is mirrored by a decrease RORγt protein expression by western blotting performed 24 hr after induction of Th17 differentiation (Figure 2B). STAT3 is a transcription factor required for initiation of Th17 program and induction of *Rorc* mRNA expression (Durant et al., 2010). As STAT3 requires acetylation to exert its transcriptional function, we hypothesized that SIRT1 activation may affect STAT3 activation. We observed by western blotting that the three SIRT1 agonists reduced both STAT3 acetylation (K685) and STAT3 phosphorylation (Y705) (Figure S2A). STAT3 deacetylation by SIRT1 activator occurred after 6 hr of treatment and was maintained at 24 hr (Figure 2B). A lower dosage of metformin of 10 μM equivalent to the dosage classically found in mouse serum also impedes the in vitro Th17 difSTAT3 acetylation in Th17 cells (Figure S2B). In contrast, STAT3 acetylation and phosphorylation were not affected in $CD4^{SIRT1-/-}$ cells by SIRT1 activators (Figure S2C). Inhibition of SIRT1 using EX-527 did not affect STAT3 acetylation (Figure 2B). When we examined RORγt expression, we observed that RORγt expression is only detectable after 24 hr of differentiation (Figure 2B). Although SIRT1 activator inhibited RORγt expression, inhibitor of SIRT1 modestly enhanced RORγt expression (Figure 2B).

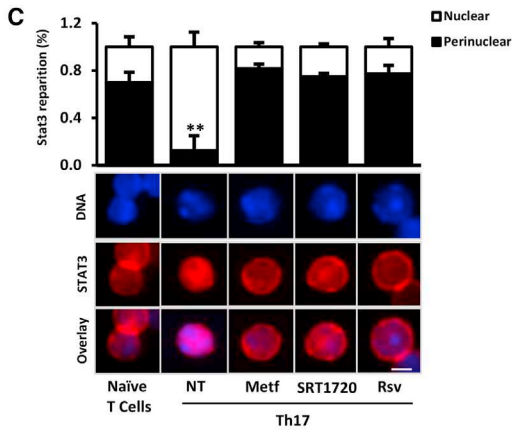
In addition to its capacity to deacetylate STAT3, SIRT1 is also known to be able to deacetylate RORγt, PPARγ, and p65 (Ghisays et al., 2015; Han et al., 2010; Lim et al., 2015), which are molecules involved in Th17 differentiation (Berger et al., 2013; Lim et al., 2015; Ruan and Chen, 2012). To test whether STAT3 deacetylation is involved in the effect of SIRT1 activator on Th17 differentiation, we treated naive CD4 T cells with either RORγt, PPARγ, p65, or STAT3 inhibitor in the presence or absence of SIRT1 activator and performed Th17 differentiation. We observed that SIRT1 activator enhanced the capacity of RORγt, PPARγ, and p65 inhibitor to blunt Th17 polarization,

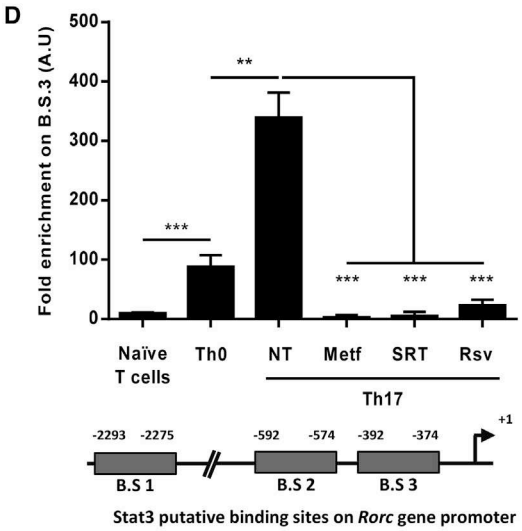
(I) Flow cytometry analysis of intracellular staining for IL-17A in naive $CD4^+$ T cells isolated from fl-SIRT1 (left panel) or $CD4^{SIRT1-/-}$ (middle panel) mice polarized or not in Th17 in the presence or not of SIRT1 agonists assessed on day 3 of culture. Numbers in outlined areas indicate percentage of cells in gate. Representative data from one of three independent experiments are shown in right panel.

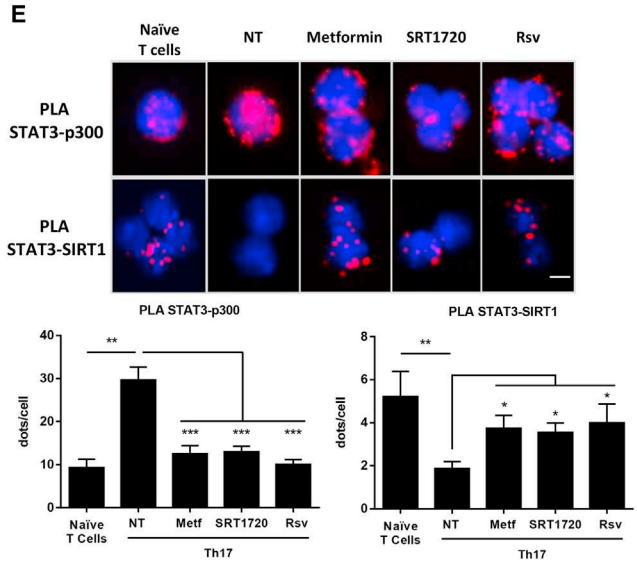
NS, not significant; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Data are from three independent experiments (median and SEM).











(legend on next page)

whereas SIRT1 activator was unable to enhance the inhibitory effect of STAT3 inhibitor, thus demonstrating that SIRT1 activator and STAT3 activator target the similar pathway. Together, such data strongly suggested that the main effect of SIRT1 activator relied on its capacity to target STAT3 (Figure S2D).

STAT3 acetylation was previously shown to affect its ability to translocate into the nucleus (Zhuang, 2013). Using immunofluorescence, we observed that Th17 differentiation induced STAT3 translocation from the cytoplasm into the nucleus. SIRT1 agonists blunted this nuclear translocation and maintained STAT3 in the cytoplasm (Figure 2C). Accordingly, STAT3 chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay on three putative binding sites on *Rorc* promoter gene using nuclear extract of Th17 cells treated or not with SIRT1 agonists showed that STAT3 binding on *Rorc* promoter (binding site 3 [B.S3]) is dramatically impeded by the SIRT1 agonist treatment (no enrichment was observed on B.S1 and B.S2) (Figure 2D). STAT3 can heterodimerize with either the histone deacetylase SIRT1 or the histone acetylase p300 to regulate its acetylation. These interactions dictate the acetylation status of STAT3 and its ability to migrate into the nucleus to drive its transcriptional effect (Zhuang, 2013). In contrast, a previous report showed that basal SIRT1 activity deacetylates RORγt (Lim et al., 2015). To determine whether SIRT1 activation modifies such interactions in Th17 cells, we performed a proximity ligation assay using anti-STAT3, anti RORγt antibody, and anti-SIRT1 or p300 antibodies. This experiment revealed that, in the absence of activator, SIRT1 did not interact with STAT3 but with RORγt in Th17 (Figure S2E). p300 and STAT3 strongly interacted in Th17 nuclei compared to naive CD4 T cells, thus corroborating the role of this complex in the induction of the Th17 program (Figure 2E). SIRT1 agonists strongly reduced p300-STAT3 interacting dots and enhanced the number of SIRT1 STAT3 interacting dots (Figure 2E). Importantly, most of these dots were found outside the nucleus (Figure 2E), thus supporting the hypothesis that SIRT1 is involved in STAT3 exclusion of the nucleus of CD4 T cells via its deacetylase activity and a competition with p300 interaction. In the presence of SIRT1 activator, SIRT1 does not interact with RORγt, thus confirming that in the activating condition SIRT1 mostly acts on STAT3 (Figure S2E).

Overall, our results support the hypothesis that SIRT1 interacts with STAT3 to deacetylate and maintain it outside of the nucleus of Th17 cells, thus preventing its association with p300 and the initiation of the Th17 program.

SIRT1 Inhibition Blunts In Vivo Th17 Polarization

We previously demonstrated during B16F10 melanoma tumor growth that Th17 accumulates in both tumor bed and draining lymph nodes (Bruchard et al., 2013; Chalmin et al., 2012). Using metformin to activate SIRT1 in vivo, we observed a reduction of IL-17A-expressing CD4 T cell frequency in the tumor bed and draining lymph nodes of B16F10 tumor-bearing mice (Figures 3A and 3B). In contrast, metformin did not affect IL-17A-expressing CD4 T cell frequency in transgenic $CD4^{SIRT1-/-}$ mice in this setting of subcutaneous transplanted B16F10 tumors (Figures 3A and 3B). As a control, we observed that metformin did not affect Th1, Th2, and iTreg frequency (Figure S3). Similarly, to in vitro data, we observed a reduction of STAT3 acetylation in Th17 infiltrating cells in mice after metformin treatment, and this reduction was not observed in Th17 from $CD4^{SIRT1-/-}$ mice (Figure 3C).

Together, these data underscore that in vivo pharmacological SIRT1 activation in CD4 T cells reduces Th17 polarization and STAT3 acetylation without affecting other T helper differentiation in the context of cancer.

The Anticancer Therapeutic Effects of SIRT1 Agonists Rely on Their Ability to Target IL-17A

IL-17A was shown to contribute to tumor growth by different mechanisms notably by its ability to promote tumor angiogenesis (Liu et al., 2011). In B16F10 and CT26 models, two models of subcutaneous transplantable tumors in C57BL/6 and Balb/C mice, respectively, we observed that metformin and Rsv delayed tumor growth (Figures 4A and 4B). This effect was blunted by the SIRT1 antagonist EX-527 (Figures 4A and 4B). Similar results were observed in the B16F10 metastasis lung tumor model (Figure 4C). The effect of SIRT1 agonist was completely dependent on T cells because in the two tumor models the treatment efficacy was completely blunted in athymic nude mice (Figures 4D and 4E). As SIRT1 agonist reduced Th17 cell polarization and IL-17A production without affecting other T helper polarization, we searched for a role of IL-17A in the therapeutic effect of SIRT1 agonist. B16F10 tumor progression is reduced in IL-17A-deficient mice (Figure 4F). Importantly, although metformin and Rsv reduced tumor growth in wild-type (WT) mice, these drugs had no effect in $IL17a^{-/-}$ mice, thus demonstrating that IL-17A was required for the antitumor effect of SIRT1 agonists (Figure 4F). Similar results were observed in the CT26 model using IL-17A neutralizing antibody (Figure 4G). In the setting of B16F10 tumor, IL-17A production was observed in the tumor

Figure 2. SIRT1 Regulates IL-17A and RORγt Expression by Deacetylation of STAT3

(A) Cell-sorted naive $CD4^{+}CD62L^{hi}$ T cells were isolated from C57BL/6 and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 1, 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24, 48, and 72 hr in the presence or not of SIRT1 agonist (low dose of metformin). qRT-PCR analysis of *Rorc*, *Rora*, *Foxp3*, *Batf*, *cMaf*, *Irf4*, *il6*, *il17a*, *il17f*, *il21*, *il22*, and *il23r* expression. Expression is presented relative to *Actb* expression.

(B) Expression of Ac-STAT3 (K685), p-STAT3 (Y705), or RORγt in naive T cells, Th0, or Th17-differentiated cells for 6 and 24 hr treated or not with the SIRT1 agonist (low dose of metformin), or the SIRT1 inhibitor (EX-527), or both was determined by western blotting.

(C) Naive T cells and Th17-differentiated cells for 6 hr treated or not with the SIRT1 agonists were stained and analyzed for STAT3 expression and localization (nuclear or perinuclear) using immunofluorescence (upper panel is quantification on 100 cells; lower panel, a representative cell).

(D) ChIP analysis of the interaction between STAT3 and *Rorc* promoter in naive T cells and in vitro Th17 cells that were differentiated and treated or not with the SIRT1. Analysis on the putative B.S3 for STAT3 on *Rorc* promoter (−392 −374) is shown. For the putative B.S1 and B.S2, any amplification was obtained.

(E) Proximity ligation assay (PLA) analysis of the interaction between STAT3 and p300 or STAT3 and SIRT1 in naive T cells and in vitro-differentiated Th17 cells treated or not with the SIRT1 agonists. (The lower panel shows quantification of interacting dots on 100 cells; in the upper panel, a representative cell is shown).

NS, not significant; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Data are from three (A and D) independent experiments (median and SEM); (B), (C), and (E) are one experiment representative of three independent experiments.

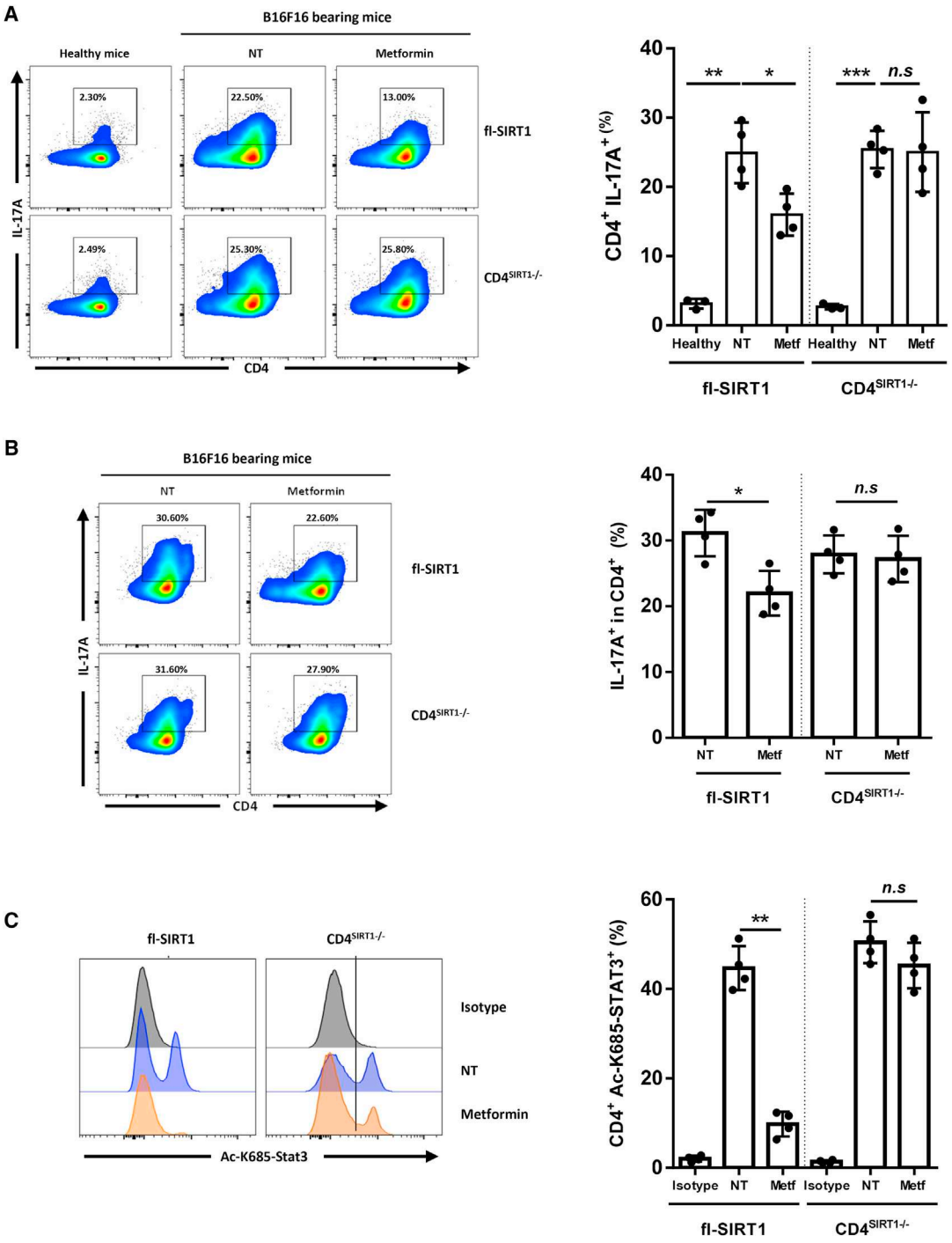


Figure 3. SIRT1 Activation Blunts In Vivo Th17 Polarization

$CD4^+$ T cells isolated from draining lymph nodes or tumor-infiltrating lymphocytes isolated from B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice under control or metformin (150 mg/kg/day) treatment. Cells were activated for 6 hr with PMA/Iono and monensin. Then, the proportion of Th17 cells was determined by IL-17A intracellular cytokine staining.

(A and B) IL-17A expression from Th17 cells was assessed by intracellular cytokine staining in draining lymph nodes of WT mice, B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control, or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice (A) or in the tumor bed of B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice (B) under control or metformin treatment. The left panel is a representative dot plot; the right panel represents data from four independent mice.

(C) Same as (B), expression of Ac-STAT3 in $CD4^+$ cells was assessed by intracellular cytokine staining.

NS, not significant; *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$ (Mann-Whitney test). Data are from four (right panels) independent mice (median and SEM) or are from one representative of four independent mice (left panels).

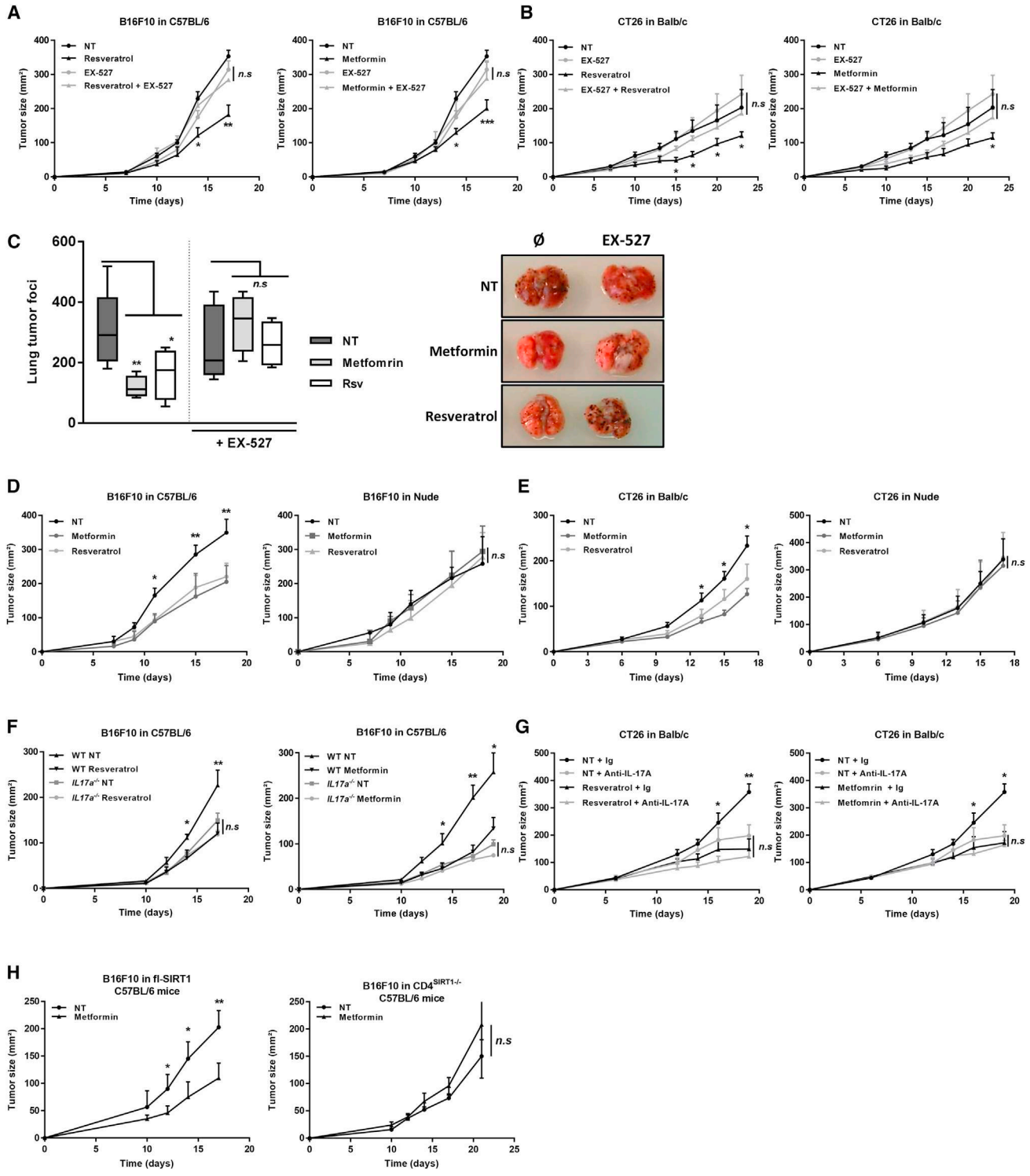


Figure 4. The Anticancer Therapeutic Effect of SIRT1 Agonists Relies on Their Ability to Target IL-17A

(A and B) C57BL/6 (A) and BALB/c mice (B) under control, Rsv (35 mg/kg/day) (left), or metformin (150 mg/kg/day) (right) treatments with or without EX-527 (1 mg/kg/day) treatment were inoculated with B16F10 and CT26 cells, respectively, and tumor growth was monitored over 2.5 weeks.

(C) Lung tumor foci in WT mice 13 days after intravenous injection of B16F10 melanoma cells with or without metformin or Rsv treatment and with or without EX-527 (1 mg/kg/day) treatment in some cases.

(D and E) Same as in (A), but B16F10 (D) and CT26 (E) cells were injected subcutaneously in C57BL/6 or BALB/c mice (left) or in Nude mice (right), and tumor growth was monitored over 2.5 weeks.

(legend continued on next page)

bed. This IL-17A production is reduced by metformin or Rsv and restored by EX-527 (Figure S4A). Finally, to validate that the effect of SIRT1 agonist is related to its specific effect on CD4 T cells, we treated $CD4^{SIRT1-/-}$ mice bearing B16F10 tumor with metformin. We observed that this treatment did not affect tumor growth in these mice (Figure 4H). Interestingly, IL-17A deficiency and SIRT1 activation by metformin both reduced VEGF-A production by B16F10 tumor, thus suggesting that IL-17A inhibition impacts on tumor growth via a reduction of proangiogenic factors (Figures S4A and S4B).

Together, these data show that SIRT1 agonist antitumor effect in mice is dependent on T cells, IL-17A, and SIRT1 expression in CD4 T cells, thus suggesting that it relies on the downregulation of IL-17A secretion by Th17 cells.

SIRT1 Agonists Are Also Effective on Human Th17 Cells

We tested the ability of SIRT1 agonists to impede in vitro differentiation of naive human T cells from blood healthy donors, into Th17 cells. We cell-sorted $CD4^+$ $CD45RA^+$ cells from blood and differentiated them with IL-6 plus IL-23 and TGFβ with TCR triggering, as previously described (Bettelli et al., 2008; Gaffen, 2008; Laurence et al., 2007; Veldhoen et al., 2009). We observed that adding Rsv, SRT1720, or low-dose metformin reduced STAT3 acetylation (Figure 5A). As for our mouse study, we selected a dose of metformin that did not affect the AKT/mTor pathway as demonstrated by persistence of AKT phosphorylation and absence of the inhibitory phosphorylation of serine 792 of Raptor (Figure S5A). SIRT1 agonists reduced *il17a* and *Rorc* mRNA expression during Th17 differentiation (Figure 5B). At the protein level, we confirmed that SIRT1 inhibitors reduced IL-17A protein production using ELISA (Figure 5C) and RORγt expression using western blotting (Figure 5D). Importantly, the SIRT1 antagonist EX-527 restored IL-17A production and RORyt expression in Th17 differentiated from CD4 T cells treated by SIRT1 activators (Figures 5E and 5F). Using intracellular staining, we validated that SIRT1 agonists reduced IL-17A expression in human Th17 cells (Figure 5G). The SIRT1 antagonist EX-527 restored IL-17A expression (Figure 5G). Like in mouse settings, we also observed that SIRT1 activators did not affect *Ifng* and *Tbx21* mRNA expression in Th1, *Gata3*, *il4*, and *il13* mRNA expression in Th2 and *Ctla4*, *Gitr*, and *Foxp3* mRNA expression in iTreg cells generated in vitro (Figure S5B).

Using peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from blood healthy donors, we isolated by flow cytometry memory CD4 T cell subpopulations using chemokine receptor labeling as previously described (Mahnke and Roederer, 2007; Thibaudin et al., 2015). Th1 ($CXCR3^+$ $CCR6^-$), Th2 ($CXCR3^-$ $CCR6^-$ $CCR4^+$), iTreg ($CD25^+$ $Foxp3^+$), and Th17 cells ($CXCR3^-$ $CCR6^+$) were characterized (Figure S6A). We validated the purity of each subset by ELISA and qPCR as we previously reported (Thibaudin et al., 2015). Th17 cells were treated ex vivo with SIRT1 agonists during 3 days with TCR stimulation in presence of Th17-polarizing cytokines. Using qPCR, we observed that such treatment reduced *Rorc* and *il17a* mRNA expression in Th17 cells (Figure 5H). We validated that SIRT1 agonists reduced IL-17A production in Th17 by ELISA (Figure S6B) and by intracellular staining (Figure S6C). This effect is blunted by the SIRT1 antagonist EX-527 (Figures S6D and S6E).

Together, these data demonstrate that SIRT1 agonists blunt selectively in vitro differentiation of human naive T cells into Th17 cells but also Th17 program of memory Th17 cells.

Administration of the SIRT1 Agonist Metformin to Metastatic Colon Cancer Patients Blunts IL-17A Production by Blood Th17 Cells

To test the clinical relevance of our observations, we determined the effect of the SIRT1 agonist metformin in patients bearing metastatic colorectal cancer. We focused on metastatic colorectal cancer because previous reports have shown an accumulation of Th17 cells in PBMCs and that IL-17A in tumors is associated with poor prognosis (Tosolini et al., 2011). We selected metastatic colorectal cancer patients still untreated by chemotherapy and diagnosed with a non insulino-dependent diabetes and for whom a treatment by metformin (500 mg per day bid) was proposed by the oncologist. We could include 10 patients (7 men and 3 women; mean age of 65 years; clinical and biological characteristics of the patients are presented in Figure S6F and Table S1). Blood samples were obtained before and after 1-month metformin treatment initiation. Using CXCR3 and CCR6 labeling, we tested STAT3 acetylation in Th17 cells (Figure 6A). We observed that the treatment induced a downregulation of STAT3 acetylation in Th17 lymphocytes (Figure 6B). The frequency of each T helper subset is not affected by this treatment (Figure 6C). However, the frequency of IL-17A-producing Th17 cells determined by intracellular staining is significantly reduced by metformin treatment (Figure 6D). In contrast, the frequency of IFN-γ production by Th1 cells and Foxp3 expression by Treg cells is not affected by the treatment (Figure 6D).

Together, these data corroborate that in vivo metformin deacetylates STAT3 and reduces the production of IL-17A by Th17 cells in metastatic colorectal cancer patients.

DISCUSSION

SIRT1 is a member of the family of class III deacetylases (NAD^+-dependent). This enzyme is involved in the control of many cellular pathways, including metabolism, stress, and genome stability. In the context of T cell biology, SIRT1-deficient mice

(F) Monitoring of tumor growth of B16F10 melanoma cells in C57BL/6 and $IL17a^{-/-}$ mice. Mice were also treated with Rsv (left) or metformin (right).
(G) Monitoring of tumor growth of CT26 colon cancer cells in BALB/c mice injected with an anti-IL-17A antibody (200 mg/day injected on day 0, 1, 2, 3, 4, and 6) or control rat immunoglobulin G (Ig). Mice were also treated with Rsv (left) or metformin (right).
(H) Monitoring of tumor growth of B16F10 melanoma cells in fl-SIRT1 control mice (left) or in $CD4^{SIRT1-/-}$ mice (right) treated or not with metformin, and tumor growth was monitored over 3 weeks.
All experiments were done two times with seven to eight mice per group.
NS, not significant; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Data are from two (A–H) independent experiments with seven to eight mice per group (median and SEM) or are from one representative of two independent experiments (C).

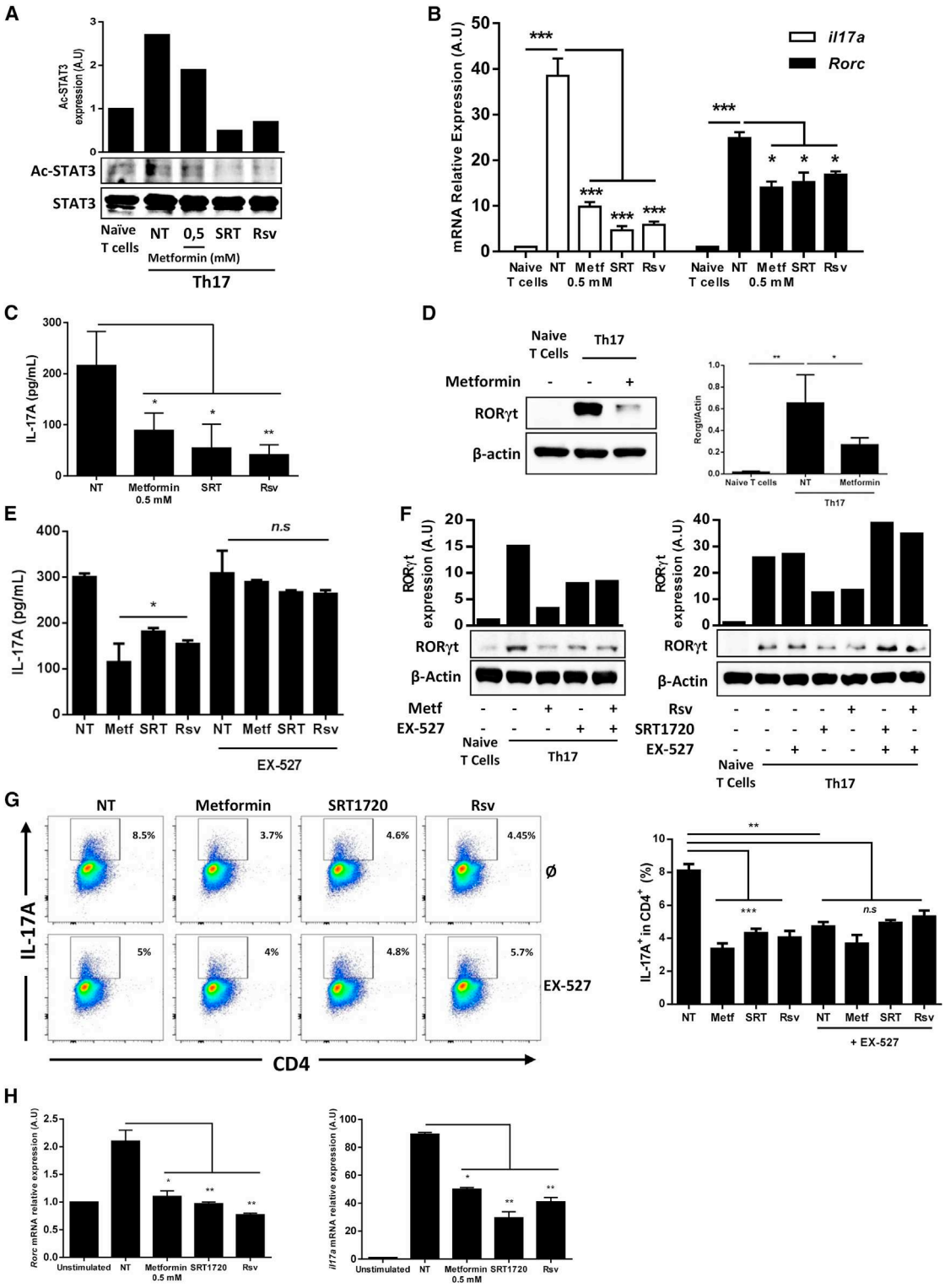


Figure 5. SIRT1 Agonists Are Also Effective on Human Th17 Cells

CD4 naive T cells ($CD4^+$ $CD45RA^+$) were sorted from the blood of healthy volunteers and then differentiated or not into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hr, treated or not with the SIRT1 agonists (0.5 mM metformin, Rsv, and SRT1720).

(A) Expression of Ac-STAT3 was assessed by western blotting in naive T cells or differentiated Th17 cells after 6 hr of culture (lower panel). STAT3 was used as a reference for Ac-STAT3 quantification (A.U, arbitrary unit) (upper panel).

(legend continued on next page)

show increased T cell activation and a breakdown of $CD4^+$ T cell tolerance. SIRT1 interacted with and deacetylated c-Jun, thus resulting in an inactive AP-1 factor. SIRT1-deficient mice were unable to maintain T cell tolerance and developed severe experimental allergic encephalomyelitis, a Th17-dependent disease as well as spontaneous autoimmunity (Zhang et al., 2009). Similar results were also obtained by another team that used Rsv as a SIRT1 activator and observed that such treatment could globally reduce T cell activation (Zou et al., 2013). This led to the hypothesis that SIRT1 may have a general role in the control of excessive autoimmune responses. In contrast, in reports using $CD4^{SIRT1-/-}$ mice to investigate the role of SIRT1 deletion specifically in the CD4 T cell compartment, authors observed that SIRT1 invalidation does not affect function of effector cells in contrast to the previous report that was generated using SIRT1 knockout mice. This difference may be explained by the effect of SIRT1 in other cells such as myeloid cells. In $CD4^{SIRT1-/-}$ mice, Treg numbers and their suppressive function are increased. It was reported that Foxp3 is deacetylated by SIRT1, and SIRT1 inhibition leads to increased Foxp3 acetylation, which makes Foxp3 more resistant to proteasomal degradation and thus stabilizes it post-translationally (Akimova et al., 2014; Beier et al., 2011). Such SIRT1 inactivation promotes prolonged allograft survival and limits the development of experimental colitis, thus suggesting that SIRT1 inhibition could be deleterious in cancer. Together, these data suggest that SIRT1 activity in CD4 T cells is proinflammatory by limiting the Treg transcriptional program. In the context of Th9 differentiation, SIRT1 controls mTOR-HIF1α signaling, inhibits Th9 cell differentiation, and limits Th9-dependent antitumor immunity (Wang et al., 2016). Recently, Lim et al. (2015) tested the role of basal SIRT1 function in a transgenic model using mice generated by crossing Flox-SIRT1 mice with RORc-Cre mice, leading to the specific deletion of SIRT1 in RORγt-expressing cells. In this model, they observed that SIRT1 deletion blunts RORγt transcriptional activity and limits Th17 cell generation and function. The mechanism relies on the ability of SIRT1 to induce deacetylation of RORγt, thus enhancing its transcriptional activity. Similar results were also observed in our experiments. Importantly, this report and all other reports that addressed SIRT1 function in T cells only focuses on the basal effect of SIRT1 without activation and not its pharmacological activation. Our study unravels a biphasic role of SIRT1 on Th17 polarization with a capacity to induce Th17 differentiation on basal status and a capacity to impede Th17 differentiation after pharmacological activation. Previous reports suggested that some endogenous proteins like AROS could modestly activate SIRT1 function in comparison to ligand such as Rsv (Kim et al., 2007). We therefore could speculate that endogenous activation of SIRT1 enhances Th17 function by deacetylation of RORγt, whereas high activation of SIRT1 via pharmacological activators in therapeutic setting induces inhibition of Th17 differentiation via STAT3 deacetylation.

SIRT1 regulates a wide variety of cellular functions. SIRT1 was shown to deacetylate histone like H3K9, thus leading to the induction of a repressive transcriptional complex (Chen et al., 2015). SIRT1 can act on many non-histone proteins, including transcription factors, transcriptional coregulatory proteins, and histones. These functions mediate stress resistance, apoptosis, hypoxia, inflammatory signaling, and autophagy as physiological responses to environmental toxicity. Although SIRT1 was previously shown to deacetylate STAT3 in gastric cancer cells (Lu et al., 2014), keratinocytes (Sestito et al., 2011), and liver cells (Nie et al., 2009), the effect of SIRT1 on STAT3 acetylation and the role of STAT3 acetylation in CD4 T cells have not been explored. Our work shows that SIRT1 activation induces competition between p300 and SIRT1 in Th17 cells, thus leading to deacetylation of STAT3, its absence of migration into the nucleus, and reduction of its transcriptional function on the Th17 program. However, we cannot exclude that SIRT1 could also act on epigenetic modifications of histones or other transcription factors that could affect Th17 cell differentiation.

Many studies describe some anticancer properties of SIRT1 agonist like SRT1720 (Chauhan et al., 2011) or Rsv (Bishayee, 2009). In addition, the commonly used antidiabetic drug metformin could induce SIRT1 expression and activation in an AMPK-dependent manner (Song et al., 2015). The anticancer effect of metformin is currently well known clinically and experimentally, but the mechanism of action of metformin remains obscure. Metformin was shown to exert both chemopreventive and chemotherapeutic activities. Notably, it has been shown that cancer rates in diabetics using metformin are lower than in patients using other insulin-sensitizing agents or insulin (Chlebowski et al., 2012; Gong et al., 2016; He et al., 2016). In addition, metformin is known to affect tumor growth and cancer prognosis in different mouse and human cancers (Aldea et al., 2014; Pernicova and

(B) qRT-PCR analysis of *Rorc* and *il17a* mRNA expression was assessed on hour 6 (*Rorc*) and on day 3 (*il17a*) of culture. Expression is presented relative to *Actb* expression.
(C) IL-17A secretion was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture.
(D) Expression of RORγt was assessed using western-blotting experiment (left panel), and quantification using β-actin as reference is shown (right panel).
(E) Same as in (C), but a treatment with an inhibitor of SIRT1, EX-527, was also performed in some conditions. IL-17A secretion was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture.
(F) Same as in (E), but expression of RORγt was assessed using western-blotting experiment after 3 days of culture. β-Actin was used as loading control and as a reference for RORγt quantification (A.U, arbitrary unit).
(G) Same as in (E), but IL-17A expression was assessed using intracellular cytokine staining after 3 days of culture. Numbers beside outlined areas indicate percentage of cells in gate. Representative data from one of three independent experiments are shown.
(H) Memory Th17 ($CD4^+$ $CD45RA^-$ $CCR6^+$ $CXCR3^-$) cells were sorted from blood of healthy volunteers and stimulated in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hr, treated or not with the SIRT1 agonists. qRT-PCR analysis of *Rorc* (left panel) and *il17a* (right panel) mRNA expression were assessed after 3 days of culture. Expression is presented relative to *Actb* expression.
NS, not significant; *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, and ***$p < 0.001$ (Mann-Whitney test). Data are from three (B, C, E, G, and H) independent experiments (median and SEM). (A), (D), (F), and (G) are one representative of three independent experiments.

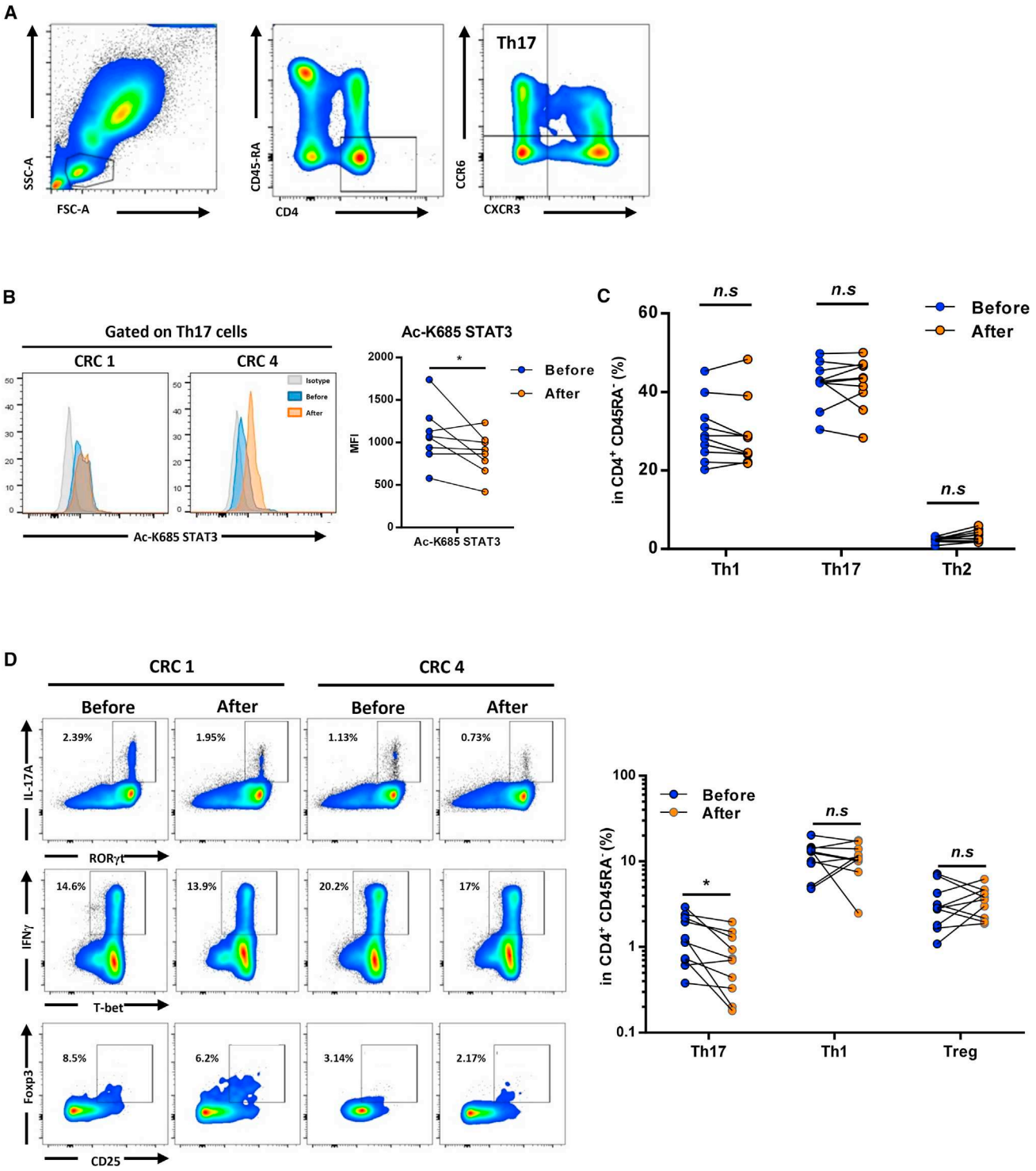


Figure 6. Administration of the SIRT1 Agonist Metformin to Metastatic Colon Cancer Patients Blunts IL-17A Production by Blood Th17 Cells

Ten mCRC patients still untreated by chemotherapy and diagnosed with a non insulino-dependent diabetes were selected and treated by metformin (500 mg per day bid). Blood samples were obtained before and after 1-month metformin treatment initiation.

(A) Flow cytometry-gating strategy to identify memory Th17 cells through chemokine receptor expression.

(B) Expression of Ac-STAT3 was assessed by intracellular cytokine staining before and after metformin treatment; (left panel) two representative histograms are shown; (right panel) mean fluorescence intensity (MFI) for eight patients is shown.

(C) Proportion of memory Th1, Th2, and Th17 cells was assessed by flow cytometry before and after metformin treatment.

(legend continued on next page)

Korbonits, 2014; Yin et al., 2013). The typically used concentrations in such studies are 5–30 mM, which are much higher than the plasma and tissue concentrations measured in individuals who have received recommended therapeutic doses, and less than 1 mM metformin has little effect on cancer cell proliferation. Therefore, we decided to use an in vitro dosage of 0.5 mM, which does not affect mTor. In addition, the relevance of in vitro dosage is experimentally validated by the in vivo results in mice and humans, which give similar results. In the context of inflammatory disease or hepatocellular carcinoma, a high dosage of metformin reduces Th17 cells, but this effect is dependent on mTor pathway inhibition (Sun et al., 2016; Zhao et al., 2015). The respective role of SIRT1 activation versus mTor inhibition was not tested, and the link between metformin effect on SIRT1 and Th17 polarization was not tested. Our model highlights a function of SIRT1 activators as defined by the selective targeting of SIRT1 and not mTor pathway in vitro and in vivo in mice and humans. Using this strategy, we observed that SIRT1 activators blunt only Th17 polarization and affect tumor growth only in immunocompetent mice. Moreover, metformin antitumor effect is aborted in $CD4^{SIRT1-/-}$ mice in our settings. Together, such data suggest that only a low dose of metformin can selectively modulate the SIRT1 pathway. Such treatment affects tumor growth mostly by targeting Th17 polarization in a SIRT1-dependent manner.

In conclusion, our study unravels the particular ability of pharmacological activation of SIRT1 to limit STAT3 acetylation in Th17 cells, thus limiting the STAT3-dependent initiation of the Th17 program. We propose that pharmacological activation of SIRT1 using a low dose of metformin could be a valuable tool to control deleterious Th17 expansion in cancer patients.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mouse Strains

All animals were bred and maintained according to both the Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, Dijon, France). Animals were used between 6 and 22 weeks of age.

In Vitro T Cell Differentiation

Naive $CD4^+$ T cells ($CD4^+$ $CD62L^{hi}$) were obtained from spleens and lymph nodes of C57BL/6 WT or fl-CD4/Sirt-1-Cre mice. Purification of $CD4^+$ T cells was achieved as described by Berger et al. (2013).

Human Sample

Experiments on human $CD4^+$ T cells were carried out using peripheral blood from healthy volunteers (provided by the "Etablissement Français du Sang," Besançon, France). Written informed consent was obtained from all healthy blood donors.

Between January 2014 and December 2015, we collected whole blood from (n = 10) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients in the Centre Georges François Leclerc. Because of concomitant diagnosis of diabetes, a metformin treatment (500 mg twice a day) was introduced. A blood sample was harvested before initiation of metformin and 1 month later. All patients gave informed consent approved by the local ethics committee. The collection of blood sample was authorized by French authorization number AC2014-2460.

ChIP Assay

Purified naive T cells were differentiated for 6 hr into murine Th0 or Th17 cells with or without metformin, Rsv, or SRT720. ChIP was conducted according to the manufacturer's instructions (ChiP-IT Express Enzymatic; Active Motif). Primers designed to assess ChIP assay are as described in Table S2.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA from T cells was extracted with TriReagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), and analyzed by real-time qPCR with the SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primers designed to assess gene expression are as described in Table S3.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, six figures, and three tables and can be found with this article online at http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.004.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

F.G., D.D., and L.A. conceived the experiments. E.L. and M.T. performed all experiments and analyzed the results. R.E., H.B., P.C., F.V., E.H., R.B., C.R., and V.D. participated in some experiments. R.E., H.B., P.C., F.V., E.H., R.B., C.R., V.D., S.L., and L.A. read the manuscript. E.L., M.T., D.D., and F.G. wrote the manuscript. L.A., S.L., R.B., F.V., D.D., and F.G. sustained this project.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are supported by grants from Ligue Nationale contre le Cancer (F.G.,), Fondation de France (L.A.), Institut National du Cancer (F.G.), Association pour la Recherche sur le Cancer (PJA20131200160) (S.L.), Conseil Régional Bourgogne, the FEDER, INSERM (E.L., D.D., and M.T.), Fondation Lilliane Betancourt (R.E.), the French National Research Agency (ANR-13-JSV3-0001 [L.A.] and ANR-11-LABX-0021), Ligue Régionale contre le Cancer Comité Grand-Est (L.A., S.L., R.B., F.V., E.L., and D.D.), Cancéropôle Grand-Est (L.A.), and the European Community (Marie Curie Fellowship PCIG10-GA-2011-303719) (L.A.).

Received: December 29, 2016
Revised: February 24, 2017
Accepted: March 31, 2017
Published: April 25, 2017

REFERENCES

Akimova, T., Xiao, H., Liu, Y., Bhatti, T.R., Jiao, J., Eruslanov, E., Singhal, S., Wang, L., Han, R., Zacharia, K., et al. (2014). Targeting sirtuin-1 alleviates experimental autoimmune colitis by induction of $Foxp3^+$ T-regulatory cells. Mucosal Immunol. *7*, 1209–1220.

Aldea, M., Craciun, L., Tomuleasa, C., Berindan-Neagoe, I., Kacso, G., Florian, I.S., and Crivii, C. (2014). Repositioning metformin in cancer: genetics, drug targets, and new ways of delivery. Tumor Biol. *35*, 5101–5110.

Beier, U.H., Wang, L., Bhatti, T.R., Liu, Y., Han, R., Ge, G., and Hancock, W.W. (2011). Sirtuin-1 targeting promotes $Foxp3^+$ T-regulatory cell function and prolongs allograft survival. Mol. Cell. Biol. *31*, 1022–1029.

(D) Expression of RORγt, IL-17A, T-bet, IFN-γ, and Foxp3 to identify Th17 ($ROR\gamma t^+$ $IL\text{-}17A^+$), Th1 ($T\text{-}bet^+$ $IFN\text{-}\gamma^+$), and Treg cells ($CD25^{high}$ $Foxp3^+$) was assessed by intracellular cytokine staining before and after metformin treatment. Numbers beside outlined areas indicate percentage of cells in gate. Representative data from 2 of 10 patients are shown (left panel). Percentage of positive cells for each patient is shown (right panel).
NS, not significant; *$p < 0.05$ (paired Mann-Whitney test). Data are from ten mCRC patients.

Berger, H., Végran, F., Chikh, M., Gilardi, F., Ladoire, S., Bugaut, H., Mignot, G., Chalmin, F., Bruchard, M., Derangère, V., et al. (2013). SOCS3 transactivation by PPARγ prevents IL-17-driven cancer growth. Cancer Res. *73*, 3578–3590.

Bettelli, E., Korn, T., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2008). Induction and effector functions of T_H17 cells. Nature *453*, 1051–1057.

Bishayee, A. (2009). Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials. Cancer Prev. Res. (Phila.) *2*, 409–418.

Bruchard, M., Mignot, G., Derangère, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Végran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L., et al. (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat. Med. *19*, 57–64.

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

Chandel, N.S., Avizonis, D., Reczek, C.R., Weinberg, S.E., Menz, S., Neuhaus, R., Christian, S., Haegebarth, A., Algire, C., and Pollak, M. (2016). Are metformin doses used in murine cancer models clinically relevant? Cell Metab. *23*, 569–570.

Chauhan, D., Bandi, M., Singh, A.V., Ray, A., Raje, N., Richardson, P., and Anderson, K.C. (2011). Preclinical evaluation of a novel SIRT1 modulator SRT1720 in multiple myeloma cells. Br. J. Haematol. *155*, 588–598.

Chen, C.W., Koche, R.P., Sinha, A.U., Deshpande, A.J., Zhu, N., Eng, R., Doench, J.G., Xu, H., Chu, S.H., Qi, J., et al. (2015). DOT1L inhibits SIRT1-mediated epigenetic silencing to maintain leukemic gene expression in MLL-rearranged leukemia. Nat. Med. *21*, 335–343.

Chini, C.C., Espindola-Netto, J.M., Mondal, G., Guerrico, A.M., Nin, V., Escande, C., Sola-Penna, M., Zhang, J.S., Billadeau, D.D., and Chini, E.N. (2015). SIRT1-activating compounds (STAC) negatively regulate pancreatic cancer cell growth and viability through a SIRT1 lysosomal-dependent pathway. Clin. Cancer Res. *22*, 2496–2507.

Chlebowski, R.T., McTiernan, A., Wactawski-Wende, J., Manson, J.E., Aragaki, A.K., Rohan, T., Ipp, E., Kaklamani, V.G., Vitolins, M., Wallace, R., et al. (2012). Diabetes, metformin, and breast cancer in postmenopausal women. J. Clin. Oncol. *30*, 2844–2852.

Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkhurst, C.N., Muratet, M., et al. (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. Cell *151*, 289–303.

Dong, C. (2008). TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nat. Rev. Immunol. *8*, 337–348.

Durant, L., Watford, W.T., Ramos, H.L., Laurence, A., Vahedi, G., Wei, L., Takahashi, H., Sun, H.W., Kanno, Y., Powrie, F., and O'Shea, J.J. (2010). Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. Immunity *32*, 605–615.

Gaffen, S.L. (2008). An overview of IL-17 function and signaling. Cytokine *43*, 402–407.

Ghisays, F., Brace, C.S., Yackly, S.M., Kwon, H.J., Mills, K.F., Kashentseva, E., Dmitriev, I.P., Curiel, D.T., Imai, S.I., and Ellenberger, T. (2015). The N-terminal domain of SIRT1 is a positive regulator of endogenous SIRT1-dependent deacetylation and transcriptional outputs. Cell Rep. *10*, 1665–1673.

Gong, Z., Aragaki, A.K., Chlebowski, R.T., Manson, J.E., Rohan, T.E., Chen, C., Vitolins, M.Z., Tinker, L.F., LeBlanc, E.S., Kuller, L.H., et al. (2016). Diabetes, metformin and incidence of and death from invasive cancer in postmenopausal women: results from the women's health initiative. Int. J. Cancer *138*, 1915–1927.

Han, L., Zhou, R., Niu, J., McNutt, M.A., Wang, P., and Tong, T. (2010). SIRT1 is regulated by a PPARγ-SIRT1 negative feedback loop associated with senescence. Nucleic Acids Res. *38*, 7458–7471.

Harikumar, K.B., Kunnumakkara, A.B., Sethi, G., Diagaradjane, P., Anand, P., Pandey, M.K., Gelovani, J., Krishnan, S., Guha, S., and Aggarwal, B.B. (2010). Resveratrol, a multitargeted agent, can enhance antitumor activity of gemcitabine in vitro and in orthotopic mouse model of human pancreatic cancer. Int. J. Cancer *127*, 257–268.

Harper, C.E., Patel, B.B., Wang, J., Arabshahi, A., Eltoum, I.A., and Lamartiniere, C.A. (2007). Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice. Carcinogenesis *28*, 1946–1953.

He, D., Li, H., Yusuf, N., Elmets, C.A., Li, J., Mountz, J.D., and Xu, H. (2010). IL-17 promotes tumor development through the induction of tumor promoting microenvironments at tumor sites and myeloid-derived suppressor cells. J. Immunol. *184*, 2281–2288.

He, X.K., Su, T.T., Si, J.M., and Sun, L.M. (2016). Metformin is associated with slightly reduced risk of colorectal cancer and moderate survival benefits in diabetes mellitus: a meta-analysis. Medicine (Baltimore) *95*, e2749.

Hung, C.H., Chan, S.H., Chu, P.M., Lin, H.C., and Tsai, K.L. (2016). Metformin regulates oxLDL-facilitated endothelial dysfunction by modulation of SIRT1 through repressing LOX-1-modulated oxidative signaling. Oncotarget *7*, 10773.

Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17$^+$ T helper cells. Cell *126*, 1121–1133.

Kim, E.J., Kho, J.H., Kang, M.R., and Um, S.J. (2007). Active regulator of SIRT1 cooperates with SIRT1 and facilitates suppression of p53 activity. Mol. Cell *28*, 277–290.

Laurence, A., Tato, C.M., Davidson, T.S., Kanno, Y., Chen, Z., Yao, Z., Blank, R.B., Meylan, F., Siegel, R., Hennighausen, L., et al. (2007). Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. Immunity *26*, 371–381.

Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. J. Exp. Med. *203*, 2271–2279.

Lim, H.W., Kang, S.G., Ryu, J.K., Schilling, B., Fei, M., Lee, I.S., Kehasse, A., Shirakawa, K., Yokoyama, M., Schnölzer, M., et al. (2015). SIRT1 deacetylates RORγt and enhances Th17 cell generation. J. Exp. Med. *212*, 607–617.

Liu, J., Duan, Y., Cheng, X., Chen, X., Xie, W., Long, H., Lin, Z., and Zhu, B. (2011). IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. Biochem. Biophys. Res. Commun. *407*, 348–354.

Loncle, C., Bonjoch, L., Folch-Puy, E., Lopez-Millan, M.B., Lac, S., Molejon, M.I., Chuluyan, E., Cordelier, P., Dubus, P., Lomberk, G., et al. (2015). IL17 functions through the novel REG3β-JAK2-STAT3 inflammatory pathway to promote the transition from chronic pancreatitis to pancreatic cancer. Cancer Res. *75*, 4852–4862.

Lu, J., Zhang, L., Chen, X., Lu, Q., Yang, Y., Liu, J., and Ma, X. (2014). SIRT1 counteracted the activation of STAT3 and NF-κB to repress the gastric cancer growth. Int. J. Clin. Exp. Med. *7*, 5050–5058.

Mahnke, Y.D., and Roederer, M. (2007). Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. Clin. Lab. Med. *27*, 469–485, v.

Martin, F., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2012). Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-β-dependent immunosuppressive activity? Trends Mol. Med. *18*, 742–749.

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. Immunity *31*, 787–798.

Nie, Y., Erion, D.M., Yuan, Z., Dietrich, M., Shulman, G.I., Horvath, T.L., and Gao, Q. (2009). STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. Nat. Cell Biol. *11*, 492–500.

Numasaki, M., Fukushi, J., Ono, M., Narula, S.K., Zavodny, P.J., Kudo, T., Robbins, P.D., Tahara, H., and Lotze, M.T. (2003). Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth. Blood *101*, 2620–2627.

Pernicova, I., and Korbonits, M. (2014). Metformin–mode of action and clinical implications for diabetes and cancer. Nat. Rev. Endocrinol. *10*, 143–156.

Ruan, Q., and Chen, Y.H. (2012). Nuclear factor-κB in immunity and inflammation: the Treg and Th17 connection. Adv. Exp. Med. Biol. *946*, 207–221.

Sestito, R., Madonna, S., Scarponi, C., Cianfarani, F., Failla, C.M., Cavani, A., Girolomoni, G., and Albanesi, C. (2011). STAT3-dependent effects of IL-22 in human keratinocytes are counterregulated by sirtuin 1 through a direct inhibition of STAT3 acetylation. FASEB J. *25*, 916–927.

Song, Y.M., Lee, Y.H., Kim, J.W., Ham, D.S., Kang, E.S., Cha, B.S., Lee, H.C., and Lee, B.W. (2015). Metformin alleviates hepatosteatosis by restoring SIRT1-mediated autophagy induction via an AMP-activated protein kinase-independent pathway. Autophagy *11*, 46–59.

Stritesky, G.L., Yeh, N., and Kaplan, M.H. (2008). IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage. J. Immunol. *181*, 5948–5955.

Sun, Y., Tian, T., Gao, J., Liu, X., Hou, H., Cao, R., Li, B., Quan, M., and Guo, L. (2016). Metformin ameliorates the development of experimental autoimmune encephalomyelitis by regulating T helper 17 and regulatory T cells in mice. J. Neuroimmunol. *292*, 58–67.

Thibaudin, M., Chaix, M., Boidot, R., Végran, F., Derangère, V., Limagne, E., Berger, H., Ladoire, S., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2015). Human ectonucleotidase-expressing CD25(high) Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. OncoImmunology *5*, e1055444.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.H., Pagès, F., and Galon, J. (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer Res. *71*, 1263–1271.

Tyack, P.L., Calambokidis, J., Friedlaender, A., Goldbogen, J., and Southall, B. (2015). Formal comment on Schorr GS, Falcone EA, Moretti DJ, Andrews RD (2014) First long-term behavioral records from Cuvier's beaked whales (*Ziphius cavirostris*) reveal record-breaking dives. PLoS One 9(3): e92633. doi: 10.1371/journal.pone.0092633. PloS One *10*, e0142287.

Veldhoen, M., Hirota, K., Christensen, J., O'Garra, A., and Stockinger, B. (2009). Natural agonists for aryl hydrocarbon receptor in culture medium are essential for optimal differentiation of Th17 T cells. J. Exp. Med. *206*, 43–49.

Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. J. Exp. Med. *206*, 1457–1464.

Wang, Y., Bi, Y., Chen, X., Li, C., Li, Y., Zhang, Z., Wang, J., Lu, Y., Yu, Q., Su, H., et al. (2016). Histone deacetylase SIRT1 negatively regulates the differentiation of interleukin-9-producing $CD4^+$ T cells. Immunity *44*, 1337–1349.

Wen, Z., Zhong, Z., and Darnell, J.E., Jr. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell *82*, 241–250.

Yin, M., Zhou, J., Gorak, E.J., and Quddus, F. (2013). Metformin is associated with survival benefit in cancer patients with concurrent type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. Oncologist *18*, 1248–1255.

Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Chatterjee, D., and Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. Science *307*, 269–273.

Zhang, J., Lee, S.M., Shannon, S., Gao, B., Chen, W., Chen, A., Divekar, R., McBurney, M.W., Braley-Mullen, H., Zaghouani, H., and Fang, D. (2009). The type III histone deacetylase Sirt1 is essential for maintenance of T cell tolerance in mice. J. Clin. Invest. *119*, 3048–3058.

Zhang, E., Guo, Q., Gao, H., Xu, R., Teng, S., and Wu, Y. (2015). Metformin and resveratrol inhibited high glucose-induced metabolic memory of endothelial senescence through SIRT1/p300/p53/p21 pathway. PLoS One *10*, e0143814.

Zhao, D., Long, X.D., Lu, T.F., Wang, T., Zhang, W.W., Liu, Y.X., Cui, X.L., Dai, H.J., Xue, F., and Xia, Q. (2015). Metformin decreases IL-22 secretion to suppress tumor growth in an orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma. Int. J. Cancer *136*, 2556–2565.

Zhuang, S. (2013). Regulation of STAT signaling by acetylation. Cell. Signal. *25*, 1924–1931.

Zou, T., Yang, Y., Xia, F., Huang, A., Gao, X., Fang, D., Xiong, S., and Zhang, J. (2013). Resveratrol inhibits $CD4^+$ T cell activation by enhancing the expression and activity of Sirt1. PLoS One *8*, e75139.

Cell Reports, Volume *19*

Supplemental Information

Sirtuin-1 Activation Controls Tumor Growth by Impeding Th17 Differentiation via STAT3 Deacetylation

Emeric Limagne, Marion Thibaudin, Romain Euvrard, Hélène Berger, Pauline Chalons, Frédérique Végan, Etienne Humblin, Romain Boidot, Cédric Rébé, Valentin Derangère, Sylvain Ladoire, Lionel Apetoh, Dominique Delmas, and François Ghiringhelli

Sirtuin-1 (SIRT1) activation controls tumor growth by impeding Th17 differentiation via STAT3 deacetylation

Emeric Limagne[1,2,3]*, Marion Thibaudin[1,2]*, Romain Euvrard[1,2], Hélène Berger[1,2], Pauline Chalons[1,2], Frédérique Végan[1,2,3], Etienne Humblin[1,2], Romain Boidot[1,2,3], Cédric Rébé[1,2,3], Valentin Derangère[1,2,3], Sylvain Ladoire[1,2,3,4], Lionel Apetoh[1,2,4], Dominique Delmas[1,2**], François Ghiringhelli[1,2,3,4**]**

Correspondence to: **fghiringhelli@cgfl.fr**

Supplementary Figure 1: SIRT1 activation selectively blunts Th17 differentiation. Related to Figure 1.

Supplementary Figure 2: SIRT1 regulates IL-17A and RORγt expression by desacetylation of STAT3. Related to Figure 2.

Supplementary Figure 3: SIRT1 inhibition blunts in vivo Th17 polarization. Related to Figure 3.

Supplementary Figure 4: The anticancer therapeutic effects of SIRT1 agonists rely on their ability to target IL-17A. Related to Figure 4.

Supplementary Figure 5: SIRT1 agonists are also effective on human Th17 cells. Related to Figure 5.

Supplementary Figure 6: Administration of the SIRT1 agonist Metformin to metastatic colon cancer patients blunts IL-17A production by blood Th17 cells. Related to Figure 6.

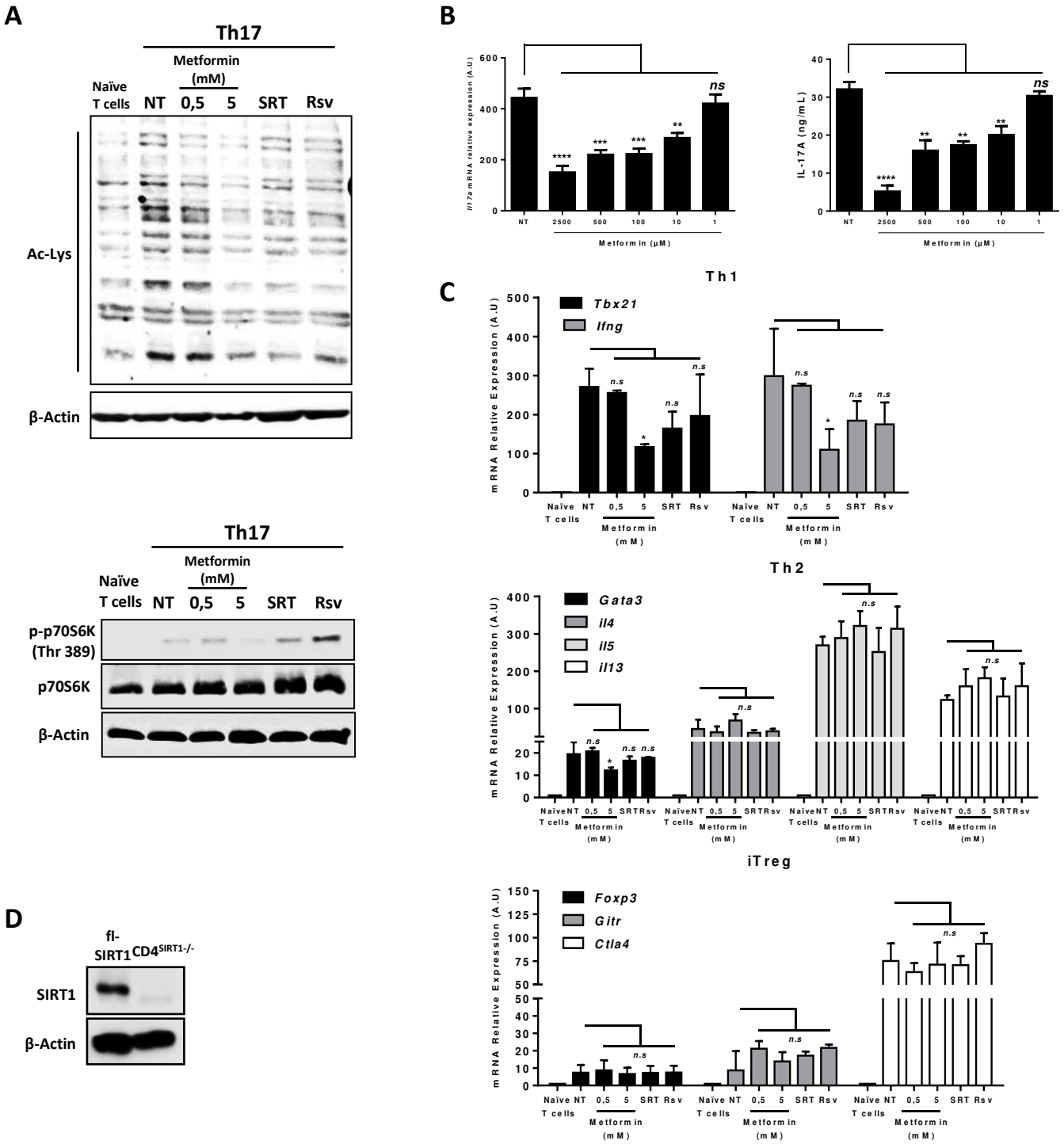
SUPPLEMENTARY TABLES

Supplementary Table 1: Patient characteristics. Related to Figure 6.

Supplementary Table 2: List of mouse primers used for chromatin immunoprecipitation assay. Related to Figure 2.

Supplementary Table 3: List of mouse and human primers used for mRNA relative expression. Related to Figure 1, 2 and 5.

SUPPLEMENTARY EXPERIMENTAL PROCEDURES



Supplementary Figure 1:

A. Cell-sorted naïve CD4^{+} CD62L^{hi} T cells were isolated from C57BL/6 or CD4$^{SIRT1-/-}$ mice and differentiated into Th1, Th2, iTreg, or Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hours in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 µM of resveratrol or 1 µM of SRT1720.

Expression of global acetylation (top) and p-STAT3 (bottom) were assessed by Western blotting after 6 hours of culture.

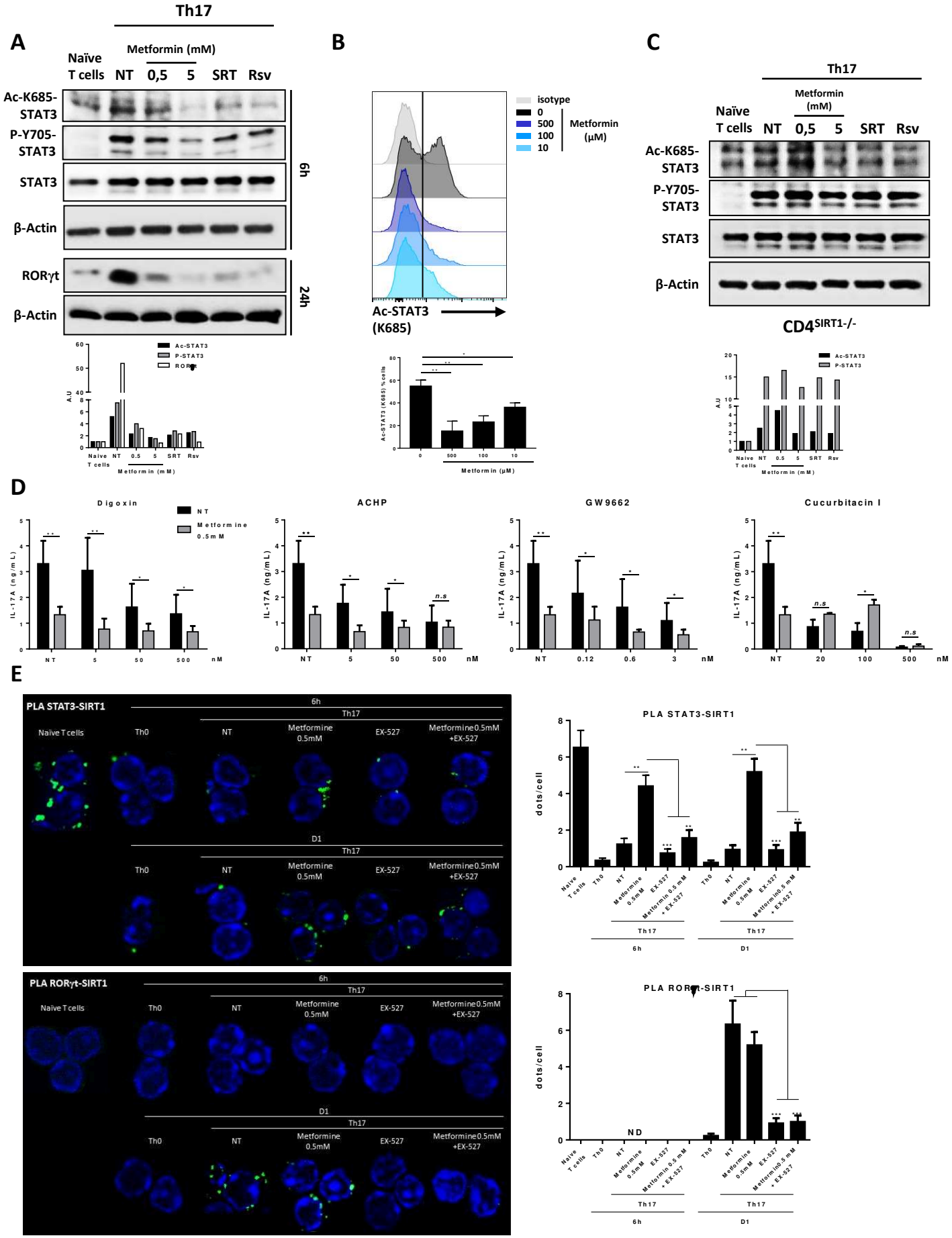
B. Cell-sorted naïve $CD4^+$ $CD62L^{hi}$ $CD44^{lo}$ T cells were isolated from C57BL/6 mice and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 24 hours in presence or not of 500, 100, 10 and 1µM of metformin. Expression of *il17a* was determined using qRT-PCR analysis (left panel) and IL-17A protein expression was determined by ELISA (Right panel).

C. Cell-sorted naïve $CD4^+$ $CD62L^{hi}$ T cells were isolated from C57BL/6 or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice and differentiated into Th1, Th2, iTreg, or Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hours in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 µM of resveratrol or 1 µM of SRT1720. qRT-PCR analysis of *Tbx21*, *Ifng* (top), *Gata3*, *il4*, *il5*, *il13* (middle), *Foxp3*, *Gitr* and *Ctla4* (bottom) mRNA expression was assessed after 3 days of culture and expression is presented relative to *Actb* expression.

C. Cell-sorted naïve $CD4^+$ $CD62L^{hi}$ T cells were isolated from C57BL/6 or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice and differentiated into Th1, Th2, iTreg, or Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 72 hours in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 µM of resveratrol or 1 µM of SRT1720.

Expression of SIRT1 was assessed by Western blotting on $CD4^+$ T cells isolated from spleen of fl-SIRT1 control or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice.

NS, not significant and *$P < 0.05$ (Mann-Whitney test). Data are from three (b) independent experiments (median and s.e.m.) or are from one representative of three independent experiments (a, c).


A
Th17
Naïve T cells
Metformin (mM)
NT
0,5
5
SRT
Rsv
Ac-K685-STAT3
P-Y705-STAT3
STAT3
β-Actin
6h
RORγt
β-Actin
24h
Ac-STAT3
P-STAT3
RORγt
A.U
Naive T cells
NT
0.5
5
SRT
Rsv
Metformin (mM)
B
isotype
0
500
100
10
Metformin (μM)
Ac-STAT3 (K685)
Ac-STAT3 (K685) % cells
Metformin (μM)
C
Th17
Naïve T cells
Metformin (mM)
NT
0,5
5
SRT
Rsv
Ac-K685-STAT3
P-Y705-STAT3
STAT3
β-Actin
CD4SIRT1-/-
Ac-STAT3
P-STAT3
A.U
D
Digoxin
ACHP
GW9662
Cucurbitacin I
NT
Metformine 0.5mM
IL-17A (ng/mL)
n.s
nM
E
PLA STAT3-SIRT1
6h
Th17
Naïve T cells
Th0
NT
Metformine 0.5mM
EX-527
Metformine 0.5mM +EX-527
D1
PLA STAT3-SIRT1
dots/cell
Naive T cells
Th0
NT
Metformine 0.5mM
EX-527
Metformin 0.5 mM + EX-527
Th17
6h
D1
PLA RORγt-SIRT1
ND

Supplementary Figure 2:

A. Cell-sorted naïve $CD4^+$ $CD62L^{hi}$ $CD44^{lo}$ T cells were isolated from C57BL/6 mice and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 or 24 hours in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 µM of resveratrol or 1 µM of SRT1720. Expression of Ac-STAT3, p-STAT3 and RORγt in naïve T cells and differentiated Th17 cells for 6 or 24 hours were assessed by western blotting. β-actin was used as loading control and as a reference for RORγt and STAT3 was used as a reference for Ac-STAT3 and p-STAT3 quantification. Data are from one representative of three independent experiments.

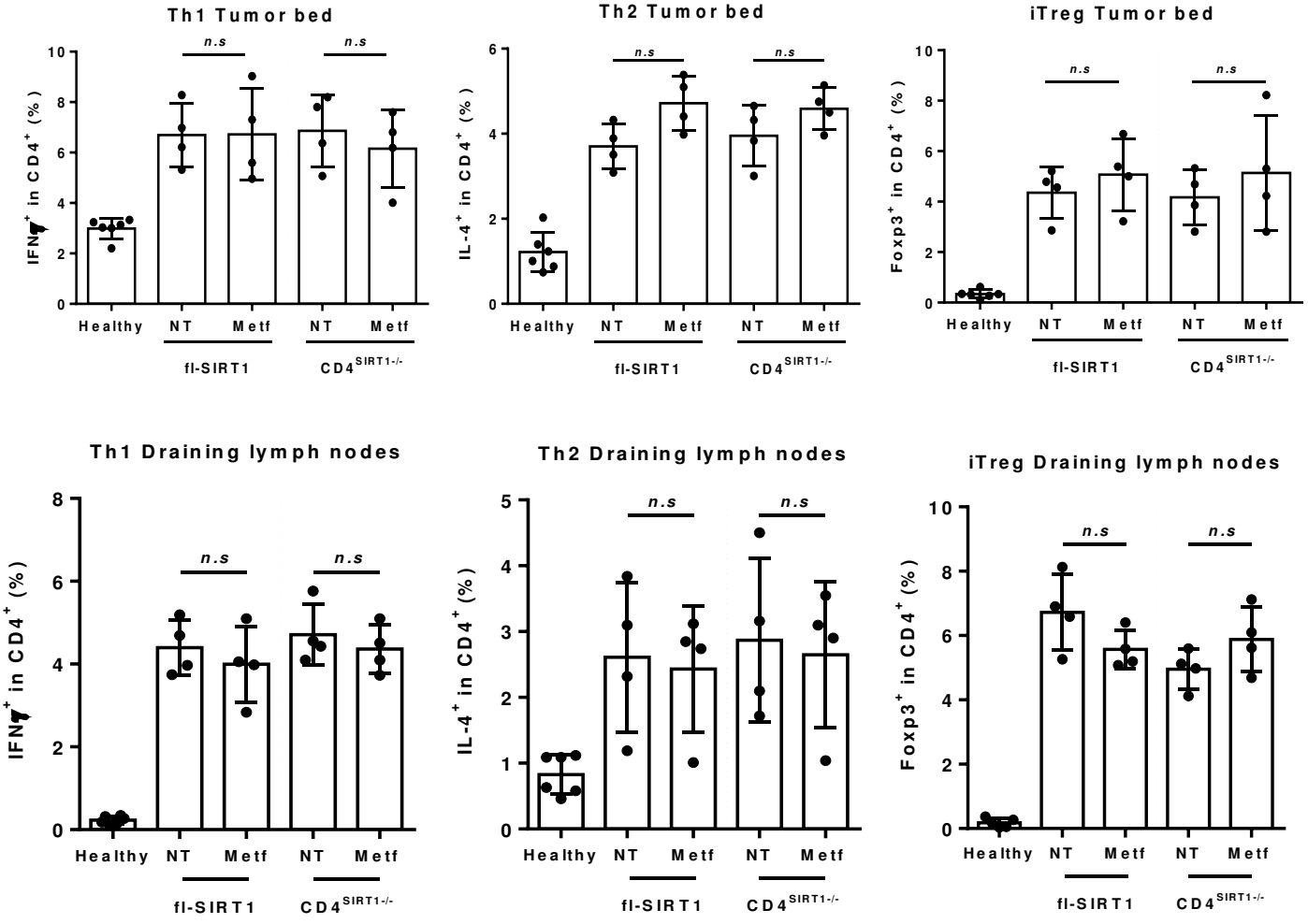
B. Cell-sorted naïve $CD4^+$ $CD62L^{hi}$ $CD44^{lo}$ T cells were isolated from C57BL/6 mice and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 24 hours in presence or not of 500, 100, 10 and 1µM of metformin. Expression of Ac-STAT3 was assessed by FACS.

C. Cell-sorted naïve $CD4^+$ $CD62L^{hi}$ $CD44^{lo}$ T cells were isolated from $CD4^{SIRT1-/-}$ mice and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 6 hours in presence or not of 0.5 mM or 5 mM of metformin, 10 µM of resveratrol or 1 µM of SRT1720. Expression of Ac-STAT3 and p-STAT3 in naïve T cells and differentiated Th17 cells for 6 hours was assessed by western blotting. STAT3 was used as a reference for Ac-STAT3 and p-STAT3 quantification. Data are from one representative of three independent experiments.

D. Cell-sorted naïve $CD4^+$ $CD62L^{hi}$ $CD44^{lo}$ T cells were isolated from C57BL/6 mice and differentiated into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 3 days in presence or not of 0.5 of metformin and either with an three dose effect of RORγt inhibitor (Digoxin), or p65 inhibitor (ACHP), or PPARγ inhibitor (GW9662) or STAT3 inhibitor (Cucurbitacin I). IL-17A secretion was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture.

E. Proximity Ligation Assay (PLA) analysis of the interaction between STAT3 and SIRT1 or RORγt and SIRT1 in naïve T cells and *in vitro* differentiated Th0 or Th17 cells for 6 and 24 hours treated or not with the SIRT1 agonist (low dose of metformin), or the SIRT1 inhibitor (EX-527) or both. (Representative cells are shown in left panel and right panel is a quantification of interacting dot on 100 cells).

NS, not significant; *P < 0.05, **P < 0.01 and ***p<0.001 (Mann-Whitney test). Data are from three (a,d) independent experiments (median and s.e.m.), (b, c, e) are one experiment representative of three independent experiments.

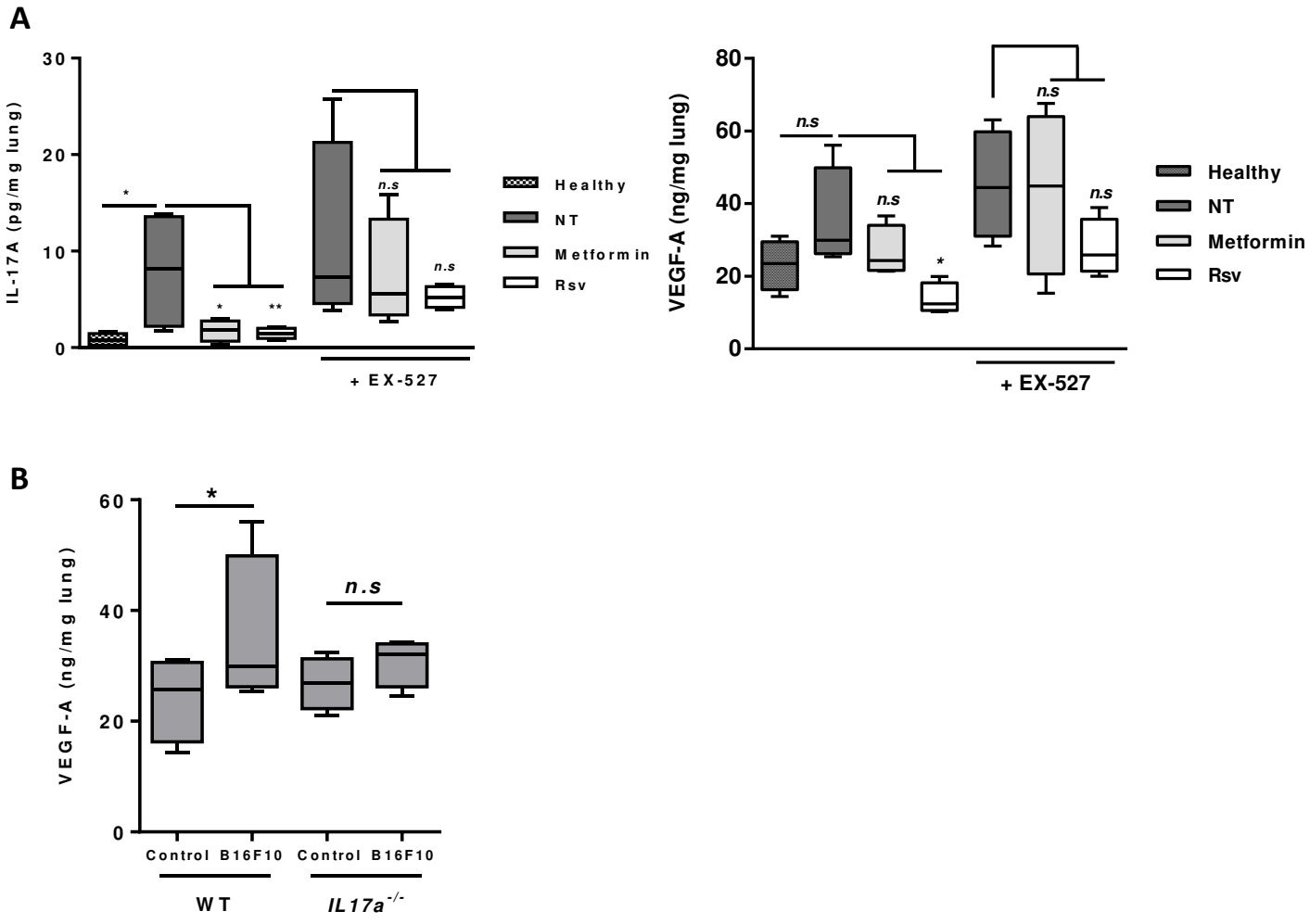


Supplementary Figure 3:

CD4⁺ T cells isolated from draining lymph nodes or tumor infiltrating lymphocytes isolated from tumor of B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice under control or metformin (150 mg/kg/day) treatment after 2.5 weeks of tumor growth. Cells were activated 3 days with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Then, proportion of Th1, Th2 and iTreg cells was determined by intracellular cytokine staining.

IFNγ or IL-4 secretion and Foxp3 expression in CD4⁺ T cells were assessed by intracellular cytokine staining in tumor bed (top) and draining lymph nodes (bottom) of B16F10 tumor-bearing fl-SIRT1 control or $CD4^{SIRT1-/-}$ mice under control or metformin treatment.

NS, not significant (Mann-Whitney test). Data are from two (a, b, c, d, e, f, g, h) independent experiments with 7 to 8 mice per group (median and s.e.m.). (c) are from one representative of two independent experiments.

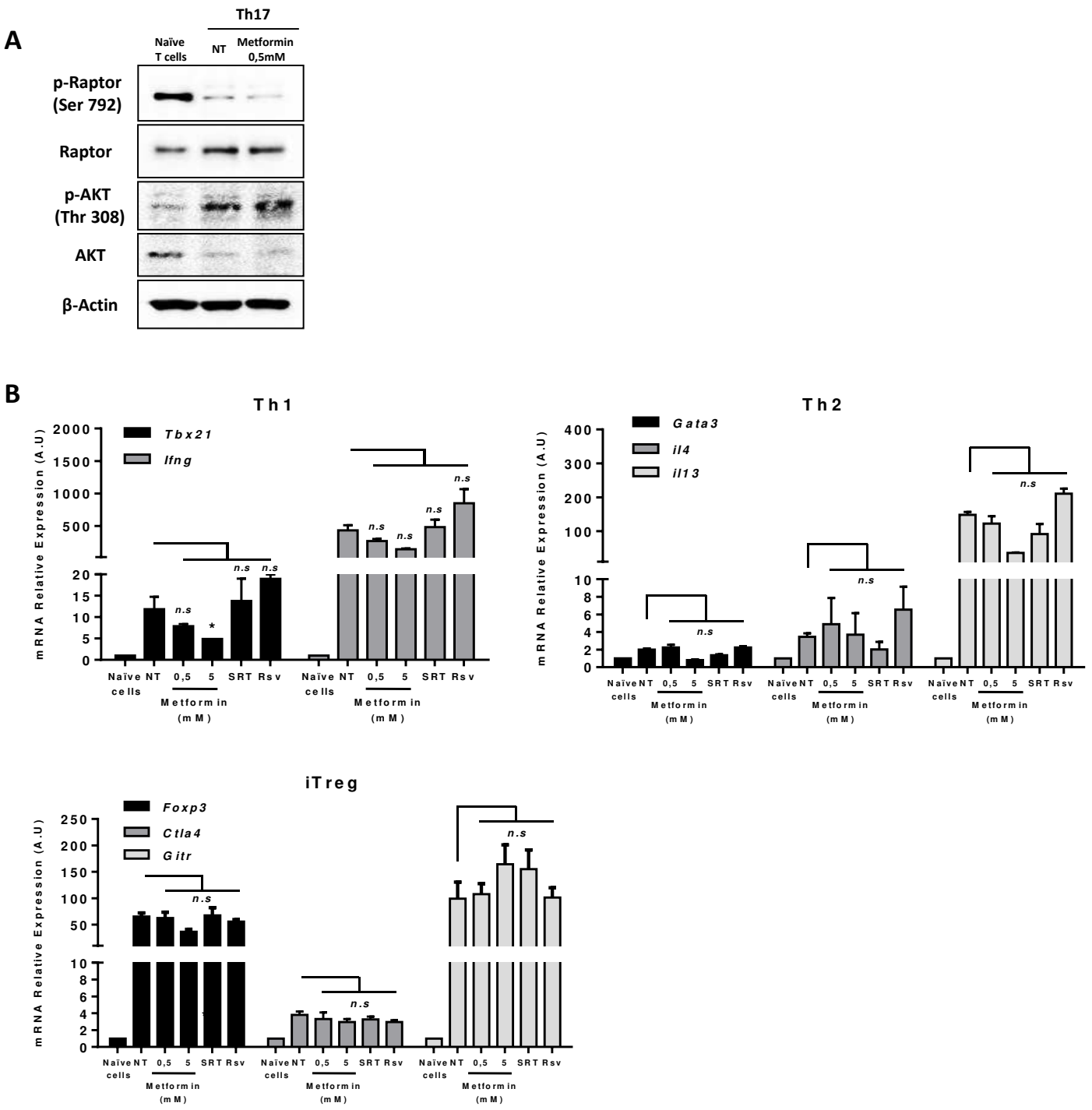


Supplementary Figure 4:

A. C57BL/6 mice under control, resveratrol (35 mg/kg/day) or metformin (150 mg/kg/day) treatments with or without EX-527 (14 mg/kg/day) treatment were inoculated or not with intravenous injection of B16F10 melanoma cells. IL-17A (left) and VEGF-A (right) release from healthy lung or lung tumor foci was controlled by ELISA after 13 days of tumor growth.

B. C57BL/6 or *IL17a*$^{-/-}$ mice were inoculated or not with intravenous injection of B16F10 cells and VEGF-A release from healthy lung or lung tumor foci was controlled by ELISA after 13 days of tumor growth.

NS, not significant; *P < 0.05 and **P < 0.01 (Mann-Whitney test). Data are from two (a, b) independent experiments with 7 to 8 mice per group (median and s.e.m.).

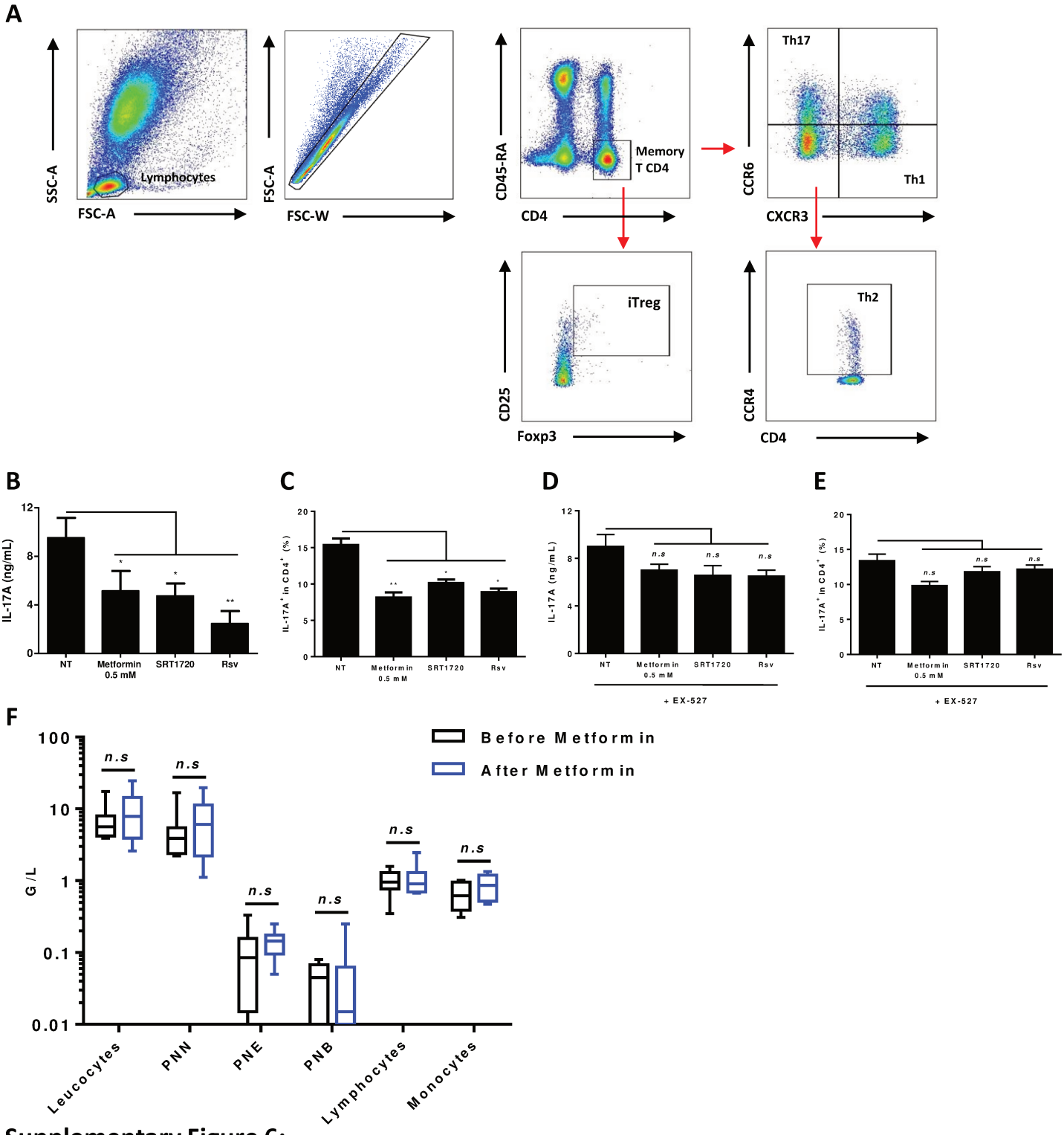


Supplementary Figure 5:

A. CD4 naïve T cells ($CD4^+$ $CD45RA^+$) were sorted from blood of healthy volunteers and then differentiated or not into Th17 cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with 0.5 mM of metformin. Expression of p-Raptor and AKT was assessed using western blotting experiment.

B. CD4 naïve T cells ($CD4^+$ $CD45RA^+$) were sorted from blood of healthy volunteers and then differentiated or not into Th1, Th2 and Treg cells in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with the SIRT1 agonists (0.5 mM of metformin, resveratrol and SRT1720).

qRT-PCR analysis of Tbx21 and Ifng (left top), Gata3, il4 and il5 (right top) and Foxp3, Ctla4 and Gitr (bottom) mRNA expression was assessed on day 3 of culture. Expression is presented relative to Actb expression.
NS, not significant and *P < 0.05 (Mann-Whitney test). Data are from three (b) independent experiments (median and s.e.m.). (a) is a representative of three independent experiments.



Supplementary Figure 6:

A. Flow cytometry gating strategy to identify human memory CD4 T cell subpopulations through chemokine receptor expression.

B and C. Memory Th17 ($CD4^+$ $CD45RA^-$ $CCR6^+$ $CXCR3^-$) cells were sorted from blood of healthy volunteers and stimulated in the presence of anti-CD3 and anti-CD28 for 72 hours treated or not with the SIRT1 agonists (low dose of metformin, resveratrol and SRT1720) in presence of Th17 polarizing cytokines. IL-17A secretion or expression was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture (B) and using intracellular cytokine staining after 3 days of culture (C).

D and E. Same as B and C, but memory Th17 cells were also treated with EX-527 for 72 hours. IL-17A secretion or expression was assessed using ELISA on supernatants after 3 days of culture (D) and using intracellular cytokine staining after 3 days of culture (E).
NS, not significant; *P < 0.05 and **P < 0.01 (Mann-Whitney test). Data are from three (a, b, c, d, e, f) independent experiments (median and s.e.m.).
F. Blood parameters in metastatic colorectal cancer patients before and after metformin treatment.

Age (years)	Mean 56 range [42-67]
Sex	
Male	7
Female	3
pTumor origin	
Colon	6
Rectum	4
Metastatic sites (number)	
1	4
2	4
3 or more	2
CEA level ng/mL	Mean : 67 range [34-134]
Genetic Mutations	
RAS	5
RAF	1

Supplementary Table 1 : Patients (N = 10) characteristics

	Forward	Reverse
Actb	5′-ACTCTTTGCAGCCACATTCC-3′	3′-AGCGTCTGGTTCCCAATACT-5′
Rorc 2293-2275	5′-TGAGTTGGAGGTCACCCTAGG-3′	3′-GTTTATTTGTGCACCATTTGTGTG-5′
Rorc 592-574	5′-GTCCAGTGCAGTTGCTCTCTTCT-3′	3′-TATACTTCCCTGCAGCTTGGGC-5′
Rorc 392-374	5’-CAGAGGCTGTCTTTTCTCTTCACTC-3’	3’-TTTTGGAATCCCACATGATAACC-5’

Supplementary Table 2: List of mouse primers used for chromatin immunoprecipitation assay.

	Forward	Reverse
mActb	5′-ATGGAGGGGAATACAGCCC-3′	5′-TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT-3′
mTbx21	5′-ATCCTGTAATGGCTTGTGGG-3′	5′-TCAACCAGCACCAGACAGAG-3′
mFoxp3	5′-CTCGTCTGAAGGCAGAGTCA-3′	5′-TGGCAGAGAGGTATTGAGGG-3′
mRorc	5′-GGTGATAACCCCGTAGTGGA-3′	5′-CTGCAAAGAAGACCCACACC-3′
mRora	5′-CCCCTACTGTTCCTTCACCA-3′	5′-TGCCACATCACCTCTCTCTG-3′
mIfng	5’-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3’	3’-ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT-5’
mGata3	5′-AGGATGTCCCTGCTCTCCTT-3′	3′-GCCTGCGGACTCTACCATAA-5′
mIl4	5’-CGAGCTCACTCTCTGTGGTG-3’	3’-TGAACGAGGTCACAGGAGAA-5’
mIl5	5’-CATTTCCACAGTACCCCCAC-3’	3’-GCAATGAGACGATGAGGCTT-5’
mIl13	5’-ATGTTGGTCAGGGAATCCAG-3’	3’-TGTGTCTCTCCCTCTGACCC-5’
mGitr	5’-GGCTCTTGTGCATAGTGGCT-3’	3’-ACTCGATGGCAGTTGCTTG-5’
mCtla4	5’-TCTCTGAAGCCATACAGGTGAC-3’	3’-AGAATCCGGGCATGGTTCTG-5’
mIl17a	5’-TGAGCTTCCCAGATCACAGA-3’	3’-TCCAGAAGGCCCTCAGACTA-5’
mIl17f	5′-TTGATGCAGCCTGAGTGTCT-3′	3’-AATTCCAGAACCGCTCCAGT-5'
mIl21	5′-AAAACAGGCAAAAGCTGCAT-3′	3′-TGACATTGTTGAACAGCTGAAA-5′
mIl22	5′-TCGCCTTGATCTCTCCACTC-3′	3’-GCTCAGCTCCTGTCACATCA-5′
mIl23r	5’-CTGAGGTTCGTGGGATGATT-3’	3’-AAAAGAAACTGGCAGCCTTG-5’
mIl6	5’-ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC-3’	3’-TGATGCACTTGCAGAAAACA-5’
mIrf4	5’-CAAAGCACAGAGTCACCTGG-3’	3’-TGCAAGCTCTTTGACACACA-5'
mBatf	5’-CCTGGCAAACAGGACTCATCT-3’	3’-GGATCACGGGAGTAGCATCG-5’
mCmaf	5’-GGCCATGGAATATGTTAATGACTTC-3’	3’-CCGCACTGGCTGATGATG-5’
hActb	5’-GTTGTCGACGACGAGCG-3’	3’-GCACAGAGCCTCGCCTT-5’
hRorc	5′-AAGCAGGAGCAATGGAAGTG-3′	3′-GCAATCTCATCCTCGGAAAA-5′
hIl17a	5’-CACTTTGCCTCCCAGATCAC-3’	3’-ACCAATCCCAAAAGGTCCTC-5’
hTbx21	5’-CCACCTGTTGTGGTCCAAGT-3’	3’-ACCACGTCCACAAACATCCT-5’
hIfng	5’-GTATTGCTTTGCGTTGGACA-3’	3’-GAGTGTGGAGAGACCATCAAGGA-5’
hGata3	5’-TTCCTCCTCCAGAGTGTGGT-3’	3’-AAAATGAACGGACAGAACCG-5’
hIl4	5’-GCACCGAGTTGACCGTAACA-3’	3’-GCGAGTGTCCTTCTCATGGT-5’
hIl5	5’-CTCTTGGAGCTGCCTACGTG-3’	3’-TTTCCACAGTACCCCCTTGC-5’
hIl13	5’-GAGCTGGTCAACATCACCCA-3’	3’-AGCTGTCAGGTTGATGCTCC-5’
hFoxp3	5’-TTCCTTGAACCCCATGCCAC-3’	3’-TGAAATGTGGCCTGTCCTGGC-5’

Supplementary Table 3: List of mouse and human primers used for mRNA relative expression.

Supplementary experimental procedures:

Mouse strains

All animals were bred and maintained according to both the Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA) and the Animal Experimental Ethics Committee Guidelines (University of Burgundy, Dijon, France). Animals were used between 6 and 22 weeks of age. Female C57BL/6, BALB/c and Nude mice were purchased from Centre d'élevage Janvier and from Charles River Laboratories. IL17a$^{-/-}$ and fl-CD4/SIRT1-Cre mice were provided by the CDTA (Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal) and distributed by EMMA (European Mouse Mutant Archive, a service funded by the EC FP7 Capacities Specific Programme).

Tumor growth experiments

B16F10 melanoma and CT26 colon cancer cells were cultured at 37°C under 5% CO2 in DMEM high glucose and RPMI-1640 respectively with GlutaMax-1 (Lonza) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (Lonza), 1% penicillin, streptomycin, amphotericin B (Gibco), 4 mmol/L HEPES (Gibco), and 1 mmol/L sodium pyruvate (Gibco). B16F10 and CT26 cells were obtained from American Type Culture Collection. All cells were routinely tested for Mycoplasma contamination using Mycoalert Mycoplasma Detection Kit (Lonza) and were found to be negative. To induce tumor formation, 2×10^5 B16F10 or 4×10^5 CT26 cancer cells were injected subcutaneously into mice. Alternatively, 2×10^5 B16F10 cells were injected intravenously into mice. Lung tumor foci were counted after 13 days by researchers 'blinded' to sample identity. In vivo IL-17A neutralization was respectively achieved by injecting 200 µg intraperitoneally (i.p.) of an anti-IL-17A antibody (clone 17F3; BioXCell) on day 0, 1, 2, 3, 4, and 6 following tumor implantation. Alternatively, intraperitoneally injections of metformin (150 mg/kg/day) or resveratrol (35 mg/kg/day) were achieved on day 7 following tumor implantation. In vivo SIRT1 inhibition was achieved by injecting 1mg/kg/day of EX-527 (Cayman). All treatment is not performed the weekend. All tumor growth experiments were carried out in accordance with guidelines prescribed by the Ethics Committee at the University of Burgundy.

In vitro T cell differentiation

Naïve CD4$^+$ T cells (CD4$^+$ CD62L^{hi}) were obtained from spleens and lymph nodes of C57BL/6 wild-type (WT) or fl-CD4/Sirt-1-Cre mice. Purification of CD4$^+$ T cells was achieved as described in (Berger et al., 2013). In experiments, metformin, resveratrol and SRT1720 which are classical activators of SIRT1 have been added at

the final concentration of 0.5 and 5 mM (Sigma Aldrich), 10 µM (Sigma Aldrich) and 1 µM (Cayman), respectively. In some experiments, EX-527, a classical inhibitor of SIRT1, has been added at the final concentration of 250 nM (Cayman). In one experiment, four different inhibitors were used in a three dose effect respectively chosen according to IC50 of each one. Digoxin (Tocris) and ACHP (Tocris) have been added at the final concentration of 5, 50 and 500 nM. GW9662 (Tocris) has been added at the final concentration of 0.12, 0.6 and 3 nM and Cucurbitacin I (Cayman Chemical) has been added at the final concentration of 20, 100 and 500 nM. Cells were classically harvested on day 3 (unless otherwise specified) for detection of cytokines by ELISA and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis.

Human sample

Experiments on human $CD4^+$ T cells were carried out using peripheral blood from healthy volunteers (provided by the "Etablissement Français du Sang" Besançon, France). Written informed consent was obtained from all healthy blood donors. Anti-CD45RA-APC-Vio770 (T6D11) and anti-CD4-VioGreen (VIT4) were purchased from Miltenyi Biotech and were used to sort out naïve CD4 T ($CD4^+$ $CD45RA^+$) cells.

Naïve CD4 T cells or memory Th17 cells were sorted from blood of healthy volunteers, followed by activation with plate-bound antibodies against CD3 (OKT3; 2 µg/ml; Bio-Xcell) and CD28 (CD28.2; 2 µg/ml; Bio-Xcell). Naïve CD4 T cells were differentiated for 3 days into effector CD4 T lymphocyte subsets with cytokines and memory CD4 T cells were restimulated in the presence of the same cytokines (IL-6, IL-23 and TGF-β). Human IL-4 (10 ng/mL), IL-6 (10 ng/mL), IL-12 (10 ng/mL), IL-23 (10 ng/mL) and TGF-β (5 ng/mL) were all purchased from Miltenyi Biotech. Anti-IL-4 (clone MP4; 7 µg/mL; BioLegend) and anti-IFNγ (clone NIB42; 7 µg/mL; BioLegend) antibodies were obtained from Bio-XCell. In some experiments, metformin, resveratrol, SRT1720 or EX-527 have been added as previously described.

Patients

Between January 2014 and December 2015, we collected whole blood from (n=10) metastatic colorectal cancer (mCRC) patients in the Centre Georges François Leclerc. mCRC patients were diagnosed in our cancer. Because of concomitant diagnosis of diabetes a metformin treatment (500mg twice a day) was introduced. A blood sample was harvested before initial of metformin and 1 month later. All patients gave informed consent approved by the local Ethics Committee. The collection of blood sample is authorized by the French authorization N° (AC2014-2460). No addition blood than blood required for routine testing was taken.

Flow cytometry

Antibodies and cytometry procedure

Anti-CXCR3-PE-Vio700 (REA232), anti-CCR6-PE (REA190), anti-CD25-APC (4E3), anti-CD45RA-APC-Vio770 (T6D11), anti-CD4-VioGreen (VIT4), anti-IFNγ-APC (45-15), anti-RORγt-APC (REA278) and anti-Foxp3-PE (3G3) were purchased from Miltenyi Biotech. Anti-CCR4-BrilliantViolet421 (1G1) was purchased from BD Biosciences. Anti-Tbet-PacificBlue (4B10) and anti-IL17A-PacificBlue (BL168) were purchased from BioLegend. Anti-acetyl-STAT3-K685 was purchased from Cell Signaling Technology and was conjugated with a goat anti-rabbit-Alexa405 (Life Technologies). All events were acquired by a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences) and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, Oregon).

Leucocyte population identification

Written informed consent was obtained from all metastatic colorectal cancer patients. For leucocyte identification by flow cytometry, whole blood removed to heparinized tube, 100 µL of whole blood were stained with different antibody cocktail during 45 minutes. For Treg ($CD4^+$ $CD45RA^-$ $CD25^+$ $Foxp3^+$) analysis we used CD4, CD45RA, CD25 and Foxp3 antibodies and for others T_{Helper} subsets (Th1: $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CCR6^-$ $CXCR3^+$, Th2: $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CCR6^-$ $CXCR3^-$ $CCR4^+$, Th17: $CD4^+$ $CD45RA^-$ $CCR6^+$ $CXCR3^-$) we used CD4, CD45RA, CD25, CCR6, CXCR3, CCR4. After surface staining, 2 mL of red blood cells lysis solution (BD Biosciences) were added during 10 minutes, centrifuged (400 g, 5 minutes) and then resuspended in flow cytometry buffer (eBiosciences). Foxp3 or Acetyl-STAT3 staining was carried out according to the manufacturer's protocol using the fixation/permeabilization solution (eBiosciences). The gating strategy is described in Supplementary Figure 6.

Measurement of cytokines

After a 72-hour polarization, cell culture supernatants were assayed by ELISA for mouse IL-4 (BD Biosciences), IL-13 (eBiosciences), IL-17A (Biolegend), IFNγ (BD Biosciences), VEGF-A (eBiosciences) or human IL-17A (Biolegend) according to the manufacturer's protocol.

For intracellular cytokine staining, cells were cultured for 3 days and then stimulated for 4 hours at 37°C in culture medium containing phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 50 ng/mL; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) and monensin (GolgiStop; 1 µL/mL; BD Biosciences). After staining for surface

markers, cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Fixation/Permeabilisation kit, eBiosciences), then stained for intracellular products. Monoclanal antibody (mAb) used for mouse surface marker staining was FITC-conjugated anti-mouse CD4 (GK1.5; Miltenyi). Monoclonal antibodies used for intracellular staining were as follows: eFLuor®450–conjugated anti-mouse IL-17A (eBio 17B7; eBiosciences), Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-mouse Foxp3 (FJK-16s; eBiosciences), PacificBlue-conjugated anti-human IL-17A (BL168; BioLegend), Allophycocyanin (APC)-conjugated anti-human IFNγ (45-15; Miltenyi), APC-conjugated anti-human RORγt (REA278; Miltenyi), Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-human Foxp3 (3G3; Miltenyi), PacificBlue-conjugated anti-human Tbet (4B10; BioLegend).

Western Blotting analysis

Purified naïve T cells were differentiated for 6 or 24 hours into Th17 cells with or without metformin, resveratrol, SRT720 or EX-527, then collected and pelleted by centrifugation (5 minutes, 450g, 4°C). Cells were lysed in boiling buffer [1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate, and 10 mM Tris (pH 7.4)] containing protease inhibitor cocktail for 20 minutes at 4°C. Cell lysates were subjected to sonication (10 seconds at 10%) and protein concentration was assessed using the Bio-Rad DC Protein Assay Kit. Proteins were then denaturated, loaded, and separated on SDS-PAGE and transferred on nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell). After blocking with 5% nonfat milk in Phosphate-Buffered Saline containing 0.1% Tween 20 (PBST), membranes were incubated overnight with primary antibody diluted in PBST containing 5% BSA, washed and incubated for 1 hour with secondary antibody diluted in PBST–5% nonfat milk. After additional washes, membranes were incubated with luminol reagent (Santa Cruz Biotechnology) and exposed to X-ray films. The following mouse monoclonal antibody was used: anti-β-actin (Sigma-Aldrich). The following rabbit monoclonal antibodies were used: anti-STAT3, anti-acetyl-STAT3-K685, anti-phospho-STAT3-Tyr705, anti-Raptor, anti-phospho-Raptor-S2448, anti-phospho-Raptor-S792, anti-p70s6kinase, anti-phospho-p70s6kinase-Thr389, anti-AKT and anti-phospho-AKT-Thr308 (Cell Signaling Technology). The following rat monoclonal antibody was used: anti-RORγt (eBiosciences). Secondary antibodies HRP-conjugated polyclonal goat anti-mouse (Jackson ImmunoResearch), polyclonal goat anti-rabbit (Cell Signaling Technology) and polyclonal goat anti-rat (Santa Cruz Biotechnology) were also used.

Chromatin immunoprecipitation assay

Purified naïve T cells were differentiated for 6 hours into murine Th0 or Th17 cells with or without metformin, resveratrol or SRT720. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was conducted according to the manufacturer's

instructions (ChiP-IT Express Enzymatic; Active Motif). Briefly, cells were fixed in a solution containing 37% formaldehyde for 10 minutes and quenched with 0.125 mol/L glycine. Chromatin was isolated and sheared to an average length of 300 to 500 bp by Enzymatic Cocktail. Twenty-five micrograms of DNA were immunoprecipitated with a STAT3-specific antibody (Cell Signaling Technology). After chromatin elution, cross-links were reversed by a Reverse Cross-linking Buffer and qRT-PCR was conducted. Data were normalized to Actin-b Ct values and expressed in fold enrichment according to immunoglobulin (Ig) values. Primers designed to assess ChIP assay are as described in Supplementary Table 2.

Quantitative real-time PCR

Total RNA from T cells was extracted with TriReagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), and was analyzed by RT-qPCR with the SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of mouse or human Actb. Primers designed to assess gene expression are as described in Supplementary Table 3.

Immunofluorescence and in situ proximity ligation assay

$0.5x10^6$ purified naïve T cells were differentiated or not for 6 hours into murine Th17 cells with or without metformin, resveratrol or SRT720. Cells were washed, then were fixed for 10 min at 4 °C with 4% PFA and were permeabilized for glacial methanol on ice. Non-specific binding in slides was blocked by incubation for 20 min at room temperature with a buffer of 0.5% BSA in PBS. Samples were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (identified below). For immunofluorescence experiments, cells were washed three times with PBS and were incubated for 30 min at room temperature with the secondary antibody Alexa Fluor 594–coupled anti-rabbit (identified below), then were washed three times with PBS. For proximity ligation assay experiments, after primary antibodies were washed out, cells were incubated for 1 h at 37 °C with the appropriate probes (identified below) and were washed two times with PBS. Probes were then ligated for 30 min at 37 °C and washed two times in Buffer A and were amplified for 100 min at 37 °C in the dark with polymerase (Sigma-Aldrich).

For both experiments, cells were then mounted for 2 h in the dark on a drop of Mounting Medium containing DAPI (P36931; Molecular Probes) on a microscopy slide (045796; Dutscher). Slides were imaged with a charge-coupled device-equipped upright microscope (Zeiss) and 40× or 63× objectives with a numerical aperture of 1.4. Images were analyzed by ImageJ software.

The following antibodies were used for immunofluorescence and proximity ligation assays: anti-mouse STAT3 (124H6; Cell Signaling Technology), anti-rabbit p300 (sc-585, Santa Cruz Biotechnology), anti-rabbit SIRT1 (D60E1; Cell Signaling Technology), anti-rat RORγt (B2D, eBiosciences), anti-rabbit PLUS probe (1:5 dilution; Duo92002; Sigma-Aldrich) anti-mouse MINUS probe (1:5 dilution; Duo92004; Sigma-Aldrich), and Alexa Fluor 594–conjugated goat anti-rabbit (1:2000 dilution; A-11012; Invitrogen). The primary antibodies were used as recommended by the supplier.

Statistical analyses

Statistical analysis was conducted using Prism software (Graph Pad software). For the analysis of experimental data, comparison of continuous data was achieved by the Mann–Whitney U test and comparison of patient monitoring by the paired Mann-Whitney U test, as appropriate. All P values are two-tailed. P values less than 0.05 were considered significant (*P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001). Data are represented as median ± s.e.m.

Ce projet nous a permis de mettre en évidence différents points importants (**Figure 20**, p. 172) :

1. Détermination du rôle de l'activation de SIRT1 sur la polarisation T CD4$^+$

- ✓ L'activation de SIRT1 par des agonistes pharmacologiques (resvératrol, SRT1720, metformine) permet d'inhiber spécifiquement la polarisation Th17 chez la souris et chez l'Homme. Elle n'a pas d'impact sur la polarisation Th1, Th2 et Treg.
- ✓ L'activation de SIRT1 inhibe la voie STAT3 par désacétylation et inhibition de sa translocation nucléaire, il en résulte ainsi une absence d'expression génique du facteur de transcription RORγt indispensable au bon fonctionnement du programme Th17.

2. Étude du rôle de l'activation de SIRT1 *in vivo*

- ✓ L'activation *in vivo* de SIRT1 diminue le nombre de lymphocytes Th17 et permet de retarder la croissance tumoral de deux modèles murins précliniques de cancer (B16F10 : mélanome et CT26 : cancer colique). Nous avons pu mettre en évidence que ce retard est lié à une diminution de la production de VEGF-A dans la tumeur.

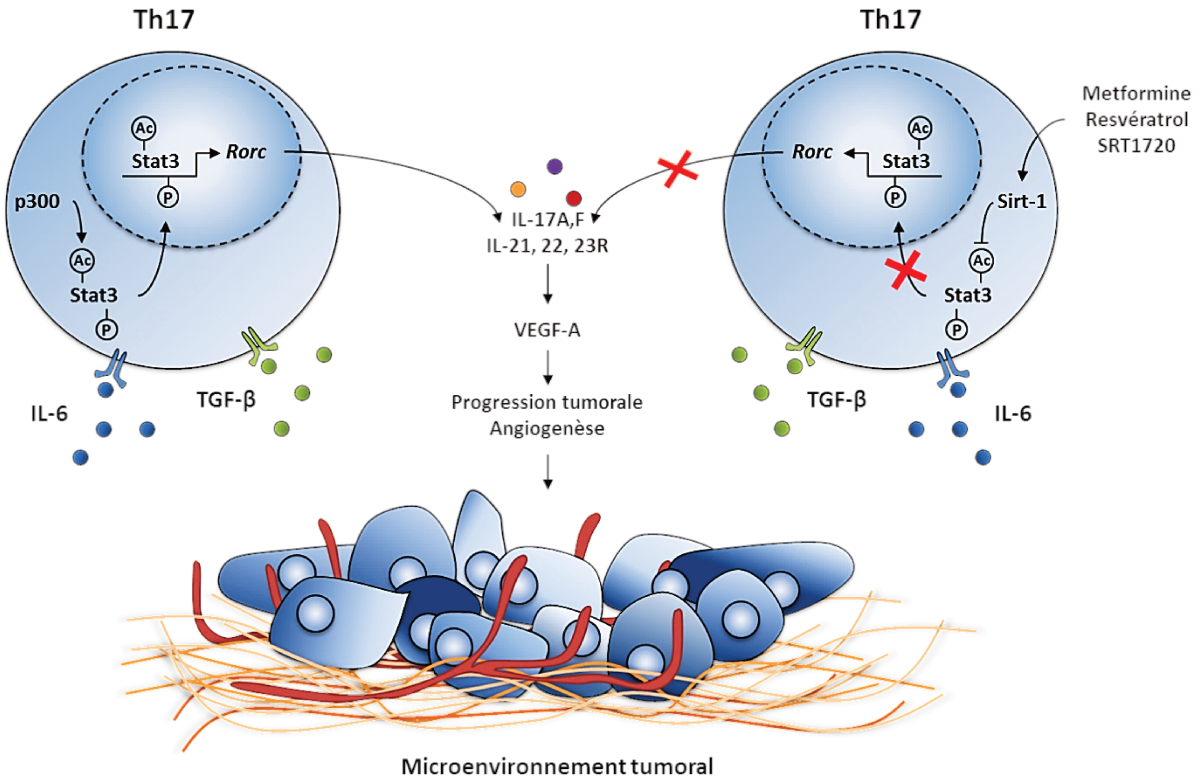


Figure 20. Rôle de l'activation de SIRT1 dans la polarisation des lymphocytes Th17 et dans la progression tumorale.

Les conclusions et perspectives de l'article précédent faisaient appel au blocage des fonctions immunorégulatrices des lymphocytes Th17 comme nouvelle stratégie thérapeutique pour le cancer du sein. Le travail que nous avons mené sur les agonistes de SIRT1 s'inscrit dans la démarche d'inhiber la polarisation Th17 en visant à stopper l'inflammation et l'angiogenèse induites par les cellules Th17 dans un contexte de cancer. Les premiers résultats que nous avons obtenus chez l'homme montrent que la prise de metformine permet effectivement de limiter la fonctionnalité des lymphocytes Th17 tout en conservant celle des populations de bon pronostic telles que les cellules Th1 dans un contexte tumoral.

La confrontation de nos données et des publications de la littérature concernant l'impact de SIRT1 sur la polarisation des lymphocytes Th17 peut montrer quelques contradictions en particulier depuis la publication de l'équipe d'Éric Verdin (Lim et al., 2015). Nous avons montré que l'activation de SIRT1 par des agonistes pharmacologiques induit une diminution de la différenciation des lymphocytes Th17 par l'intermédiaire de la désacétylation de STAT3. Cette modification de STAT3 induit une suppression de l'expression génique de *Rorc* et de l'*Il17a*. L'équipe d'Éric Verdin a montré que SIRT1 pouvait au contraire favoriser la polarisation Th17 grâce à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de RORγt suite à sa désacétylation. Ces données pourraient laisser croire à un rôle biphasique de SIRT1 sur la polarisation Th17. Cependant, il est important de préciser que nous n'avons pas étudié les mêmes mécanismes biologiques puisque l'équipe d'Éric Verdin a étudié l'activité basale de SIRT1 alors que nous avons étudié le rôle de SIRT1 après activation pharmacologique. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que l'activité endogène de SIRT1 augmente la polarisation Th17 *via* la désacétylation de RORγt tandis qu'une forte activation de SIRT1 avec des agents pharmacologiques dans un contexte thérapeutique induit l'inhibition de la différentiation Th17 *via* la désacétylation de STAT3.

Notre hypothèse de départ concernant la régulation de la polarisation des Th17 repose sur le contrôle de l'activité de STAT3, un facteur de transcription impliqué très précocement dans le programme de différenciation Th17. STAT3 a ainsi la possibilité de contrôler l'expression génique de *Rorc* qui pourra alors induire avec STAT3 l'expression de l'*Il17a*. Nous avons mis en évidence que l'activation de SIRT1 dès le début de la polarisation des lymphocytes Th17 permet de limiter l'acétylation de STAT3, ce qui empêche l'expression de *Rorc* et en découle donc l'inhibition de l'expression protéique de RORγt et de l'IL-17A. L'impact de SIRT1 sur STAT3 est décrit par de nombreuses autres équipes dans différents modèles cellulaires et pathologiques (obésité, inflammation articulaire, cutanée, neurologique, *etc.*). L'effet anti-inflammatoire de SIRT1 est également lié à la désacétylation d'autres facteurs de transcription tels que NFκB, NFAT, AP-1 (Kong et al., 2012).

Il est également important de replacer SIRT1 et la réponse inflammatoire dans un contexte métabolique. Notre analyse du rôle de SIRT1 sur la polarisation des cellules Th17 repose ainsi sur sa régulation dans un contexte de restriction calorique. Nous avons utilisé la metformine comme activateur de SIRT1, une molécule qui joue sur le ratio ATP/ADP et NAD^+/NADH puisqu'en situation de restriction calorique, le rapport ATP/ADP change dans la cellule et provoque une activation de l'AMPK qui régule les taux de NAD^+ pour induire l'activité de SIRT1. L'axe AMPK/SIRT1 est très important dans la régularisation de la polarisation T $CD4^+$ et de nombreuses études ont récemment montré qu'impacter cet axe permet de moduler la balance Th17/Treg. Des études, utilisant d'autres activateurs de SIRT1 tels que le NAD^+, montrent également que cet axe moléculaire peut limiter la polarisation Th17 et le processus d'EAE chez la souris (Wang et al., 2016a; Wang et al., 2016b). Dans le cancer chez l'Homme, des données récentes montrent également que la metformine peut limiter le risque de rechute des patients hyperglycémiques et porteurs de cancer du pancréas (Pusceddu et al., 2017). L'utilisation d'agonistes pharmacologiques de SIRT1 ou le recours à la restriction calorique pour diminuer l'inflammation due en partie aux lymphocytes Th17 pourrait donc être de bonnes stratégies à adopter. L'utilisation de ces méthodes thérapeutiques peut être freinée par les oncologues, surtout chez les patients présentant une cachexie et des dysfonctionnements d'organes importants. Toutefois, des études montrent que cette alternative thérapeutique doit être envisagée puisqu'elle permet, lorsqu'elle est combinée à la chimiothérapie, d'obtenir des réponses importantes tout en limitant les effets secondaires des traitements chez la souris (Raffaghello et al., 2008) et chez l'Homme (Raffaghello et al., 2010; Safdie et al., 2009). Pour finir, ce travail ne se limite pas uniquement à la prise en charge du cancer puisque l'utilisation d'agents pharmacologiques capables d'inhiber la polarisation des lymphocytes Th17 peut également avoir une utilité dans le traitement de nombreuses maladies inflammatoires telles que le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde mais aussi les maladies neurodégénératives.

Projet 3 – Article en préparation

Étude du rôle pronostique des lymphocytes Th9 humains dans les cancers du sein

a) Contexte du projet et objectifs

Il est désormais admis que les lymphocytes Th9 sont impliqués dans l'induction des maladies auto-immunes telles que le psoriasis ou la dermatite atopique ainsi que dans les maladies allergiques. Cependant, certaines observations ont suggéré que ces cellules pouvaient également présenter des fonctions anti-tumorales mais les mécanismes moléculaires à l'origine de ces propriétés effectrices sont restés longtemps méconnus. L'équipe du Pr. Ghiringhelli, et plus précisément Frédérique Végran et Hélène Berger, ont mis en évidence que le facteur de transcription IRF1 augmente les fonctions effectrices des lymphocytes Th9 et dicte leurs propriétés anti-tumorales. Dans des conditions de polarisation Th9, c'est-à-dire en présence d'IL-4 et de TGF-β, l'IL-1β induit la phosphorylation du facteur de transcription STAT1 et l'expression consécutive d'IRF1, qui va se lier aux promoteurs des gènes de l'*Il9* et de l'*Il21* et ainsi augmenter la sécrétion de ces deux cytokines par les lymphocytes Th9. Par ailleurs, les cellules Th9 différenciées en présence d'IL-1β exercent de puissantes fonctions anti-cancéreuses dépendantes de l'expression d'IRF1 et d'IL-21. Ces résultats ont ainsi permis d'identifier le facteur de transcription IRF1 comme une cible pour contrôler l'activité des lymphocytes Th9 (Vegran et al., 2014).

Il nous a donc paru intéressant de déterminer si les résultats obtenus chez la souris étaient transposables à l'Homme. Ainsi, nous avons tenté de vérifier si les lymphocytes Th9 humains présentaient les mêmes propriétés effectrices que les Th9 murins, à savoir l'expression des facteurs de transcription caractéristiques tels que PU.1 et IRF4 et la sécrétion d'IL-9. Par ailleurs, nous avons voulu déterminer si la différenciation de ces cellules en présence d'IL-1β favorisait leurs propriétés anti-tumorales *via* l'expression du facteur de transcription IRF1 et par une sécrétion plus importante d'IL-9 et d'IL-21.

Enfin, comme nous l'avons développé préalablement, il est désormais admis que l'infiltration lymphocytaire tient un rôle important dans le pronostic des patients atteints de cancer, particulièrement du sein. Ainsi, une infiltration tumorale en lymphocytes Th1 ou T $CD8^+$, populations lymphocytaires cytotoxiques et anti-tumorales, est associée à un meilleur pronostic dans de nombreux types de cancer et notamment dans le cancer du sein (Gu-Trantien et al., 2013; Mahmoud et al., 2011a). Si les lymphocytes Th9 humains présentent des fonctions effectrices anti-tumorales comme cela a déjà été démontré pour les lymphocytes Th9 murins, nous allons donc chercher à savoir si les lymphocytes Th9 jouent un rôle pronostique dans le cancer du sein puisque cela n'a jusqu'à maintenant jamais été étudié. Pour étudier l'impact pronostique de ces cellules T $CD4^+$, nous avons donc effectué, sur une cohorte de 301 patientes atteintes de cancer du sein et traitées par chirurgie et chimiothérapie adjuvante, un double marquage par immunohistochimie (CD4/PU.1) permettant d'identifier les lymphocytes Th9 et de déterminer leur rôle pronostique ou non.

b) Matériels et méthodes

✓ Isolement, restimulation et différenciation des lymphocytes T CD4$^+$ naïfs

Isolement et tri des lymphocytes T CD4$^+$ naïfs humains : Le sang de volontaires sains est obtenu à l'Établissement Français du Sang (EFS) et une sélection négative des lymphocytes T CD4$^+$ est réalisée avec un kit RosetteSep® « Human CD4$^+$ T Cell Enrichment Cocktail » : il consiste en la combinaison d'anticorps monoclonaux spécifiques des antigènes de surface des cellules hématopoïétiques humaines non CD4$^+$ et des globules rouges du sang. Ce cocktail est mis au contact du sang de volontaires sains pendant 20 minutes à température ambiante à raison de 50 µL pour 1 mL de sang. Il convient ensuite de séparer les cellules ciblées par ce kit des cellules d'intérêt : pour cela, une séparation en gradient de densité (Ficoll®) est réalisée après dilution du sang au demi dans du PBS 1X avec une centrifugation sans frein de 20 minutes à 1000g permettant ainsi la purification des lymphocytes T CD4$^+$ totaux après récupération de l'anneau cellulaire situé à l'interphase. Afin d'isoler les lymphocytes T CD4$^+$ naïfs, une étape de marquage membranaire est réalisée : un mix d'anticorps, préparé dans du milieu de culture AIMV® medium, comprenant un anticorps anti-CD4 (Clone : VIT4) et un anticorps anti-CD45RA (Clone : T6D11) est préparé à raison de 1 µL pour 10.10^6 cellules CD4$^+$. Après 45 minutes de marquage, les tubes sont centrifugés pendant 5 minutes à 450g, une étape de lavage est réalisée pour éliminer l'excès d'anticorps et ensuite les cellules sont reprises dans du milieu de culture à une concentration de 5.10^6 cellules par mL. Le tri des lymphocytes T CD4$^+$ naïfs (CD4$^+$ CD45RA$^+$) est ensuite réalisé avec l'appareil BD FACS ARIA^{TM} III.

Restimulation et différenciation des lymphocytes T CD4$^+$ naïfs *in vitro* : Les cellules T CD4$^+$ naïves sont mises en culture à raison de 200 000 cellules par puits dans des plaques 96 puits. Les plaques sont prétraitées pendant 2 heures avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 (respectivement, clones : OKT-3 et CD28.2) à raison de 1 mg/mL pour chaque anticorps permettant ainsi de mimer une activation non spécifique des lymphocytes T. Pour orienter la différenciation vers un sous-type T CD4 particulier, des mix de cytokines et d'anticorps bloquant sont ajoutés dans chaque puits (voir Tableau 1, p. 178).

Tableau 1. Combinaisons de cytokines et anticorps bloquant pour l'induction de la polarisation de lymphocytes T CD4$^+$ effecteurs.

	Anti-IFNγ (MD-1)	IL-4	TGF-β	IL-1β	IFNα	IFNβ	IL-21
Concentration	7 µg/mL	10 ng/mL	5 ng/mL	10 ng/mL	10 ng/mL	100 U/mL	10 ng/mL
Th2	×	×					
Th9	×	×	×				
Th9 + IL-1β	×	×	×	×			
Th9 + IFNα	×	×	×		×		
Th9 + IFNβ	×	×	×			×	
Th9 + IL-21	×	×	×				×

Les cellules différenciées sont laissées en culture pendant 1h, 16h, 24h, 48h ou 72h, sont ensuite récupérées et une centrifugation (300g pendant 5 minutes à 4°C) permet de récupérer le surnageant ainsi que les cellules qui sont conservés à -20°C jusqu'à leur analyse par ELISA ou RT-qPCR.

✓ **Analyse de l'expression génique et de la sécrétion de cytokines des différents sous-types T CD4$^+$ différenciées**

Détermination de la sécrétion de cytokines par ELISA : Après récupération des surnageants des différents sous-types lymphocytaires T différenciées après 3 jours de culture, la sécrétion des cytokines IL-9 et IL-4 est analysée par la technique ELISA.

Caractérisation du profil transcriptomique par RT-qPCR : Après l'extraction des ARN des cellules par séparation de phase (trizol/chloroforme), la transcription inverse est réalisée à l'aide du kit *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen^{TM}) dans un thermocycleur Veriti (Applied Biosystems). Enfin, une réaction de polymérisation en chaine quantitative en temps réel (qPCR) est effectuée, à partir des ADNc obtenus, avec le kit *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems). L'expression génique des gènes *Il9*, *Il4*, *Il21*, *Il10*, *Pu1*, *Irf4*, *Batf*, *Irf1*, *Gata3* est analysée après 1h, 16h, 24h ou 48h de culture.

✓ **Immunohistochimie : double marquage CD4/PU.1**

Pour étudier le rôle pronostique des lymphocytes Th9 dans les cancers du sein, nous avons utilisé des coupes de tumeurs mammaires incluses en paraffine d'une cohorte de 301 patientes traitées par chirurgie et chimiothérapie adjuvante (regroupant tous les sous-types de cancer du sein) dont 9 patientes avec une récidive loco-régionale. Nous avons choisi de caractériser les lymphocytes Th9 par la double expression du marqueur CD4 et du facteur de transcription PU.1 puisque ce dernier

est considéré comme un facteur de transcription spécifique de ces cellules (Chang et al., 2005) et qu'un tel marquage a déjà été réalisé pour identifier les lymphocytes Th9 sur des coupes de peau humaine (Cortelazzi et al., 2013).

Après déparaffinage, les lames sont incubées pendant 45 minutes dans du tampon citrate à 97°C permettant ainsi le démasquage antigénique du tissu. On procède ensuite au blocage des biotines/avidines et peroxydases endogènes avant de saturer pendant 30 minutes avec du sérum humain. L'anticorps anti-CD4 (Clone : SP35, Ventana) est prêt à l'emploi et est incubé pendant une heure puis un anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué au 200^{e} est déposé sur les lames pendant 30 minutes. La révélation avec le substrat *Vector Red* a été validée pour une durée de 15 minutes lors de la mise au point du marquage. Il est ensuite nécessaire de décoller les complexes d'anticorps en passant les lames à 800W pendant deux fois 5 minutes dans du tampon de démasquage antigénique à pH 6 comme précédemment utilisé. On réitère ensuite le blocage des biotines/avidines et des peroxydases endogènes ainsi que la saturation et on incube alors avec l'anticorps anti-PU.1 (Clone : phpu13, eBiosciences) dilué au 50^{e} pendant une nuit. Enfin, nous utilisons un kit de détection contenant des polymères couplés à la phosphatase alcaline (ImmPRESS^{TM}-AP Reagent, Vector Laboratories) incubé pendant 30 minutes puis la révélation avec le substrat *Vector Blue* a été validée pour une durée de 5 minutes lors de la mise au point du marquage. Il convient ensuite de laisser sécher les lames avant d'appliquer le milieu de montage et de déposer une lamelle sur chaque lame.

Le comptage a été effectué au microscope au X40 : sur cinq zones de la lame, le nombre de cellules $CD4^{+}$ ont été comptées ainsi que le nombre de cellules double positives $CD4^{+}$ $PU.1^{+}$ (Image représentative du marquage immunohistochimique, p. 179). Les cinq zones analysées pour chaque tumeur portaient sur des zones stromales bordant les nids tumoraux et ne comprenant pas le front d'invasion et la couronne périphérique, ni des « *hots spots* » isolés.

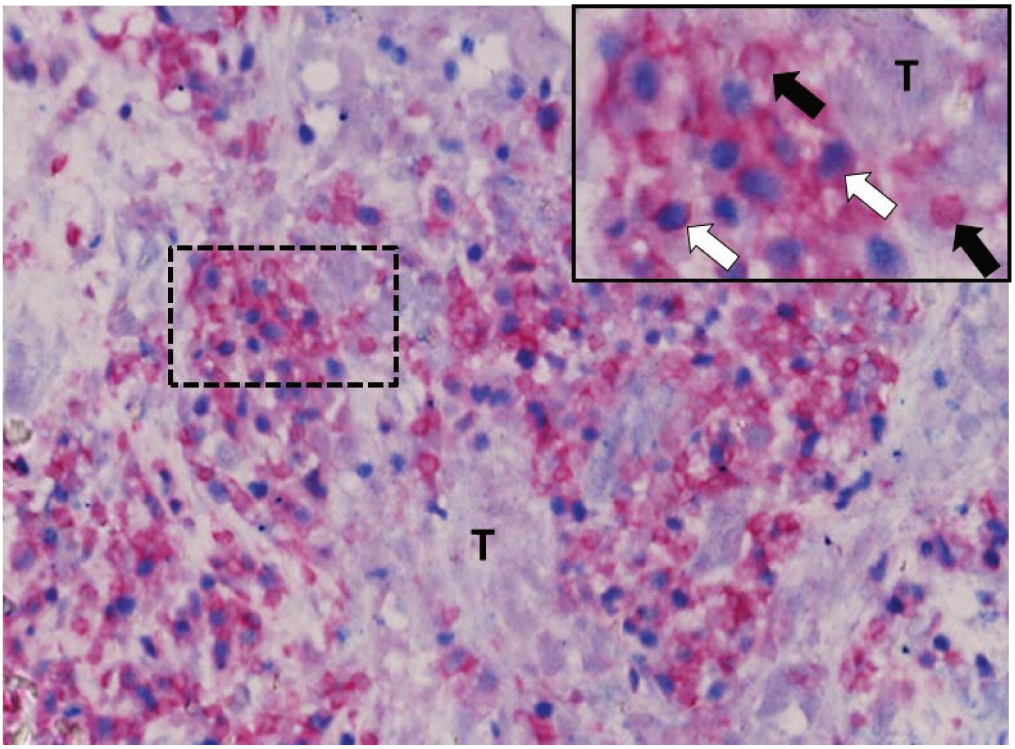


Image représentative du double marquage $CD4^+/PU.1^+$ sur une coupe de tumeur du sein

✓ **Traitement statistique des données**

Les données ont été exprimées en moyenne ± SEM. La comparaison intergroupe a fait appel à une analyse de variance à un facteur (ANOVA) suivie d'un test de Tukey. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *GraphPad Prism*. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

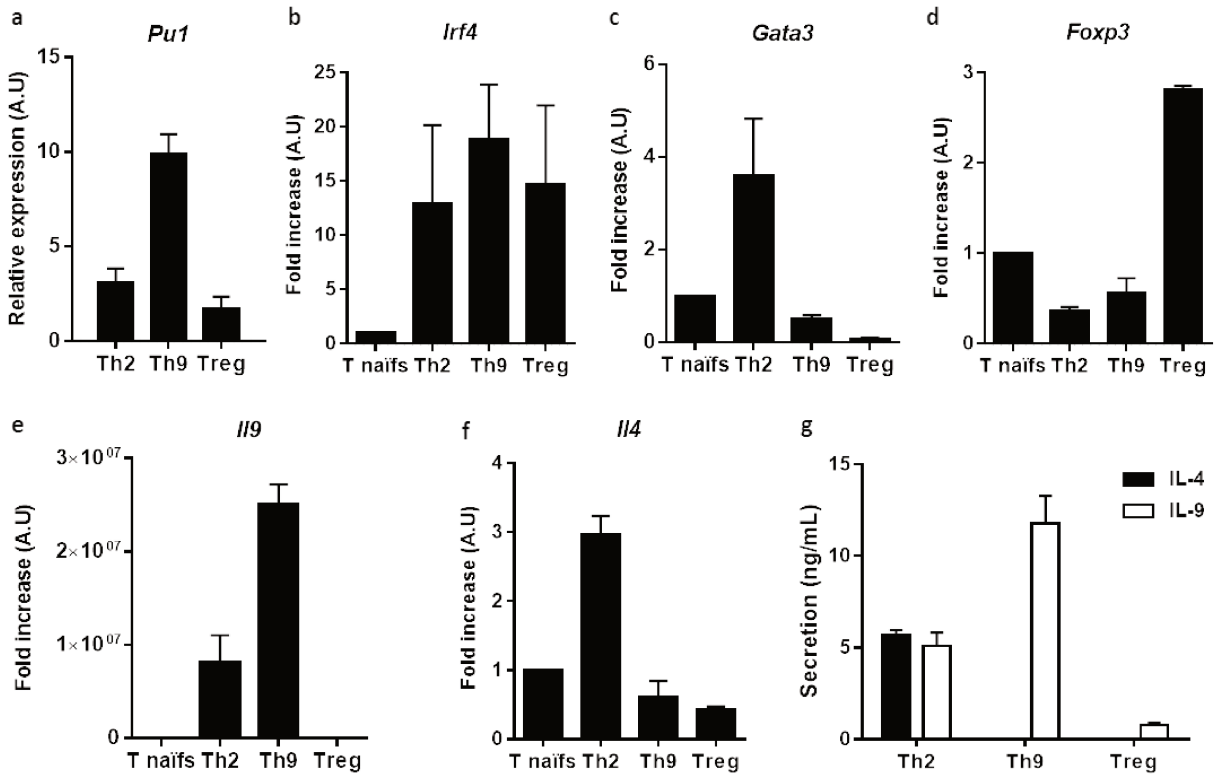
Les analyses statistiques de survie globale et de survie sans récidive, permettant l'étude de l'impact pronostique des lymphocytes Th9 après le double marquage CD4/PU.1 en immunohistochimie, ont été réalisées avec la méthode de Kaplan-Meier et furent comparées par un test de log-rank. Les Hazard Ratio (HR) et les intervalles de confiance (IC 95%) ont été calculés avec des analyses de régression à variable simple (Cox univarié). Enfin, des analyses de régression à variables multiples ont été utilisées pour évaluer l'effet indépendant du pronostic sur la survie sans récidive.

c) Résultats

i. Validation de la différenciation Th9 humaine *in vitro*

Dans un premier temps, il était nécessaire de démontrer une possible polarisation de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs humains en lymphocytes Th9. Pour cela, nous avons différencié des lymphocytes Th2, Th9 et Treg à partir de cellules T naïves et nous avons analysé l'expression génique des facteurs de transcription *Pu1*, Irf4, *Foxp3* et *Gata3* (Figures 1a, b, c, d) ainsi que l'expression génique et la sécrétion de deux cytokines, l'IL-9 et l'IL-4 (Figures 1e, f, g). Les lymphocytes T naïfs humains différenciés en présence d'IL-4 et de TGF-β sécrètent de grande quantité d'IL-9 (Figure 1e) et expriment de façon importante le gène codant pour l'*Il9* (Figure 1f) tandis qu'ils n'expriment ni ne sécrètent d'IL-4 (Figure 1g). Par ailleurs, en ce qui concerne l'expression génique des facteurs de transcription, ces cellules différenciées en présence d'IL-4 et de TGF-β montrent l'expression du facteur de transcription PU.1 après 16h de différenciation (Figure 1a) ainsi que du facteur de transcription IRF4 après 24h de différenciation (Figure 1b). Ce dernier est également exprimé par les lymphocytes Th2 et Treg, différenciés respectivement en présence d'IL4 ou de TGF-β. Toutefois, lorsque l'on analyse l'expression génique de deux autres facteurs de transcription, GATA3 et Foxp3, nous n'observons pas leur expression au sein des cellules différenciées en présence d'IL-4 et de TGF-β (Figure 1c, d) ; tandis que le sous-type Th2 exprime de façon importante le facteur de transcription GATA3 (Figure 1c), caractéristique de cette population lymphocytaire et que le sous-type Treg exprime quant à lui le facteur de transcription Foxp3 (Figure 1d), également caractéristique de ce sous-type lymphocytaire T $CD4^+$. Nous validons donc ainsi la différenciation en lymphocytes Th9 humains puisque nous retrouvons un profil d'expression génique et un profil cytokinique comparable à ceux retrouvés pour les lymphocytes Th9 murins, dont la spécificité de l'expression du facteur de transcription PU.1.

Figure 1. Validation de la différenciation Th9 humaine *in vitro*



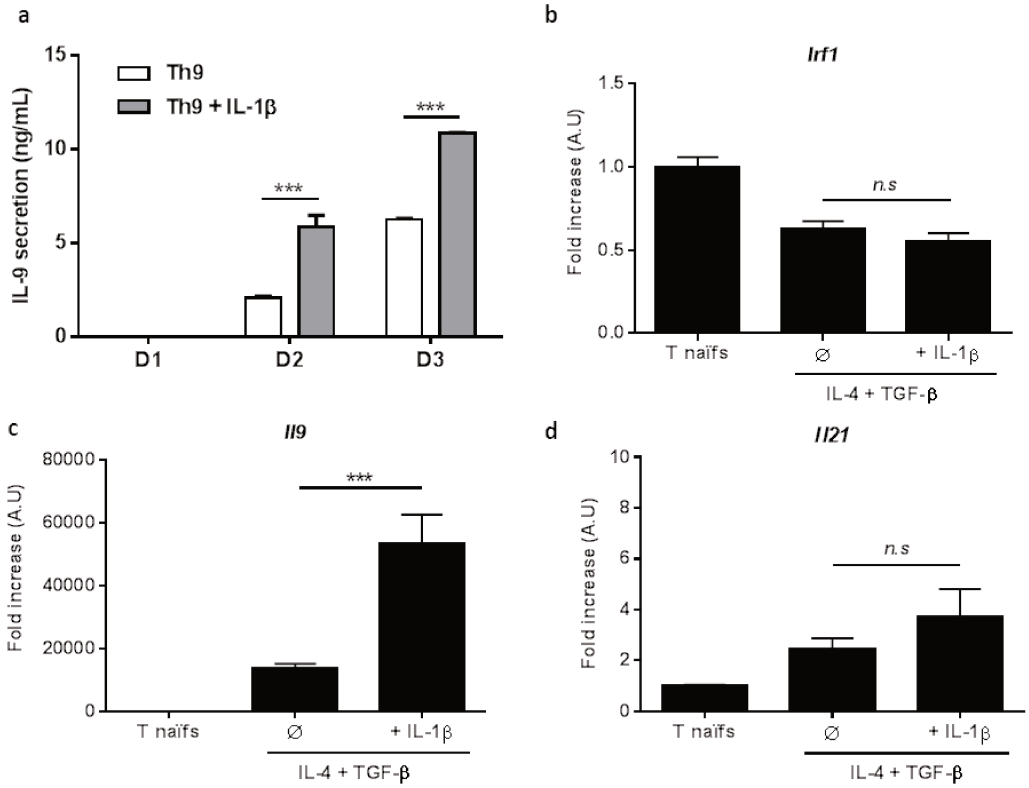
Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs humains ont été activés en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et d'IL-4 (Th2), ou d'IL-4 et de TGF-β (Th9) ou de TGF-β seul (Treg). **a)** Le niveau d'expression de *Pu1* a été évalué par RT-qPCR après 16 heures de différenciation et normalisé au niveau de β-actine. **b, c, d)** Les niveaux d'expression d'*Irf4* **(b)**, de *Gata3* **(c)** et de *Foxp3* **(d)** ont été évalués par RT-qPCR après 24h de différenciation et normalisés au niveau de β-actine. **e, f)** Les niveaux d'expression d'*Il9* **(e)** et d'*Il4* **(f)** ont été évalués par RT-qPCR après 48h de différenciation et normalisé au niveau de β-actine. **g)** Quantification de la sécrétion d'IL-4 et d'IL-9 par ELISA dans les surnageants de culture de lymphocytes T CD4⁺ naïfs différenciés 72h en Th2, Th9 ou Treg.
Les valeurs sont indiquées en moyenne ± SEM et sont représentatives de trois expériences indépendantes.

ii. Effet de l'IL-1β sur la différenciation Th9 humaine *in vitro*

Après avoir démontré la capacité de générer des lymphocytes Th9 humains *in vitro*, nous avons eu pour objectif de déterminer si les données obtenues chez la souris étaient transposables à l'Homme, à savoir est-ce que l'IL-1β favorise les propriétés effectrices et anti-tumorales de ces cellules *via* l'activation du facteur de transcription IRF1 et de façon dépendante de la sécrétion d'IL-9 et d'IL-21. Nous avons donc testé l'effet de l'IL-1β sur des lymphocytes Th9 et analysé la sécrétion d'IL-9 et l'expression génique des gènes *Il9*, *Il21* et *Irf1*. Nous avons mis en évidence que la différenciation des cellules Th9 en présence d'IL-1β induit l'augmentation de la sécrétion d'IL-9, que ce soit après 2 ou 3 jours de différenciation (Figure 2a), ainsi que de l'expression génique du gène codant pour l'IL-9 (Figure 2c) par rapport à des cellules Th9 différenciées en absence d'IL-1β. Cependant, l'augmentation de la sécrétion d'IL-9 n'est pas liée à l'augmentation de l'expression

génique d'IRF1 puisque celle-ci n'est pas retrouvée dans les cellules Th9 différenciées en présence d'IL-1β (Figure 2b). De la même manière, la polarisation Th9 avec de l'IL-1β n'induit pas l'expression génique d'IL-21 (Figure 2d). Contrairement aux lymphocytes Th9 murins, l'IL-1β ne booste pas la différenciation Th9 humaine de manière IRF1-dépendante.

Figure 2. Effet de l'IL-1β sur la différenciation Th9 humaine *in vitro*

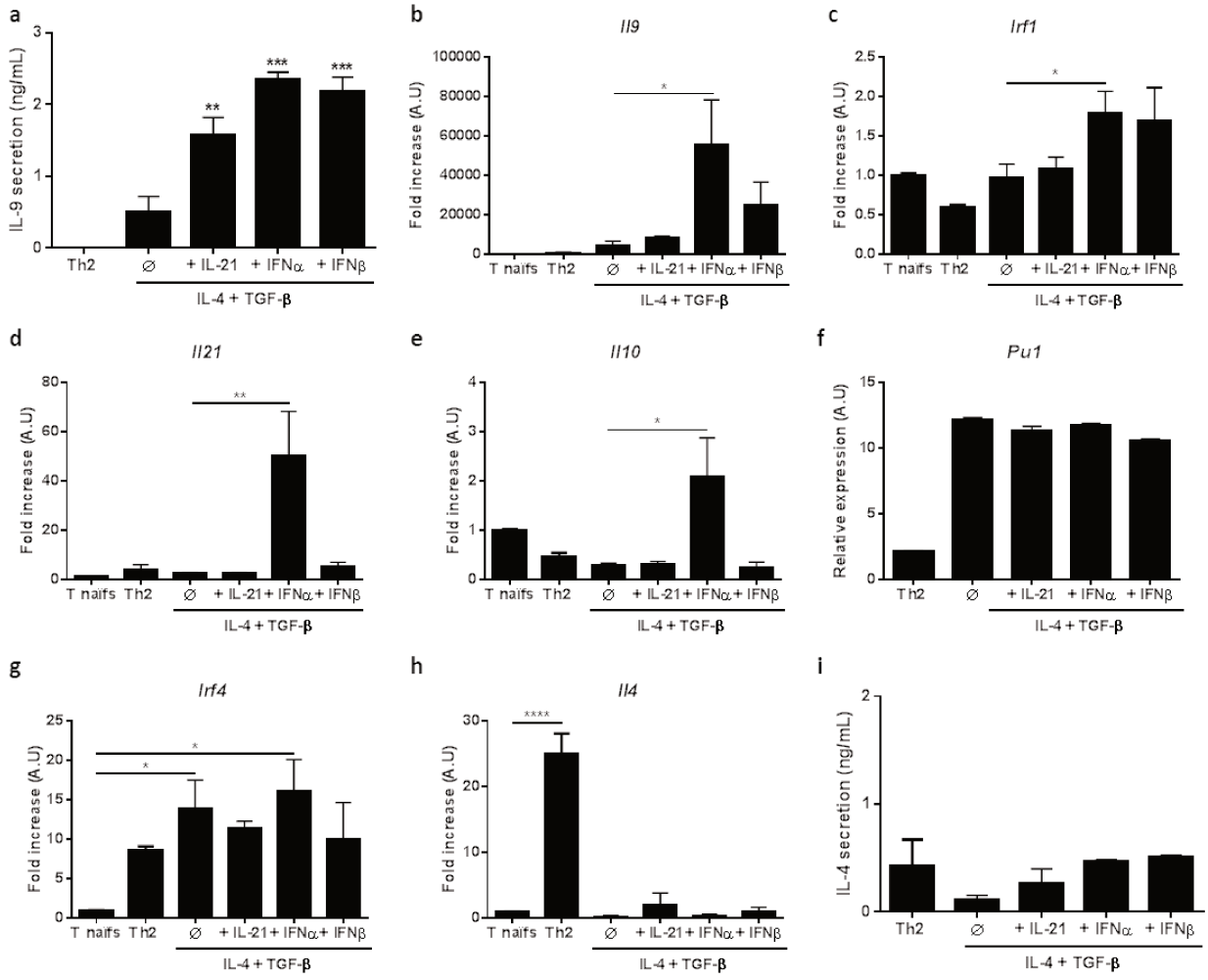


Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs humains ont été activés en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et d'IL-4 et de TGF-β (Th9) en présence ou non d'IL-1β. **a)** Quantification de la sécrétion d'IL-9 par ELISA dans les surnageants de culture de lymphocytes T CD4⁺ naïfs différenciés 24h, 48h, ou 72h en Th9 en présence ou non d'IL-1β. **b)** Le niveau d'expression d'*Irf1* a été évaluée par RT-qPCR après 1h de différenciation et normalisé au niveau de β-actine. **c, d)** Les niveaux d'expression d'*Il9* **(c)** et d'*Il*21 **(d)** ont été évalués par RT-qPCR après 72h de différenciation et normalisés au niveau de β-actine.
Les valeurs sont indiquées en moyenne ± SEM et sont représentatives de trois expériences indépendantes ; *n.s* : non significatif et *** $p < 0,001$.

iii. Effet d'autres cytokines capables d'activer IRF1 sur la différenciation humaine Th9 *in vitro*

Nous nous sommes donc demandé si un autre signal cytokinique pouvait augmenter la différenciation Th9 humaine *via* l'activation d'IRF1. Nous avons ainsi testé l'effet de trois autres cytokines (IL-21, IFNα et IFNβ), capables d'activer le facteur de transcription IRF1, sur la différenciation Th9.

Figure 3. Effet d'autres cytokines capables d'activer IRF1 sur la différenciation Th9 humaine *in vitro*



Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs humains ont été activés en présence d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 et d'IL-4 (Th2) ou d'IL-4 et de TGF-β (Th9) en présence ou non d'IL-21, d'IFNα ou d'IFNβ. **a)** Le niveau d'expression d'*Irf1* a été évalué par RT-qPCR après 1h de différenciation et normalisé au niveau de β-actine. **b)** Le niveau d'expression de *Pu1* a été évalué par RT-qPCR après 16h de différenciation. **c)** Le niveau d'expression d'*Irf4* a été évalué par RT-qPCR après 24h de différenciation et normalisé au niveau de β-actine. **d, e, f, g)** Les niveaux d'expression d'*Il9* **(d)**, d'*Il*4 **(e)**, d'*Il21* **(f)** et d'*Il10* **(g)** ont été évalués par RT-qPCR après 72h de différenciation et normalisés au niveau de β-actine. **h, i)** Quantification de la sécrétion d'IL-9 **(h)** et d'IL-4 **(i)** par ELISA dans les surnageants de culture de lymphocytes T CD4⁺ différenciés 72h en Th2 et Th9 en présence ou non d'IL-21, d'IFNα ou d'IFNβ.
Les valeurs sont indiquées en moyenne ± SEM et sont représentatives de trois expériences indépendantes ; * p < 0,05, ** p < 0,01 *** p < 0,001 et **** p < 0,0001.

La différenciation de cellules Th9 en présence de ces 3 cytokines révèle une augmentation significative de la sécrétion d'IL-9 par rapport aux cellules Th9 contrôles (Figure 3a). Cependant, la polarisation avec l'IFNα induit la plus grande augmentation de l'expression génique du gène codant pour l'IL-9 (Figure 3b). Quand on s'intéresse au facteur de transcription IRF1, deux des 3 cytokines sont capables d'induire une augmentation significative de l'expression génique du gène codant pour ce facteur : l'IFNα et l'IFNβ (Facteur 3c). Cependant, seule la polarisation en présence d'IFNα favorise

l'expression génique des gènes codant pour les cytokines IL-21 et IL-10 par les cellules Th9 humaines (Figure 3d, e), profil d'expression retrouvé également au sein des lymphocytes Th9 différenciés en présence d'IL-1β. Par ailleurs, lorsque l'on analyse les facteurs de transcription caractéristiques des cellules Th9, PU.1 et IRF4, on retrouve une expression génique importante de *Pu1* dans les Th9 différenciés en présence ou non de ces 3 cytokines comparativement à des lymphocytes Th2 (Figure 3f) et même, on observe une augmentation significative de l'expression d'*Irf4* dans les Th9 différenciés en présence ou non d'IFNα par rapport à des lymphocytes T naïfs (Figure 3g). De même, on valide la polarisation Th9 avec l'analyse de l'expression génique du gène codant pour l'IL-4 et l'analyse de la sécrétion d'IL-4 par ELISA puisque comparativement à des lymphocytes Th2, les lymphocytes Th9 différenciés en présence ou non des trois cytokines utilisées n'expriment ni ne sécrètent d'IL-4 (Figure 3h, i). Nous pouvons donc postuler que la différenciation de lymphocytes Th9 humains en présence d'IFNα permet de retrouver les données publiées chez la souris avec l'IL-1β, à savoir une augmentation potentielle des fonctions effectrices des cellules Th9 *via* l'activation du facteur de transcription IRF1.

iv. Impact pronostique des lymphocytes Th9 dans les cancers du sein

✓ Caractéristiques de la cohorte étudiée

Les 301 patientes de cette cohorte ont été suivies et traitées au Centre Georges François Leclerc entre 2005 et 2013. Les différentes caractéristiques de ces patientes sont présentées dans le Tableau 2 (p. 186). L'âge moyen et médian au diagnostic des patientes est de 56,1 ans. Il s'agit en majorité de petites tumeurs (60% de stade pT1) sans ou avec un faible envahissement ganglionnaire axillaire (82% pN0-1). 141 patientes (soit 46,8%) présentent un cancer de grade SBR I ou II, 159 patientes (soit 52,8%) présentent un cancer de grade SBR III et le grade SBR d'une patiente n'a pas pu être déterminé. En ce qui concerne le profil moléculaire du cancer des patientes, 39,9% (120 patientes) ont un cancer luminal, 38,5% (116 patientes) un cancer HER2+++ et 21,6% (65 patientes) un cancer triple-négatif. 197 patientes (soit 65,5%) présentent un cancer RO+, 156 (soit 51,8%) un cancer RP+ et 116 (soit 38,5%) un cancer HER2+. 9 patientes (soit 3%) de cette cohorte ont eu une récidive loco-régionale. Toutes les patientes ont été traitées par chirurgie et chimiothérapie adjuvante. 257 patientes (soit 85,4%) ont également reçu une radiothérapie et 193 (soit 64,1%) une hormonothérapie adjuvante. 17,3% des patientes ont fait une rechute (47 rechutes métastatiques et 9 rechutes loco-régionales) et 40 patientes (soit 13,3%) sont décédées à ce jour.

Tableau 2. Caractéristiques de la cohorte étudiée comprenant 301 patientes atteintes de cancer du sein.

Age au diagnostic	
moyenne (écart-type)	56,1 (12,1)
médiane [min-max]	56,1 [25,0 - 87,2]
pT	
1	178 (59,1%)
2	110 (36,5%)
3	7 (2,3%)
4	6 (2,0%)
pN	
0	126 (41,9%)
1	123 (40,9%)
2	38 (12,6%)
3	14 (4,7%)
Rechute métastatique	
Non	254 (84,4%)
Oui	47 (15,6%)
Grade SBR	
I et II	141 (46,8%)
III	159 (52,8%)
Non applicable	1
Profil moléculaire RH/HER2	
luminal	120 (39,9%)
HER2+	116 (38,5%)
TN	65 (21,6%)
RO	
Négatif	104 (34,6%)
Positif	197 (65,5%)
RP	
Négatif	145 (48,2%)
Positif	156 (51,8%)
HER2	
Négatif	185 (61,5%)
Positif	116 (38,5%)
Récidive loco-régionale	
Non	292 (97,0%)
Oui	9 (3,0%)

Chirurgie	
Oui	301 (100%)
Type de chirurgie	
Conservatrice	195 (64,8%)
Mastectomie	106 (35,2%)
Chimiothérapie adjuvante	
Oui	301 (100%)
Type de chimiothérapie adjuvante	
ANTRACYCLINES + TAXANE ± TRASTUZUMAB	217 (72,1%)
TAXANE + TRASTUZUMAB	80 (26,6%)
FARMORUBICINE (1138B5)	4 (1,3%)
Radiothérapie	
Oui	257 (85,4%)
Non	44 (14,6%)
Hormonothérapie	
Oui	193 (64,1%)
Non	108 (35,9%)
Type d'hormonothérapie	
Castration chirurgicale	1 (0,5%)
Anti-oestrogène (taxomifène)	69 (35,8%)
Antiaromatase (anastrozole): Arimidex	52 (26,9%)
Antiaromatase type I : Aromasine	4 (2,1%)
Antiaromatase (létrozole): Femara	65 (33,7%)
Agoniste LH-RH (Decapeptyl)	1 (0,5%)
Agoniste Lh-RH (Enantone)	1 (0,5%)
Rechute	
Oui	56 (18,6%)
Non	245 (81,4%)
Décès	
Oui	40 (13,3%)
Non	261 (86,7%)

Les caractéristiques des patientes en fonction du profil moléculaire du cancer du sein sont présentées dans le Tableau 3 (p. 187). L'âge médian des patientes présentent un cancer luminal est de 54,6 ans, celui des patientes avec un cancer HER2+ est de 57,2 ans et celui des patientes avec un cancer triple-négatif est de 56,6 ans. En ce qui concerne le sous-type luminal, 65% des patientes présentent un grade SBR I ou II et 35% un grade SBR III. Les patientes avec un cancer HER2+++ ont dans 44,8% des cas un grade SBR I ou II et dans 55,2% des cas un grade III tandis que les patientes avec un cancer du sein triple-négatif ont dans 82,8% un grade SBR III.

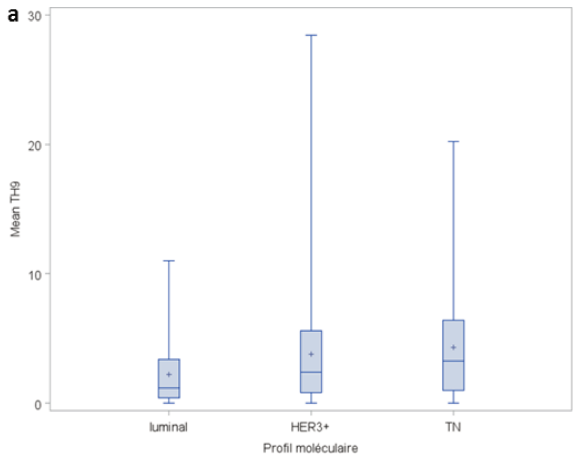
Tableau 3. Caractéristiques de la cohorte étudiée en fonction du profil moléculaire.

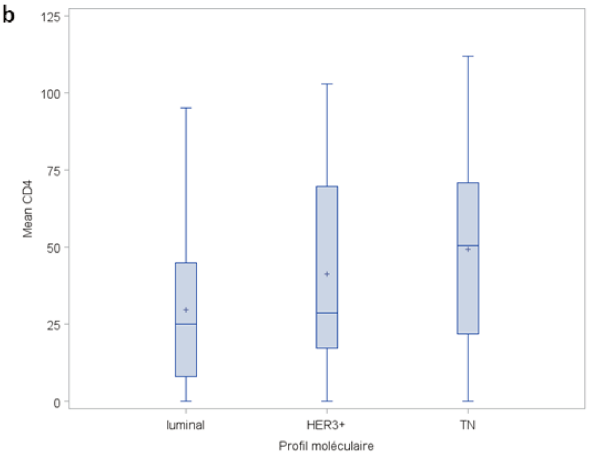
	luminal (N=120)	HER2+ (N=116)	TN (N=65)
Age au diagnostic (ans)			
moyenne (écart-type)	55,0 (11,2)	57,3 (12,5)	56,3 (13,1)
médiane [min-max]	54,6 [25,0 ; 80,3]	57,2 [32,5 ; 87,2]	56,6 [28,4 ; 85,6]
pT			
1	55 (45,8%)	81 (69,8%)	42 (64,6%)
2	60 (50,0%)	28 (24,1%)	22 (33,9%)
3	2 (1,7%)	4 (3,5%)	1 (1,5%)
4	3 (2,5%)	3 (2,6%)	0 (0,0%)
pN			
0	25 (20,8%)	63 (54,3%)	38 (58,5%)
1	64 (53,3%)	36 (31,0%)	23 (35,4%)
2	18 (15,0%)	16 (13,8%)	4 (6,2%)
3	13 (10,8%)	1 (0,9%)	0 (0,0%)
Rechute métastatique			
Non	95 (79,2%)	107 (92,2%)	52 (80,0%)
Oui	25 (20,8%)	9 (7,8%)	13 (20,0%)
Grade SBR			
I et II	78 (65,0%)	52 (44,8%)	11 (17,2%)
III	42 (35,0%)	64 (55,2%)	53 (82,8%)
Non applicable	0	0	1

✓ Description de la proportion de lymphocytes Th9, de lymphocytes CD4 et du rapport Th9/CD4 en fonction du sous-type moléculaire du cancer du sein

Nous avons tout d'abord analysé la densité de lymphocytes Th9 et de cellules T $CD4^+$ et le pourcentage de Th9 parmi les $CD4^+$ en fonction du sous-type moléculaire de chaque cancer : luminal, HER2+++ et triple-négatif. On observe ainsi une plus grande densité de lymphocytes Th9 et de lymphocytes T $CD4^+$ dans les sous-types HER2 et triple-négatif comparativement au sous-type luminal (respectivement, $p = 0,0003$ et $p < 0,0001$) (Figure 4a, b). Par ailleurs, on ne distingue pas de différence entre les trois sous-types moléculaires en ce qui concerne le rapport Th9/CD4 ($p = 0,0857$) (Figure 4c). Ainsi, les corrélations concernant le rapport Th9/CD4 ne sont pas significatives quel que soit le sous-type étudié, cela met donc en évidence qu'une infiltration importante en lymphocytes T $CD4^+$ n'équivaut pas forcément à une forte densité de lymphocytes Th9 *in situ*.

Figure 4. Proportion de Th9, de CD4 et du rapport Th9/CD4 en fonction du sous-type moléculaire du cancer du sein



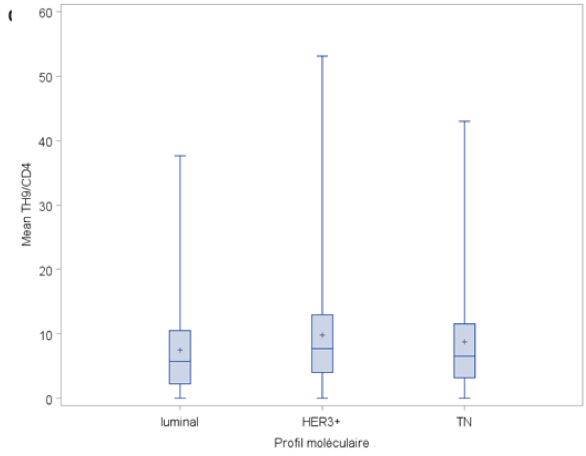


TH9	Profil moléculaire luminal (N=120)	HER2+ (N=116)	TN (N=65)	Test
TH9				
moyenne (écart-type)	2,2 (2,6)	3,8 (4,3)	4,3 (4,2)	ANOVA:
médiane [min-max]	1,2 [0,0 - 11,0]	2,4 [0,0 - 28,4]	3,3 [0,0 - 20,2]	p = 0,0003
manquant	2	2	1	

Comparaisons 2 à 2	p
HER3+ *vs* TN	0,6199
HER3+ *vs* luminal	0,0043
TN *vs* luminal	0,0009

CD4	Profil moléculaire luminal (N=120)	HER2+ (N=116)	TN (N=65)	Test
CD4				
moyenne (écart-type)	29,7 (26,3)	41,4 (30,0)	49,4 (29,7)	ANOVA:
médiane [min-max]	25,0 [0,0 - 95,2]	28,7 [0,0 - 102,8]	0,6 [0,0 - 112,(	p < 0,0001
manquant	2	2	2	

Comparaisons 2 à 2	p
HER3+ *vs* TN	0,1757
HER3+ *vs* luminal	0,0057
TN *vs* luminal	<0,0001



TH9/CD4	Profil moléculaire luminal (N=120)	HER2+ (N=116)	TN (N=65)	Test
TH9/CD4 (%)				
moyenne (écart-type)	7,5 (6,9)	9,8 (8,3)	8,8 (8,3)	ANOVA:
médiane [min-max]	5,7 [0,0 - 37,7]	7,8 [0,0 - 53,2]	6,5 [0,0 - 43,0]	p = 0,0857
manquant	9	3	3	

Corrélation TH9/CD4 :	
Population globale	r = 0,68392
Luminaux	r = 0,67714
TN	r = 0,70580
HER3+	r = 0,60699

a, b, c) Étude de la proportion de lymphocytes Th9 **(a)**, de lymphocytes T CD4$^+$ **(b)** et du rapport Th9/CD4 **(c)** en fonction du sous-type moléculaire du cancer des 301 patientes étudiées. Des comparaisons entre chaque sous-type ont été effectuées avec un test statistique ANOVA.

Ces résultats sont donc en adéquation avec les données de la littérature qui révélaient que les sous-types HER2 et triple-négatif sont plus riches en TILs que le sous-type luminal. L'infiltration en lymphocytes T CD4$^+$ et en lymphocytes Th9 est plus importante dans ces sous-types.

✓ Impact pronostique des lymphocytes Th9 sur la survie sans récidive des patientes

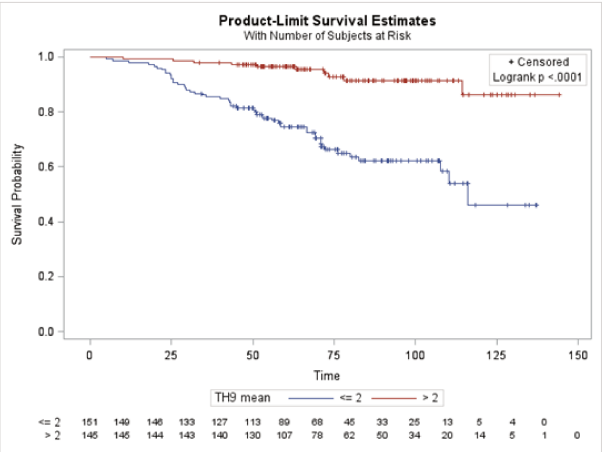
Nous avons donc quantifié par immunohistochimie les lymphocytes $CD4^+$ et $CD4^+$ $PU.1^+$ dans le stroma tumoral près de nids tumoraux dans cette série rétrospective de 301 patientes atteintes de cancer du sein. Nous avons ensuite séparé les patientes en deux groupes (faible *vs* forte densité) en utilisant la médiane comme seuil de séparation pour chaque marqueur : CD4 (médiane = 28,4), Th9 (médiane = 2) et rapport TH9/CD4 (médiane = 6,7). Les patientes présentant une forte densité de lymphocytes Th9 ont une survie sans récidive significativement augmentée par rapport aux patientes avec une faible densité de Th9 (p < 0,0001 ; H.R : 0,171 ; IC 95% : [0,087-0,338]) (Figure 5a, d). Il en est de même pour la densité de cellules $CD4^+$ intra-tumorales : une forte densité de $CD4^+$ est significativement associée à une meilleure survie sans rechute des patientes (p = 0,0087 ; H.R : 0,493 ; IC 95% : [0,291-0,836]) (Figure 5b, d). Enfin, nous avons étudié l'impact de la proportion de Th9 parmi les $CD4^+$ à travers le rapport Th9/CD4 sur la survie sans récidive des patientes et un rapport de Th9/CD4 supérieur à 7% est significativement associé à une meilleure survie sans récidive des patientes (p < 0,0001 ; H.R : 0,149 ; IC 95% : [0,071-0,313]) (Figure 5c, d). Une infiltration tumorale importante en lymphocytes Th9 semble donc associée au pronostic des patientes en termes de survie sans récidive ainsi qu'une forte proportion de Th9 parmi les lymphocytes T $CD4^+$.

En analyse univariée, les autres facteurs ressortant comme significativement associés à la survie sans rechute étaient le type de chirurgie, la taille tumorale et l'envahissement ganglionnaire axillaire (Figure 5d).

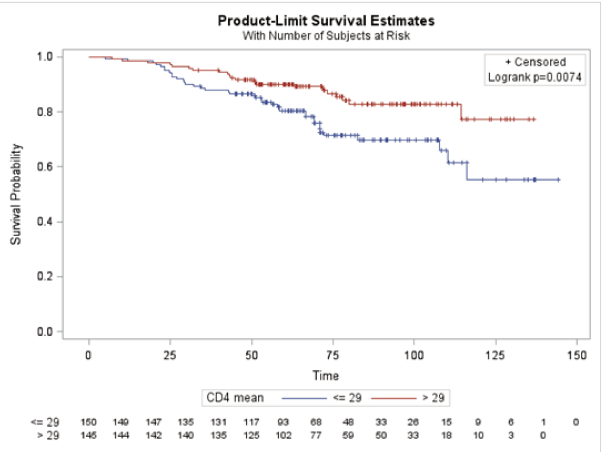
En analyse multivariée, avec un modèle incluant la variable Th9, seuls la taille tumorale, le profil moléculaire (TN), et une forte densité en Th9 étaient indépendamment associés à la survie sans récidive (Figure 5e).

Figure 5. Étude du rôle pronostique des lymphocytes Th9, CD4 et du rapport Th9/CD4 sur la survie sans récidive des patientes

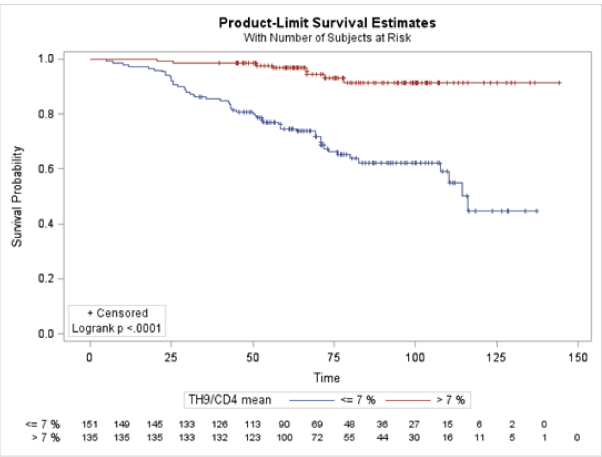
a



b



c



d

Cox univariés			
Variable testée	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
Age			
> 56 ans *vs* < ou = 56 ans	1,435	[0,864 ; 2,384]	0,1631
Type de chirurgie			
Mastectomie *vs* Conservatrice	1,807	[1,092 ; 2,989]	0,0212
Radiothérapie			
Oui *vs* Non	1,039	[0,493 ; 2,191]	0,9202
Hormonothérapie			
Oui *vs* Non	0,832	[0,945 ; 1,396]	0,4857
Profil moléculaire			
HER2+ *vs* TN	0,536	[0,271 ; 1,062]	0,1778
luminal *vs* TN	0,826	[0,447 ; 1,527]	
SBR			
III *vs* I et II	1,361	[0,807 ; 2,293]	0,2479
pT			
> ou = 2 *vs* 1	2,445	[1,456 ; 4,105]	0,0007
pN			
> ou = 1 *vs* 0	1,952	[1,102 ; 3,459]	0,0219
TH9			
> 2 *vs* < ou = 2	0,171	[0,087 - 0,338]	< 0,0001
CD4			
> 29 *vs* < ou = 29	0,493	{0,291 - 0,836]	0,0087
TH9/CD4			
> 7% *vs* < ou = 7%	0,149	[0,071 - 0,313]	< 0,0001

e

Modèle de Cox multivarié			
Variable	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
TH9			
> 2 *vs* < ou = 2	0,171	[0,085 ; 0,344]	< 0,0001
pT			
>1 *vs* 1	1,787	[1,031 ; 3,098]	0,0386
pN			
N+ *vs* N-	1,580	[0,853 ; 2,926]	0,1455
Profil moléculaire			
HER2+ *vs* luminal	0,9	[0,472 - 1,718]	0,7504
TN *vs* luminal	2,11	[1,045 - 4,263]	0,0373
Age			
> 56 ans *vs* < ou = 56 ans	1,33	[0,782 ; 2,262]	0,2921
SBR			
III *vs* I et II	1,318	[0,756 ; 2,298]	0,3297

a, b, c) Courbes de Kaplan-Meier de survie sans rechute des patientes en fonction de la faible ou forte densité de Th9 **(a)**, de la faible ou forte densité de T CD4$^+$ **(b)** et du rapport Th9/CD4 **(c)**, *N* = 301 patientes. Les p-value ont été calculées en utilisant le test statistique de log-rank. **d, e)** Résultats statistiques des Cox univariés **(d)** réalisés en fonction de différentes variables et des Cox multivariés incorporant la variable « densité en Th9 » **(e)** avec pour chaque analyse, le HR, l'IC 95% et la p-value pour chaque variable.

o Impact pronostique des lymphocytes Th9 sur la survie globale des patientes

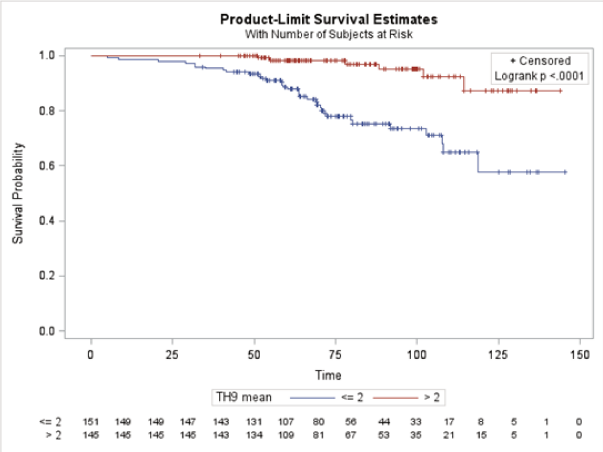
Nous avons ensuite étudié le rôle des lymphocytes Th9 sur la survie globale des patientes atteintes de cancer du sein. Une forte infiltration en lymphocytes $CD4^+$ $PU.1^+$ est significativement associée à une augmentation de la survie globale des patientes (p < 0,0001 ; H.R : 0,161 ; IC 95% : [0,071-0,401] (Figure 6a, d). La présence d'une forte densité de lymphocytes $CD4^+$ n'est quant à elle pas statistiquement associée à une meilleure survie globale des patientes (p = 0,0516 ; H.R : 0,524, IC 95% : [0,274-1,004]) (Figure 6b, d). Cependant, de la même façon que pour la survie sans récidive, la présence d'un rapport Th9/CD4 important est également associée à une meilleure survie globale des patientes (p = 0,0007 ; H.R : 0,244 ; IC 95% : [0,108-0,554]) (Figure 6c, d).

En analyse univariée, les autres facteurs significativement associés à la survie globale étaient l'âge, le sous type moléculaire, et la taille tumorale (Figure 6d).

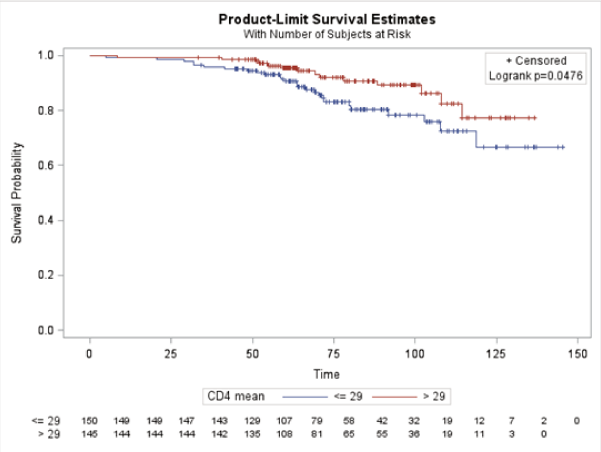
En analyse multivariée, en utilisant un modèle incorporant la variable « densité en Th9 », seuls l'âge, le sous type moléculaire (TN) et la densité en Th9 étaient significativement indépendamment associés à une meilleure survie globale (Figure 6e).

Figure 6. Étude du rôle pronostique des lymphocytes Th9, CD4 et du rapport Th9/CD4 sur la survie globale des patientes

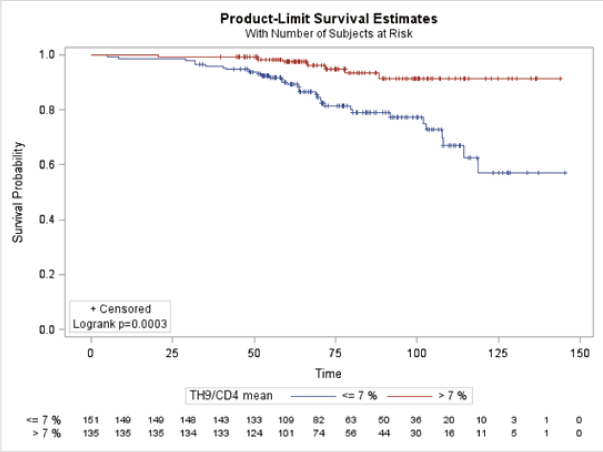
a



b



c



d

Cox univariés			
Variable testée	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
Age			
> 56 ans *vs* < ou = 56 ans	2,954	[1,474 ; 5,919]	0,0023
Type de chirurgie			
Mastectomie *vs* Conservatrice	1,645	[0,881 ; 3,073]	0,1183
Radiothérapie			
Oui *vs* Non	0,797	[0,332 ; 1,917]	0,6127
Hormonothérapie			
Oui *vs* Non	0,493	[0,265 ; 0,917]	0,0254
Profil moléculaire			
HER3+ *vs* TN	0,316	[0,137 ; 0,731]	0,0242
luminal *vs* TN	0,553	[0,272 ; 1,124]	
SBR			
III *vs* I et II	1,412	[0,732 ; 2,722]	0,3033
pT			
> ou = 2 *vs* 1	2,278	[1,201 ; 4,322]	0,0117
pN			
> ou = 1 *vs* 0	1,638	[0,814 ; 3,295]	0,1664
TH9			
> 2 *vs* < ou = 2	0,168	[0,071 - 0,401]	< 0,0001
CD4			
> 29 *vs* < ou = 29	0,524	[0,274 - 1,004]	0,0516
TH9/CD4			
> 7% *vs* < ou = 7%	0,244	[0,108 - 0,554]	0,0007

e

Modèle de Cox multivarié			
Variable	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
TH9			
> 2 *vs* < ou = 2	0,161	[0,066 ; 0,393]	< 0,0001
pT			
> 1 *vs* 1	1,469	[0,743 ; 2,902]	0,2690
pN			
N+ *vs* N-	1,424	[0,670 ; 3,026]	0,3577
Profil moléculaire			
HER2+ *vs* luminal	0,640	[0,274 ; 1,494]	0,3025
TN *vs* luminal	2,340	[1,069 ; 5,123]	0,0335
Age			
> 56 ans *vs* < ou = 56 ans	3,191	[1,518 ; 6,705]	0,0022
SBR			
III *vs* I et II	1,423	[0,716 ; 2,829]	0,3139

a, b, c) Courbes de Kaplan-Meier de survie globale des patientes en fonction de la faible ou forte densité de Th9 **(a)**, de la faible ou forte densité de T CD4$^+$ **(b)** et du rapport Th9/CD4 **(c)**, *N* = 301 patientes. Les p-value ont été calculées en utilisant le test statistique de log-rank. **d, e)** Résultats statistiques des Cox univariés **(d)** réalisés en fonction de différentes variables et des Cox multivariés incorporant la variable « densité en Th9 » **(e)** avec pour chaque analyse, le HR, l'IC 95% et la p-value pour chaque variable

- Impact pronostique des lymphocytes Th9 en fonction du sous-type moléculaire du cancer du sein

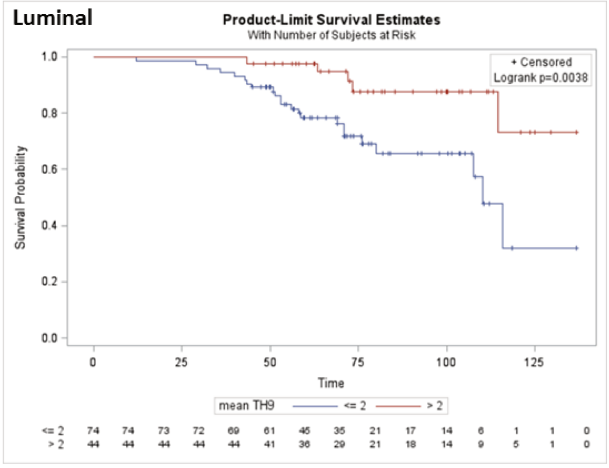
Nous avons enfin voulu étudier, à titre exploratoire, le rôle des lymphocytes Th9 en fonction du sous-type moléculaire du cancer du sein. Nous avons donc analysé l'impact pronostique des lymphocytes Th9 en fonction du sous-type du cancer du sein. En ce qui concerne le sous-type Luminal, la forte densité de Th9 intra-tumoraux est significativement associée à une meilleure survie sans récidive (p = 0,0069 ; H.R : 0,261 ; IC 95% : [0,098-0,692]) (Figure 7a) et à une meilleure survie globale (p = 0,0162 ; H.R : 0,162) des patientes. En analyse multivariée, l'infiltration en Th9 est même le seul paramètre avec la taille tumorale à rester indépendamment associé à la survie sans récidive, et le seul à rester associé à la survie globale (Figure 7a).

L'analyse du sous-type HER2 montre que la forte infiltration tumorale en lymphocytes Th9 est également significativement associée à une meilleure survie sans rechute (p = 0,0073 ; H.R : 0,181 ; IC 95% : [0,052-0,630]) (Figure 7b), y compris en analyse multivariée (p = 0,0066) (Figure 7b) mais ce n'est pas le cas en ce qui concerne la survie globale (p = 0,0858 ; H.R = 0,252).

Enfin, l'étude dans le sous-type triple-négatif montre un fort impact pronostique puisqu'une forte densité de Th9 intra-tumoraux est significativement associée à une meilleure survie sans récidive (p = 0,0002 ; H.R : 0,058 ; IC 95% : [0,013-0,257]) (Figure 7c) et à une meilleure survie globale (p = 0,001 ; H.R : 0,081) des patientes en analyse univariée, mais également en analyse multivariée (p = 0,0005) (Figure 7c), avec un pronostic particulièrement bon pour les patientes avec une forte densité en Th9 (seulement 2 rechutes).

Figure 7. Étude du rôle pronostique des lymphocytes Th9 en fonction du sous-type moléculaire sur la survie sans récidive des patientes

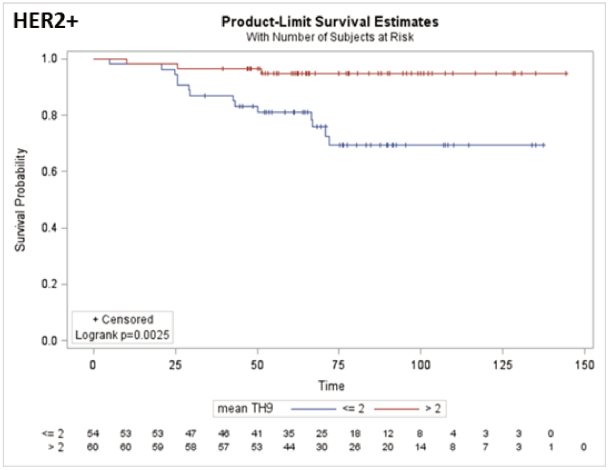
a **Luminal**



Modèle de Cox univarié			
TH9	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
> 2 *vs* < ou = 2	0,261	[0,098 ; 0,692]	0,0069

Modèle de Cox multivarié			
Variable	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
TH9			
> 2 *vs* < ou = 2	0,261	[0,097 ; 0,698]	0,0074
pT			
>1 *vs* 1	2,488	[1,011 ; 6,122]	0,0473
pN			
N+ *vs* N-	2,591	[0,604 ; 11,108]	0,1998
Age			
> 56 ans *vs* < ou = 56 ans	1,118	[0,509 ; 2,456]	0,7804
SBR			
III *vs* I et II	1,491	[0,695 ; 3,202]	0,3054

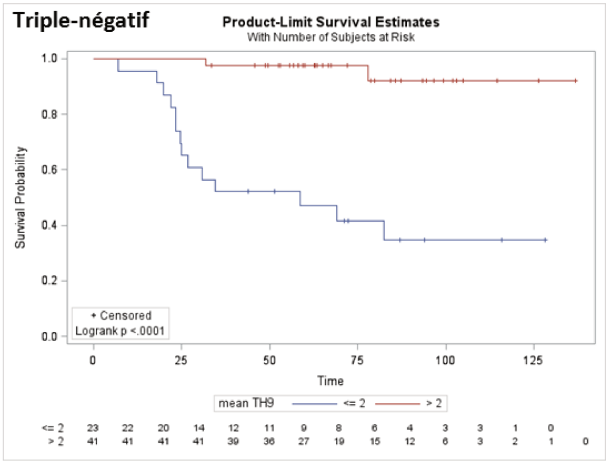
b **HER2+**



Modèle de Cox univarié			
TH9	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
> 2 *vs* < ou = 2	0,181	[0,052 ; 0,630]	0,0073

Modèle de Cox multivarié			
Variable	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
TH9			
> 2 *vs* < ou = 2	0,175	[0,050 ; 0,616]	0,0066
pT			
>1 *vs* 1	0,680	[0,215 ; 2,157]	0,3790
pN			
N+ *vs* N-	2,006	[0,689 ; 5,839]	0,2702
Age			
> 56 ans *vs* < ou = 56 ans	0,939	[0,356 ; 2,472]	0,898
SBR			
III *vs* I et II	1,920	[0,643 ; 5,732]	0,2421

c **Triple-négatif**



Modèle de Cox univarié			
TH9	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
> 2 *vs* < ou = 2	0,058	[0,013 ; 0,257]	0,0002

Modèle de Cox multivarié			
Variable	**HR**	**IC 95%**	**p-value**
TH9			
> 2 *vs* < ou = 2	0,067	[0,014 ; 0,309]	0,0005
pT			
>1 *vs* 1	2,589	[0,834 ; 8,038]	0,0999
pN			
N+ *vs* N-	1,833	[0,621 ; 5,409]	0,2724
Age			
> 56 ans *vs* < ou = 56 ans	3,776	[0,957 ; 14,899]	0,0578
SBR			
III *vs* I et II	2,671	[0,698 ; 10,227]	0,1514

a, b, c) Courbes de Kaplan-Meier de survie sans récidive des patientes en fonction de la densité de Th9 dans le sous-type Luminal **(a)**, dans le sous-type HER2+++ **(b)** et dans le sous-type triple-négatif **(c)**, *N* = 301 patientes. Les p-value ont été calculées en utilisant le test statistique de log-rank et des Cox univariés et multivariés ont été réalisés en fonction de différentes variables avec pour chacune, le HR, l'IC 95% et la p-value.

d) Discussion des résultats

Nous avons, dans un premier temps, mis en évidence *in vitro*, la différenciation des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs en lymphocytes Th9, caractérisés par l'expression des facteurs de transcription PU.1 et IRF4 ainsi que par la sécrétion importante d'IL-9. À la différence du phénotype murin, l'IFNα, et non l'IL-1β, augmente les propriétés effectrices des cellules Th9 humaines *via* l'expression d'IRF1. L'IFNα favorise ainsi l'augmentation de la sécrétion d'IL-9 et la sécrétion d'IL-21 par les lymphocytes Th9 humains.

Les résultats obtenus à partir du double marquage immunohistochimique CD4/PU.1 semblent démontrer un rôle pronostique favorable de l'infiltration en lymphocytes Th9 dans les cancers du sein. Par rapport à l'infiltration en lymphocytes T $CD4^+$ totaux, il est important de noter qu'il n'existe pas une corrélation absolue entre l'infiltration en CD4 totaux et en Th9 dans notre série, et que en termes de discrimination pronostique, l'infiltration en lymphocytes Th9, ou le ratio Th9/CD4 semble mieux rendre compte du pronostic que l'infiltration en CD4 totaux.

L'importance d'une infiltration tumorale en TILs est dorénavant admise et nous confirmons ainsi l'impact pronostique positif d'une infiltration tumorale en lymphocytes T $CD4^+$. Toutefois, l'importance pronostique des TILs dans les cancers du sein est plus particulièrement retrouvée dans les sous-types agressifs, que sont les sous-types HER2+ et triple-négatif. Il nous a donc paru important d'étudier le rôle pronostique des lymphocytes Th9 en fonction du sous-type moléculaire des cancers du sein. On peut tout d'abord noter que les sous-types HER2+ et triple-négatif sont les sous-types les plus infiltrés par les lymphocytes Th9 comparativement au sous-type luminal, à l'instar de ce qui est déjà rapporté dans la littérature, notamment pour les cellules T $CD8^+$. Lorsque le rôle pronostique des lymphocytes Th9 est analysé en fonction du sous-type moléculaire, la forte densité de Th9 est significativement associée à une meilleure survie sans récidive que ce soit lorsque l'on étudie le sous-type luminal, le sous-type HER2+ et le sous-type triple-négatif. Les lymphocytes Th9 présentent donc un impact positif sur la survie des patientes quel que soit le sous-type moléculaire du cancer du sein, ce qui est assez singulier, notamment vis-à-vis du sous-type luminal. Cependant, il semble que l'impact pronostique des cellules Th9 sur la survie sans récidive des patientes soit plus important dans le sous-type triple-négatif.

e) Conclusion et perspectives

En ce qui concerne les expériences réalisées in vitro, nous avons pu montrer que l'IFNα pouvait augmenter les propriétés anti-tumorales des lymphocytes Th9 humains en favorisant une sécrétion plus importante d'IL-9 mais surtout en induisant une sécrétion d'IL-21 par ces cellules. Il

nous reste, cependant, à valider l'expression protéique des facteurs de transcription caractéristiques des lymphocytes Th9, à savoir PU.1 et IRF4, par Western Blot ou par marquage en cytométrie de flux pour confirmer la différenciation de ce sous-type lymphocytaire T $CD4^+$ chez l'Homme et valider également notre double marquage immunohistochimique.

L'étude du rôle pronostique des lymphocytes Th9 par immunohistochimie réalisée sur une cohorte de 301 patientes atteintes d'un cancer du sein a montré qu'une forte densité de lymphocytes Th9 infiltrant la tumeur était significativement associée à un meilleur pronostic des patientes en termes de survie sans récidive et de survie globale. Ce rôle positif sur le pronostic est également retrouvé quel que soit le sous-type moléculaire étudié mais laisse penser que l'impact pronostique de ces cellules est plus important dans le sous-type triple-négatif. Nous souhaitons valider ces résultats en isolant une signature transcriptomique Th9 (à partir de lymphocytes Th9 différenciés *in vitro* ou en utilisant une signature déjà existante (*gene set* GSE2770)) et étudier l'influence pronostique de cette signature Th9 à travers les données transcriptomiques publiques relatives à une grande série de cancers du sein localisés. Ce travail bio-informatique sera réalisé à l'aide d'approches de déconvolution et d'un outil d'estimation des proportions des différents sous-types de lymphocytes, mis au point dans notre équipe. Ceci permettrait d'appuyer les résultats obtenus sur notre cohorte et de confirmer sur un plus grand nombre de patientes le rôle pronostique des lymphocytes Th9 humains.

CONCLUSIONS et PERSPECTIVES

L'efficacité des chimiothérapies dans les cancers avancés n'est malheureusement que transitoire et dans la plupart des cas cette approche cytotoxique pure visant les cellules cancéreuses ne permet pas d'obtenir une rémission durable, se heurtant aux mécanismes adaptatifs de résistance cellulaire. Ce constat d'échec établi a donc permis d'orienter les recherches thérapeutiques en oncologie non plus seulement sur la cellule cancéreuse elle-même, mais aussi sur la caractérisation du microenvironnement tumoral et son ciblage thérapeutique (néoangiogenèse, immunothérapies, *etc.*). Notre équipe de recherche s'intéresse depuis ses débuts à la polarisation T $CD4^+$ et aux rôles de ces cellules dans la progression tumorale. C'est dans cet environnement scientifique que nous avons été amené à étudier, d'abord dans des modèles précliniques, puis chez des patients atteints de cancer, les fonctions biologiques et les rôles pronostiques de populations lymphocytaires T $CD4^+$ jusqu'à présent rarement étudiées dans un contexte tumoral chez l'Homme (les lymphocytes Th17 et Th9).

1. Le système immunitaire : une reconnaissance seulement récente d'un rôle dans le cancer :

Des observations épidémiologiques chez des patients immunodéprimés avaient, dès les années 80, déjà attiré l'attention sur le rôle potentiel protecteur du système immunitaire sur la survenue des cancers, en particulier sur le développement de cancers viro-induits comme le sarcome de Kaposi (Pape et al., 1983; Schreiber and Podack, 2009). De la même façon, les patients transplantés, qui reçoivent des thérapies immunosuppressives pour tenter d'éviter le rejet de greffe, ont également un risque plus élevé de développer des tumeurs solides, telles que des tumeurs colorectales (Curtis et al., 1997) ou mammaires (Kasiske et al., 2004) par exemple, suggérant ainsi la place importante que tient le système immunitaire dans l'apparition et le développement des cancers. Tous ces arguments cliniques, certes indirects, plaident donc néanmoins pour penser que les concepts d'immunosurveillance et d'immunoédition (démontrés expérimentalement dans des modèles animaux), sont également valides chez l'Homme.

À côté de ce rôle dans la survenue ou non d'un cancer, de nombreuses études ont donc également montré l'influence pronostique des stigmates de réponse immunitaire anti-tumorale compromise ou non, une fois le diagnostic de cancer posé. C'est ainsi que la lymphopénie et son pronostic défavorable dans la progression tumorale (Ray-Coquard et al., 2009) et la diminution de cellules sécrétrices d'IFNγ, sont reliés à un moins bon pronostic clinique dans de nombreux cancers, tout comme la présence importante chez l'hôte de cellules de l'immunité favorisant la progression

tumorale, comme les lymphocytes T régulateurs ou les cellules myéloïdes suppressives (Gabitass et al., 2011).

Nous avons ainsi montré, à l'instar d'autres travaux, qu'au niveau périphérique, les patients atteints d'un cancer métastatique présentaient une augmentation de la proportion de MDSC granulocytaires (gMDSC), de lymphocytes Th17 et Treg tandis que le taux de lymphocytes Th1 diminue, comparativement à des volontaires sains (Limagne et al., 2016). Le taux initial en gMDSC est de plus associé à un moins bon pronostic clinique des patients (voir article en annexe 1).

Ainsi, la situation immunitaire biologique d'un patient atteint de cancer apparait cauchemardesque pour l'immunothérapeute : le fait même que le cancer puisse être décelable signifie donc que les populations cellulaires tumorales ayant réussi à émerger sont « invisibles » pour le système immunitaire du patient, système immunitaire qui est par ailleurs plus ou moins profondément détourné au profit de la progression tumorale *via* ces populations immunosuppressives ou immunorégulatrices.

Néanmoins le démembrement biologique progressif des anomalies de la réponse immune lors de la progression tumorale, et les récents succès cliniques des immunothérapies de nouvelle génération montrent que le combat n'est pas perdu d'avance, et qu'il semble possible, au moins en partie, de contourner les mécanismes d'échappement pour restaurer une immunité efficace vis-à-vis de la tumeur.

Ces récentes améliorations des connaissances, ont également permis de revisiter le rôle potentiel du système immunitaire dans des variétés tumorales considérées comme « non immunogéniques » comme le cancer du sein. Aux aspects de signes d'immunosuppression/ immunosubversion périphérique (lymphopénie et augmentation du nombre de lymphocytes Treg ou de MDSC circulants entre autre) sont venus s'ajouter depuis le début des années 2010, les très nombreuses études tissulaires ayant montré le rôle pronostique très fort des lymphocytes infiltrant les tumeurs du sein (TILs).

2. Les TILs : Une dimension pronostique considérable dans les cancers

L'importance de la quantité et de la qualité de l'infiltrat immunologique a été soulevée dans les cancers du côlon dès le début des années 2000 par l'équipe de J. Galon (Galon et al., 2006). Quel que soit le type de tumeur, il est désormais admis que la présence d'une forte densité en TILs au site tumoral est en général associée au meilleur pronostic des patients soulignant donc l'importance de l'évaluation de la d'une réponse immunitaire anti-tumorale *in situ* (Becht et al., 2016).

L'amélioration des techniques d'analyse tissulaires, ainsi que le recours à des techniques de biologie moléculaire haut débit (transcriptomique notamment) a ensuite permis d'étudier plus précisément la composition de l'infiltration lymphocytaire au sein des cancers, en révélant que l'orientation fonctionnelle et la localisation des TILs avaient également un fort impact sur le pronostic des patientes. Ainsi, une infiltration en lymphocytes T $CD8^+$ est donc corrélée à une meilleure survie des patients dans la plupart des tumeurs solides (Fridman et al., 2014). À l'inverse, les populations régulatrices, comme les lymphocytes T régulateurs infiltrant les tumeurs sont le plus souvent associés à un moins bon pronostic clinique des patients. Dès lors, l'étude de l'infiltration immune tumorale s'est retrouvée au centre des attentions des immunologistes du cancer, et de nombreuses équipes de recherche sont actuellement engagées sur le démembrement biologique de la réponse immunitaire et son impact pronostique chez des patients atteints de cancer.

Notre recherche s'inscrit donc complètement dans ce démembrement progressif des rôles biologiques respectifs des différentes populations cellulaires impliquées dans la réponse anti-tumorale, en particulier les différents types de lymphocytes T $CD4^+$, ainsi que les mécanismes immunosuppresseurs ou anti-tumoraux inhérents à leur fonction. C'est dans ce contexte que nous avons étudié deux sous-types lymphocytaires T $CD4^+$, les lymphocytes Th17 et Th9, dans le cadre des cancers du sein. Les lymphocytes Th17 constituent une population importante à étudier puisque, jusqu'à présent, aucune donnée de la littérature n'a mis en évidence le rôle pronostique de ces cellules dans les tumeurs mammaires. Nous avons ainsi montré que l'accumulation de lymphocytes Th17 dans le tissu tumoral mammaire est associée à un mauvais pronostic clinique et qu'une forte infiltration de ces cellules contrecarre le bénéfice d'une infiltration importante en cellules T $CD8^+$ (Thibaudin et al., 2016). L'expression intra-tumorale de la chémokine CCL20, ligand du récepteur CCR6 exprimé par les cellules Th17 favorise leur migration depuis la circulation et les organes lymphoïdes au site tumoral. Une fois dans la tumeur, la présence d'IL-6 et de TGF-β, cytokines du microenvironnement tumoral, est responsable de modifications phénotypiques et fonctionnelles notamment en induisant l'expression de deux enzymes : CD39 et CD73, déjà décrites pour être exprimées par les lymphocytes Treg et responsables de leur activité immunosuppressive (Deaglio et al., 2007). Les ectonucléotidases vont alors permettre la transformation de l'ATP en adénosine, molécule immunosuppressive, qui va inhiber la réponse cytotoxique établie par les lymphocytes Th1 et T $CD8^+$ en inhibant la production de TNFα et d'IFNγ (Thibaudin et al., 2016). Ce phénotype immunosuppresseur Th17 favorise ainsi la progression tumorale des cancers du sein.

Par ailleurs, nous avons eu un grand intérêt à étudier un autre sous-type T $CD4^+$ découvert en 2008, les lymphocytes Th9. Les travaux précliniques princeps en contexte tumoral réalisés chez la souris par notre équipe ont initialement permis de démontrer que les cellules Th9 pouvaient

présenter des fonctions anti-tumorales dans plusieurs modèles de cancer (Vegran et al., 2014). Nous avons donc voulu déterminer si les lymphocytes Th9 infiltrant les tumeurs du sein pouvaient jouer un rôle pronostique. Outre des différences biologiques en termes de cytokines clés pour induire leur polarisation, par rapport au modèle murin, nous avons ainsi montré qu'une forte densité de lymphocytes Th9 est associée avec une meilleure survie globale et survie sans récidive des patientes atteintes de cancer du sein et que plus le rapport Th9/CD4 totaux est élevé, c'est-à-dire plus la proportion de Th9 parmi les lymphocytes T $CD4^+$ infiltrants est importante, meilleur est le pronostic des patientes en termes de survie sans récidive (Thibaudin et al., article en préparation). Il nous a également paru important d'analyser l'impact pronostique de ces cellules en fonction du sous-type moléculaire du cancer du sein. Nous avons ainsi montré que quel que soit le sous-type moléculaire (luminal, HER2+ ou triple-négatif), la forte densité de lymphocytes Th9 au site tumoral est associée à une meilleure survie sans récidive des patientes, ce qui est relativement original, notamment vis-à-vis des formes luminales, dans lesquelles le rôle des TILs pris de façon globale est très incertain. Toutefois, l'impact pronostique des Th9 reste le plus important dans le sous-type triple-négatif.

L'étude de ces deux sous-types T helper dans le cancer du sein nous a permis :

1) De mettre en lumière l'importance d'une évaluation fine des différentes populations de TILs, au-delà d'une évaluation globale en HES, même si, au jour d'aujourd'hui, rien ne permet d'affirmer formellement qu'une approche « démembrée » des différentes populations de TILs soit plus performante qu'une évaluation générale de leur densité (indépendamment des différents sous-types) pour la stratification pronostique des patientes atteintes d'un cancer du sein. Néanmoins, nos différents travaux soulignent bien la complexité fonctionnelle et pronostique du microenvironnement immunitaire des cancers du sein.

2) De souligner la complémentarité des approches précliniques et translationnelles au sein de la même équipe de recherche, pour la mise en évidence de nouvelles cibles, et de nouveaux biomarqueurs du microenvironnement immunitaire des cancers. C'est en effet, pour chacun de nos travaux de recherche, des résultats initiaux dans des modèles murins obtenus au laboratoire, qui nous ont permis de vérifier la pertinence et le parallélisme des concepts Th17 et Th9 chez l'Homme après les avoir mis en évidence chez l'animal.

3. Manipulation thérapeutique éventuelle des TILs comme stratégie thérapeutique

Les stratégies d'immunothérapie menées jusqu'à présent dans le cancer du sein (cytokines, vaccination à l'aide de peptides tumoraux, *etc.*) permettent en général de voir apparaitre une réponse T cytotoxique ainsi qu'une réponse humorale, mais malheureusement rarement accompagnées de signes de régression tumorale objective. Une immunosuppression trop importante au site tumoral, une immunosélection progressive faisant émerger des clones tumoraux ayant perdu l'expression de l'antigène ou la variabilité du degré d'expression antigénique d'un site tumoral à l'autre, voire au sein d'une même localisation tumorale, constituent certainement des hypothèses plausibles pour expliquer 30 ans d'échec de l'immunothérapie dans le cancer, en particulier du sein.

Mais l'immunothérapie en cancérologie a été incontestablement relancée depuis les 3 dernières années avec l'essor des anticorps monoclonaux ciblant les points de contrôles de la réponse immunitaire (anticorps anti-CTLA-4, anti-PD-1 ou anti-PD-L1), avec des progrès cliniques majeurs pour le traitement des mélanomes, des cancers bronchiques, de la vessie et du rein notamment. Malgré ces premiers succès, de nombreuses questions restent en suspens, notamment quant à l'identification précoce des patients susceptibles de tirer un bénéfice de ces nouveaux traitements, ou à la compréhension des mécanismes de résistance primaire ou secondaire à ces inhibiteurs de checkpoints de la réponse immunitaire. Le monde de l'immunothérapie des cancers s'est donc lancé dans une recherche acharnée de biomarqueurs prédictifs, au-delà de ceux mis en lumière ces dernières années (expression tumorale et/ou microenvironnementale de PD-L1), charge mutationnelle tumorale, infiltration tumorale par les lymphocytes T $CD8^+$, *etc.*) qui restent imparfaits et/ou difficiles à mettre en œuvre en routine.

Dans le cancer du sein, à ce jour, les premiers résultats cliniques des immunothérapies de nouvelle génération sont certes encourageants, mais un peu décevants par rapport à d'autres variétés tumorales. De façon non surprenante, les résultats les plus aboutis ont été obtenus dans les cancers du sein triple-négatifs (Nanda et al., 2016), qui sont les plus infiltrés en TILs, ceux qui expriment le plus PD-L1 (corrélation logique avec la présence d'une forte densité en TILs), et ceux dont l'instabilité génomique rend compte d'une plus forte charge mutationnelle (Luen et al., 2016). Cependant, une faible fraction des patientes (certes à un stade avancé de la maladie) sont répondeuses et, là encore, la complexité de la réponse immunitaire face au cancer rend difficile la mise en évidence de biomarqueurs prédictifs fiables à eux seuls. Il est donc probable que les cliniciens doivent recourir dans les années à venir, plutôt à un panel de biomarqueurs

immunologiques, au sein desquels les TILs, mais aussi peut être la balance entre TILs favorables et défavorables à une réponse immunitaire anti-tumorale, devraient jouer un rôle majeur.

Notre travail sur l'impact négatif de l'infiltration tumorale des lymphocytes Th17 sur le pronostic des patientes atteintes de cancer du sein soulève de nouvelles possibilités de stratégies de manipulation du système immunitaire à visée thérapeutique. Ainsi, inhiber les fonctions suppressives des lymphocytes Th17 en bloquant les ectonucléotidases avec un anticorps permettrait de restaurer une réponse immunitaire cytotoxique dépendante des lymphocytes Th1 et T $CD8^+$. La meilleure cible est l'enzyme CD39 puisque c'est elle qui transforme l'ATP ou APD extracellulaire en AMP et cette réaction est indispensable à l'obtention d'adénosine *via* l'enzyme CD73. Par ailleurs, les ectonucléotidases sont exprimées par d'autres cellules immunosuppressives telles que les lymphocytes T régulateurs ou les cellules myéloïdes (Ghiringhelli et al., 2012), ainsi le blocage de ces enzymes permettrait d'inhiber l'immunosuppression établie par le biais de CD39 et CD73 au sein de la tumeur. Un anticorps anti-CD39, le BY40, est actuellement en cours de développement préclinique pour diminuer l'immunosuppression présente au site tumoral laissant présager l'arrivée de cette nouvelle possibilité thérapeutique.

Inhiber les fonctions immunorégulatrices dépendantes des ectonucléotidases des lymphocytes Th17 constitue une cible potentielle mais les Th17 sont également une cible thérapeutique de choix. Limiter la polarisation Th17 permettrait ainsi d'inhiber entièrement les mécanismes d'immunosuppression établis par cette population lymphocytaire *in situ*. C'est avec cet objectif thérapeutique que nous avons étudié l'activation de l'histone désacétylase SIRT1 par des agents pharmacologiques sur la différenciation Th17. Nous avons ainsi mis en évidence que l'activation de SIRT1 inhibe spécifiquement la différenciation Th17 *in vitro* à la fois chez la souris et chez l'Homme (diminution de la sécrétion d'IL-17A et diminution de l'expression de RORγt). L'effet biologique observé est dépendant de SIRT1 en utilisant un inhibiteur spécifique, l'EX-527, ou en utilisant des souris déficientes pour SIRT1 uniquement au sein des lymphocytes T $CD4^+$. Les données obtenues à partir des analyses *ex vivo* sur des prélèvements sanguins de donneurs sains, nous ont alors poussés à explorer l'effet d'une prise de metformine sur les lymphocytes Th17 chez des patients atteints d'un cancer avancé, nous permettant ainsi de constater une diminution du nombre de cellules IL-17A+ parmi les cellules CD4+ RORγt+ qui indique une perte de fonctionnalité biologique des Th17 chez ces patients. Bien que la metformine ne soit pas une molécule anti-cancéreuse à proprement parlé, elle montre néanmoins une capacité à retarder les phénomènes de cancérogenèse digestive chez les patients diabétiques, et nos travaux montrent de nouveaux effets immunologiques de cette molécule. Ceci ouvre donc la possibilité d'associer la metformine aux

agents anti-cancéreux utilisés pour le traitement des cancers dans lesquels les lymphocytes Th17 ont un rôle pronostique péjoratif.

Enfin, limiter les actions pro-tumorales des populations lymphocytaires immunosuppressives pourrait être remplacé voire combiné avec des stratégies permettant l'augmentation des propriétés effectrices des cellules anti-tumorales. La mise en évidence chez la souris des importantes fonctions anti-tumorales des lymphocytes Th9 nous a donc poussés à étudier cette population lymphocytaire chez l'Homme (Vegran et al., 2014). Nous avons mis en évidence que l'IFNα augmente la sécrétion d'IL-9 par les cellules Th9 comme cela a déjà été montré par l'équipe de P.J. Utz (Wong et al., 2010). Cette cytokine induit également la sécrétion d'IL-21 *via* l'activation d'IRF1 dans ces cellules, cytokine qui possède une grande capacité à induire une réponse cytotoxique et qui soutient la maturation des cellules B (Zeng et al., 2007). Il serait donc intéressant d'analyser si le phénotype Th9 induit en présence d'IFNα joue un rôle pronostique plus important que les lymphocytes Th9 dans les cancers du sein. L'IFNα est une cytokine sécrétée par des cellules de l'immunité innée telles que les cellules dendritiques et il parait important d'étudier l'impact de cette cytokine sur des Th9 infiltrant des tumeurs mammaires. Il est envisageable que les lymphocytes Th9 migrent au site tumoral et qu'au contact de l'IFNα relargué dans le microenvironnement tumoral acquièrent des propriétés effectrices plus importantes. Ces hypothèses pourraient donc laisser penser que *via* l'injection d'IFNα au niveau tumoral, les capacités anti-tumorales des lymphocytes Th9 présents *in situ* pourraient être décuplées. Ceci pourrait laisser entrevoir une stratégie thérapeutique visant à stimuler une réponse immunitaire anti-cancéreuse directement en intra-tumoral.

Nos travaux apportent donc des arguments supplémentaires, et de nouvelles pierres à l'édifice du décryptage de la réponse immunitaire anti-tumorale dans les cancers du sein à travers les sous-populations Th17 et Th9. Les résultats exposés dans ce travail ouvrent des perspectives potentielles de ciblage thérapeutique, et d'associations thérapeutiques à visée immunomodulatrice, différentes (mais peut être complémentaires !!) des immunothérapies actuelles ciblant les checkpoints de la réponse immunitaire. Enfin, ils identifient parmi les TILs de nouvelles sous-populations ayant potentiellement un intérêt pour la stratification pronostique des patientes atteintes d'un cancer du sein.

ANNEXES

ANNEXE 1

« Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen »

Cancer Research

Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX–Bevacizumab Drug Treatment Regimen

Emeric Limagne[1,2,3,4], Romain Euvrard[1,2], Marion Thibaudin[1,2], Cédric Rébé[1,2,3,4], Valentin Derangère[1,2,3,4], Angélique Chevriaux[1,2,3,4], Romain Boidot[1,2,3,4], Frédérique Végran[1,2,3,4], Nathalie Bonnefoy[5,6,7], Julie Vincent[3], Leila Bengrine-Lefevre[3], Sylvain Ladoire[1,2,3,4], Dominique Delmas[1,2], Lionel Apetoh[1,2,3], and François Ghiringhelli[1,2,3,4]

Abstract

Host immunity controls the development of colorectal cancer, and chemotherapy used to treat colorectal cancer is likely to recruit the host immune system at some level. Athough preclinical studies have argued that colorectal cancer drugs, such as 5-fluorouracil (5-FU) and oxaliplatin, exert such effects, their combination as employed in the oncology clinic has not been evaluated. Here, we report the results of prospective immunomonitoring of 25 metastatic colorectal cancer (mCRC) patients treated with a first-line combination regimen of 5-FU, oxaliplatin, and bevacizumab (FOLFOX–bevacizumab), as compared with 20 healthy volunteers. Before this therapy was initiated, T regulatory cells (Treg), Th17, and granulocytic myeloid-derived suppressor cells (gMDSC) were increased significantly in mCRC, but only a high level of gMDSC was associated with a poor prognosis. Chemotherapy modulated the Treg/Th17 balance by decreasing Treg and increasing Th17 cell frequency by 15 days after the start of treatment. Increased Th17 frequency was associated with a poor prognosis. FOLFOX–bevacizumab treatment elicited a decrease in gMDSC in 15 of 25 patients and was associated with a better survival outcome. Notably, the gMDSCs that expressed high levels of PD-L1, CD39, and CD73 exerted a robust immunosuppressive activity, relative to other myeloid cells present in blood, which could be reversed by blocking the CD39/CD73 and PD-1/PD-L1 axes. Our work underscores the critical prognostic impact of early modifications in Th17 and gMDSC frequency in mCRC. Furthermore, it provides a clinical rationale to combine FOLFOX–bevacizumab chemotherapy with inhibitors of ATP ectonucleotidases and/or anti-PD-1/PD-L1 antibodies to more effectively treat this disease. *Cancer Res; 76(18); 5241–52. ©2016 AACR.*

Introduction

Colorectal cancer is the fourth most commonly diagnosed cancer worldwide and is a major cause of cancer-related deaths. Numerous studies have demonstrated a link between chronic inflammation and many cancers, including colorectal cancer. For example, inflammatory bowel disease is associated with increased incidence of colorectal cancer (1). Colorectal cancer is controlled by the immune system: Accumulating evidence shows that T-cell infiltration of primary tumors is associated with better prognosis (2, 3). Similar findings were also observed in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC; ref. 4). In particular, infiltration with memory CD8 T cells, follicular helper T cells, or regulatory T cells (Treg) is associated with better tumor prognosis in colorectal cancer (5–7). However, infiltration with Th17 cells is associated with poor prognosis (8) due to the secretion of proinflammatory cytokines like IL17A, which can promote angiogenesis or other protumor effects (9).

Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) are a heterogeneous population composed of myeloid cells blocked at several stages of differentiation. These cells were observed to accumulate in the blood, lymph nodes, bone marrow, and tumor sites of tumor-bearing patients and in experimental animal models of cancer (10, 11). These cells are characterized by their ability to inhibit both innate and adaptive immune responses, thus having a negative effect on antitumor immunity (12). In humans, MDSCs are not well characterized, partially because no unified markers are currently available for these cells. However, these cells typically express the common myeloid markers, CD33 and CD11b, but lack markers of mature myeloid cells, such as HLA-DR. Among human MDSCs, the monocytic subset comprises $CD14^+$ cells, and

[1]INSERM, U866, Dijon, France. [2]UFR des Sciences de Santé, Université de Bourgogne-Franche Comté, Dijon, France. [3]Centre Georges François Leclerc, Dijon, France. [4]Plateforme de Transfert en Biologie Cancérologique, CGFL, Dijon, France. [5]Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, Montpellier, France. [6]INSERM U1194, Université de Montpellier, Montpellier, France. [7]OREGA Biotech, Ecully, France.

Note: Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (http://cancerres.aacrjournals.org/).

E. Limagne and R. Euvrard share first authorship of this article.

L. Apetoh and F. Ghiringhelli share senior authorship of this article.

Corresponding Authors: Emeric Limagne, Centre Georges-François Leclerc, 1 rue du Pr Marion, Dijon 21000, France. Phone: 038-039-3383; Fax: 038-039-3434; E-mail: elimagne@cgfl.fr; and François Ghiringhelli, fghiringhelli@cgfl.fr

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-3164

©2016 American Association for Cancer Research.

the granulocytic subset comprises $CD15^+$ cells (13, 14). We previously reported that 5-fluorouracil (5-FU) could induce MDSC depletion in mouse models of cancer (15) but enhance Th17 cell accumulation (15, 16).

Currently, mCRC patients are frequently treated in front line with a combination of chemotherapies, which associates 5-FU with either oxaliplatin (FOLFOX) or irinotecan (FOLFIRI). In addition to the chemotherapeutic regimens, patients are often treated with biotherapies, such as antiangiogenic agents like the anti-VEGF mAb bevacizumab or anti-EGFR mAb. The effect of such combination chemotherapies on peripheral immune responses is currently poorly explored. In addition, the prognostic value of initial immune parameters and their putative alteration by chemotherapy is also unknown.

In this work, we have first compared blood repartition of memory T-helper cells and MDSC [granulocytic MDSC (gMDSC) and monocytiic MDSC (mMDSC)] subsets in 20 healthy volunteers versus 25 consecutive mCRCs treated with FOLFOX plus bevacizumab combination as first line and tested the association of immune parameters with patients' outcome.

Patients and Methods

Patients and healthy donors

Between January 2014 and October 2014, we collected whole blood from healthy volunteers ($n = 20$) and mCRC patients ($n = 25$) at the Centre Georges François Leclerc (Dijon, France). mCRC patients were diagnosed in our cancer center and were proposed to be treated with FOLFOX plus bevacizumab as a first-line regimen. FOLFOX regimen was given every 14 days as follows: oxaliplatin (85 mg/m^2 over 2 hours), leucovorin (400 mg/m^2 over 2 hours), and 5-FU (400 mg/m^2 bolus, then 2,400 mg/m^2 over 46 hours). Bevacizumab was given at a dose of 5 mg/kg once every 2 weeks.

After 12 cycles or sooner in case of toxicity, responder patients received a maintenance treatment with bevacizumab, leucovorin (400 mg/m^2 over 2 hours), and 5-FU (400 mg/m^2 bolus, then 2,400 mg/m^2 over 46 hours every 2 weeks). All patients must have received at least four cycles of chemotherapy to be evaluable. Tumor response was prospectively assessed every four cycles according to RECIST criteria by CT scan (17). Treatment was repeated until the occurrence of disease progression or unacceptable toxicity, whichever occurred first.

Validation set

We added another study of immunomonitoring performed on 20 patients treated in Centre Georges François Leclerc for mCRC in second or third line by 5-FU–based chemotherapy plus bevacizumab combination.

All patients gave informed consent approved by the local Ethics Committee. The collection of blood sample is authorized by the French authorization (nr. AC2014-2460). No additional blood samples beyond those required for routine testing were taken. Whole blood of mCRC patients was sampled before (D0) and after chemotherapy (D15, D30, and D60) on EDTA-K2 tubes (BD Biosciences) for complete blood count, which was performed in our Clinical Biology Unit (Centre George François Leclerc) and on heparinized tube for leucocyte phenotyping. All analyses were performed following the first 6 hours after sampling. Review of pathology reports confirmed the diagnosis. Information regarding clinical, pathologic, and biological characters of patients and healthy volunteers is presented in Supplementary Table S1.

Flow cytometry

Antibodies and cytometry procedure. Anti-CXCR3-PE-Vio700 (REA232), anti-CCR6-PE (REA190), anti-CD25-APC (4E3), anti-CD45RA-APV-Vio770 (T6D11), anti-CD4-VioGreen (VIT4), anti-CD8-VioGreen (BW135/80), anti-CD33-APC-Vio770 (AC104.3E3), anti-HLA-DR-Vioblue (AC122), anti-CD15-Vio-Green (VIMC6), anti-CD14-PerCP-Vio700 (TUK4), anti-CD3-FITC (BW264/56), anti-CD56-FITC (REA136), anti-CD19-FITC (LT19), anti-CD20-FITC (LT20), anti-TNF-α–PE (REA656), and anti-Foxp3-PE (3G3) were purchased from Miltenyi Biotec. Anti-CCR4-BV450 (1G1), anti-PD-L1-APC (MIH1), anti-Ki-67-eFluor450 (20Raj1), and anti-PD-1-PerCP-eFluor710 (J105) were purchased from BD Biosciences and eBioscience, respectively. Anti-CD4-Alexa Fluor 700 (RPA-T4), anti-CD39-PE (A1), anti-CD73-Brillant Violet 421 (AD2), and anti-IL17A-Pacific Blue (BL168) were purchased from BioLegend. All events were acquired by a BD LSR-II cytometer equipped with BD FACSDiva software (BD Biosciences), and data were analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Leucocyte population identification and numeration. For leucocytes identification by flow cytometry, whole blood removed to heparinized tube (100 μL) was stained with different antibody cocktail for 45 minutes at room temperature. For MDSC identification, we used lineage cocktail (CD3, 56, 19, and 20), CD33, CD15, CD14, and HLA-DR antibody. For Treg analysis, we used CD4, CD45RA, CD25, and Foxp3 antibodies, and for other T-helper subsets, we used CD4, CD45RA, CD25, CCR6, CXCR3, and CCR4 antibodies. The gating strategy is described in Supplementary Fig. S1 and S2. After surface staining, 2 mL of red blood cells lysis solution (BD Biosciences) was added for 10 minutes, centrifuged (400 × *g*, 5 minutes), and then resuspended in flow cytometry buffer (eBioscience). Foxp3 staining was carried out according to the manufacturer's protocol using the fixation/permeabilization solution (eBioscience).

Suppression assays

To test MDSC subset suppressive activity, total $CD3^+$ lymphocytes and MDSC subsets were sorted from mCRC patient blood (around 15 mL). For gMDSC and granulocytes isolation (around 7.5 mL of blood), we used Whole Blood CD15 MicroBeads and column following the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). For mMDSC and monocytes isolation (around 7.5 mL of blood), we performed peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation on lymphocyte separation medium (Eurobio). $CD15^+$ cells and PBMCs were then stained with anti-CD33-APC-Vio770 (AC104.3E3), anti-HLA-DR-Vioblue (AC122), anti-CD15-VioGreen (VIMC6), anti-CD14-PerCP-Vio700 (TUK4), and anti-CD3-FITC (BW264/56) in flow cytometry buffer (eBioscience) for 30 minutes. Myeloid subsets (gMDSC, mMDSC, monocytes, and granulocytes) and total T cells were cell sorted on ARIA-III (BD Biosciences). $CD3^+$ cells were activated with 2 μg/mL anti-CD3 (Bio X Cell) and anti-CD28 (Bio X Cell) as effector cells and cocultured with or without gMDSC, mMDSC, granulocytes, or monocytes (T-cell/myeloid cell ratios are 10:1 or 25:1) for one week in culture medium (AIM V Medium, Fisher Scientific) in the presence of 2 μmol/L of ATP (Sigma). In some experiments, the CD39-neutralizing antibody

(OREGA Biotech, clone BY40, 10 μg/mL) and/or anti-PD-1 antibody (Nivolumab, 2 μg/mL) were added. In some experiments, TNFα and Ki67 expression was assessed in $CD3^+$ T cells by flow cytometry after 24 hours of coculture with or without MDSCs. This was performed in the presence of anti-CD3 (2 μg/mL, Bio X Cell) and anti-CD28 (2 μg/mL, Bio X Cell). Mouse IgG1 (11711, R&D Systems) and human IgG4 (ET904, eBioscience) antibodies were respectively used as a control for anti-CD39 and anti-PD-1 antibody efficacy.

Measurement of cytokines

After 5 days of culture, cell culture supernatants were assessed by ELISA for human TNFα (Biolegend) according to the manufacturer's protocol.

For intracellular cytokine staining, cells were stimulated for 4 hours at 37°C in culture medium containing PMA (50 ng/mL; Sigma-Aldrich), ionomycin (1 μg/mL; Sigma-Aldrich), and monensin (GolgiStop; 1 μL/mL; BD Biosciences). After staining for surface markers [anti-CD3-FITC (BW264/56)], cells were fixed and permeabilized according to the manufacturer's instructions (Fixation/Permeabilization Kit; eBiosciences), then stained for intracellular products. Antibodies used for intracellular staining were as follows: phycoerythrin (PE)-conjugated anti-TNFα or eFluor 450–conjugated anti-Ki67.

qRT-PCR

Total RNA from T cells was extracted with TRI Reagent (Ambion), reverse transcribed using M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen), and was analyzed by qRT-PCR with the SYBR Green method according to the manufacturer's instructions using the 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Expression was normalized to the expression of human *ACTB*. Primers designed to assess gene expression are as reported in Supplementary Table S2.

Statistical analyses

For the analysis of data, comparison of continuous data was achieved by the Mann–Whitney U test or Wilcoxon Test and comparison of categorical data by Fisher exact test, as appropriate. All P values are two tailed. $P < 0.05$ was considered significant. Data are represented as mean ± SEM. All patients were followed up until death or the end of data recording (May 30, 2015). Progression-free survival (PFS) was calculated from the date when therapy started to the date of disease progression, and overall survival was calculated from the date when therapy started to the date of death. Median follow-up with its 95% confidence interval (CI) was calculated using the reverse Kaplan–Meier method. Survival probabilities were estimated using the Kaplan–Meier method, and survival curves were compared using the log-rank test. Analyses were performed using MedCalc Software.

Determination of the required number of patients

We proposed to separate patients using median as a cutoff to have comparable number of patients in the two groups. The rate of PFS under FOLFOX–bevacizumab is about 60% at 6 months (18). We decided to only foster on clinically relevant biomarker that could separate a group of patients with 6 months PFS rate of 40% versus 80%. With a risk α of 5% and a power of 80%, we needed a minimum of 11 patients per group to detect a difference. For this reason, we decided to include 25 patients.

Results

Accumulation of Treg and Th17 and Th1 depletion in mCRC patients

We first analyzed the frequency of circulating immune cell populations from mCRC patients at baseline compared with healthy individuals. The clinical characteristics and blood parameters of patients and healthy volunteers are summarized in Supplementary Table S1 and Supplementary Fig. S3. To assess the frequency of memory T-cell subpopulations, we relied on their chemokine receptor expression using a gating strategy adapted from Mahnke and colleagues (19). The transcription factor Foxp3 occurred with a concomitant high expression of CD25, while Th1, Th2, Th17, and Th17/Th1 cells were analyzed on the basis of their expressions of CCR6, CXCR3, and CCR4 (Supplementary Fig. S1). To validate our gating strategy, we analyzed IFNγ and IL17A cytokine expressions in memory T-CD4 cells regarding chemokine receptor expression (Supplementary Fig. S4). The frequency of memory Th2 cells was comparable between healthy volunteers and mCRC patients while there was a small decrease in memory Th1 ($P = 0.035$) in mCRC (Fig. 1A). In contrast, we observed a significant increase in the number of Treg ($P < 0.0001$) and Th17 cells ($P = 0.019$) while inflammatory Th17 cells expressing the CXCR3 marker, and called Th17/Th1 in the article, did not accumulate in mCRC patients ($P = 0.071$) (Fig. 1A). We then studied the prognostic role of accumulation of Treg or Th17 cells. We separated patients into two groups using median as a cutoff, and we did not observe any association between Treg ($P = 0.68$) or Th17 ($P = 0.42$) accumulation and PFS during first-line chemotherapy and overall survival (Fig. 1B and C and not shown). Th1, Th2, and inflammatory Th17 cells were also not associated with prognosis (not shown). Together, these data show alterations in the frequency of memory T-helper populations in mCRC patients compared with healthy donors. However, these changes do not seem to affect tumor prognosis.

Effect of FOLFOX–bevacizumab regimen on subsets of memory CD4 T cells

Chemotherapy using 5-FU was shown to affect both MDSC levels and T-cell polarization (15, 16). Oxaliplatin was also shown to improve antitumor T-cell functions via a mechanism called immunogenic cell death (20). We observed that one cycle of chemotherapy did not significantly alter the number of circulating lymphocytes (Supplementary Fig. S5). T-helper frequencies (Th1, Th2, Treg, Th1/Th17, and Th17) were monitored at days 0, 15, 30, and 60 after chemotherapy. In the 25 mCRC patients, we did not observe any change in the frequency of Th1, Th2, and Th17/Th1. For Treg and Th17 cells, we observed only a respective decrease ($P = 0.013$) and increase ($P = 0.047$) frequency at day 15 that did not persist during follow-up (Fig. 2A). As a control, we could not detect significant modification of Treg and Th17 frequencies in untreated patients (data not shown). Importantly, when we focused on the impact of modifications of memory CD4 T-helper cell frequency on PFS, we observed a subset of patients whose Treg number is decreased 15 days after the first cycle of chemotherapy. This modulation is maintained during the whole follow-up (D30, $P = 0.021$; D60, $P = 0.013$). Nevertheless, Treg frequency modulation at day 15 was not associated with PFS ($P = 0.42$; Fig. 2B and C). Concerning Th17 cells' frequency modulation, we also observed a subset of patients whose Th17 percentage increased 15 days after the first cycle of chemotherapy. This increase is only

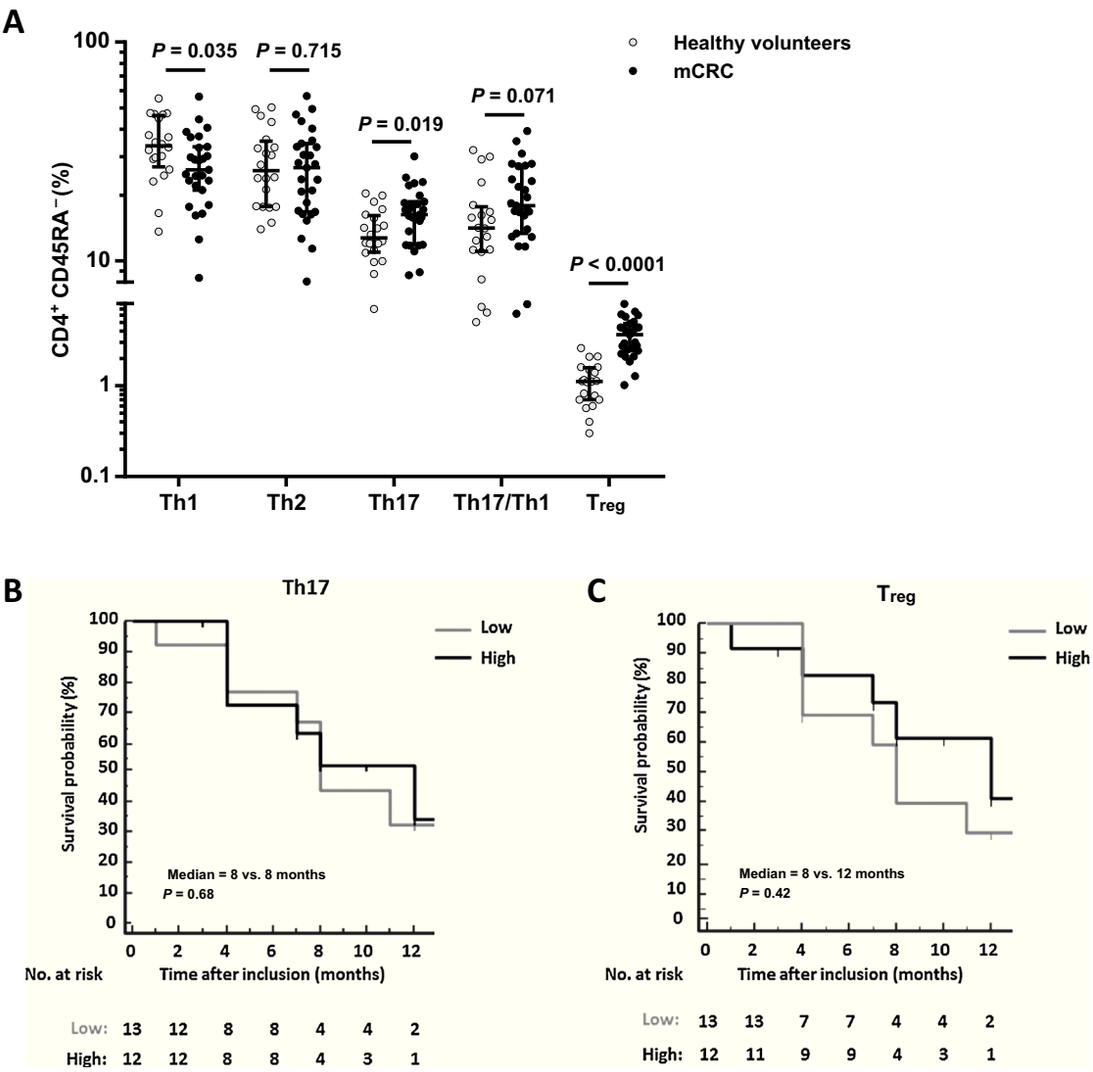


Figure 1.

Treg, Th17 accumulation, and Th1 depletion in mCRC patients. **A,** whole blood of healthy volunteers or mCRC patients was stained with anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CXCR3, anti-CCR4, anti-CD25, and anti-Foxp3 antibodies and analyzed by flow cytometry. The frequency of memory CD4 (CD45RA$^-$ CD4$^+$), Th1 (CCR6$^-$ CXCR3$^+$), Th2 (CCR6$^-$ CXCR3$^-$ CCR4$^+$), Th17 (CCR6$^+$ CXCR3$^-$), Th17/Th1 (CCR6$^+$ CXCR3$^+$), and Treg (CD25^{high} Foxp3$^+$) cells is depicted. The data presented constitute the analyses performed on 20 healthy volunteers and 25 mCRC patients. **B,** Kaplan–Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the presence of a high or low level of Th17 cells in blood (using median frequency as a cutoff). **C,** Kaplan–Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the presence of a high or low level of Treg cells in blood (using median frequency as a cutoff).

transitory. However, this increase in Th17 cell frequency at day 15 was associated with a poor PFS ($P = 0.048$; Fig. 2D and E). In the group of patients with increased Th17 frequency, we observed 46% of partial response after 3 months of treatment, while all patients presented a partial response upon RECIST criteria in the group of patients with a decrease of Th17 cell frequency ($P = 0.03$, Fisher exact test). We could observe similar prognostic role of Th17 frequency decrease after a cycle of 5-FU–based chemotherapy plus bevacizumab in a series of 20 metastatic colorectal cancer patients treated by this protocol in second or third line [median PFS of 7 months vs. 4 months for patients with decreased vs. increased Th17 frequency ($P = 0.04$; data not shown)]. Together, these results show that after the first cycle of chemotherapy, Treg frequency decreased to a normal level while Th17 frequency increased in some patients. Increased Th17 level is associated with poor prognosis and resistance to therapy.

Accumulation of MDSCs in mCRC patients

We also investigated the frequency of MDSCs using the Lin$^-$ CD33^{high} HLA-DR$^-$ cell labeling. Using CD14 and CD15 labeling, we separated the two types of MDSCs: gMDSCs, which express CD15 and CD14 marker; and mMDSCs, which express the CD14 marker only (Supplementary Fig. S2). To validate our gating strategy, we cell sorted from mCRC whole-blood CD15$^+$ cells using magnetic beads. These cells were then separated cells upon CD33 labeling and we observed that only CD15$^+$ CD33^{high}

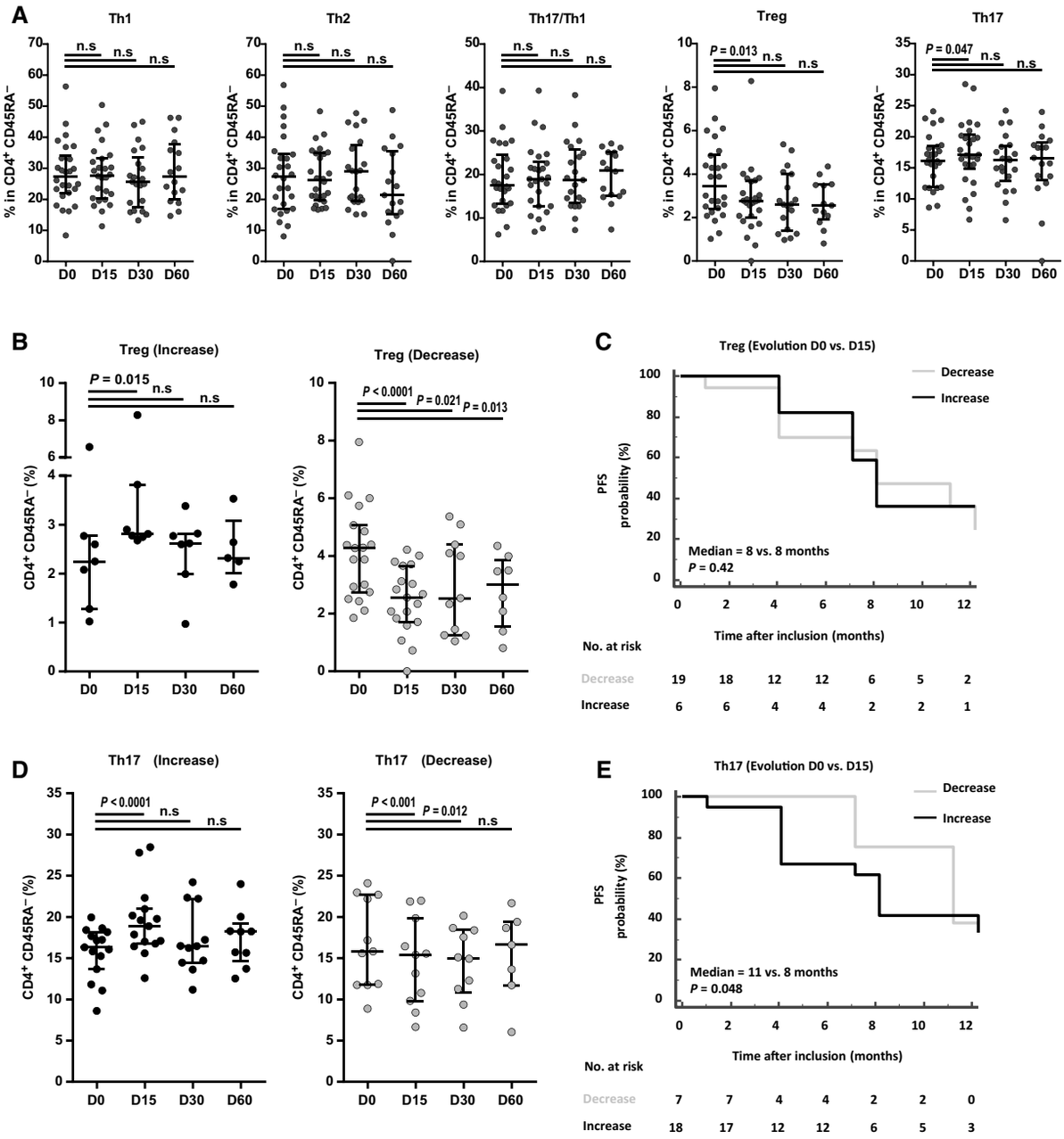


Figure 2.

Effect of FOLFOX–bevacizumab regimen on memory CD4 T-cell subsets. **A,** whole blood of mCRC patients was stained with anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CXCR3, anti-CCR4, anti-CD25, and anti-Foxp3 antibodies and was analyzed by flow cytometry before (D0) and after (D15, D30, and D60) first-line chemotherapy. Memory CD4 T-cell frequency is depicted as described in Fig. 1. The data presented constitute the analyses performed on 25 mCRC patients. **B,** evolution (D0, D15, D30, and D60) of Treg cell frequency in the blood of a patient with an induction or a decrease of Treg after chemotherapy (D0 vs. D15). **C,** Kaplan–Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the evolution (increase vs. decrease) of Treg cell frequency in blood before (D0) and after (D15) chemotherapy. **D,** evolution (D0, D15, D30, and D60) of Th17 cell frequency in the blood of a patient with an induction or a decrease of Th17 after chemotherapy (D0 vs. D15). **E,** Kaplan–Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the evolution (increase vs. decrease) of Th17 cell frequency in blood before (D0) and after (D15) chemotherapy. n.s., not significant.

cells exerted immunosuppressive function and could be called gMDSCs, while $CD15^+$ $CD33^{low}$ cells did not exert suppressive function and could be called granulocytes (Fig. 3A–C). For $CD14^+$ cells isolated from PBMC, all cells expressed CD33 labeling but only cells with HLA-DR^{low} expression had immunosuppressive function and could be called mMDSCs (Fig. 3A–C). In addition, only $CD15^+$ $CD33^{high}$ gMDSCs but not $CD15^+$ $CD33^{low}$ granulocytes expressed CD124 (IL4Rα), a classical marker of MDSC

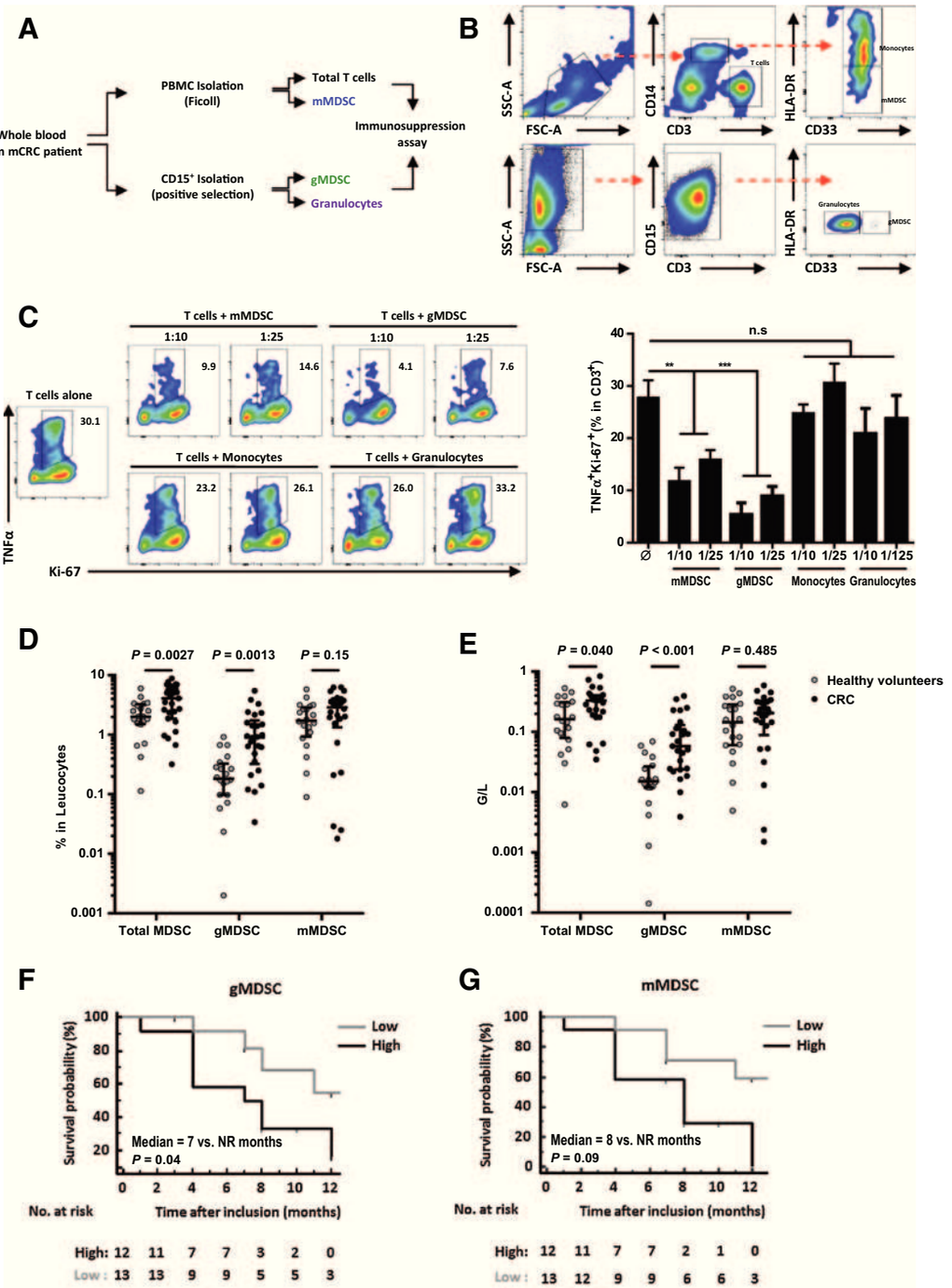


Figure 3.

Accumulation of MDSCs in mCRC patients. **A,** graphical representation of cell-sorting experiment performed for analysis of MDSC, monocyte, and granulocyte-suppressive capacities on autologous T cells. **B,** representative gating strategy used for T cells, mMDSC, granulocytes, and gMDSC sorting from an mCRC patient's whole blood. **C,** total $CD3^+$ lymphocytes, granulocytes, and gMDSC subsets were sorted from a cancer patient's blood. Then, $CD3^+$ T cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 as effector cells and cocultured (in the presence of ATP) with or without myeloid cells at different ratios (1:10 or 1:25, myeloid cells: T cells) during 5 days. We usually used around 20,000 T cells in our immunosuppression assay. TNFα and Ki67 expressions were assessed using intracellular staining and were analyzed in $CD3^+$ T cells. One representative experiment is shown ($n = 3$ mCRC patients). n.s., not significant. **D** and **E,** whole blood of healthy volunteers or mCRC patients was stained with anti-CD33, anti-Lin (i.e., anti-CD3, -CD19, -CD20, -CD56), anti-HLA-DR, anti-CD14, and anti-CD15 antibodies and was analyzed by flow cytometry. The frequency (**D**) or the absolute count (**E**) of gMDSC ($CD33^+$ Lin^- HLA-$DR^{-/low}$ $CD14^-$ $CD15^+$) or mMDSC ($CD33^+$ Lin^- HLA-$DR^{-/low}$ $CD14^+$ $CD15^-$) is depicted. The data presented constitute the analysis performed on 20 healthy volunteers and 25 mCRC patients. **F,** Kaplan–Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the presence of a high or low level of gMDSC cells in blood (using median frequency as a cutoff). **G,** Kaplan–Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the presence of a high or low level of mMDSC cells in blood (using median frequency as a cutoff).

(Supplementary Fig. S2D). The proportion and absolute number of total MDSCs in peripheral blood from untreated mCRC patients was significantly increased compared with the proportion found in healthy donors ($P = 0.0027$; Fig. 3D). We also observed that both the frequency (Fig. 3D) and the absolute number (Fig. 3E) of gMDSC ($P = 0.0013$ and $P < 0.001$), but not mMDSC ($P = 0.15$ and $P = 0.485$), significantly accumulate in the blood of mCRC patients compared with healthy donors. We then studied the prognostic role of MDSCs. As described above, we separated patients into two groups using median MDSC frequency as a cutoff. We observed that high levels of gMDSC at baseline are significantly associated with poor PFS [7 months vs. median not reached (NR), $P = 0.04$] and overall survival (12 months vs. 23 months, $P = 0.04$; data not shown), while mMDSC level is not associated with prognosis (Fig. 3F and G). We also confirmed that decrease in the frequency of gMDSC is significantly associated with longer median PFS after a cycle of 5-FU–based chemotherapy plus bevacizumab in a series of 20 colorectal patients treated by this protocol in second or third line [median PFS 6 months vs. 4 months for patients with decreased vs. increased gMDSC frequency ($P = 0.05$; data not shown)]. Together, these data show that mCRC patients have high levels of MDSCs, and initial high levels of gMDSCs are associated with poor prognosis.

Effect of FOLFOX–bevacizumab regimen on MDSC frequency

We previously observed that 5-FU induced MDSC cell death in humans, so we tested the effect of the first cycle of FOLFOX–bevacizumab chemotherapy on the frequency of MDSCs. We tested the evolution of MDSC frequency during the first 2 months of treatment. We observed that FOLFOX–bevacizumab chemotherapy did not impact on total MDSC or mMDSC frequency. In contrast, we observed a significant decrease in the number of gMDSCs 2 months after the beginning of the treatment ($P = 0.008$; Fig. 4A). As a control, we could not detect significant modification of MDSC frequency in untreated patients (data not shown). However, when we studied gMDSC, we found that 15 of 25 patients have a decreased frequency of gMDSC after the first cycle of chemotherapy compared with baseline (Fig. 4B). Analysis of gMDSC frequency at days 30 and 60 after initiation of the treatment confirmed that decreased frequency of gMDSC is maintained during the whole follow-up. For the other 10 patients, we did not observe a decrease in gMDSC frequency. Importantly, we observed that decrease in the gMDSC frequency is significantly associated with better prognosis and longer PFS ($P = 0.006$; Fig. 4C). In contrast for mMDSC, we observed that patients with a decreased frequency of mMDSC at day 15 did not maintain this evolution during the whole follow-up (D30, $P = 0.57$; D60, $P = 0.99$). Patients with an increased frequency of mMDSC at day 15 maintained this evolution during the whole follow-up (D30, $P = 0.0013$; D60, $P = 0.006$; Fig. 4D). The increase of mMDSC frequency did not change PFS ($P = 0.09$; Fig. 4E). We also confirmed that decrease in the frequency of gMDSC is significantly associated with longer median PFS after a cycle of 5-FU–based chemotherapy plus bevacizumab in a series of 20 metastatic colorectal cancer patients treated by this protocol in second or third line [median PFS 6 months vs. 4 months for patients with decreased vs. increased gMDSC frequency ($P = 0.05$; data not shown)]. Together, these data show that FOLFOX–bevacizumab induces a decrease of gMDSC, and this decrease is associated with better PFS.

MDSCs in mCRC patients express high levels of CD73, CD39, and PD-L1

Previous reports suggested that MDSCs in human cancers could suppress immunity using PD-L1 and CD39 (14, 21). PD-L1 interacts with PD-1, which is located on the surface membrane of effector memory T cells, and transmits an inhibitory signal reducing the proliferation and activity of these cells. CD39 is an ectonucleotidase that converts extracellular ATP or ADP into AMP. CD39 works together with CD73, another ectonucleotidase that converts AMP into adenosine, which is the final immunosuppressive molecule (22). Thus, both enzymes are required to convert ATP into the immunosuppressive molecule adenosine. We first tested the expression of PD-L1, CD73, and CD39 in the peripheral different myeloid cells (gMDSC and mMDSC, granulocytes, and monocytes) of mCRC patients and healthy volunteers. We observed that gMDSC is the myeloid population that expressed the highest levels of PD-L1, CD73, and CD39 (Fig. 5A–C). Interestingly, a higher expression of PD-L1, CD39, and CD73 is observed in gMDSCs of mCRC patients compared with healthy volunteers, thus suggesting a more important immunosuppressive activity in mCRC patients (Fig. 5A–C). We also confirmed that gMDSC of mCRC patients expressed more *Pdl1*, *Entpd1*, and *Nt5e* (coding for CD39 and CD73, respectively) mRNA than mMDSC (Supplementary Fig. S6).

To exert its immunosuppressive effect, PD-L1 must encounter PD-1 on a T cell. We checked the level of expression of PD-1 in CD4 and CD8 T-cell subsets of mCRC patients and observed a high expression of PD-1 on memory CD8 T cells in both healthy volunteers and mCRC patients. In CD4 T cells, PD-1 is only found on Th1 cells and a higher level is found in mCRC patients compared with healthy volunteers (Fig. 5D–F).

Then, we tested the expression of CD39 and CD73 in effector CD4 and CD8 T-cell subsets and observed that while CD8 and CD4 T cells expressed reduced level of CD73 in mCRC patients, a similar level of CD39 was observed in mCRC patients compared with healthy volunteers (Fig. 5D–F).

Together, these data demonstrate that in mCRC patients, gMDSC expressed high levels of PD-L1, CD73, and CD39, while Th1 and CD8 memory cells expressed PD-1, thus suggesting that gMDSC could blunt T-cell response using both ectonucleotidases and PD-L1.

gMDSC blunts T-cell function in a PD-L1– and ectonucleotidase-dependent manner

To test the immunosuppressive function of MDSC from mCRC patients, we sorted $CD3^+$ T cells and gMDSC and mMDSC from 5 mCRC patients. In an autologous model, we stimulated T cells with CD3 plus CD28 mAb and added in the culture either gMDSC or mMDSC in the presence of ATP molecule. As a control, we used granulocytes in this experiment. We observed that both gMDSC and mMDSC subsets have an immunosuppressive effect on T cells, demonstrated by reduced TNFα and Ki67 proliferation marker expression, however, gMDSC exert a more important immunosuppressive effect (Fig. 6A and B). Similar results were obtained using TNFα ELISA assay (Fig. 6C). Importantly, the addition of nivolumab, a clinically available anti PD-1 mAb, and/or the antagonistic anti-CD39 mAb BY40 blunted the immunosuppressive effect of gMDSC on $CD3^+$ T cells, while it did not affect the immunosuppressive effect of mMDSC (Fig. 6A–C).

Together, these data show that gMDSCs that accumulate in mCRC patients have a high immunosuppressive function that could be targeted with anti-PD-1 or anti-CD39 antibodies.

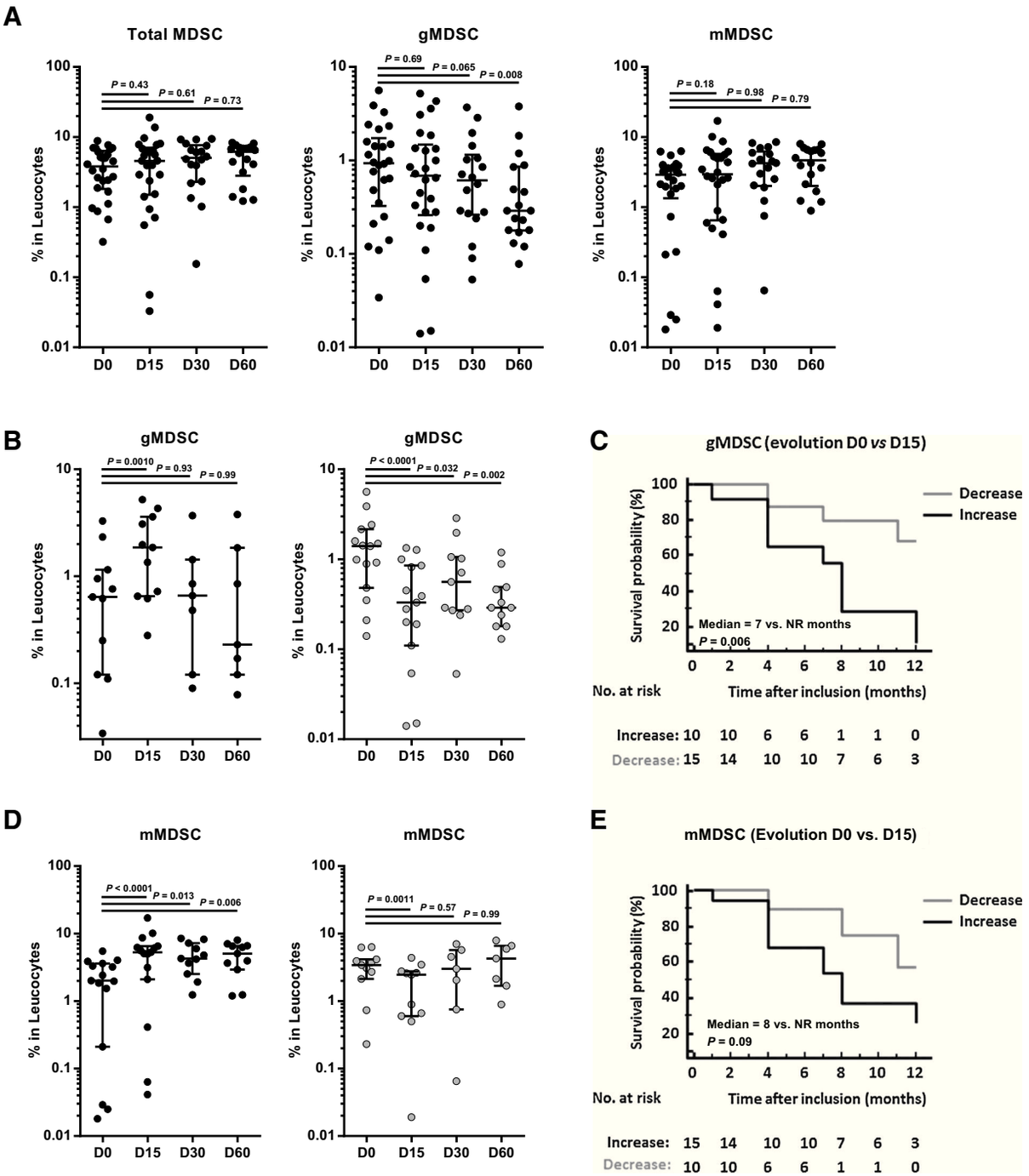


Figure 4.

Effect of FOLFOX–bevacizumab regimen on MDSCs. **A,** whole blood of mCRC patients was stained with anti-CD33, anti-Lin (i.e., anti-CD3, -CD19, -CD20, -CD56), anti-HLA-DR, anti-CD14, and anti-CD15 antibodies and was analyzed by flow cytometry before (D0) and after (D15, D30, and D60) first-line chemotherapy. The frequency of total, gMDSC or mMDSC is depicted as described in Fig. 3D and E. The data presented constitute the analysis performed on 25 mCRC patients. **B,** evolution (D0, D15, D30, and D60) of gMDSC cell frequency in the blood of a patient with an induction or a decrease of gMDSC after chemotherapy (D0 vs. D15). **C,** Kaplan–Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the evolution (increase vs. decrease) of gMDSC cells in blood before (D0) and after (D15) chemotherapy. **D,** evolution (D0, D15, D30, and D60) of mMDSC cell frequency in the blood of a patient with an induction or a decrease of mMDSC after chemotherapy (D0 vs. D15). **E,** Kaplan–Meier curve of PFS for patients with mCRC according to the ratio (increase vs. decrease) of mMDSC cells in blood before (D0) and after (D15) chemotherapy.

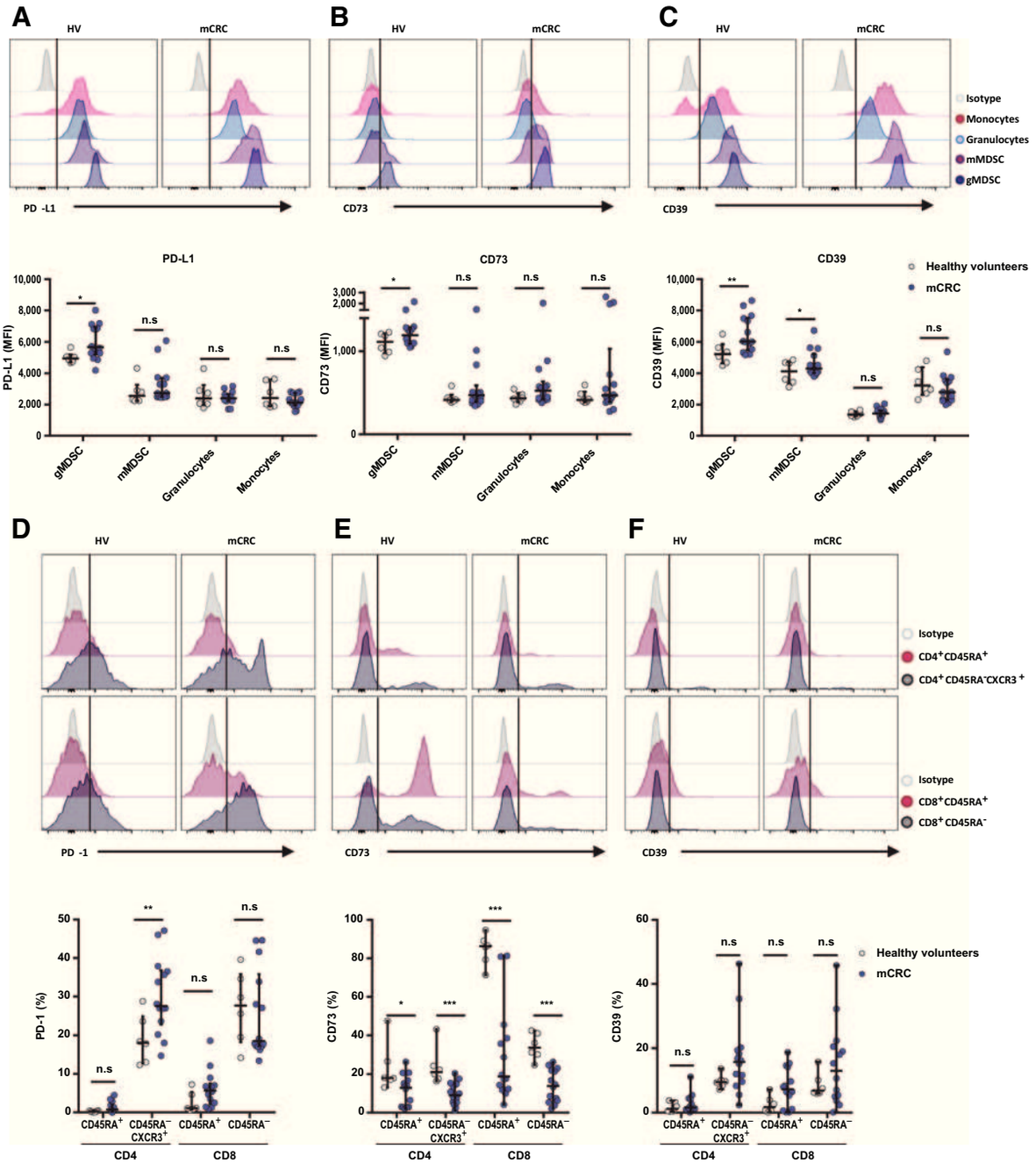


Figure 5.

MDSCs in mCRC patients express high levels of CD73, CD39, and PD-L1. **A–C,** expressions of PD-L1 (**A**), CD73 (**B**), and CD39 (**C**) on gMDSC, mMDSC, granulocytes, and monocytes are depicted. Top, representative histogram; bottom, individual data for healthy volunteers (HV; $n = 6$; gray circle) and mCRC ($n = 14$, blue circle). MFI, mean fluorescence intensity. **D–F,** expressions of PD-1 (**D**), CD73 (**E**), and CD39 (**F**) on naïve CD4 T cells, memory CXCR3$^+$ CD4 T cells, naïve CD8 T cells, and memory CD8 T cells are depicted. Top, representative histogram; bottom, individual data for healthy volunteers ($n = 6$, gray circle) and mCRC ($n = 14$, blue circle). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$ (Mann-Whitney test). n.s., not significant.

Discussion

Previous reports have shown that a high number of MDSC is associated with a poor prognosis in different solid cancers and in hematologic malignancies like chronic lymphocytic leukemia or myeloma (23–25). However, the prognostic role of MDSCs has not been yet addressed in mCRC. We observed here that accumulation of gMDSC in mCRC is associated with a poor outcome. However, due to the low number of patients, further studies are required to confirm this observation and determine whether

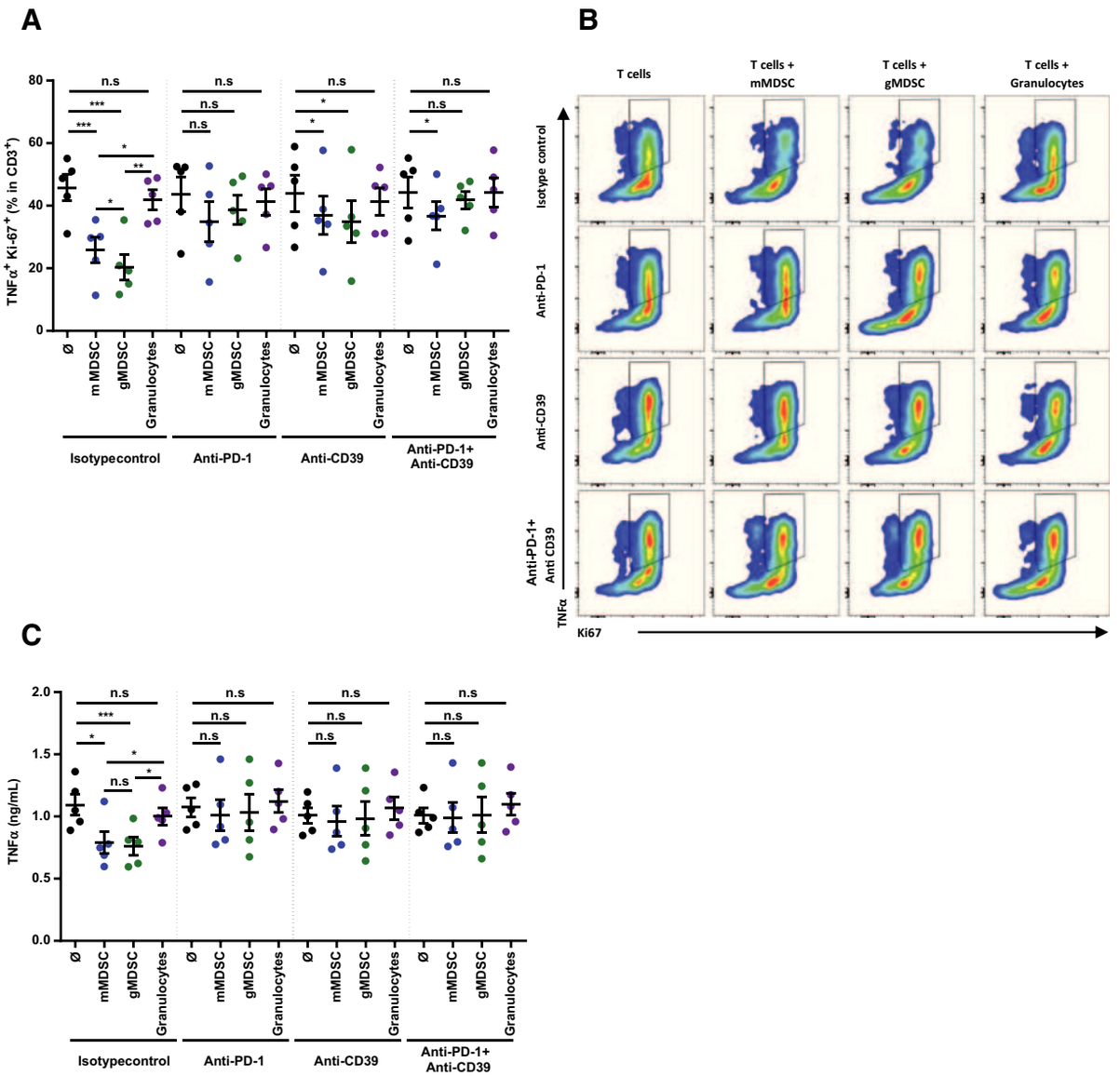


Figure 6.

gMDSC blunts T-cell function in a PD-L1– and ectonucleotidase-dependent manner. **A** and **B,** total CD3, granulocytes, mMDSC, and gMDSC subsets were sorted from a cancer patient's blood. Then, CD3 cells were activated with anti-CD3 and anti-CD28 as effector cells and cocultured with or without myeloid cells at different ratios (in the presence of ATP) for 5 days. TNFα and Ki67 expression was assessed using intracellular staining and was analyzed in $CD3^+$ T cells. One representative experiment is shown for **B** and for **A**, results are for 5 independent patients. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$. **C,** TNFα secretion was assessed using ELISA on the supernatants of cocultures after 5 days. Experiment was performed as in **A**. Data are mean ± SD of three independent experiments. *, $P < 0.05$. n.s., not significant.

gMDSC accumulation is an independent prognostic factor in mCRC.

We observed that mMDSCs are the most frequent MDSC population in patient blood. Such data contrast with previous reports on MDSC in colorectal cancer, in which the authors did not observe expression of CD15 or CD14 on MDSC or only detected $CD15^+$ gMDSC (14, 21). Definition of human MDSC phenotype is still controversial. Although $CD14^+$ Lin^- $HLA\text{-}DR^-$ cells were commonly admitted to be mMDSC, the definitive of gMDSC is not consensual. Most reports define gMDSCs as low-density granulocytes copurified with PBMC during Ficoll gradient. Here, we observed that blood $CD15^+$ $CD33^{high}$ Lin^- $HLA\text{-}DR^-$ cells are immunosuppressive cells and could be called MDSC, while $CD15^+$ $CD33^{low}$ Lin^- $HLA\text{-}DR^-$ cells are not immunosuppressive and are granulocytes. Moreover, we could compare the functions of both gMDSC and mMDSC. We observed that gMDSC have a higher immunosuppressive function than mMDSC on a per cell basis. Previous data suggested that MDSC from mCRC patients have a more important immunosuppressive function compared with MDSC from

healthy donors, but the comparison of the function of gMDSC and mMDSC was not addressed (21). We found that gMDSCs have higher levels of PD-L1, CD39, and CD73 expression and exerted a stronger immunosuppressive activity than mMDSCs. Together, such data suggest that gMDSC is the major subset of MDSC involved in immunosuppression in mCRC and strengthen the rationale to combine PD-1/PD-L1 or ectonucleotidase-neutralizing antibodies with chemotherapy to blunt immunosuppression induced by gMDSC in mCRC.

In a previous report, we observed that 5-FU mediated MDSC depletion via an induction of cell death (15). In humans, a recent study on a few colorectal cancer patients treated with FOLFOX (6 patients) or FOLFIRI (4 patients) showed that while FOLFOX treatment of patients with colorectal cancer led to a decrease in MDSC levels, FOLFIRI had the opposite effect (26). In this report, we also observed that FOLFOX–bevacizumab induces a decrease of MDSC but only of the gMDSC subset. This reduction of gMDSC frequency is preferentially observed in patients with initial high level of gMDSC ($\geq$1% in leucocytes), thus raising the hypothesis that accumulating gMDSC from mCRC patients may have a specific biology that renders them more sensitive to chemotherapy-induced cell death.

We had previously reported that MDSC cell death mediated by 5-FU induced the activation of NLRP3 inflammasome and was associated with IL1β secretion. This IL1β secretion promoted induction of Th17 response. We demonstrated that Th17 induction was associated with the accumulation of proangiogenic molecules in the tumor. Such phenomenon is deleterious, and depletion of IL17A or IL1β is associated with enhanced efficacy of 5-FU treatment in mice (16). In this report, we observed that FOLFOX–bevacizumab induced Th17 accumulation after one cycle. Concomitantly, we also noted a decrease of gMDSC in patients with high initial levels. Such data strongly support that this combination of chemotherapy also affects antitumor immune response through similar mechanisms to those observed with 5-FU monotherapy in mouse and human models. Importantly, increase in Th17 cells and absence of reduction of gMDSC frequency are both associated with a poor prognosis, thus suggesting, in a similar way to mouse observations, that FOLFOX–bevacizumab induced a deleterious effect on immune response via induction of Th17 polarization.

In conclusion, our study shows that FOLFOX–bevacizumab chemotherapy induced accumulation of Th17 cells in patients, and this parameter is associated with poor prognosis, while gMDSC depletion is associated with better outcome. However, the most important point in this study is that gMDSC is an MDSC subset that could be targeted in mCRC using molecules that target the PD-1/PD-L1 or CD39/CD73 ectonucleotidase pathways. Thus, our data give rationale to use ectonucleotidase inhibitors or anti-PD-1/PD-L1 in association with FOLFOX–bevacizumab regimen in further clinical development of chemoimmunotherapy in human colorectal cancer.

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

N. Bonnefoy is a consultant/advisory board member for OREGA Biotech. L. Apetoh is a consultant/advisory board member for Bristol-Myers Squibb. No potential conflicts of interest were disclosed by the other authors.

Authors' Contributions

Conception and design: E. Limagne, S. Ladoire, L. Apetoh, F. Ghiringhelli
Development of methodology: E. Limagne, V. Derangère, F. Végran, S. Ladoire
Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.): E. Limagne, R. Euvrard, M. Thibaudin, N. Bonnefoy, J. Vincent, L. Bengrine-Lefevre
Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis): E. Limagne, R. Euvrard, M. Thibaudin, V. Derangère, R. Boidot, L. Apetoh, F. Ghiringhelli
Writing, review, and/or revision of the manuscript: E. Limagne, R. Euvrard, M. Thibaudin, C. Rébé, V. Derangère, F. Végran, N. Bonnefoy, D. Delmas, L. Apetoh, F. Ghiringhelli
Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases): C. Rébé, A. Chevriaux, R. Boidot, S. Ladoire
Study supervision: E. Limagne, L. Apetoh, F. Ghiringhelli

Acknowledgments

We thank Aurelie Bertaut (statistician) for calculation of the required number of patients.

Grant Support

This work was supported by the Ligue Nationale contre le Cancer, the Institut National du Cancer, the Association pour la recherche sur le cancer, the Conseil Régional Bourgogne/INSERM, Fondation pour la Recherche Médicale (F. Ghiringhelli) the Fondation de France, the Fondation Lilliane Betancourt, the French National Research Agency (ANR-13-JSV3-0001 and ANR-11-LABX-0021), the Ligue Régionale contre le Cancer Comité Grand-Est, the Canceropôle Grand-Est, and the European Community (Marie Curie Fellowship PCIG10-GA-2011-303719 to L. Apetoh). This work was also supported by institutional grants from INSERM and Université de Montpellier 1 and from the LabEx MabImprove (N. Bonnefoy).

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

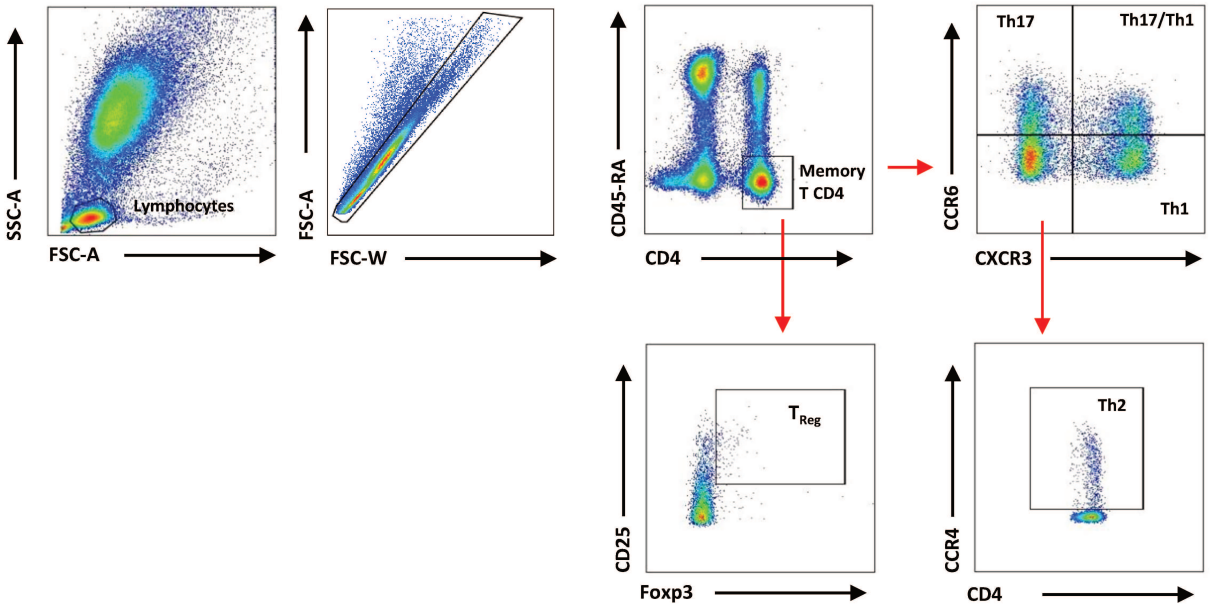
Received November 17, 2015; revised June 2, 2016; accepted July 5, 2016; published OnlineFirst August 5, 2016.

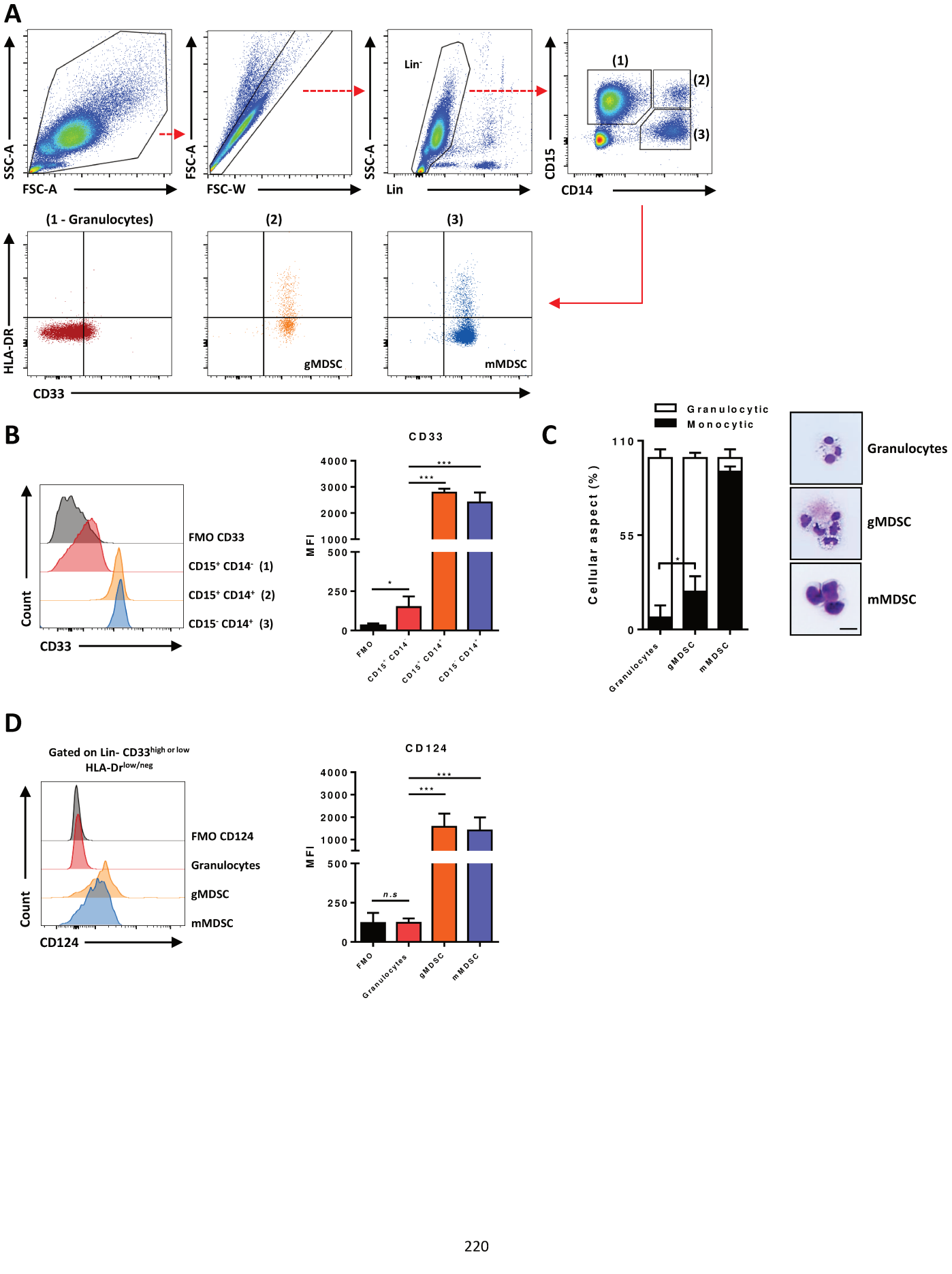
References

1. Principi M, Barone M, Pricci M, De Tullio N, Losurdo G, Ierardi E, et al. Ulcerative colitis: from inflammation to cancer. Do estrogen receptors have a role? World J Gastroenterol 2014;20:11496–04.
2. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 2006;313:1960–64.
3. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. The N Engl J Med 2005;353:2654–66.
4. Salama P, Stewart C, Forrest C, Platell C, Iacopetta B. FOXP3+ cell density in lymphoid follicles from histologically normal mucosa is a strong prognostic factor in early stage colon cancer. Cancer Immunol Immunother 2012;61:1183–90.
5. Bindea G, Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Waldner M, Obenauf AC, et al. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. Immunity 2013;39:782–95.
6. Mei Z, Liu Y, Liu C, Cui A, Liang Z, Wang G, et al. Tumour-infiltrating inflammation and prognosis in colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Br J Cancer 2014;110:1595–605.
7. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. J Clin Oncol 2009;27:186–92.
8. Liu J, Duan Y, Cheng X, Chen X, Xie W, Long H, et al. et al.IL-17 is associated with poor prognosis and promotes angiogenesis via stimulating VEGF production of cancer cells in colorectal carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 2011;407:348–54.

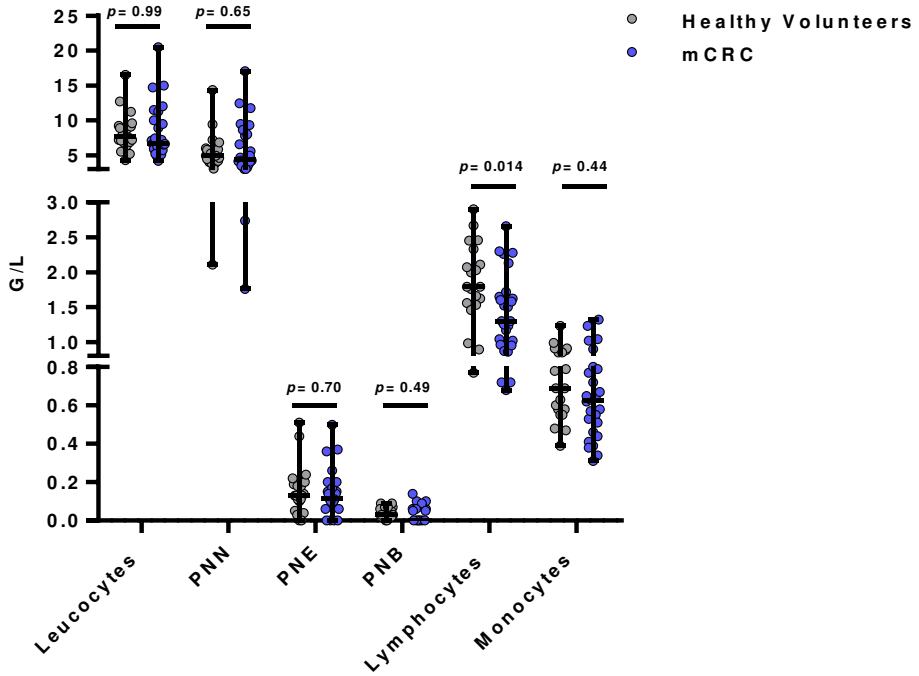
9. Chung AS, Wu X, Zhuang G, Ngu H, Kasman I, Zhang J, et al. An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. Nat Med 2013;19:1114–23.
10. Apetoh L, Vegran F, Ladoire S, Ghiringhelli F. Restoration of antitumor immunity through selective inhibition of myeloid derived suppressor cells by anticancer therapies. Curr Mol Med 2011;11:365–72.
11. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. J Clin Invest 2015; 125:3356–64.
12. Gabrilovich DI, Ostrand-Rosenberg S, Bronte V. Coordinated regulation of myeloid cells by tumours. Nat Rev Immunol 2012;12:253–68.
13. Solito S, Marigo I, Pinton L, Damuzzo V, Mandruzzato S, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity in human cancers. Ann N Y Acad Sci 2014;1319:47–65.
14. OuYang LY, Wu XJ, Ye SB, Zhang RX, Li ZL, Liao W, et al. et al.Tumor-induced myeloid-derived suppressor cells promote tumor progression through oxidative metabolism in human colorectal cancer. J Transl Med 2015;13:47.
15. Vincent J, Mignot G, Chalmin F, Ladoire S, Bruchard M, Chevriaux A, et al. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. Cancer Res 2010;70:3052–61.
16. Bruchard M, Mignot G, Derangère V, Chalmin F, Chevriaux A, Végran F, et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nat Med 2013;19:57–64.
17. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). Eur J Cancer 2009;45:228–47.
18. McCleary NJ, Meyerhardt JA, Green E, Yothers G, de Gramont A, Van Cutsem E, et al. Impact of age on the efficacy of newer adjuvant therapies in patients with stage II/III colon cancer: findings from the ACCENT database. J Clin Oncol 2013;31:2600–6.
19. Mahnke YD, Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. Clin Lab Med 2007;27:469–85.
20. Tesniere A, Apetoh L, Ghiringhelli F, Joza N, Panaretakis T, Kepp O, et al. Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. Curr Opin Immunol 2008;20:504–11.
21. Zhang B, Wang Z, Wu L, Zhang M, Li W, Ding J, et al. Circulating and tumor-infiltrating myeloid-derived suppressor cells in patients with colorectal carcinoma. PLoS One 2013;8:e57114.
22. Bastid J, Cottalorda-Regairaz A, Alberici G, Bonnefoy N, Eliaou JF, Bensussan A. ENTPD1/CD39 is a promising therapeutic target in oncology. Oncogene 2013;32:1743–51.
23. Chen MF, Kuan FC, Yen TC, Lu MS, Lin PY, Chung YH, et al. et al.IL-6-stimulated CD11b+ CD14+ HLA-DR- myeloid-derived suppressor cells, are associated with progression and poor prognosis in squamous cell carcinoma of the esophagus. Oncotarget 2014;5: 8716–28.
24. Idorn M, Kollgaard T, Kongsted P, Sengelov L, Thor Straten P. Correlation between frequencies of blood monocytic myeloid-derived suppressor cells, regulatory T cells and negative prognostic markers in patients with castration-resistant metastatic prostate cancer. Cancer Immunol Immunother 2014;63:1177–87.
25. Romano A, Parrinello NL, Vetro C, Forte S, Chiarenza A, Figuera A, et al. Circulating myeloid-derived suppressor cells correlate with clinical outcome in Hodgkin lymphoma patients treated up-front with a risk-adapted strategy. Br J Haematol 2015;168:689–700.
26. Kanterman J, Sade-Feldman M, Biton M, Ish-Shalom E, Lasry A, Goldshtein A, et al. et al.Adverse immunoregulatory effects of 5FU and CPT11 chemotherapy on myeloid-derived suppressor cells and colorectal cancer outcomes. Cancer Res 2014;74:6022–35.

Supplementary Figure 1: T_{Helper} gating strategy

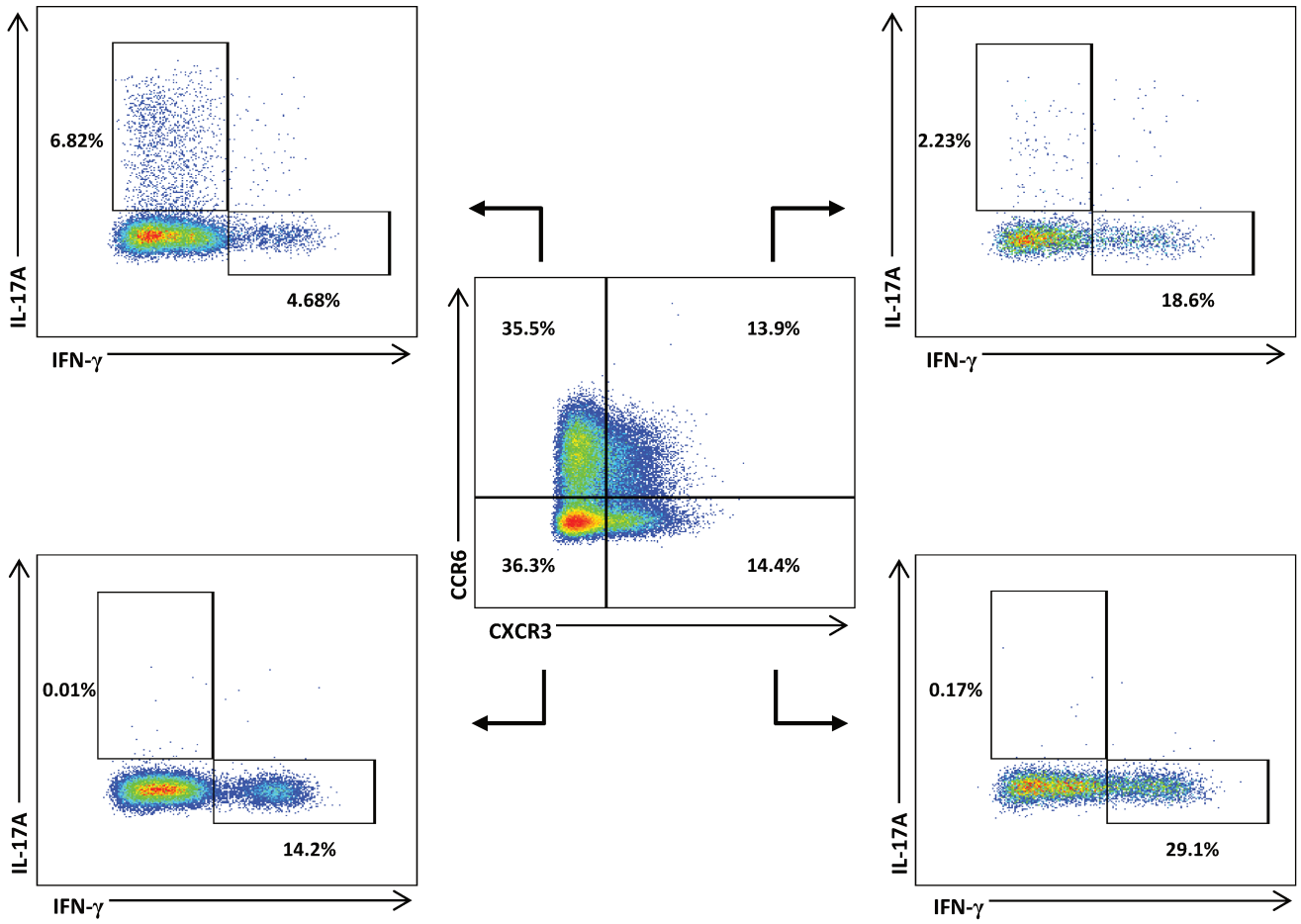


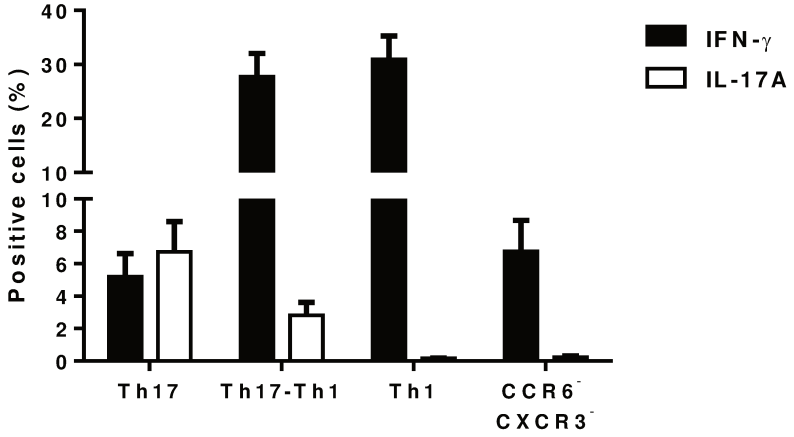

A
SSC-A
FSC-A
FSC-A
FSC-W
SSC-A
Lin-
Lin
CD15
CD14
(1)
(2)
(3)
(1 - Granulocytes)
(2)
(3)
HLA-DR
CD33
gMDSC
mMDSC
B
Count
CD33
FMO CD33
CD15+ CD14- (1)
CD15+ CD14+ (2)
CD15- CD14+ (3)
CD33
MFI
4000
3000
2000
1000
500
250
0
***
***
*
FMO
CD15+ CD14-
CD15+ CD14+
CD15- CD14+
C
Granulocytic
Monocytic
Cellular aspect (%)
110
55
0
*
Granulocytes
gMDSC
mMDSC
Granulocytes
gMDSC
mMDSC
D
Gated on Lin- CD33high or low
HLA-Drlow/neg
Count
CD124
FMO CD124
Granulocytes
gMDSC
mMDSC
CD124
MFI
4000
3000
2000
1000
500
250
0
***
***
n.s
FMO
Granulocytes
gMDSC
mMDSC

Supplementary Figure 3: Blood parameters in Healthy volunteers *versus* mCRC patients

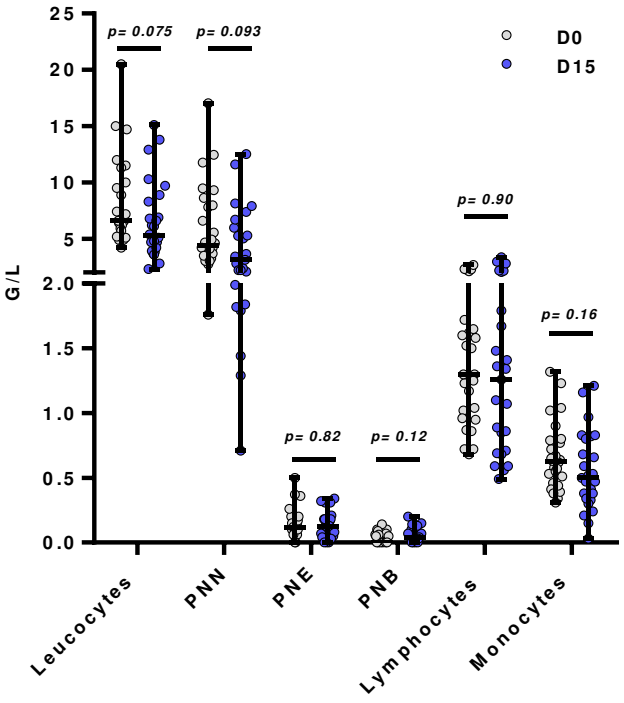


Supplementary Figure 4: IFN-γ and IL-17A secretion by CCR6 and CXCR3 expressing CD4 T cells





Supplementary Figure 5: Blood parameters in mCRC patients, D0 *versus* D15



Supplementary Figure 6: mRNA relative expression of genes involved in immunosuppression

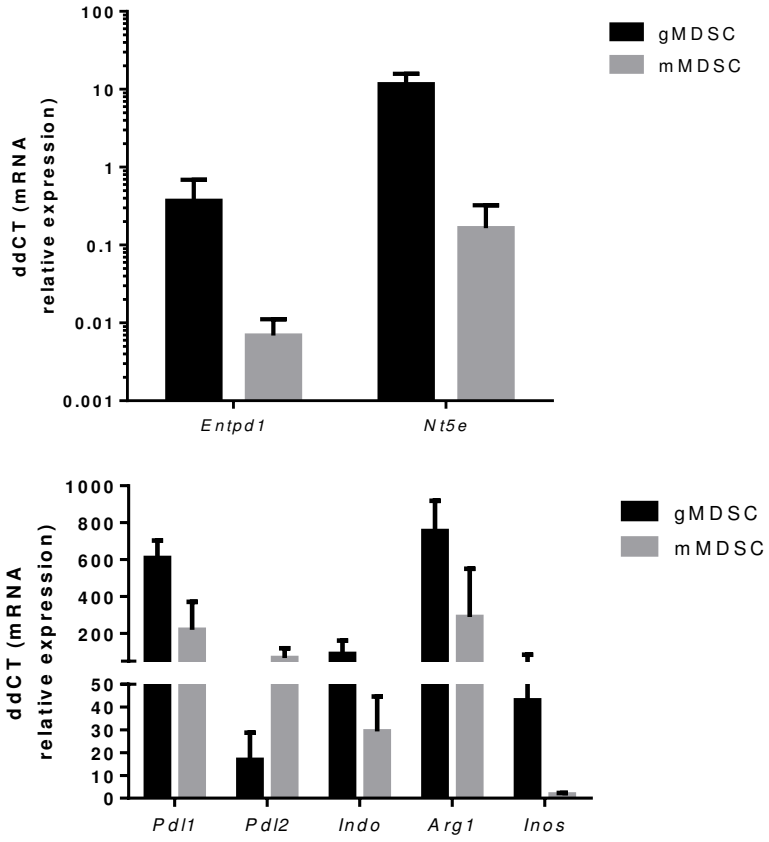


Table 1 : Patients (N = 25) and healthy volunteers (N = 20) characteristics

Patients Characteristics		
Age (years)		
	< 50 years (%)	2 (8%)
	> = 50 years (%)	23 (92%)
	median (SEM)	69 (10.6)
	mean (SD)	66.5 (13.7)
Sexe		
	M (%)	14 (56%)
	F (%)	11 (44%)
Primary tumor origin		
	Colon (%)	20 (80%)
	Rectum (%)	5 (20%)
Mutations		
	Ras (Yes/No)	42.3/57.7%
	Raf (Yes/No)	11.5/88.5%
Metastatic sites (number)		
	median (SEM)	1 (0,47)
	mean (SD)	1.1 (0.79)
LDH (U/L)		
	median (SEM)	6.60 (2.52)
	mean (SD)	7.64 (3.41)
Phosphatase Alcaline (U/L)		
	median (SEM)	107.0 (104.7)
	mean (SD)	178.7 (184.1)
ACE (µg/L)		
	median (SEM)	15.5 (2308.8)
	mean (SD)	(5059.5)

Healthy Volunteers Characteristics		
Age (years)		
	< 50 years (%)	3 (15%)
	> = 50 years (%)	17 (85%)
	median (SEM)	65 (6.76)
	mean (SD)	63.2 (9.79)
Sexe		
	M (%)	10 (50%)
	F (%)	10 (50%)

Table 2 -Human primer sequences used for RT-qPCR analysis

	Forward	Reverse
ACTB	5’-GTTGTCGACGACGAGCG-3’	5’-GCACAGAGCCTCGCCTT-3’
Entpd1	5'-AAATGAGCTGCTGGACTCCTC-3'	5'-CCCAGGTAAACGGGTGTCTC-3'
Nt5e	5'-CTCCTCTCAATCATGCCGCT-3'	5'-CAAATGTGCCTCCAAAGGGC-3'
Arg1	5’-ACGGAAGAATCAGCCTGGTG-3’	5’-GTCCACGTCTCTCAAGCCAA-3’
Nos2	5/-GCCATAGAGATGGCCTGTCC-3’	5’-TGCATCCAGCTTGACCAGAG-3’
Indo	5’-GATGAAGAAGTGGGCTTTGC-3’	5’- CAGGCAGATGTTTAGCAATGA-3’
PDL1	5’- ACAGCTGAATTGGTCATCCC-3’	5’- TGTCAGTGCTACACCAAGGC-3’
PDL2	5’ TAATCATCTATGGGGTCGCC-3’	5’- CCTCATCTGTTTCTGGAACCT-3’

Supplementary Figure Legends

Supplementary Figure 1: T_{Helper} gating strategy

Flow cytometry gating strategy to identify memory CD4 T cell subpopulations through chemokine receptor expression.

Supplementary Figure 2: MDSC gating strategy and IL-4Rα expression analysis.

A. Flow cytometry gating strategy to identify MDSC subpopulations through CD33, Lin (=CD3, CD20, CD19 and CD56), HLA-DR, CD14 and CD15 marker expression. Pictures correspond to May-Grünwald Giemsa staining mMDSC and gMDSC isolated after cell sorting.

B. As in A, we identify MDSC subpopulations, granulocytes and monocytes and we have analyzed IL-4Rα (CD124) expression in 3 mCRC patients.

Supplementary Figure 3: Blood parameters in Healthy Volunteers versus mCRC patients

Whole blood of Healthy volunteers and metastatic colorectal cancer patient (mCRC) was sample on EDTA-K2 tubes (BD Bioscience) and a complete blood count (CBC) was performed in Clinical Biology Unit (Centre George François Leclerc).

Supplementary Figure 4: IFN-γ and IL-17A secretion by CCR6 and CXCR3 expressing CD4 T cells

PBMCs of mCRC patients were stained after PMA/ionomycin/Brefeldin/Monensin stimulation (4 hrs) with anti-CD4, anti-CD45RA, anti-CCR6, anti-CXCR3, anti-IFN-γ and anti-IL-17A antibodies and analyzed by flow cytometry. The expression of IFN-γ and/or IL-17A on memory CD4 ($CD45RA^-$ $CD4^+$) Th1 ($CCR6^-$ $CXCR3^+$), Th17 ($CCR6^+$ $CXCR3^-$), Th17/Th1 ($CCR6^+$ $CXCR3^+$) and $CCR6^-$ $CXCR3^-$ cells is depicted.

Supplementary Figure 5: Blood parameters in mCRC patients, D0 versus D15

Whole blood of metastatic colorectal cancer patient (mCRC) was sample before (D0) and after chemotherapy (D15) on EDAT-K2 tubes (BD Bioscience) and a complete blood count (CBC) was performed in Clinical Biology Unit (Centre George François Leclerc).

Supplementary Figure 6: mRNA relative expression of genes involved in immunosuppression

gMDSC and mMDSC were cell sorted from four mCRC patient blood. mRNA were extracted and the expression of Entpd1, Nt5e, Pdl1, Pdl2, Indo, Arg1 and Inos was determined using RT-qPCR.

Supplementary Table 1: Patient and Healthy volunteer's characteristics

Baseline characteristics (Age, Sex, Tumor origin, K-Ras and B-Raf status, number of metastatic sites, LDH, PA and CEA) of metastatic colorectal cancer patients (mCRC) and healthy volunteers.

Supplementary Table 2: Human primer sequences used for RT-qPCR analysis

ANNEXE 2

Liste des autres publications et des communications présentées au cours de la thèse.

- ✓ Publications

Blood immunomonitoring and efficacy of nivolumab in patients with lung cancer. Limagne E., Richard C., **Thibaudin M.**, Fumet J.D., Chevrier S., Lagrange A., Favier L., Coudert B., Perol M., Truntzer C., Végran F., Boidot R., Saintigny P., Ghiringhelli F. En préparation

IRF8 dependent molecular complexes control Th9 transcription program. Humblin E., **Thibaudin M.**, Chalmin F., Derangère V., Limagne E., Richard C., Flavell R.A., Chevrier S., Ladoire S., Berger H., Boidot R., Apetoh L., Végran F., Ghiringhelli F. Sous presse dans *Nature Communications*

The anti-tumor immune response in breast cancer: Update and therapeutic perspectives. (2017) Ladoire S., Derangère V., Arnould L., **Thibaudin M.**, Courdert B., Lorgis V., Desmoulins I., Chaix M., Fumoleau P., Ghiringhelli F. Annales de Pathologie *37*, 133-141.

- ✓ Présentations issues des travaux de thèse

17-19 Mars 2016 : 21èmes Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens – Toulouse – « Les lymphocytes Th9 humains dans les cancers du sein » (poster)

18-19 Juin 2015 : 21èmes Forum des Jeunes Chercheurs – Dijon, UFR SVTE – « Human ectonucleotidase-expressing CD25high Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions » (poster)

12-14 Mars 2015 : 20èmes Journées du Collège des Histologistes, Embryologistes et Cytogénéticiens – Paris, Institut Pasteur – « Les lymphocytes Th17 intra-tumoraux exercent des fonctions immunosuppressives dépendantes de l'adénosine dans le cancer du sein » (communication orale et poster)

BIBLIOGRAPHIE

Acosta-Rodriguez, E.V., Rivino, L., Geginat, J., Jarrossay, D., Gattorno, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., and Napolitani, G. (2007). Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. Nature immunology *8*, 639-646.

Adams, S., Gray, R.J., Demaria, S., Goldstein, L., Perez, E.A., Shulman, L.N., Martino, S., Wang, M., Jones, V.E., Saphner, T.J*., et al.* (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *32*, 2959-2966.

Adeegbe, D.O., and Nishikawa, H. (2013). Natural and induced T regulatory cells in cancer. Frontiers in immunology *4*, 190.

Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nature reviews Cancer *7*, 834-846.

Algarra, I., Cabrera, T., and Garrido, F. (2000). The HLA crossroad in tumor immunology. Human immunology *61*, 65-73.

Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., and Romagnani, S. (2008). The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. International immunology *20*, 1361-1368.

Aruga, A., Aruga, E., Tanigawa, K., Bishop, D.K., Sondak, V.K., and Chang, A.E. (1997). Type 1 versus type 2 cytokine release by Vbeta T cell subpopulations determines in vivo antitumor reactivity: IL-10 mediates a suppressive role. Journal of immunology *159*, 664-673.

Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E.C., Su, D., Marches, F., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. The Journal of experimental medicine *204*, 1037-1047.

Awe, O., Hufford, M.M., Wu, H., Pham, D., Chang, H.C., Jabeen, R., Dent, A.L., and Kaplan, M.H. (2015). PU.1 Expression in T Follicular Helper Cells Limits CD40L-Dependent Germinal Center B Cell Development. Journal of immunology *195*, 3705-3715.

Badoual, C., Hans, S., Rodriguez, J., Peyrard, S., Klein, C., Agueznay Nel, H., Mosseri, V., Laccourreye, O., Bruneval, P., Fridman, W.H*., et al.* (2006). Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *12*, 465-472.

Bailey, S.R., Nelson, M.H., Himes, R.A., Li, Z., Mehrotra, S., and Paulos, C.M. (2014). Th17 cells in cancer: the ultimate identity crisis. Frontiers in immunology *5*, 276.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. Annual review of immunology *18*, 767-811.

Banchereau, J., and Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. Nature *392*, 245-252.

Barbi, J., Pardoll, D., and Pan, F. (2013). Metabolic control of the Treg/Th17 axis. Immunological reviews *252*, 52-77.

Bassil, R., Orent, W., Olah, M., Kurdi, A.T., Frangieh, M., Buttrick, T., Khoury, S.J., and Elyaman, W. (2014). BCL6 controls Th9 cell development by repressing Il9 transcription. Journal of immunology *193*, 198-207.

Bates, G.J., Fox, S.B., Han, C., Leek, R.D., Garcia, J.F., Harris, A.L., and Banham, A.H. (2006). Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and

those at risk of late relapse. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *24*, 5373-5380.

Beavis, P.A., Stagg, J., Darcy, P.K., and Smyth, M.J. (2012). CD73: a potent suppressor of antitumor immune responses. Trends in immunology *33*, 231-237.

Becht, E., Giraldo, N.A., Germain, C., de Reynies, A., Laurent-Puig, P., Zucman-Rossi, J., Dieu-Nosjean, M.C., Sautes-Fridman, C., and Fridman, W.H. (2016). Immune Contexture, Immunoscore, and Malignant Cell Molecular Subgroups for Prognostic and Theranostic Classifications of Cancers. Advances in immunology *130*, 95-190.

Bense, R.D., Sotiriou, C., Piccart-Gebhart, M.J., Haanen, J.B., van Vugt, M.A., de Vries, E.G., Schroder, C.P., and Fehrmann, R.S. (2017). Relevance of Tumor-Infiltrating Immune Cell Composition and Functionality for Disease Outcome in Breast Cancer. Journal of the National Cancer Institute *109*.

Berger, H., Vegran, F., Chikh, M., Gilardi, F., Ladoire, S., Bugaut, H., Mignot, G., Chalmin, F., Bruchard, M., Derangere, V*., et al.* (2013). SOCS3 transactivation by PPARgamma prevents IL-17-driven cancer growth. Cancer research *73*, 3578-3590.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. Nature *441*, 235-238.

Bianchini, G., Pusztai, L., Pienkowski, T., Im, Y.H., Bianchi, G.V., Tseng, L.M., Liu, M.C., Lluch, A., Galeota, E., Magazzu, D*., et al.* (2015). Immune modulation of pathologic complete response after neoadjuvant HER2-directed therapies in the NeoSphere trial. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *26*, 2429-2436.

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A*., et al.* (2013). Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. Immunity *39*, 782-795.

Bingle, L., Brown, N.J., and Lewis, C.E. (2002). The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. The Journal of pathology *196*, 254-265.

Braumuller, H., Wieder, T., Brenner, E., Assmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C*., et al.* (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature *494*, 361-365.

Breitfeld, D., Ohl, L., Kremmer, E., Ellwart, J., Sallusto, F., Lipp, M., and Forster, R. (2000). Follicular B helper T cells express CXC chemokine receptor 5, localize to B cell follicles, and support immunoglobulin production. The Journal of experimental medicine *192*, 1545-1552.

Bronte, V., and Zanovello, P. (2005). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. Nature reviews Immunology *5*, 641-654.

Bruchard, M., Mignot, G., Derangere, V., Chalmin, F., Chevriaux, A., Vegran, F., Boireau, W., Simon, B., Ryffel, B., Connat, J.L*., et al.* (2013). Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. Nature medicine *19*, 57-64.

Bruno, A., Pagani, A., Pulze, L., Albini, A., Dallaglio, K., Noonan, D.M., and Mortara, L. (2014). Orchestration of angiogenesis by immune cells. Frontiers in oncology *4*, 131.

Brustle, A., Heink, S., Huber, M., Rosenplanter, C., Stadelmann, C., Yu, P., Arpaia, E., Mak, T.W., Kamradt, T., and Lohoff, M. (2007). The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. Nature immunology *8*, 958-966.

Burkholder, B., Huang, R.Y., Burgess, R., Luo, S., Jones, V.S., Zhang, W., Lv, Z.Q., Gao, C.Y., Wang, B.L., Zhang, Y.M.*, et al.* (2014). Tumor-induced perturbations of cytokines and immune cell networks. Biochimica et biophysica acta *1845*, 182-201.

Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. Progress in experimental tumor research *13*, 1-27.

Burnet, M. (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. British medical journal *1*, 779-786.

Cabrera, T., Angustias Fernandez, M., Sierra, A., Garrido, A., Herruzo, A., Escobedo, A., Fabra, A., and Garrido, F. (1996). High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. Human immunology *50*, 127-134.

Caras, I., Grigorescu, A., Stavaru, C., Radu, D.L., Mogos, I., Szegli, G., and Salageanu, A. (2004). Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients. Cancer immunology, immunotherapy : CII *53*, 1146-1152.

Carreras, J., Lopez-Guillermo, A., Fox, B.C., Colomo, L., Martinez, A., Roncador, G., Montserrat, E., Campo, E., and Banham, A.H. (2006). High numbers of tumor-infiltrating FOXP3-positive regulatory T cells are associated with improved overall survival in follicular lymphoma. Blood *108*, 2957-2964.

Carrington, M., Wang, S., Martin, M.P., Gao, X., Schiffman, M., Cheng, J., Herrero, R., Rodriguez, A.C., Kurman, R., Mortel, R.*, et al.* (2005). Hierarchy of resistance to cervical neoplasia mediated by combinations of killer immunoglobulin-like receptor and human leukocyte antigen loci. The Journal of experimental medicine *201*, 1069-1075.

Chaitchik, S., Kabakow, B., De Chabon, A., Jonson, J.J., Bar-Eyal, A., Selzer, G., Feuer, E.J., Keydar, I., and Hizi, A. (1987). Prognostic factors in breast cancer--a pathological and immunological study of patients with stage 1 breast cancer. European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology *13*, 499-504.

Chalmin, F., Ladoire, S., Mignot, G., Vincent, J., Bruchard, M., Remy-Martin, J.P., Boireau, W., Rouleau, A., Simon, B., Lanneau, D.*, et al.* (2010). Membrane-associated Hsp72 from tumor-derived exosomes mediates STAT3-dependent immunosuppressive function of mouse and human myeloid-derived suppressor cells. The Journal of clinical investigation *120*, 457-471.

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

Chang, H.C., Han, L., Jabeen, R., Carotta, S., Nutt, S.L., and Kaplan, M.H. (2009). PU.1 regulates TCR expression by modulating GATA-3 activity. Journal of immunology *183*, 4887-4894.

Chang, H.C., Sehra, S., Goswami, R., Yao, W., Yu, Q., Stritesky, G.L., Jabeen, R., McKinley, C., Ahyi, A.N., Han, L.*, et al.* (2010). The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. Nature immunology *11*, 527-534.

Chang, H.C., Zhang, S., Thieu, V.T., Slee, R.B., Bruns, H.A., Laribee, R.N., Klemsz, M.J., and Kaplan, M.H. (2005). PU.1 expression delineates heterogeneity in primary Th2 cells. Immunity *22*, 693-703.

Chen, J.G., Xia, J.C., Liang, X.T., Pan, K., Wang, W., Lv, L., Zhao, J.J., Wang, Q.J., Li, Y.Q., Chen, S.P.*, et al.* (2011). Intratumoral expression of IL-17 and its prognostic role in gastric adenocarcinoma patients. International journal of biological sciences *7*, 53-60.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K.J., Li, L., Marinos, N., McGrady, G., and Wahl, S.M. (2003). Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. The Journal of experimental medicine *198*, 1875-1886.

Chen, W.C., Lai, Y.H., Chen, H.Y., Guo, H.R., Su, I.J., and Chen, H.H. (2013). Interleukin-17-producing cell infiltration in the breast cancer tumour microenvironment is a poor prognostic factor. Histopathology *63*, 225-233.

Chen, X., Wan, J., Liu, J., Xie, W., Diao, X., Xu, J., Zhu, B., and Chen, Z. (2010). Increased IL-17-producing cells correlate with poor survival and lymphangiogenesis in NSCLC patients. Lung cancer *69*, 348-354.

Chew, V., Chen, J., Lee, D., Loh, E., Lee, J., Lim, K.H., Weber, A., Slankamenac, K., Poon, R.T., Yang, H*., et al.* (2012). Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. Gut *61*, 427-438.

Chung, A.S., Wu, X., Zhuang, G., Ngu, H., Kasman, I., Zhang, J., Vernes, J.M., Jiang, Z., Meng, Y.G., Peale, F.V*., et al.* (2013). An interleukin-17-mediated paracrine network promotes tumor resistance to anti-angiogenic therapy. Nature medicine *19*, 1114-1123.

Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkhurst, C.N., Muratet, M*., et al.* (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. Cell *151*, 289-303.

Clark, R.A., Chong, B., Mirchandani, N., Brinster, N.K., Yamanaka, K., Dowgiert, R.K., and Kupper, T.S. (2006). The vast majority of CLA+ T cells are resident in normal skin. Journal of immunology *176*, 4431-4439.

Clark, W.H., Jr., Elder, D.E., Guerry, D.t., Braitman, L.E., Trock, B.J., Schultz, D., Synnestvedt, M., and Halpern, A.C. (1989). Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. Journal of the National Cancer Institute *81*, 1893-1904.

Clemente, C.G., Mihm, M.C., Jr., Bufalino, R., Zurrida, S., Collini, P., and Cascinelli, N. (1996). Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. Cancer *77*, 1303-1310.

Coley, W.B. (1891). II. Contribution to the Knowledge of Sarcoma. Annals of surgery *14*, 199-220.

Coley, W.B. (1893). The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. Clinical orthopaedics and related research, 3-11.

Cooney, L.A., Towery, K., Endres, J., and Fox, D.A. (2011). Sensitivity and resistance to regulation by IL-4 during Th17 maturation. Journal of immunology *187*, 4440-4450.

Cortelazzi, C., Campanini, N., Ricci, R., and De Panfilis, G. (2013). Inflammed skin harbours Th9 cells. Acta dermato-venereologica *93*, 183-185.

Couch, F.J., Nathanson, K.L., and Offit, K. (2014). Two decades after BRCA: setting paradigms in personalized cancer care and prevention. Science *343*, 1466-1470.

Croce, M., Rigo, V., and Ferrini, S. (2015). IL-21: a pleiotropic cytokine with potential applications in oncology. Journal of immunology research *2015*, 696578.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T*., et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. Nature *421*, 744-748.

Cui, J., Chen, Y., Wang, H.Y., and Wang, R.F. (2014). Mechanisms and pathways of innate immune activation and regulation in health and cancer. Human vaccines & immunotherapeutics *10*, 3270-3285.

Curiel, T.J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J.R., Zhang, L., Burow, M*., et al.* (2004). Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nature medicine *10*, 942-949.

Curotto de Lafaille, M.A., and Lafaille, J.J. (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? Immunity *30*, 626-635.

Curtis, R.E., Rowlings, P.A., Deeg, H.J., Shriner, D.A., Socie, G., Travis, L.B., Horowitz, M.M., Witherspoon, R.P., Hoover, R.N., Sobocinski, K.A.*, et al.* (1997). Solid cancers after bone marrow transplantation. The New England journal of medicine *336*, 897-904.

Danaei, G., Vander Hoorn, S., Lopez, A.D., Murray, C.J., Ezzati, M., and Comparative Risk Assessment collaborating, g. (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. Lancet *366*, 1784-1793.

Dang, E.V., Barbi, J., Yang, H.Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H.R.*, et al.* (2011). Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. Cell *146*, 772-784.

Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.C.*, et al.* (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. Nature immunology *9*, 1347-1355.

Davis, M.R., Zhu, Z., Hansen, D.M., Bai, Q., and Fang, Y. (2015). The role of IL-21 in immunity and cancer. Cancer letters *358*, 107-114.

De Monte, L., Reni, M., Tassi, E., Clavenna, D., Papa, I., Recalde, H., Braga, M., Di Carlo, V., Doglioni, C., and Protti, M.P. (2011). Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. The Journal of experimental medicine *208*, 469-478.

Deaglio, S., Dwyer, K.M., Gao, W., Friedman, D., Usheva, A., Erat, A., Chen, J.F., Enjyoji, K., Linden, J., Oukka, M.*, et al.* (2007). Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression. The Journal of experimental medicine *204*, 1257-1265.

Demaria, S., Volm, M.D., Shapiro, R.L., Yee, H.T., Oratz, R., Formenti, S.C., Muggia, F., and Symmans, W.F. (2001). Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *7*, 3025-3030.

DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. Cancer cell *16*, 91-102.

Denkert, C., Loibl, S., Noske, A., Roller, M., Muller, B.M., Komor, M., Budczies, J., Darb-Esfahani, S., Kronenwett, R., Hanusch, C.*, et al.* (2010). Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *28*, 105-113.

Denkert, C., von Minckwitz, G., Brase, J.C., Sinn, B.V., Gade, S., Kronenwett, R., Pfitzner, B.M., Salat, C., Loi, S., Schmitt, W.D.*, et al.* (2015). Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *33*, 983-991.

Derhovanessian, E., Adams, V., Hahnel, K., Groeger, A., Pandha, H., Ward, S., and Pawelec, G. (2009). Pretreatment frequency of circulating IL-17+ CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. International journal of cancer Journal international du cancer *125*, 1372-1379.

Derre, L., Corvaisier, M., Charreau, B., Moreau, A., Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Jotereau, F., and Gervois, N. (2006). Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells. Journal of immunology *177*, 3100-3107.

Desmedt, C., Haibe-Kains, B., Wirapati, P., Buyse, M., Larsimont, D., Bontempi, G., Delorenzi, M., Piccart, M., and Sotiriou, C. (2008). Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *14*, 5158-5165.

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

Dieci, M.V., Criscitiello, C., Goubar, A., Viale, G., Conte, P., Guarneri, V., Ficarra, G., Mathieu, M.C., Delaloge, S., Curigliano, G.*, et al.* (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *25*, 611-618.

Dieci, M.V., Mathieu, M.C., Guarneri, V., Conte, P., Delaloge, S., Andre, F., and Goubar, A. (2015). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in two phase III randomized adjuvant breast cancer trials. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *26*, 1698-1704.

Dieu-Nosjean, M.C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L.*, et al.* (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *26*, 4410-4417.

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

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K.*, et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. Nature medicine *8*, 793-800.

Drews-Elger, K., Iorns, E., Dias, A., Miller, P., Ward, T.M., Dean, S., Clarke, J., Campion-Flora, A., Rodrigues, D.N., Reis-Filho, J.S.*, et al.* (2014). Infiltrating S100A8+ myeloid cells promote metastatic spread of human breast cancer and predict poor clinical outcome. Breast cancer research and treatment *148*, 41-59.

Du, R., Zhao, H., Yan, F., and Li, H. (2014). IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. Journal of leukocyte biology *96*, 39-48.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nature immunology *3*, 991-998.

Dunn, G.P., Koebel, C.M., and Schreiber, R.D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. Nature reviews Immunology *6*, 836-848.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity *21*, 137-148.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004b). The three Es of cancer immunoediting. Annual review of immunology *22*, 329-360.

Dwyer, K.M., Hanidziar, D., Putheti, P., Hill, P.A., Pommey, S., McRae, J.L., Winterhalter, A., Doherty, G., Deaglio, S., Koulmanda, M.*, et al.* (2010). Expression of CD39 by human peripheral blood CD4+ CD25+ T cells denotes a regulatory memory phenotype. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons *10*, 2410-2420.

Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen stand der karzinomforschung. Ned Tijdschr Geneeskd *5*, 273-290.

Fang, Y., Chen, X., Bai, Q., Qin, C., Mohamud, A.O., Zhu, Z., Ball, T.W., Ruth, C.M., Newcomer, D.R., Herrick, E.J.*, et al.* (2015). IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL. Journal of surgical oncology *111*, 969-974.

Farmer, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D.*, et al.* (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. Oncogene *24*, 4660-4671.

Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A.*, et al.* (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. Nature medicine *14*, 518-527.

Finn, O.J. (2012). Immuno-oncology: understanding the function and dysfunction of the immune system in cancer. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *23 Suppl 8*, viii6-9.

Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. (2003). Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nature immunology *4*, 330-336.

Forbes, E.E., Groschwitz, K., Abonia, J.P., Brandt, E.B., Cohen, E., Blanchard, C., Ahrens, R., Seidu, L., McKenzie, A., Strait, R.*, et al.* (2008). IL-9- and mast cell-mediated intestinal permeability predisposes to oral antigen hypersensitivity. The Journal of experimental medicine *205*, 897-913.

Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J.J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S.*, et al.* (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. The Journal of experimental medicine *183*, 2593-2603.

Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nature reviews Cancer *12*, 298-306.

Fridman, W.H., Remark, R., Goc, J., Giraldo, N.A., Becht, E., Hammond, S.A., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M.C., and Sautes-Fridman, C. (2014). The immune microenvironment: a major player in human cancers. International archives of allergy and immunology *164*, 13-26.

Fu, J., Xu, D., Liu, Z., Shi, M., Zhao, P., Fu, B., Zhang, Z., Yang, H., Zhang, H., Zhou, C.*, et al.* (2007). Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients. Gastroenterology *132*, 2328-2339.

Gabitass, R.F., Annels, N.E., Stocken, D.D., Pandha, H.A., and Middleton, G.W. (2011). Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. Cancer immunology, immunotherapy : CII *60*, 1419-1430.

Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S., and Carbone, D.P. (1998). Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. Blood *92*, 4150-4166.

Gabrilovich, D.I., Ishida, T., Nadaf, S., Ohm, J.E., and Carbone, D.P. (1999). Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *5*, 2963-2970.

Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. Nature reviews Immunology *9*, 162-174.

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

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pages, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P*., et al.* (2006). Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science *313*, 1960-1964.

Gao, Q., Qiu, S.J., Fan, J., Zhou, J., Wang, X.Y., Xiao, Y.S., Xu, Y., Li, Y.W., and Tang, Z.Y. (2007). Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *25*, 2586-2593.

Gao, Q., Wang, X.Y., Qiu, S.J., Zhou, J., Shi, Y.H., Zhang, B.H., and Fan, J. (2011). Tumor stroma reaction-related gene signature predicts clinical outcome in human hepatocellular carcinoma. Cancer science *102*, 1522-1531.

Gerlach, K., Hwang, Y., Nikolaev, A., Atreya, R., Dornhoff, H., Steiner, S., Lehr, H.A., Wirtz, S., Vieth, M., Waisman, A*., et al.* (2014). TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells. Nature immunology *15*, 676-686.

Ghirelli, C., Reyal, F., Jeanmougin, M., Zollinger, R., Sirven, P., Michea, P., Caux, C., Bendriss-Vermare, N., Donnadieu, M.H., Caly, M*., et al.* (2015). Breast Cancer Cell-Derived GM-CSF Licenses Regulatory Th2 Induction by Plasmacytoid Predendritic Cells in Aggressive Disease Subtypes. Cancer research *75*, 2775-2787.

Ghiringhelli, F., Bruchard, M., Chalmin, F., and Rebe, C. (2012). Production of adenosine by ectonucleotidases: a key factor in tumor immunoescape. Journal of biomedicine & biotechnology *2012*, 473712.

Gilliet, M., and Liu, Y.J. (2002). Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. The Journal of experimental medicine *195*, 695-704.

Giovarelli, M., Musiani, P., Garotta, G., Ebner, R., Di Carlo, E., Kim, Y., Cappello, P., Rigamonti, L., Bernabei, P., Novelli, F*., et al.* (1999). A "stealth effect": adenocarcinoma cells engineered to express TRAIL elude tumor-specific and allogeneic T cell reactions. Journal of immunology *163*, 4886-4893.

Giraldo, N.A., Becht, E., Pages, F., Skliris, G., Verkarre, V., Vano, Y., Mejean, A., Saint-Aubert, N., Lacroix, L., Natario, I*., et al.* (2015). Orchestration and Prognostic Significance of Immune Checkpoints in the Microenvironment of Primary and Metastatic Renal Cell Cancer. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *21*, 3031-3040.

Glasmacher, E., Agrawal, S., Chang, A.B., Murphy, T.L., Zeng, W., Vander Lugt, B., Khan, A.A., Ciofani, M., Spooner, C.J., Rutz, S*., et al.* (2012). A genomic regulatory element that directs assembly and function of immune-specific AP-1-IRF complexes. Science *338*, 975-980.

Gobert, M., Treilleux, I., Bendriss-Vermare, N., Bachelot, T., Goddard-Leon, S., Arfi, V., Biota, C., Doffin, A.C., Durand, I., Olive, D*., et al.* (2009). Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer research *69*, 2000-2009.

Goeppert, B., Frauenschuh, L., Zucknick, M., Stenzinger, A., Andrulis, M., Klauschen, F., Joehrens, K., Warth, A., Renner, M., Mehrabi, A*., et al.* (2013). Prognostic impact of tumour-infiltrating immune cells on biliary tract cancer. British journal of cancer *109*, 2665-2674.

Goswami, R., Jabeen, R., Yagi, R., Pham, D., Zhu, J., Goenka, S., and Kaplan, M.H. (2012). STAT6-dependent regulation of Th9 development. Journal of immunology *188*, 968-975.

Goswami, R., and Kaplan, M.H. (2012). Gcn5 is required for PU.1-dependent IL-9 induction in Th9 cells. Journal of immunology *189*, 3026-3033.

Gottlieb, A.B., Matheson, R.T., Menter, A., Leonardi, C.L., Day, R.M., Hu, C., Schafer, P.H., and Krueger, J.G. (2013). Efficacy, tolerability, and pharmacodynamics of apremilast in recalcitrant plaque psoriasis: a phase II open-label study. Journal of drugs in dermatology : JDD *12*, 888-897.

Gran, B., Zhang, G.X., Yu, S., Li, J., Chen, X.H., Ventura, E.S., Kamoun, M., and Rostami, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. Journal of immunology *169*, 7104-7110.

Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. Nature *419*, 734-738.

Gu-Trantien, C., Loi, S., Garaud, S., Equeter, C., Libin, M., de Wind, A., Ravoet, M., Le Buanec, H., Sibille, C., Manfouo-Foutsop, G*., et al.* (2013). CD4(+) follicular helper T cell infiltration predicts breast cancer survival. The Journal of clinical investigation *123*, 2873-2892.

Guery, L., and Hugues, S. (2015). Th17 Cell Plasticity and Functions in Cancer Immunity. BioMed research international *2015*, 314620.

Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L.E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D*., et al.* (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. Science *274*, 1363-1366.

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

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

Harrington, L.E., Hatton, R.D., Mangan, P.R., Turner, H., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Weaver, C.T. (2005). Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nature immunology *6*, 1123-1132.

Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., and Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. Cancer research *66*, 563-570.

Heidelberger, C. (1975). Chemical carcinogenesis. Annual review of biochemistry *44*, 79-121.

Hinz, S., Trauzold, A., Boenicke, L., Sandberg, C., Beckmann, S., Bayer, E., Walczak, H., Kalthoff, H., and Ungefroren, H. (2000). Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. Oncogene *19*, 5477-5486.

Hirahara, K., Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X.P., Kanno, Y., and O'Shea, J.J. (2010). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. Cytokine & growth factor reviews *21*, 425-434.

Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T., and Hirohashi, S. (2006). Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *12*, 5423-5434.

Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. (2006). Soluble MICA in malignant diseases. International journal of cancer Journal international du cancer *118*, 684-687.

Huang, B., Pan, P.Y., Li, Q., Sato, A.I., Levy, D.E., Bromberg, J., Divino, C.M., and Chen, S.H. (2006). 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 research *66*, 1123-1131.

Huang, C.T., Workman, C.J., Flies, D., Pan, X., Marson, A.L., Zhou, G., Hipkiss, E.L., Ravi, S., Kowalski, J., Levitsky, H.I.*, et al.* (2004). Role of LAG-3 in regulatory T cells. Immunity *21*, 503-513.

Ignatiadis, M., Singhal, S.K., Desmedt, C., Haibe-Kains, B., Criscitiello, C., Andre, F., Loi, S., Piccart, M., Michiels, S., and Sotiriou, C. (2012). Gene modules and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer subtypes: a pooled analysis. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *30*, 1996-2004.

Iida, T., Iwahashi, M., Katsuda, M., Ishida, K., Nakamori, M., Nakamura, M., Naka, T., Ojima, T., Ueda, K., Hayata, K.*, et al.* (2011). Tumor-infiltrating CD4+ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. Oncology reports *25*, 1271-1277.

Ikehara, S., Pahwa, R.N., Fernandes, G., Hansen, C.T., and Good, R.A. (1984). Functional T cells in athymic nude mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *81*, 886-888.

Issa-Nummer, Y., Darb-Esfahani, S., Loibl, S., Kunz, G., Nekljudova, V., Schrader, I., Sinn, B.V., Ulmer, H.U., Kronenwett, R., Just, M.*, et al.* (2013). Prospective validation of immunological infiltrate for prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in HER2-negative breast cancer--a substudy of the neoadjuvant GeparQuinto trial. PloS one *8*, e79775.

Ivanov, II, McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor RORgammat directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. Cell *126*, 1121-1133.

Iwakura, Y., and Ishigame, H. (2006). The IL-23/IL-17 axis in inflammation. The Journal of clinical investigation *116*, 1218-1222.

Jabeen, R., Goswami, R., Awe, O., Kulkarni, A., Nguyen, E.T., Attenasio, A., Walsh, D., Olson, M.R., Kim, M.H., Tepper, R.S.*, et al.* (2013). Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network. The Journal of clinical investigation *123*, 4641-4653.

Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. Journal of immunology *183*, 7169-7177.

Jager, E., Ringhoffer, M., Karbach, J., Arand, M., Oesch, F., and Knuth, A. (1996). Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. International journal of cancer Journal international du cancer *66*, 470-476.

Jass, J.R. (1986). Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. Journal of clinical pathology *39*, 585-589.

Johnston, R.J., Poholek, A.C., DiToro, D., Yusuf, I., Eto, D., Barnett, B., Dent, A.L., Craft, J., and Crotty, S. (2009). Bcl6 and Blimp-1 are reciprocal and antagonistic regulators of T follicular helper cell differentiation. Science *325*, 1006-1010.

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

Kaplan, M.H., Hufford, M.M., and Olson, M.R. (2015). The development and in vivo function of T helper 9 cells. Nature reviews Immunology *15*, 295-307.

Kara, E.E., Comerford, I., Bastow, C.R., Fenix, K.A., Litchfield, W., Handel, T.M., and McColl, S.R. (2013). Distinct chemokine receptor axes regulate Th9 cell trafficking to allergic and autoimmune inflammatory sites. Journal of immunology *191*, 1110-1117.

Karja, V., Aaltomaa, S., Lipponen, P., Isotalo, T., Talja, M., and Mokka, R. (2005). Tumour-infiltrating lymphocytes: A prognostic factor of PSA-free survival in patients with local prostate carcinoma treated by radical prostatectomy. Anticancer research *25*, 4435-4438.

Karrison, T.G., Ferguson, D.J., and Meier, P. (1999). Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. Journal of the National Cancer Institute *91*, 80-85.

Kasiske, B.L., Snyder, J.J., Gilbertson, D.T., and Wang, C. (2004). Cancer after kidney transplantation in the United States. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons *4*, 905-913.

Kataoka, T., Schroter, M., Hahne, M., Schneider, P., Irmler, M., Thome, M., Froelich, C.J., and Tschopp, J. (1998). FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. Journal of immunology *161*, 3936-3942.

Kennedy, R., and Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. Immunological reviews *222*, 129-144.

Khong, H.T., Wang, Q.J., and Rosenberg, S.A. (2004). Identification of multiple antigens recognized by tumor-infiltrating lymphocytes from a single patient: tumor escape by antigen loss and loss of MHC expression. Journal of immunotherapy *27*, 184-190.

Kim, I.K., Kim, B.S., Koh, C.H., Seok, J.W., Park, J.S., Shin, K.S., Bae, E.A., Lee, G.E., Jeon, H., Cho, J.*, et al.* (2015). Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein co-stimulation facilitates tumor regression by inducing IL-9-producing helper T cells. Nature medicine *21*, 1010-1017.

Kim, J.S., Sklarz, T., Banks, L.B., Gohil, M., Waickman, A.T., Skuli, N., Krock, B.L., Luo, C.T., Hu, W., Pollizzi, K.N.*, et al.* (2013). Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways. Nature immunology *14*, 611-618.

Kleinewietfeld, M., Manzel, A., Titze, J., Kvakan, H., Yosef, N., Linker, R.A., Muller, D.N., and Hafler, D.A. (2013). Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. Nature *496*, 518-522.

Kluger, H.M., Zito, C.R., Barr, M.L., Baine, M.K., Chiang, V.L., Sznol, M., Rimm, D.L., Chen, L., and Jilaveanu, L.B. (2015). Characterization of PD-L1 Expression and Associated T-cell Infiltrates in Metastatic Melanoma Samples from Variable Anatomic Sites. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *21*, 3052-3060.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature *450*, 903-907.

Kong, S., McBurney, M.W., and Fang, D. (2012). Sirtuin 1 in immune regulation and autoimmunity. Immunology and cell biology *90*, 6-13.

Konjevic, G., Radenkovic, S., Srdic, T., Jurisic, V., Stamatovic, L., and Milovic, M. (2011). Association of decreased NK cell activity and IFNgamma expression with pSTAT dysregulation in breast cancer patients. Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology *16*, 219-226.

Kopp, T., Riedl, E., Bangert, C., Bowman, E.P., Greisenegger, E., Horowitz, A., Kittler, H., Blumenschein, W.M., McClanahan, T.K., Marbury, T.*, et al.* (2015). Clinical improvement in psoriasis with specific targeting of interleukin-23. Nature *521*, 222-226.

Korkolopoulou, P., Kaklamanis, L., Pezzella, F., Harris, A.L., and Gatter, K.C. (1996). Loss of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. British journal of cancer *73*, 148-153.

Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V.K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. Annual review of immunology *27*, 485-517.

Kristensen, V.N., Vaske, C.J., Ursini-Siegel, J., Van Loo, P., Nordgard, S.H., Sachidanandam, R., Sorlie, T., Warnberg, F., Haakensen, V.D., Helland, A.*, et al.* (2012). Integrated molecular profiles of invasive breast tumors and ductal carcinoma in situ (DCIS) reveal differential vascular and interleukin signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *109*, 2802-2807.

Krueger, J., Clark, J.D., Suarez-Farinas, M., Fuentes-Duculan, J., Cueto, I., Wang, C.Q., Tan, H., Wolk, R., Rottinghaus, S.T., Whitley, M.Z.*, et al.* (2016). Tofacitinib attenuates pathologic immune pathways in patients with psoriasis: A randomized phase 2 study. The Journal of allergy and clinical immunology *137*, 1079-1090.

Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L., and Zou, W. (2009). Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. Blood *114*, 357-359.

Kusuda, T., Shigemasa, K., Arihiro, K., Fujii, T., Nagai, N., and Ohama, K. (2005). Relative expression levels of Th1 and Th2 cytokine mRNA are independent prognostic factors in patients with ovarian cancer. Oncology reports *13*, 1153-1158.

Lacey, J.V., Jr., Kreimer, A.R., Buys, S.S., Marcus, P.M., Chang, S.C., Leitzmann, M.F., Hoover, R.N., Prorok, P.C., Berg, C.D., Hartge, P.*, et al.* (2009). Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. BMC cancer *9*, 84.

Ladoire, S., Martin, F., and Ghiringhelli, F. (2011a). Prognostic role of FOXP3+ regulatory T cells infiltrating human carcinomas: the paradox of colorectal cancer. Cancer immunology, immunotherapy : CII *60*, 909-918.

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

Langley, R.G., Elewski, B.E., Lebwohl, M., Reich, K., Griffiths, C.E., Papp, K., Puig, L., Nakagawa, H., Spelman, L., Sigurgeirsson, B.*, et al.* (2014). Secukinumab in plaque psoriasis--results of two phase 3 trials. The New England journal of medicine *371*, 326-338.

Langrish, C.L., Chen, Y., Blumenschein, W.M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J.D., McClanahan, T., Kastelein, R.A., and Cua, D.J. (2005). IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. The Journal of experimental medicine *201*, 233-240.

Leffers, N., Gooden, M.J., de Jong, R.A., Hoogeboom, B.N., ten Hoor, K.A., Hollema, H., Boezen, H.M., van der Zee, A.G., Daemen, T., and Nijman, H.W. (2009). Prognostic significance of tumor-infiltrating T-lymphocytes in primary and metastatic lesions of advanced stage ovarian cancer. Cancer immunology, immunotherapy : CII *58*, 449-459.

Lehmann, B.D., Jovanovic, B., Chen, X., Estrada, M.V., Johnson, K.N., Shyr, Y., Moses, H.L., Sanders, M.E., and Pietenpol, J.A. (2016). Refinement of Triple-Negative Breast Cancer Molecular Subtypes: Implications for Neoadjuvant Chemotherapy Selection. PloS one *11*, e0157368.

Lemoli, R.M., Fortuna, A., Tafuri, A., Grande, A., Amabile, M., Martinelli, G., Ferrari, S., and Tura, S. (1997). Interleukin-9 in human myeloid leukemia cells. Leukemia & lymphoma *26*, 563-573.

Leonard, W.J., and Spolski, R. (2005). Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. Nature reviews Immunology *5*, 688-698.

Li, H., Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., and Cao, X. (2009). Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1. Journal of immunology *182*, 240-249.

Li, P., Spolski, R., Liao, W., Wang, L., Murphy, T.L., Murphy, K.M., and Leonard, W.J. (2012). BATF-JUN is critical for IRF4-mediated transcription in T cells. Nature *490*, 543-546.

Li, Z., Jiang, J., Wang, Z., Zhang, J., Xiao, M., Wang, C., Lu, Y., and Qin, Z. (2008). Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. Cancer research *68*, 8687-8694.

Liang, S.C., Tan, X.Y., Luxenberg, D.P., Karim, R., Dunussi-Joannopoulos, K., Collins, M., and Fouser, L.A. (2006). Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. The Journal of experimental medicine *203*, 2271-2279.

Liao, W., Spolski, R., Li, P., Du, N., West, E.E., Ren, M., Mitra, S., and Leonard, W.J. (2014). Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *111*, 3508-3513.

Lim, H.W., Kang, S.G., Ryu, J.K., Schilling, B., Fei, M., Lee, I.S., Kehasse, A., Shirakawa, K., Yokoyama, M., Schnolzer, M*., et al.* (2015). SIRT1 deacetylates RORgammat and enhances Th17 cell generation. The Journal of experimental medicine *212*, 973.

Limagne, E., Euvrard, R., Thibaudin, M., Rebe, C., Derangere, V., Chevriaux, A., Boidot, R., Vegran, F., Bonnefoy, N., Vincent, J*., et al.* (2016). Accumulation of MDSC and Th17 Cells in Patients with Metastatic Colorectal Cancer Predicts the Efficacy of a FOLFOX-Bevacizumab Drug Treatment Regimen. Cancer research *76*, 5241-5252.

Liu, X., Chen, X., Zhong, B., Wang, A., Wang, X., Chu, F., Nurieva, R.I., Yan, X., Chen, P., van der Flier, L.G*., et al.* (2014). Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. Nature *507*, 513-518.

Lohoff, M., Mittrucker, H.W., Prechtl, S., Bischof, S., Sommer, F., Kock, S., Ferrick, D.A., Duncan, G.S., Gessner, A., and Mak, T.W. (2002). Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *99*, 11808-11812.

Loi, S., Michiels, S., Salgado, R., Sirtaine, N., Jose, V., Fumagalli, D., Kellokumpu-Lehtinen, P.L., Bono, P., Kataja, V., Desmedt, C*., et al.* (2014). Tumor infiltrating lymphocytes are prognostic in triple negative breast cancer and predictive for trastuzumab benefit in early breast cancer: results from the FinHER trial. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *25*, 1544-1550.

Loi, S., Sirtaine, N., Piette, F., Salgado, R., Viale, G., Van Eenoo, F., Rouas, G., Francis, P., Crown, J.P., Hitre, E*., et al.* (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *31*, 860-867.

Longphre, M., Li, D., Gallup, M., Drori, E., Ordonez, C.L., Redman, T., Wenzel, S., Bice, D.E., Fahy, J.V., and Basbaum, C. (1999). Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. The Journal of clinical investigation *104*, 1375-1382.

Lu, Y., Hong, S., Li, H., Park, J., Hong, B., Wang, L., Zheng, Y., Liu, Z., Xu, J., He, J*., et al.* (2012). Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. The Journal of clinical investigation *122*, 4160-4171.

Luen, S., Virassamy, B., Savas, P., Salgado, R., and Loi, S. (2016). The genomic landscape of breast cancer and its interaction with host immunity. Breast *29*, 241-250.

Lv, L., Pan, K., Li, X.D., She, K.L., Zhao, J.J., Wang, W., Chen, J.G., Chen, Y.B., Yun, J.P., and Xia, J.C. (2011). The accumulation and prognosis value of tumor infiltrating IL-17 producing cells in esophageal squamous cell carcinoma. PloS one *6*, e18219.

Ma, L., Xue, H.B., Guan, X.H., Shu, C.M., Zhang, J.H., and Yu, J. (2014). Possible pathogenic role of T helper type 9 cells and interleukin (IL)-9 in atopic dermatitis. Clinical and experimental immunology *175*, 25-31.

MacKie, R.M., Reid, R., and Junor, B. (2003). Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. The New England journal of medicine *348*, 567-568.

Mahmoud, S.M., Lee, A.H., Paish, E.C., Macmillan, R.D., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2012a). The prognostic significance of B lymphocytes in invasive carcinoma of the breast. Breast cancer research and treatment *132*, 545-553.

Mahmoud, S.M., Lee, A.H., Paish, E.C., Macmillan, R.D., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2012b). Tumour-infiltrating macrophages and clinical outcome in breast cancer. Journal of clinical pathology *65*, 159-163.

Mahmoud, S.M., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Grainge, M.J., Lee, A.H., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011a). Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *29*, 1949-1955.

Mahmoud, S.M., Paish, E.C., Powe, D.G., Macmillan, R.D., Lee, A.H., Ellis, I.O., and Green, A.R. (2011b). An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. Breast cancer research and treatment *127*, 99-108.

Maleckar, J.R., and Sherman, L.A. (1987). The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. Journal of immunology *138*, 3873-3876.

Mamessier, E., Sylvain, A., Thibult, M.L., Houvenaeghel, G., Jacquemier, J., Castellano, R., Goncalves, A., Andre, P., Romagne, F., Thibault, G.*, et al.* (2011). Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. The Journal of clinical investigation *121*, 3609-3622.

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

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends in immunology *23*, 549-555.

Marie, J.C., Letterio, J.J., Gavin, M., and Rudensky, A.Y. (2005). TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. The Journal of experimental medicine *201*, 1061-1067.

Marshak-Rothstein, A. (2006). Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. Nature reviews Immunology *6*, 823-835.

Marshak-Rothstein, A., and Rifkin, I.R. (2007). Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. Annual review of immunology *25*, 419-441.

Marth, C., Fiegl, H., Zeimet, A.G., Muller-Holzner, E., Deibl, M., Doppler, W., and Daxenbichler, G. (2004). Interferon-gamma expression is an independent prognostic factor in ovarian cancer. American journal of obstetrics and gynecology *191*, 1598-1605.

Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X.O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N.P., Overwijk, W.W., and Dong, C. (2009). T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. Immunity *31*, 787-798.

Martin, F., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2012). Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity? Trends in molecular medicine *18*, 742-749.

Martinet, L., Garrido, I., Filleron, T., Le Guellec, S., Bellard, E., Fournie, J.J., Rochaix, P., and Girard, J.P. (2011). Human solid tumors contain high endothelial venules: association with T- and B-lymphocyte infiltration and favorable prognosis in breast cancer. Cancer research *71*, 5678-5687.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. Annual review of immunology *12*, 991-1045.

McGeachy, M.J., Bak-Jensen, K.S., Chen, Y., Tato, C.M., Blumenschein, W., McClanahan, T., and Cua, D.J. (2007). TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. Nature immunology *8*, 1390-1397.

Mease, P.J., Genovese, M.C., Greenwald, M.W., Ritchlin, C.T., Beaulieu, A.D., Deodhar, A., Newmark, R., Feng, J., Erondu, N., and Nirula, A. (2014). Brodalumab, an anti-IL17RA monoclonal antibody, in psoriatic arthritis. The New England journal of medicine *370*, 2295-2306.

Medema, J.P., de Jong, J., Peltenburg, L.T., Verdegaal, E.M., Gorter, A., Bres, S.A., Franken, K.L., Hahne, M., Albar, J.P., Melief, C.J.*, et al.* (2001). Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 11515-11520.

Medrek, C., Ponten, F., Jirstrom, K., and Leandersson, K. (2012). The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. BMC cancer *12*, 306.

Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E.P., Shete, S., Naftalis, E.Z., Huth, J.F., Beitsch, P.D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D.*, et al.* (2004). Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *10*, 8152-8162.

Merlo, A., Casalini, P., Carcangiu, M.L., Malventano, C., Triulzi, T., Menard, S., Tagliabue, E., and Balsari, A. (2009). FOXP3 expression and overall survival in breast cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *27*, 1746-1752.

Mesquida, M., Leszczynska, A., Llorenc, V., and Adan, A. (2014). Interleukin-6 blockade in ocular inflammatory diseases. Clinical and experimental immunology *176*, 301-309.

Michel, S., Benner, A., Tariverdian, M., Wentzensen, N., Hoefler, P., Pommerencke, T., Grabe, N., von Knebel Doeberitz, M., and Kloor, M. (2008). High density of FOXP3-positive T cells infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. British journal of cancer *99*, 1867-1873.

Mihm, M.C., Jr., Clemente, C.G., and Cascinelli, N. (1996). Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology *74*, 43-47.

Milne, K., Kobel, M., Kalloger, S.E., Barnes, R.O., Gao, D., Gilks, C.B., Watson, P.H., and Nelson, B.H. (2009). Systematic analysis of immune infiltrates in high-grade serous ovarian cancer reveals CD20, FoxP3 and TIA-1 as positive prognostic factors. PloS one *4*, e6412.

Miracco, C., Mourmouras, V., Biagioli, M., Rubegni, P., Mannucci, S., Monciatti, I., Cosci, E., Tosi, P., and Luzi, P. (2007). Utility of tumour-infiltrating CD25+FOXP3+ regulatory T cell evaluation in

predicting local recurrence in vertical growth phase cutaneous melanoma. Oncology reports *18*, 1115-1122.

Mittal, D., Gubin, M.M., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2014). New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape. Current opinion in immunology *27*, 16-25.

Miyashita, M., Sasano, H., Tamaki, K., Chan, M., Hirakawa, H., Suzuki, A., Tada, H., Watanabe, G., Nemoto, N., Nakagawa, S*., et al.* (2014). Tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in triple-negative breast cancer: its correlation with pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy. Breast cancer research and treatment *148*, 525-534.

Molling, J.W., Kolgen, W., van der Vliet, H.J., Boomsma, M.F., Kruizenga, H., Smorenburg, C.H., Molenkamp, B.G., Langendijk, J.A., Leemans, C.R., von Blomberg, B.M*., et al.* (2005). Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. International journal of cancer Journal international du cancer *116*, 87-93.

Monteleone, I., Rizzo, A., Sarra, M., Sica, G., Sileri, P., Biancone, L., MacDonald, T.T., Pallone, F., and Monteleone, G. (2011). Aryl hydrocarbon receptor-induced signals up-regulate IL-22 production and inhibit inflammation in the gastrointestinal tract. Gastroenterology *141*, 237-248, 248 e231.

Moretta, A. (2002). Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. Nature reviews Immunology *2*, 957-964.

Moseman, E.A., Liang, X., Dawson, A.J., Panoskaltsis-Mortari, A., Krieg, A.M., Liu, Y.J., Blazar, B.R., and Chen, W. (2004). Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells. Journal of immunology *173*, 4433-4442.

Mosmann, T.R., and Coffman, R.L. (1987). Two types of mouse helper T-cell clone Implications for immune regulation. Immunology today *8*, 223-227.

Mougiakakos, D., Johansson, C.C., Trocme, E., All-Ericsson, C., Economou, M.A., Larsson, O., Seregard, S., and Kiessling, R. (2010). Intratumoral forkhead box P3-positive regulatory T cells predict poor survival in cyclooxygenase-2-positive uveal melanoma. Cancer *116*, 2224-2233.

Mukasa, R., Balasubramani, A., Lee, Y.K., Whitley, S.K., Weaver, B.T., Shibata, Y., Crawford, G.E., Hatton, R.D., and Weaver, C.T. (2010). Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage. Immunity *32*, 616-627.

Muller-Hermelink, N., Braumuller, H., Pichler, B., Wieder, T., Mailhammer, R., Schaak, K., Ghoreschi, K., Yazdi, A., Haubner, R., Sander, C.A*., et al.* (2008). TNFR1 signaling and IFN-gamma signaling determine whether T cells induce tumor dormancy or promote multistage carcinogenesis. Cancer cell *13*, 507-518.

Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. Nature reviews Immunology *2*, 933-944.

Murugaiyan, G., Beynon, V., Pires Da Cunha, A., Joller, N., and Weiner, H.L. (2012). IFN-gamma limits Th9-mediated autoimmune inflammation through dendritic cell modulation of IL-27. Journal of immunology *189*, 5277-5283.

Nabholtz, J.M., Abrial, C., Mouret-Reynier, M.A., Dauplat, M.M., Weber, B., Gligorov, J., Forest, A.M., Tredan, O., Vanlemmens, L., Petit, T*., et al.* (2014). Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *25*, 1570-1577.

Nabholtz, J.M., Chalabi, N., Radosevic-Robin, N., Dauplat, M.M., Mouret-Reynier, M.A., Van Praagh, I., Servent, V., Jacquin, J.P., Benmammar, K.E., Kullab, S.*, et al.* (2016). Multicentric neoadjuvant pilot Phase II study of cetuximab combined with docetaxel in operable triple negative breast cancer. International journal of cancer Journal international du cancer *138*, 2274-2280.

Nagaraj, S., Gupta, K., Pisarev, V., Kinarsky, L., Sherman, S., Kang, L., Herber, D.L., Schneck, J., and Gabrilovich, D.I. (2007). Altered recognition of antigen is a mechanism of CD8+ T cell tolerance in cancer. Nature medicine *13*, 828-835.

Nakakubo, Y., Miyamoto, M., Cho, Y., Hida, Y., Oshikiri, T., Suzuoki, M., Hiraoka, K., Itoh, T., Kondo, S., and Katoh, H. (2003). Clinical significance of immune cell infiltration within gallbladder cancer. British journal of cancer *89*, 1736-1742.

Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H., and Ohtani, H. (2001). Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. Cancer research *61*, 5132-5136.

Nalleweg, N., Chiriac, M.T., Podstawa, E., Lehmann, C., Rau, T.T., Atreya, R., Krauss, E., Hundorfean, G., Fichtner-Feigl, S., Hartmann, A.*, et al.* (2015). IL-9 and its receptor are predominantly involved in the pathogenesis of UC. Gut *64*, 743-755.

Nanda, R., Chow, L.Q., Dees, E.C., Berger, R., Gupta, S., Geva, R., Pusztai, L., Pathiraja, K., Aktan, G., Cheng, J.D.*, et al.* (2016). Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *34*, 2460-2467.

Nie, Y., Erion, D.M., Yuan, Z., Dietrich, M., Shulman, G.I., Horvath, T.L., and Gao, Q. (2009). STAT3 inhibition of gluconeogenesis is downregulated by SirT1. Nature cell biology *11*, 492-500.

Nowak, E.C., Weaver, C.T., Turner, H., Begum-Haque, S., Becher, B., Schreiner, B., Coyle, A.J., Kasper, L.H., and Noelle, R.J. (2009). IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. The Journal of experimental medicine *206*, 1653-1660.

Nunez, S., Saez, J.J., Fernandez, D., Flores-Santibanez, F., Alvarez, K., Tejon, G., Ruiz, P., Maldonado, P., Hidalgo, Y., Manriquez, V.*, et al.* (2013). T helper type 17 cells contribute to anti-tumour immunity and promote the recruitment of T helper type 1 cells to the tumour. Immunology *139*, 61-71.

Nurieva, R.I., Chung, Y., Martinez, G.J., Yang, X.O., Tanaka, S., Matskevitch, T.D., Wang, Y.H., and Dong, C. (2009). Bcl6 mediates the development of T follicular helper cells. Science *325*, 1001-1005.

Oh, C.K., Leigh, R., McLaurin, K.K., Kim, K., Hultquist, M., and Molfino, N.A. (2013). A randomized, controlled trial to evaluate the effect of an anti-interleukin-9 monoclonal antibody in adults with uncontrolled asthma. Respiratory research *14*, 93.

Old, L.J., and Boyse, E.A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. Annual review of medicine *15*, 167-186.

Ono, M., Tsuda, H., Shimizu, C., Yamamoto, S., Shibata, T., Yamamoto, H., Hirata, T., Yonemori, K., Ando, M., Tamura, K.*, et al.* (2012). Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. Breast cancer research and treatment *132*, 793-805.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J.C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K.*, et al.* (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. Immunity *13*, 715-725.

Ouyang, W., Kolls, J.K., and Zheng, Y. (2008). The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. Immunity *28*, 454-467.

Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J., and Lenardo, M.J. (2007). CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. Nature immunology *8*, 1353-1362.

Pape, J.W., Liautaud, B., Thomas, F., Mathurin, J.R., St Amand, M.M., Boncy, M., Pean, V., Pamphile, M., Laroche, A.C., and Johnson, W.D., Jr. (1983). Characteristics of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) in Haiti. The New England journal of medicine *309*, 945-950.

Pardoll, D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? Annual review of immunology *21*, 807-839.

Park, H., Li, Z., Yang, X.O., Chang, S.H., Nurieva, R., Wang, Y.H., Wang, Y., Hood, L., Zhu, Z., Tian, Q.*, et al.* (2005). A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nature immunology *6*, 1133-1141.

Park, J., Li, H., Zhang, M., Lu, Y., Hong, B., Zheng, Y., He, J., Yang, J., Qian, J., and Yi, Q. (2014). Murine Th9 cells promote the survival of myeloid dendritic cells in cancer immunotherapy. Cancer immunology, immunotherapy : CII *63*, 835-845.

Parker, J.M., Oh, C.K., LaForce, C., Miller, S.D., Pearlman, D.S., Le, C., Robbie, G.J., White, W.I., White, B., Molfino, N.A.*, et al.* (2011). Safety profile and clinical activity of multiple subcutaneous doses of MEDI-528, a humanized anti-interleukin-9 monoclonal antibody, in two randomized phase 2a studies in subjects with asthma. BMC pulmonary medicine *11*, 14.

Parrot, T., Allard, M., Oger, R., Benlalam, H., Raingeard de la Bletiere, D., Coutolleau, A., Preisser, L., Desfrancois, J., Khammari, A., Dreno, B.*, et al.* (2016). IL-9 promotes the survival and function of human melanoma-infiltrating CD4(+) CD8(+) double-positive T cells. European journal of immunology *46*, 1770-1782.

Penn, I. (1988). Tumors of the immunocompromised patient. Annual review of medicine *39*, 63-73.

Perez, E.A., Ballman, K.V., Tenner, K.S., Thompson, E.A., Badve, S.S., Bailey, H., and Baehner, F.L. (2016). Association of Stromal Tumor-Infiltrating Lymphocytes With Recurrence-Free Survival in the N9831 Adjuvant Trial in Patients With Early-Stage HER2-Positive Breast Cancer. JAMA oncology *2*, 56-64.

Perou, C.M., Sorlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslen, L.A.*, et al.* (2000). Molecular portraits of human breast tumours. Nature *406*, 747-752.

Pestov, N.A., Gerasimova, N.S., Kulaeva, O.I., and Studitsky, V.M. (2015). Structure of transcribed chromatin is a sensor of DNA damage. Science advances *1*, e1500021.

Petersen, R.P., Campa, M.J., Sperlazza, J., Conlon, D., Joshi, M.B., Harpole, D.H., Jr., and Patz, E.F., Jr. (2006). Tumor infiltrating Foxp3+ regulatory T-cells are associated with recurrence in pathologic stage I NSCLC patients. Cancer *107*, 2866-2872.

Pope, J.E., Haraoui, B., Rampakakis, E., Psaradellis, E., Thorne, C., Sampalis, J.S., and Optimization of Adalimumab Trial, I. (2013). Treating to a target in established active rheumatoid arthritis patients receiving a tumor necrosis factor inhibitor: results from a real-world cluster-randomized adalimumab trial. Arthritis care & research *65*, 1401-1409.

Prabhala, R.H., Pelluru, D., Fulciniti, M., Prabhala, H.K., Nanjappa, P., Song, W., Pai, C., Amin, S., Tai, Y.T., Richardson, P.G.*, et al.* (2010). Elevated IL-17 produced by TH17 cells promotes myeloma cell growth and inhibits immune function in multiple myeloma. Blood *115*, 5385-5392.

Prat, A., Bianchini, G., Thomas, M., Belousov, A., Cheang, M.C., Koehler, A., Gomez, P., Semiglazov, V., Eiermann, W., Tjulandin, S.*, et al.* (2014). Research-based PAM50 subtype predictor identifies higher responses and improved survival outcomes in HER2-positive breast cancer in the NOAH study.

Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *20*, 511-521.

Prehn, R.T. (1971). Perspectives on oncogenesis: does immunity stimulate or inhibit neoplasia? Journal of the Reticuloendothelial Society *10*, 1-16.

Purwar, R., Schlapbach, C., Xiao, S., Kang, H.S., Elyaman, W., Jiang, X., Jetten, A.M., Khoury, S.J., Fuhlbrigge, R.C., Kuchroo, V.K.*, et al.* (2012). Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. Nature medicine *18*, 1248-1253.

Pusceddu, S., Prinzi, N., Lo Russo, G., Femia, D., Milione, M., Perrone, F., Tamborini, E., Concas, L., Pulice, I., Vernieri, C.*, et al.* (2017). Rationale and protocol of MetNET-2 trial: Lanreotide Autogel plus metformin in advanced gastrointestinal or lung neuroendocrine tumors. Future oncology.

Raffaghello, L., Lee, C., Safdie, F.M., Wei, M., Madia, F., Bianchi, G., and Longo, V.D. (2008). Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *105*, 8215-8220.

Raffaghello, L., Safdie, F., Bianchi, G., Dorff, T., Fontana, L., and Longo, V.D. (2010). Fasting and differential chemotherapy protection in patients. Cell cycle *9*, 4474-4476.

Rakha, E.A., Aleskandarany, M., El-Sayed, M.E., Blamey, R.W., Elston, C.W., Ellis, I.O., and Lee, A.H. (2009). The prognostic significance of inflammation and medullary histological type in invasive carcinoma of the breast. European journal of cancer *45*, 1780-1787.

Ramming, A., Druzd, D., Leipe, J., Schulze-Koops, H., and Skapenko, A. (2012). Maturation-related histone modifications in the PU.1 promoter regulate Th9-cell development. Blood *119*, 4665-4674.

Ray-Coquard, I., Cropet, C., Van Glabbeke, M., Sebban, C., Le Cesne, A., Judson, I., Tredan, O., Verweij, J., Biron, P., Labidi, I.*, et al.* (2009). Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. Cancer research *69*, 5383-5391.

Redjimi, N., Raffin, C., Raimbaud, I., Pignon, P., Matsuzaki, J., Odunsi, K., Valmori, D., and Ayyoub, M. (2012). CXCR3+ T regulatory cells selectively accumulate in human ovarian carcinomas to limit type I immunity. Cancer research *72*, 4351-4360.

Remark, R., Alifano, M., Cremer, I., Lupo, A., Dieu-Nosjean, M.C., Riquet, M., Crozet, L., Ouakrim, H., Goc, J., Cazes, A.*, et al.* (2013). Characteristics and clinical impacts of the immune environments in colorectal and renal cell carcinoma lung metastases: influence of tumor origin. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *19*, 4079-4091.

Restifo, N.P., Marincola, F.M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J.R., and Rosenberg, S.A. (1996). Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. Journal of the National Cancer Institute *88*, 100-108.

Rivera Vargas, T., Humblin, E., Vegran, F., Ghiringhelli, F., and Apetoh, L. (2017). TH9 cells in anti-tumor immunity. Seminars in immunopathology *39*, 39-46.

Rubinstein, N., Alvarez, M., Zwirner, N.W., Toscano, M.A., Ilarregui, J.M., Bravo, A., Mordoh, J., Fainboim, L., Podhajcer, O.L., and Rabinovich, G.A. (2004). Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. Cancer cell *5*, 241-251.

Rygaard, J., and Povlsen, C.O. (1974). The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. Acta pathologica et microbiologica Scandinavica Section B: Microbiology and immunology *82*, 99-106.

Safdie, F.M., Dorff, T., Quinn, D., Fontana, L., Wei, M., Lee, C., Cohen, P., and Longo, V.D. (2009). Fasting and cancer treatment in humans: A case series report. Aging *1*, 988-1007.

Saggini, A., Chimenti, S., and Chiricozzi, A. (2014). IL-6 as a druggable target in psoriasis: focus on pustular variants. Journal of immunology research *2014*, 964069.

Sakaguchi, S., Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., and Yamaguchi, T. (2009). Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? International immunology *21*, 1105-1111.

Salama, P., Phillips, M., Grieu, F., Morris, M., Zeps, N., Joseph, D., Platell, C., and Iacopetta, B. (2009). Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology *27*, 186-192.

Salgado, R., Denkert, C., Campbell, C., Savas, P., Nuciforo, P., Aura, C., de Azambuja, E., Eidtmann, H., Ellis, C.E., Baselga, J.*, et al.* (2015a). Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Associations With Pathological Complete Response and Event-Free Survival in HER2-Positive Early-Stage Breast Cancer Treated With Lapatinib and Trastuzumab: A Secondary Analysis of the NeoALTTO Trial. JAMA oncology *1*, 448-454.

Salgado, R., Denkert, C., Demaria, S., Sirtaine, N., Klauschen, F., Pruneri, G., Wienert, S., Van den Eynden, G., Baehner, F.L., Penault-Llorca, F.*, et al.* (2015b). The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *26*, 259-271.

Salio, M., Cella, M., Vermi, W., Facchetti, F., Palmowski, M.J., Smith, C.L., Shepherd, D., Colonna, M., and Cerundolo, V. (2003). Plasmacytoid dendritic cells prime IFN-gamma-secreting melanoma-specific CD8 lymphocytes and are found in primary melanoma lesions. European journal of immunology *33*, 1052-1062.

Sallusto, F., Zielinski, C.E., and Lanzavecchia, A. (2012). Human Th17 subsets. European journal of immunology *42*, 2215-2220.

Sarria, E.E., Mattiello, R., Yao, W., Chakr, V., Tiller, C.J., Kisling, J., Tabbey, R., Yu, Z., Kaplan, M.H., and Tepper, R.S. (2014). Atopy, cytokine production, and airway reactivity as predictors of pre-school asthma and airway responsiveness. Pediatric pulmonology *49*, 132-139.

Schaerli, P., Willimann, K., Lang, A.B., Lipp, M., Loetscher, P., and Moser, B. (2000). CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. The Journal of experimental medicine *192*, 1553-1562.

Schafer, P.H., Chen, P., Fang, L., Wang, A., and Chopra, R. (2015). The pharmacodynamic impact of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, on circulating levels of inflammatory biomarkers in patients with psoriatic arthritis: substudy results from a phase III, randomized, placebo-controlled trial (PALACE 1). Journal of immunology research *2015*, 906349.

Schlapbach, C., Gehad, A., Yang, C., Watanabe, R., Guenova, E., Teague, J.E., Campbell, L., Yawalkar, N., Kupper, T.S., and Clark, R.A. (2014). Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. Science translational medicine *6*, 219ra218.

Schmidt, M., Bohm, D., von Torne, C., Steiner, E., Puhl, A., Pilch, H., Lehr, H.A., Hengstler, J.G., Kolbl, H., and Gehrmann, M. (2008). The humoral immune system has a key prognostic impact in node-negative breast cancer. Cancer research *68*, 5405-5413.

Schmitt, E., Germann, T., Goedert, S., Hoehn, P., Huels, C., Koelsch, S., Kuhn, R., Muller, W., Palm, N., and Rude, E. (1994). IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. Journal of immunology *153*, 3989-3996.

Schneeweiss, A., Chia, S., Hickish, T., Harvey, V., Eniu, A., Hegg, R., Tausch, C., Seo, J.H., Tsai, Y.F., Ratnayake, J.*, et al.* (2013). Pertuzumab plus trastuzumab in combination with standard neoadjuvant anthracycline-containing and anthracycline-free chemotherapy regimens in patients with HER2-

positive early breast cancer: a randomized phase II cardiac safety study (TRYPHAENA). Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO *24*, 2278-2284.

Schraml, B.U., Hildner, K., Ise, W., Lee, W.L., Smith, W.A., Solomon, B., Sahota, G., Sim, J., Mukasa, R., Cemerski, S.*, et al.* (2009). The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. Nature *460*, 405-409.

Schreck, S., Friebel, D., Buettner, M., Distel, L., Grabenbauer, G., Young, L.S., and Niedobitek, G. (2009). Prognostic impact of tumour-infiltrating Th2 and regulatory T cells in classical Hodgkin lymphoma. Hematological oncology *27*, 31-39.

Schreiber, R.D., Old, L.J., and Smyth, M.J. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. Science *331*, 1565-1570.

Schreiber, T.H., and Podack, E.R. (2009). A critical analysis of the tumour immunosurveillance controversy for 3-MCA-induced sarcomas. British journal of cancer *101*, 381-386.

Sfanos, K.S., Bruno, T.C., Maris, C.H., Xu, L., Thoburn, C.J., DeMarzo, A.M., Meeker, A.K., Isaacs, W.B., and Drake, C.G. (2008). Phenotypic analysis of prostate-infiltrating lymphocytes reveals TH17 and Treg skewing. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *14*, 3254-3261.

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

Shi, L.Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D.R., and Chi, H. (2011). HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. The Journal of experimental medicine *208*, 1367-1376.

Shimokawara, I., Imamura, M., Yamanaka, N., Ishii, Y., and Kikuchi, K. (1982). Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: an immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. Cancer *49*, 1456-1464.

Shin, M.S., Kim, H.S., Lee, S.H., Park, W.S., Kim, S.Y., Park, J.Y., Lee, J.H., Lee, S.K., Lee, S.N., Jung, S.S.*, et al.* (2001). Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. Cancer research *61*, 4942-4946.

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

Sica, A., Saccani, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van Damme, J., and Mantovani, A. (2000). Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages. Journal of immunology *164*, 762-767.

Snyder, A., Makarov, V., Merghoub, T., Yuan, J., Zaretsky, J.M., Desrichard, A., Walsh, L.A., Postow, M.A., Wong, P., Ho, T.S.*, et al.* (2014). Genetic basis for clinical response to CTLA-4 blockade in melanoma. The New England journal of medicine *371*, 2189-2199.

Sorlie, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S.*, et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *98*, 10869-10874.

Srivastava, M.K., Sinha, P., Clements, V.K., Rodriguez, P., and Ostrand-Rosenberg, S. (2010). Myeloid-derived suppressor cells inhibit T-cell activation by depleting cystine and cysteine. Cancer research *70*, 68-77.

Stassen, M., Schmitt, E., and Bopp, T. (2012). From interleukin-9 to T helper 9 cells. Annals of the New York Academy of Sciences *1247*, 56-68.

Staudt, V., Bothur, E., Klein, M., Lingnau, K., Reuter, S., Grebe, N., Gerlitzki, B., Hoffmann, M., Ulges, A., Taube, C*., et al.* (2010). Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells. Immunity *33*, 192-202.

Stern-Ginossar, N., Gur, C., Biton, M., Horwitz, E., Elboim, M., Stanietsky, N., Mandelboim, M., and Mandelboim, O. (2008). Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. Nature immunology *9*, 1065-1073.

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

Su, X., Ye, J., Hsueh, E.C., Zhang, Y., Hoft, D.F., and Peng, G. (2010). Tumor microenvironments direct the recruitment and expansion of human Th17 cells. Journal of immunology *184*, 1630-1641.

Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. Cell *100*, 655-669.

Takahashi, H., Feuerhake, F., Kutok, J.L., Monti, S., Dal Cin, P., Neuberg, D., Aster, J.C., and Shipp, M.A. (2006). FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *12*, 3265-3271.

Tamiya, T., Ichiyama, K., Kotani, H., Fukaya, T., Sekiya, T., Shichita, T., Honma, K., Yui, K., Matsuyama, T., Nakao, T*., et al.* (2013). Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction. Journal of immunology *191*, 2360-2371.

Tangye, S.G., Ma, C.S., Brink, R., and Deenick, E.K. (2013). The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. Nature reviews Immunology *13*, 412-426.

Tao, H., Mimura, Y., Aoe, K., Kobayashi, S., Yamamoto, H., Matsuda, E., Okabe, K., Matsumoto, T., Sugi, K., and Ueoka, H. (2012). Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. Lung cancer *75*, 95-101.

Teng, M.W., Vesely, M.D., Duret, H., McLaughlin, N., Towne, J.E., Schreiber, R.D., and Smyth, M.J. (2012). Opposing roles for IL-23 and IL-12 in maintaining occult cancer in an equilibrium state. Cancer research *72*, 3987-3996.

Terabe, M., and Berzofsky, J.A. (2004). Immunoregulatory T cells in tumor immunity. Current opinion in immunology *16*, 157-162.

Terabe, M., Park, J.M., and Berzofsky, J.A. (2004). Role of IL-13 in regulation of anti-tumor immunity and tumor growth. Cancer immunology, immunotherapy : CII *53*, 79-85.

Terness, P., Bauer, T.M., Rose, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. (2002). Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. The Journal of experimental medicine *196*, 447-457.

Teschendorff, A.E., Miremadi, A., Pinder, S.E., Ellis, I.O., and Caldas, C. (2007). An immune response gene expression module identifies a good prognosis subtype in estrogen receptor negative breast cancer. Genome biology *8*, R157.

Thibaudin, M., Chaix, M., Boidot, R., Vegran, F., Derangere, V., Limagne, E., Berger, H., Ladoire, S., Apetoh, L., and Ghiringhelli, F. (2016). Human ectonucleotidase-expressing CD25high Th17 cells accumulate in breast cancer tumors and exert immunosuppressive functions. Oncoimmunology *5*, e1055444.

Thomas, L. (1959). In cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. Lawrence HS (ed) Hoeber-Harper: New York, 529-532.

Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2012). Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. Current opinion in immunology *24*, 207-212.

Tosolini, M., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Fredriksen, T., Mauger, S., Bindea, G., Berger, A., Bruneval, P., Fridman, W.H., Pages, F.*, et al.* (2011). Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. Cancer research *71*, 1263-1271.

Tripathi, P., and Agrawal, S. (2006). Non-classical HLA-G antigen and its role in the cancer progression. Cancer investigation *24*, 178-186.

Tzankov, A., Meier, C., Hirschmann, P., Went, P., Pileri, S.A., and Dirnhofer, S. (2008). Correlation of high numbers of intratumoral FOXP3+ regulatory T cells with improved survival in germinal center-like diffuse large B-cell lymphoma, follicular lymphoma and classical Hodgkin's lymphoma. Haematologica *93*, 193-200.

Ubukata, H., Motohashi, G., Tabuchi, T., Nagata, H., Konishi, S., and Tabuchi, T. (2010). Evaluations of interferon-gamma/interleukin-4 ratio and neutrophil/lymphocyte ratio as prognostic indicators in gastric cancer patients. Journal of surgical oncology *102*, 742-747.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. Nature medicine *9*, 1269-1274.

van den Berg, W.B., and Miossec, P. (2009). IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. Nature reviews Rheumatology *5*, 549-553.

van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. Science *254*, 1643-1647.

Vegran, F., Berger, H., Boidot, R., Mignot, G., Bruchard, M., Dosset, M., Chalmin, F., Rebe, C., Derangere, V., Ryffel, B.*, et al.* (2014). The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. Nature immunology *15*, 758-766.

Veldhoen, M., Uyttenhove, C., van Snick, J., Helmby, H., Westendorf, A., Buer, J., Martin, B., Wilhelm, C., and Stockinger, B. (2008). Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. Nature immunology *9*, 1341-1346.

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

Villablanca, E.J., Raccosta, L., Zhou, D., Fontana, R., Maggioni, D., Negro, A., Sanvito, F., Ponzoni, M., Valentinis, B., Bregni, M.*, et al.* (2010). Tumor-mediated liver X receptor-alpha activation inhibits CC chemokine receptor-7 expression on dendritic cells and dampens antitumor responses. Nature medicine *16*, 98-105.

Villarino, A.V., Gallo, E., and Abbas, A.K. (2010). STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. Journal of immunology *185*, 6461-6471.

Vincent, J., Mignot, G., Chalmin, F., Ladoire, S., Bruchard, M., Chevriaux, A., Martin, F., Apetoh, L., Rebe, C., and Ghiringhelli, F. (2010). 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. Cancer research *70*, 3052-3061.

Wada, Y., Nakashima, O., Kutami, R., Yamamoto, O., and Kojiro, M. (1998). Clinicopathological study on hepatocellular carcinoma with lymphocytic infiltration. Hepatology *27*, 407-414.

Wang, A., Pan, D., Lee, Y.H., Martinez, G.J., Feng, X.H., and Dong, C. (2013). Cutting edge: Smad2 and Smad4 regulate TGF-beta-mediated Il9 gene expression via EZH2 displacement. Journal of immunology *191*, 4908-4912.

Wang, J., Zhao, C., Kong, P., Bian, G., Sun, Z., Sun, Y., Guo, L., and Li, B. (2016a). Methylene blue alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating AMPK/SIRT1 signaling pathway and Th17/Treg immune response. Journal of neuroimmunology *299*, 45-52.

Wang, J., Zhao, C., Kong, P., Sun, H., Sun, Z., Bian, G., Sun, Y., and Guo, L. (2016b). Treatment with NAD(+) inhibited experimental autoimmune encephalomyelitis by activating AMPK/SIRT1 signaling pathway and modulating Th1/Th17 immune responses in mice. International immunopharmacology *39*, 287-294.

Wang, L., Yi, T., Kortylewski, M., Pardoll, D.M., Zeng, D., and Yu, H. (2009). IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. The Journal of experimental medicine *206*, 1457-1464.

Wang, T., Niu, G., Kortylewski, M., Burdelya, L., Shain, K., Zhang, S., Bhattacharya, R., Gabrilovich, D., Heller, R., Coppola, D.*, et al.* (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. Nature medicine *10*, 48-54.

Weaver, C.T., Hatton, R.D., Mangan, P.R., and Harrington, L.E. (2007). IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. Annual review of immunology *25*, 821-852.

West, N.R., Kost, S.E., Martin, S.D., Milne, K., Deleeuw, R.J., Nelson, B.H., and Watson, P.H. (2013). Tumour-infiltrating FOXP3(+) lymphocytes are associated with cytotoxic immune responses and good clinical outcome in oestrogen receptor-negative breast cancer. British journal of cancer *108*, 155-162.

White, B., Leon, F., White, W., and Robbie, G. (2009). Two first-in-human, open-label, phase I dose-escalation safety trials of MEDI-528, a monoclonal antibody against interleukin-9, in healthy adult volunteers. Clinical therapeutics *31*, 728-740.

Whiteside, T.L., Schuler, P., and Schilling, B. (2012). Induced and natural regulatory T cells in human cancer. Expert opinion on biological therapy *12*, 1383-1397.

Winerdal, M.E., Marits, P., Winerdal, M., Hasan, M., Rosenblatt, R., Tolf, A., Selling, K., Sherif, A., and Winqvist, O. (2011). FOXP3 and survival in urinary bladder cancer. BJU international *108*, 1672-1678.

Wolf, A.M., Wolf, D., Steurer, M., Gastl, G., Gunsilius, E., and Grubeck-Loebenstein, B. (2003). Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *9*, 606-612.

Wong, M.T., Ong, D.E., Lim, F.S., Teng, K.W., McGovern, N., Narayanan, S., Ho, W.Q., Cerny, D., Tan, H.K., Anicete, R.*, et al.* (2016). A High-Dimensional Atlas of Human T Cell Diversity Reveals Tissue-Specific Trafficking and Cytokine Signatures. Immunity *45*, 442-456.

Wong, M.T., Ye, J.J., Alonso, M.N., Landrigan, A., Cheung, R.K., Engleman, E., and Utz, P.J. (2010). Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21. Immunology and cell biology *88*, 624-631.

Wrzesinski, S.H., Wan, Y.Y., and Flavell, R.A. (2007). Transforming growth factor-beta and the immune response: implications for anticancer therapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research *13*, 5262-5270.

Wu, X., Peng, M., Huang, B., Zhang, H., Wang, H., Huang, B., Xue, Z., Zhang, L., Da, Y., Yang, D.*, et al.* (2013). Immune microenvironment profiles of tumor immune equilibrium and immune escape states of mouse sarcoma. Cancer letters *340*, 124-133.

Xiao, X., Balasubramanian, S., Liu, W., Chu, X., Wang, H., Taparowsky, E.J., Fu, Y.X., Choi, Y., Walsh, M.C., and Li, X.C. (2012). OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. Nature immunology *13*, 981-990.

Xiao, X., Shi, X., Fan, Y., Zhang, X., Wu, M., Lan, P., Minze, L., Fu, Y.X., Ghobrial, R.M., Liu, W*., et al.* (2015). GITR subverts Foxp3(+) Tregs to boost Th9 immunity through regulation of histone acetylation. Nature communications *6*, 8266.

Yamaguchi, R., Tanaka, M., Yano, A., Tse, G.M., Yamaguchi, M., Koura, K., Kanomata, N., Kawaguchi, A., Akiba, J., Naito, Y*., et al.* (2012). Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. Human pathology *43*, 1688-1694.

Yang, X.O., Pappu, B.P., Nurieva, R., Akimzhanov, A., Kang, H.S., Chung, Y., Ma, L., Shah, B., Panopoulos, A.D., Schluns, K.S*., et al.* (2008). T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR alpha and ROR gamma. Immunity *28*, 29-39.

Yang, X.O., Zhang, H., Kim, B.S., Niu, X., Peng, J., Chen, Y., Kerketta, R., Lee, Y.H., Chang, S.H., Corry, D.B*., et al.* (2013). The signaling suppressor CIS controls proallergic T cell development and allergic airway inflammation. Nature immunology *14*, 732-740.

Yang, X.P., Ghoreschi, K., Steward-Tharp, S.M., Rodriguez-Canales, J., Zhu, J., Grainger, J.R., Hirahara, K., Sun, H.W., Wei, L., Vahedi, G*., et al.* (2011). Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. Nature immunology *12*, 247-254.

Yao, W., Zhang, Y., Jabeen, R., Nguyen, E.T., Wilkes, D.S., Tepper, R.S., Kaplan, M.H., and Zhou, B. (2013). Interleukin-9 is required for allergic airway inflammation mediated by the cytokine TSLP. Immunity *38*, 360-372.

Yates, A., Callard, R., and Stark, J. (2004). Combining cytokine signalling with T-bet and GATA-3 regulation in Th1 and Th2 differentiation: a model for cellular decision-making. Journal of theoretical biology *231*, 181-196.

Ye, J., Livergood, R.S., and Peng, G. (2013). The role and regulation of human Th17 cells in tumor immunity. The American journal of pathology *182*, 10-20.

Ye, Z.J., Zhou, Q., Yin, W., Yuan, M.L., Yang, W.B., Xiong, X.Z., Zhang, J.C., and Shi, H.Z. (2012). Differentiation and immune regulation of IL-9-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. American journal of respiratory and critical care medicine *186*, 1168-1179.

Yoon, N.K., Maresh, E.L., Shen, D., Elshimali, Y., Apple, S., Horvath, S., Mah, V., Bose, S., Chia, D., Chang, H.R*., et al.* (2010). Higher levels of GATA3 predict better survival in women with breast cancer. Human pathology *41*, 1794-1801.

Yu, D., Rao, S., Tsai, L.M., Lee, S.K., He, Y., Sutcliffe, E.L., Srivastava, M., Linterman, M., Zheng, L., Simpson, N*., et al.* (2009). The transcriptional repressor Bcl-6 directs T follicular helper cell lineage commitment. Immunity *31*, 457-468.

Yuan, Z.L., Guan, Y.J., Chatterjee, D., and Chin, Y.E. (2005). Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. Science *307*, 269-273.

Zaretsky, J.M., Garcia-Diaz, A., Shin, D.S., Escuin-Ordinas, H., Hugo, W., Hu-Lieskovan, S., Torrejon, D.Y., Abril-Rodriguez, G., Sandoval, S., Barthly, L*., et al.* (2016). Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma. The New England journal of medicine *375*, 819-829.

Zeng, R., Spolski, R., Casas, E., Zhu, W., Levy, D.E., and Leonard, W.J. (2007). The molecular basis of IL-21-mediated proliferation. Blood *109*, 4135-4142.

Zhang, J.P., Yan, J., Xu, J., Pang, X.H., Chen, M.S., Li, L., Wu, C., Li, S.P., and Zheng, L. (2009). Increased intratumoral IL-17-producing cells correlate with poor survival in hepatocellular carcinoma patients. Journal of hepatology *50*, 980-989.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N.*, et al.* (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. The New England journal of medicine *348*, 203-213.

Zhang, Y.L., Li, J., Mo, H.Y., Qiu, F., Zheng, L.M., Qian, C.N., and Zeng, Y.X. (2010). Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. Molecular cancer *9*, 4.

Zhang, Z.J., Zheng, Z.J., Kan, H., Song, Y., Cui, W., Zhao, G., and Kip, K.E. (2011). Reduced risk of colorectal cancer with metformin therapy in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis. Diabetes care *34*, 2323-2328.

Zheng, W., and Flavell, R.A. (1997). The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. Cell *89*, 587-596.

Zhou, Y., Sonobe, Y., Akahori, T., Jin, S., Kawanokuchi, J., Noda, M., Iwakura, Y., Mizuno, T., and Suzumura, A. (2011). IL-9 promotes Th17 cell migration into the central nervous system via CC chemokine ligand-20 produced by astrocytes. Journal of immunology *186*, 4415-4421.

Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A.*, et al.* (2001). Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. Nature medicine *7*, 1339-1346.

RÉSUMÉ

L'échappement des tumeurs à la surveillance du système immunitaire est une des raisons pour lesquelles le cancer parvient à se développer. Un des objectifs de notre équipe consiste à étudier les lymphocytes T $CD4^+$ et leurs rôles dans un contexte de cancer. Mon travail de thèse a eu pour objectif de déterminer si les résultats murins obtenus au laboratoire étaient transposables à l'Homme, et surtout dans le cancer du sein. Nous avons tout d'abord mis en évidence que les lymphocytes Th17 infiltrant les cancers du sein inhibent les fonctions effectrices des lymphocytes T cytotoxiques de manière dépendante des ectonucléotidases. Enfin, nous avons montré qu'une infiltration tumorale riche en cellules Th17 est associée à un moins bon pronostic clinique des patientes atteintes de cancer du sein. Nous avons ensuite eu pour objectif de tenter de limiter la différenciation de ces cellules Th17. Nous avons démontré que l'activation de SIRT1 diminue l'acétylation de STAT3 ce qui perturbe le programme de différenciation de ces cellules. L'activation de SIRT1 *in vivo* limite l'expansion des Th17 et conduit à un ralentissement de la croissance tumorale. Ce concept fut validé chez l'Homme et ouvre donc la possibilité d'association d'agonistes de SIRT1 avec la chimiothérapie. Le dernier projet porte sur les lymphocytes Th9 et leur rôle pronostique dans le cancer du sein. Nous avons mis en évidence que les propriétés effectrices des lymphocytes Th9 humains pouvaient être augmentées par l'IFNα *via* l'activation du facteur de transcription IRF1. Nous avons enfin démontré que l'infiltration tumorale de lymphocytes Th9 était associée au meilleur pronostic des patientes.

Mots clés : Lymphocytes T CD4, cancer du sein, ectonucléotidases, SIRT1, pronostic

ABSTRACT

Tumor escape to immune system surveillance is one of the reasons why human cancer achieves to grow. In my research team, we aim to study CD4 T cell populations and their functions in the context of cancer. My work was precisely to determine if the results obtained in mice could be transposable in humans, in the context of breast cancer. . We first unraveled that tumor infiltrating Th17 cells could inhibit effector and cytotoxic functions of Th1 and CD8 T cells in an ectonucleotidase-dependent manner. Finally, we showed that high tumor infiltration in IL-17^+ cells were significantly associated with a worse clinical prognosis for breast cancer patients. Then, we aim to prevent Th17 cell differentiation. We first established that SIRT1 activation reduces STAT3 acetylation thus limiting Th17 cell differentiation. Activation of SIRT1 limits *in vivo* Th17 cell expansion and leads to the decrease of tumor growth. This concept has been validated in humans and gives the possibility to associate SIRT1 agonists with chemotherapy. The last project concerns the role and the prognosis impact of Th9 lymphocytes in breast cancer. We highlighted that the effector properties of human Th9 cells could be increased by IFNα *via* IRF1 activation. Finally, we attested that the tumor infiltration of Th9 lymphocytes was associated with a better prognosis for breast cancer patients.

Keywords: CD4 T lymphocyte, breast cancer, ectonucleotidases, SIRT1, prognosis