



**HAL**  
open science

# Mise en évidence et étude d'une isoforme alternative du facteur de transcription IRF-1 dans la différenciation lymphocytaire Th1

Antoine Bernard

► **To cite this version:**

Antoine Bernard. Mise en évidence et étude d'une isoforme alternative du facteur de transcription IRF-1 dans la différenciation lymphocytaire Th1. Médecine humaine et pathologie. Université Bourgogne Franche-Comté, 2019. Français. NNT : 2019UBFCI014 . tel-02502728

**HAL Id: tel-02502728**

**<https://theses.hal.science/tel-02502728>**

Submitted on 9 Mar 2020

**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.

UNIVERSITÉ DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ  
INSERM UMR1231

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

**Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté**

Discipline : *Science Vie*

Spécialités : *Immunologie, Biologie cellulaire et moléculaire*

Soutenance publique

Le vendredi 22 Novembre 2019

À DIJON

Par

**Antoine BERNARD**

---

# MISE EN ÉVIDENCE ET ÉTUDE D'UNE ISOFORME ALTERNATIVE DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION IRF1 DANS LA DIFFÉRENCIATION LYMPHOCYTAIRE TH1

---

Directeur de thèse

**Pr. François GHIRINGHELLI**

### Membres du jury :

Dr. Marie-Caroline DIEU-NOSJEAN

Présidente du jury et rapportrice

Dr. Julien MARIE

Rapporteur

Dr. Reini FERNANDEZ DE LUCO

Examinatrice

Dr. Yann GODET

Examinateur

Dr. Romain BOIDOT

Co-encadrant de thèse

Pr. François GHIRINGHELLI

Directeur de thèse



« L'homme de science le sait bien, lui, que seule la science, a pu, au fil des siècles, lui apporter l'horloge pointeuse et le parcmètre automatique sans lesquels il n'est pas de bonheur terrestre possible. »

**Pierre Desproges**

# REMERCIEMENTS

---

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement la Docteure Marie Caroline Dieu-Nosjean et le Docteur Julien Marie pour le temps qu'ils ont consacré à examiner et évaluer ce manuscrit en leur qualité de rapportrice et rapporteur. Je remercie également la Docteure Reini Fernandez de Luco et le Docteur Yann Godet d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Professeur François Ghiringelli, de m'avoir donné l'opportunité de travailler au sein de l'équipe.

Je remercie également le Docteur Romain Boidot de m'avoir formé en stage de Master 2 puis encadré durant ces quatre années de thèse. Même si sur la fin nos échanges se faisaient plus rares, notamment à cause de nos localisations respectives, travailler avec toi a toujours été agréable et j'ai le sentiment que nous avons fait du bon boulot ensemble.

Je remercie aussi la Docteure Frédérique Végran pour sa contribution autour de l'élaboration du papier.

Romain de Mary, je vais être largement moins expansif que tu l'as été à mon égard dans tes remerciements, mais je tiens à te dire combien j'ai aimé partager ces cinq années « franchement sympas » au labo en ta compagnie. Nos délires et autres pétages de câble quotidiens ont été d'un grand soutien au cours de cette épreuve qu'est la thèse. Mouah biographieuh !!! Toutefois, tu fus également d'une grande aide en cytométrie où tu m'as beaucoup appris. J'espère que tu trouveras ce que tu recherches lors de ton futur postdoc et que tu arriveras peu ou prou à avoir davantage confiance en tes capacités. Même si nos horizons divergent, et divergent c'est énorme, j'aimerais que notre relation reste, autant que faire se peut, aussi pérenne que les plasmocytes lorsqu'ils deviennent tout frétilants au contact d'un Tfh, si toutefois ils existent.

Théo alcool au lit, se fût réel plaisir d'évoluer aux côtés d'un scientifique qui au fil des jours s'est avéré être un véritable mentor. Malgré ton lobbying au doux parfum de glyphosate, tes réflexions biologiques appuyées d'études toujours lues et toujours

pertinentes sont de véritables fuites en avant furieusement post-granelliennes de par leur intelligence. À l'image de Romain de Mary, j'espère que nous pourrons rendre pérenne notre relation et que nous partagerons de nouveaux repas arrosés de vins à côté desquels nos bains de bouche resteront bien insipides.

Pierre Marie de Boutanquoi, se fût également un plaisir de partager ces années avec toi. Tu resteras sur cette période un véritable pilier de nos sorties au bar, même si parfois ton appétence naturelle pour la triple Karmeliet a pu te jouer des tours. Comme pour les deux précédents acolytes, j'espère que nous resterons en contact que ce soit au bout d'une corde (d'escalade) ou autour d'une bouteille de vin Bio, aussi dégueulasse soit-il. Merci aussi pour tes conseils pour le clonage qui ont fait de moi un véritable « couteau suisse ».

Je me fends également d'une petite litote dont raffole le bien nommé maître Hibos que j'ai créé en stage de Master 1. Ce fût un honneur de vous côtoyer dans la vie comme dans la liste des auteurs de mon papier. Vos envolées lyriques font de vous le Fabrice Luchini de la science, le Jean Pierre Raffarin de la biologie. Vous avez pas des manips vous ?

Joséphine merci pour ton aide pour la partie humaine du projet. Sans toi certains week-ends à Lille n'auraient peut-être pas été des week-ends à Lille.

Merci beaucoup à toi Fanny pour ta bonne humeur et pour ton aide sur la partie vivo de mon projet. Je te souhaite beaucoup de bonheur à toi et Guilleuuume, ainsi qu'à Chouchou 1 et au futur Chouchou 2. À la prochaine soirée jeux de société que nous ferons ensemble !

Merci à toute l'équipe avec qui ce fût un plaisir d'évoluer durant toutes ces années.

Merci également à tous les membres de l'UMR1231 avec qui j'ai pu être amené à travailler ou encore jouer au football !

J'adresse mes remerciements à ma famille qui m'a permis d'arriver jusqu'ici. Votre soutien et tous ces bons moments passés ensemble ont été d'une grande aide tout au long de mon périple universitaire. Ce sera un immense plaisir pour moi de tous vous retrouver lors de ma soutenance. Merci tout particulièrement à mes parents qui m'ont toujours soutenu et qui m'ont tant apporté.

Enfin merci à toi ma petite Alex. Ton soutien sans faille et tes conseils m'auront beaucoup aidé à affronter les « tâches » auxquelles j'ai eu affaire durant cette fin de thèse. J'espère vivre encore beaucoup d'aventures en ta compagnie peuplées de voyages, de bivouacs en tente, qu'ils soient rustiques ou non, le tout arrosé de Monkey Shoulders sous le soleil ou sous la pluie. J'ai hâte de mettre les voiles avec toi outre Atlantique et de voir ce que l'avenir nous réserve chez les mangeurs de poutine. Il m'est impossible de résumer ici tout ce que tu représentes pour moi. Ton loup.

Ces travaux n'auraient pas pu voir le jour sans le soutien financier de la Ligue contre le cancer et de la fondation Arc.

# RÉSUMÉ

---

Il est maintenant clairement établi que le système immunitaire peut influencer la réponse du cancer au traitement. Cependant, l'influence du microenvironnement tumoral sur les cellules immunitaires n'est pas complètement comprise. Dans ce contexte, l'épissage alternatif est de plus en plus décrit comme affectant la biologie du système immunitaire.

Dans ce travail, nous avons montré que le microenvironnement tumoral, en augmentant les événements d'épissage alternatif, induisait l'expression d'une isoforme alternative du facteur de transcription IRF1 dans les cellules Th1. En outre, nous avons également montré, chez la souris comme chez l'homme, que l'isoforme alternative d'IRF1 altère l'activité transcriptionnelle d'IRF1 sur le promoteur de *Il12rb1*, entraînant une diminution de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des cellules Th1.

Ainsi, l'expression de l'isoforme courte d'IRF1 augmente au sein du microenvironnement tumoral, et bloquer son apparition pourrait potentialiser l'effet anti-tumoral des cellules Th1.



# ABSTRACT

---

It is now clearly established that immune system can affect cancer response to therapy. However, the influence of tumor microenvironment on immune cells is not completely understood. In this respect, alternative splicing is increasingly described to affect immune system biology.

Here, we showed that tumor microenvironment, by increasing alternative splicing events, induced the expression of an alternative isoform of the IRF1 transcription factor in Th1 cells. Furthermore, we also showed, in both mice and humans, that IRF1 alternative isoform alters IRF1 full form transcriptional activity on *Il12rb1* promotor, resulting in decreased IFN- $\gamma$  secretion in Th1 cells.

Thus, the expression of the IRF1-short isoform increases in tumor microenvironment. Prevent this isoform appearance could potentiate Th1 cell antitumor effect.

# SOMMAIRE

---

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>4</b>
<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>7</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>13</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>17</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>18</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>20</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>21</b>
<b>Partie 1. L'épissage alternatif</b> .....	<b>23</b>
1.1 Les différentes étapes de l'épissage .....	23
1.1.1 Transcription.....	23
1.1.2 Maturation .....	23
1.1.3 Épissage .....	25
2.1 Régulation de l'épissage alternatif.....	26
2.1.1 Protéines SR.....	26
2.1.2 Protéines hnRNPs.....	27
2.2.3 Épissage alternatif.....	27
2.2.4 Régulation de l'épissage alternatif par les protéines SR et hnRNPs .....	28
2.2.5 Le cas des protéines se liant à l'ARN de manière tissu-spécifique.....	31
2.2.6 La modification des histones.....	31
2.2.7 La vitesse d'élongation de l'ARN pré-messager.....	31
2.2.8 Contrôle qualité de l'ARN messenger .....	32
2.2.9 Autre source de diversité protéique : les longs ARN non codants .....	32
<b>Partie 2. Activité anti-tumorale des lymphocytes Th1</b> .....	<b>35</b>
2.1 Différenciation des lymphocytes Th1 .....	36
2.1.1 Engagement du TCR.....	37
2.1.2 Rôle du facteur de transcription T-bet.....	40
2.1.3 Rôle du facteur de transcription IRF1 .....	42

2.2 Rôle des cellules Th1 dans la résolution des infections .....	44
2.2.1 Activation des macrophages et des cellules NK .....	44
2.2.2 Activation des lymphocyte T CD8 <sup>+</sup> cytotoxiques .....	46
2.3 Rôles physiopathologiques des lymphocytes Th1 .....	48
2.3.1 Sclérose en plaques .....	48
2.3.2 Autres maladies auto-immunes .....	49
2.4 Activité anti-tumorale des cellules Th1 .....	49
2.4.1 Immunosurveillance et immunoediting .....	49
2.4.2 Lymphocytes Th1 et cancer .....	50
2.4.2.1 Action des cellules Th1 sur la tumeur .....	51
2.4.2.2 Activation d'acteurs de l'immunité innée et acquise .....	52
2.4.2.3 Activation des lymphocytes T CD8 <sup>+</sup> cytotoxiques .....	52
2.5 Immunosuppression des cellules Th1 .....	55
2.5.1 Impact du TGF- $\beta$ dans la différenciation des cellules Th1 .....	55
2.5.1.1 Signalisation induite par le TGF- $\beta$ .....	55
2.5.2 Immunosuppression par les <i>immune checkpoints</i> .....	58
<b>Partie 3. Epissage alternatif : cancer et immunité .....</b>	<b>61</b>
3.1 Epissage alternatif et cancer .....	61
3.1.1 Epissage alternatif de p53 .....	61
3.1.2 Epissage alternatif de Bcl-2 .....	62
3.1.3 Epissage alternatif de CD44 .....	63
3.1.8 Influence du TGF- $\beta$ dans l'épissage alternatif .....	64
3.1.4 Epissage alternatif du VEGF-A .....	66
3.1.5 Mutations d'acteurs du spliceosome .....	66
3.1.6 Mutations de facteurs d'épissage .....	67
3.1.7 Epissage alternatif d'IRF1 .....	68
3.1.8 Impact de l'épigénétique sur l'épissage alternatif et le cancer .....	69
3.2 Epissage alternatif et immunité .....	71
3.2.1 Immunité innée .....	73

3.2.1.1 Rôle du facteur d'épissage SF3A1 .....	73
3.2.1.2 Epissage alternatif de MyD88.....	73
3.2.1.3 Epissage alternatif de TLR4 .....	73
3.2.1.4 Epissage alternatif de NLRP3.....	74
3.2.1.5 Epissage alternatif et maturité des cellules dendritiques.....	75
3.2.2 Immunité acquise .....	75
3.2.2.1 Lymphocytes B .....	75
3.2.2.2. Lymphocytes T.....	77
3.2.2.2.1 Epissage alternatif de CD45 .....	77
HnRNPL .....	78
HnRNPLL.....	79
PSF .....	79
SRSF1 .....	79
3.2.2.2.2 Epissage alternatif de CD44 via Sam68 .....	81
3.2.2.2.3 Epissage alternatif de la protéine MALT1 .....	81
3.2.2.2.4 Épissage alternatif de Foxp3.....	82
3.3 Epissage alternatif et immunothérapie anticancéreuse .....	85
3.3.1 Epissage alternatif et néo-épitopes tumoraux .....	85
3.3.2 Impact de l'épissage alternatif dans les thérapies cellulaires .....	88
<b>Partie 4. Objectifs du travail de thèse .....</b>	<b>89</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>90</b>
Souris.....	91
Différenciation des lymphocytes T CD4+ in vitro .....	91
Souris .....	91
Humain .....	92
Extraction d'ARNm, rétro-transcription, qPCR et PCR standard.....	93
PCR digitale.....	94
ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée) .....	96
Analyse Western Blot (WB).....	96
Clonage.....	97

Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	99
Immunoprécipitation d'ARN .....	100
Transfection de siRNA.....	100
Test luciférase .....	100
Immunofluorescence .....	101
Durée de vie de fluorescence (FLIM & FRET) .....	102
Transduction rétrovirale .....	102
Cytométrie de flux.....	103
Analyse NGS .....	104
Expériences de croissance tumorale .....	105
Analyses statistiques .....	106
<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>107</b>
I. Le microenvironnement tumoral impacte l'épissage alternatif des lymphocytes T CD4+ .....	108
II. Le TGF- $\beta$ affecte l'apparition de l'isoforme alternative <i>Irf1-short</i> .....	114
III. Le facteur d'épissage PSF régule l'épissage alternatif des pré-ARNm d' <i>Irf1</i> .....	118
IV. IRF1-short inhibe la différenciation des cellules Th1 .....	122
V. Une isoforme alternative d'IRF1 existe dans les lymphocytes Th1 humains et module leur activité.....	127
<b>DISCUSSION .....</b>	<b>132</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>141</b>
<b>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>144</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>162</b>
ANNEXE 1 : "Tumor microenvironment impairs Th1 cell differentiation through alternative splicing modifications" .....	163
ANNEXE 2 : "Cleaved Caspase-3 acts as a transcription factor promoting tumorigenesis and resistance to treatment" .....	164
ANNEXE 3 : Listes des communications orales et affichées .....	216

# LISTE DES FIGURES

---

**Figure 1** : Les grandes étapes de l'expression d'un gène (p24).

**Figure 2** : Mécanisme d'épissage (p25)

**Figure 3** : Epissage alternatif (p28).

**Figure 4** : Influence des protéines SR sur l'épissage (p29)

**Figure 5** : Influence des protéines SR dans l'inclusion des introns (p29).

**Figure 6** : Activité inhibitrice de l'épissage des hnRNPs (p30).

**Figure 7** : Différenciation des différents sous-types de T CD4<sup>+</sup> (p35).

**Figure 8** : Signalisations induites par l'engagement du TCR (p37).

**Figure 9** : Co-stimulation par le récepteur membranaire CD28 (p39).

**Figure 10** : Rôle du facteur de transcription T-bet dans la différenciation lymphocytaire Th1 (p41).

**Figure 11** : Boucle d'amplification du signal de l'IL-12 à travers la coopération de T-bet avec IRF1 (p43).

**Figure 12** : Les cellules Th1 aident les macrophages à détruire des bactéries intracellulaires (p44).

**Figure 13** : Coopération entre cellule dendritique, lymphocyte T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (p47).

**Figure 14** : Impact des cellules Th1 dans le pronostic de plusieurs cancers (p50).

**Figure 15** : Activité anti-tumorale des cellules Th1 (p54).

**Figure 16** : Voies de signalisation induites par le TGF- $\beta$  et immunosuppression des cellules Th1 (p57).

**Figure 17** : Structure moléculaire de CD44 (p63).

**Figure 18** : Rôle du TGF- $\beta$  dans l'EMT à travers l'épissage alternatif de CD44 et de TAK1 (p65).

**Figure 19** : Isoformes alternatives du facteur de transcription IRF1 dans le cancer cervical (p68).

**Figure 20** : Impact de l'épigénétique sur l'épissage alternatif dans le cancer du côlon (p70).

**Figure 21** : Evènements d'épissage alternatif dans différentes cellules de l'immunité innée ou acquise (p72).

**Figure 22** : Effet de l'épissage alternatif du domaine LRR de NLRP3 sur l'inflammation induite par les macrophages (p74).

**Figure 23** : Transition de l'isotype IgM à IgD par l'intermédiaire de l'épissage alternatif (p76).

**Figure 24** : ARNm des différentes isoformes de CD45 (p78).

**Figure 25** : Régulation de l'épissage alternatif de CD45 dans les lymphocytes T (p80).

**Figure 26** : L'IL- $\beta$  induit la transdifférenciation des lymphocytes Treg à travers l'épissage alternatif du facteur de transcription Foxp3 (p84).

**Figure 27** : Immunothérapie anti-cancéreuse et néo-épitopes tumoraux issus de l'épissage alternatif (p86).

**Figure 28** : Le microenvironnement tumoral modifie l'épissage alternatif des pré-ARNm des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (p108).

**Figure 29** : Le microenvironnement tumoral modifie l'expression des gènes en lien avec les populations lymphocytaire Th1, Th2, Th17 et Treg (p109).

**Figure 30** : Irf1 subit un épissage alternatif lors d'une différenciation lymphocytaire in vitro mais pas Tbx21 (p110).

**Figure 31** : Irf1 possède une isoforme alternative courte perdant l'exon 7 et incluant l'intron 8 possédant un codon STOP (p111).

**Figure 32** : Irf1-short est stable dans le temps et Th1 spécifique in vitro (p112).

**Figure 33** : Irf1-short est exprimé in vivo et existe au niveau protéique in vitro (p113).

**Figure 34 :** Le microenvironnement tumoral induit l'expression de gènes en lien avec le TGF- $\beta$  (p114).

**Figure 35 :** Le TGF- $\beta$  augmente l'épissage alternatif des pré-ARNm d'Irf1 in vitro (p115).

**Figure 36 :** Le TGF- $\beta$  augmente l'épissage alternatif des pré-ARNm d'Irf1 in vivo (p116).

**Figure 37 :** Les facteurs d'épissage Hnrnpb, Hnrnpf et Psf sont surexprimés dans les cellules CD4+ de tumeurs MC38 (p118).

**Figure 38 :** Les facteurs d'épissage Hnrnpb, Hnrnpf et Psf sont surexprimés dans les cellules Th1 de tumeurs B16-F10 (p119).

**Figure 39 :** L'expression et la présence au niveau nucléaire de PSF augmentent en présence de TGF- $\beta$  (p120).

**Figure 40 :** PSF interagit avec le pré-ARNm d'Irf1 et régule son épissage alternatif (p121).

**Figure 41 :** L'extinction d'Irf1-short par interférence ARN augmente l'expression de l'Il12rb1 et de l'Ifng (p123).

**Figure 42 :** La surexpression d'IRF1-short réprime l'expression de l'Il12rb1 et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des lymphocytes Th1 (p124).

**Figure 43 :** IRF1-short inhibe l'activité transcriptionnelle d'IRF1-full au niveau du promoteur de l'Il12rb1 (p125).

**Figure 44 :** IRF1-short interagit avec IRF1-full (p126).

**Figure 45 :** IRF1 subit un épissage alternatif chez l'Homme à travers l'exclusion de l'exon 7 (p128).

**Figure 46 :** IRF1-short diminue l'expression de l'IL12RB1 et la sécrétion d'IFNG chez l'homme (p129).

**Figure 47 :** Le TGF- $\beta$  et le microenvironnement tumoral augmentent l'épissage alternatif des pré-ARNm d'IRF1 (p130).

**Figure 48 :** Mécanisme d'induction de l'isoforme alternative IRF1-short, et son effet dans la différenciation lymphocytaire Th1 (p134).



**Figure 49** : Isoformes longue (full) et courte (short) d'Irf1 (**p136**).

**Figure 50** : Domaines fonctionnels d'IRF1 (**p139**).

# LISTE DES TABLEAUX

---

**Tableau 1 :** Concentrations des cytokines et anticorps bloquants utilisées pour les différentes différenciations T CD4<sup>+</sup> murine et humaines (p92).

**Tableau 2 :** Séquences des amorces utilisées en qPCR et PCR standard (stdr) (p94).

**Tableau 3 :** Liste des anticorps utilisés pour les Western blot (WB) (p97).

**Tableau 4 :** Liste des amorces et plasmides nécessaires à la réalisation des différents clonages (p98).

**Tableau 5 :** Liste des anticorps et amorces utilisées pour les CHIP (p99).

**Tableau 6 :** Anticorps nécessaire à la réalisation de l'immunofluorescence (p101).

**Tableau 7 :** Liste des anticorps utilisés en cytométrie (p104).

# ABRÉVIATIONS

---

ABCB7 : *ATP binding cassette subfamily B member 7*

ADN : *Acide désoxyribonucléique*

AP-1 : *Activator Protein-1*

ARN : *Acide ribonucléique*

ASC : *Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*

Bak : *Bcl-2 homologous antagonist/killer*

Bax : *Bcl-2-associated X protein*

Bcl-10 : *B-cell lymphoma 10*

Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*

BMP : *Bone Morphogenetic Protein*

CARMA1 : *Caspase-recruitment domain (CARD)-containing membrane associated guanylate kinase protein 1*

CAR-T cells : *Chimeric Antigen Receptor T cells*

CD : *Cluster de différenciation*

CDK6 : *Cycline-dependent kinase 6*

CMH : *Complexe majeur d'histocompatibilité*

Co-Samds : *Common-mediator Smads*

CPA : *Cellule présentatrice de l'antigène*

CTLA-4 : *Cytotoxic T-lymphocyte-Associated protein 4*

CXCL : *Chemokine (C-X-C motif) Ligand*

CXCR : *CXC chemokine receptors*

DAG : *Diacylglycérols*

EA : *Épissage alternatif*

EAE : *Experimental autoimmune encephalomyelitis*

EJC : *Exon junction Complexes*

EOMES : *Eomesodermin*

Erk : *Extracellular signal-Regulated Kinases*

ESE : *Exon Splicing Enhancer*

ETR-3 : *Elav-Type RNA-binding protein 3*

GATA3 : *GATA Binding Protein 3*

GSK3 : *Glycogen synthase kinase 3*

H3K27 : *27th amino acid in Histone H3*

HLX : *H2.0-like homeobox protein*

HnRNP : *Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein*

IFN : *Interféron*

IKK : *I $\kappa$ B Kinase*

IKK $\beta$  : *Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta*

IL : *Interleukine*

IL12R $\beta$ 1 : *Interleukine 12 Receptor  $\beta$ 1*

IP3 : *Inositol Trisphosphate*

IPEX : *Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*

IRAK1 : *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*

IRF1 : *Interferon Regulatory Factor 1*

I-Smad : *Inhibitory Smads*

ISS : *Intron Splicing Silencer*

Itk : *Interleukin-2-Inducible Kinase*

Jmdj3 ou KDM6B : *Lysine demethylase 6B*

JNK : *cJun N-terminal kinase*

KLK2 : *Kallikrein-2*

I'IgM : *Immunoglobine M*

LAT : *Linker for Activation of T cell*

LRR : *Leucine-Rich Repeat*

Ltc : *Lymphocyte T CD8+ cytotoxique*

LTN : lymphocytes T CD4+ naïfs

MALT1 : Mucosa-associated-lymphoid-tissue lymphoma-translocation gene 1

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MDS : Myelodysplastic Syndrome

Mek : MAP Erk Kinase

MORF4 : Mortality Factor on chromosome 4

MRG15 : MORF Related Gene on chromosome 15

mTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

NEK7 : NIMA (Never In Mitosis A)-related Kinase 7

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells)

NFκB : Nuclear Factor-kappa B

NKR : NK Receptor

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

NMD : Nonsense-Mediated Decay

PCBP1 : (Poly(RC) Binding Protein 1

PD-1 : Programmed cell death 1

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

PI3K : Phosphoinositide 3-Kinase

PIP2 : Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PIP3 : Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate

PKCθ : Protein Kinase C theta

PLCγ : Phosphoinositide phospholipase C

PRR : Pattern recognition receptor

PSF : Polypyrimidine tract-binding protein-associated Splicing Factor

PTB : Polypyrimidine Tract-binding Protein

PYD : N-terminal Pyrin Domain

Rbfox2 : RNA-binding complex containing Fox-1 homolog 2

RORγ: RAR-related orphan receptor gamma

ROS : Reactive Oxygen Species

R-Smads : Receptor regulated Smads

RUNX3 : Runt-related transcription factor 3

SETD2 : SET Domain Containing 2

SF3B1 : Splicing Factor 3b subunit 1

Smurf2 : SMad Ubiquitin Regulatory Factors 2

snRNP : Small nuclear ribonucleoprotein

SR : Sérine arginine

SRSF2 : Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

TAK1: TGF-β-Activated kinase 1

T-bet: T-box transcription factor

TCF/LEF : T-Cell-dependent Factor/Lymphoid Enhancer binding Factor

TCR : T Cell Receptor

Tfh : T follicular helper

TGF-β : Transforming Growth Factor β

TGF-βR1 : TGF-β récepteur 1

Th : T helper

TLR : Toll Like Receptor

TNF-α : Tumor Necrosis Factor

TP53 : Tumor Protein 53

TRAF6 : Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6

Treg : T régulateur

TSDR : Treg-Specific Demethylated Region

VEGF : Vascular endothelial growth factor

ZAP70 : Zeta chain Associated Protein kinase 70

Zfp318 : Zinc finger protein 318

---

# INTRODUCTION

---

# Préambule

Il a longtemps été estimé que le génome humain était composé de près de 300 000 gènes. Avec l'avènement des nouvelles technologies de séquençage, il est désormais acquis que nous en détenons un peu plus de 20 000. Cet état de fait peut paraître surprenant au premier abord. En effet, de nombreuses espèces telles que le poisson zèbre ou encore le ver nématode en détiennent tout autant voire plus. Ainsi, sans vouloir faire affront à ces espèces, il existerait donc un paradoxe qui voudrait que le nombre de gènes ne soit pas représentatif de la complexité biologique d'un organisme. Plusieurs mécanismes pouvant répondre à cette problématique ont été découverts, dont l'épissage alternatif des ARN pré-messagers. Ce phénomène permet d'obtenir à partir d'un seul et même gène plusieurs protéines fonctionnelles. Si au moment de la découverte de l'épissage alternatif on estimait qu'environ 10 à 15% des gènes humains produisaient plusieurs transcrits, il est maintenant établi par séquençage ARN que c'est en fait 98% des gènes qui génèrent plusieurs isoformes. Concernant le ver nématode, qui possède à peu près le même nombre de gènes que l'homme, on en compte 25% qui montrent un épissage alternatif. Ce phénomène est donc un important vecteur de diversité transcriptomique puis protéomique, qui décuple la complexité biologique d'un organisme. Il a d'ailleurs été démontré qu'il existait une corrélation positive entre le nombre de types cellulaires au sein d'une espèce et le nombre d'évènements d'épissage. Par ailleurs, la différence de structure et de fonction des isoformes générées par épissage alternatif ajoute encore un nouveau niveau de complexité. Si l'on prend l'exemple du VEGF, facteur de croissance de l'endothélium vasculaire favorisant l'angiogenèse, quand l'isoforme 165 favorise cette dernière, l'isoforme 165b la réprime. En somme, l'épissage alternatif qui met fin au paradigme « un gène, une protéine » amène à revoir la conception même de ce qu'est un gène. Pour appréhender la fonction globale d'un gène au sein d'une cellule ou d'un organisme, il faut explorer les activités des autres isoformes qui peuvent avoir aussi bien un rôle analogue, ou radicalement différent voire opposé vis-à-vis de l'isoforme principale.

L'épissage alternatif confère flexibilité et capacité d'adaptation aux cellules en fonction d'un environnement ou d'un stimulus donné. Dans ce contexte, il a été démontré que l'épissage alternatif est impliqué dans l'homéostasie et la

différenciation des cellules immunitaires et notamment celles de l'immunité acquise. Ces cellules sont subdivisées en deux groupes à savoir les lymphocytes B et les lymphocytes T. Les premiers se différencient au contact d'un antigène en plasmocyte et sécrètent des anticorps afin de combattre les virus ou les bactéries extracellulaires. Les lymphocytes T sont scindés en deux groupes en fonction de l'expression à leur membrane des glycoprotéines CD4 ou CD8. Les lymphocytes T CD8 ou autrement appelés lymphocytes T cytotoxiques, sont capables d'induire la lyse de cellules portant à leur surface un antigène du non soi. Ils sont principalement impliqués dans la lutte contre les virus et sont reconnus comme étant fortement anti-tumoraux. Les lymphocyte T CD4<sup>+</sup> ou *T helper*, permettent d'orchestrer le système immunitaire inné et acquis autour d'une agression donnée. En effet, selon le type de pathogène rencontré, les Th1, Th2 ou Th17 se chargeront de recruter et/ou d'activer les populations immunitaires appropriées pour y faire face. Les lymphocytes T régulateurs sont quant à eux d'une importance capitale pour parer à un éventuel emballement de la machinerie immunitaire, en sécrétant des cytokines immunosuppressives.

À travers les différentes agressions du non-soi auxquelles elles doivent répondre, ces cellules sont amenées à évoluer et à s'adapter dans autant d'environnements différents que peuvent l'être un ganglion, la circulation sanguine ou lymphatique ou même une tumeur. Ainsi l'étude de l'épissage alternatif de ces cellules pourrait amener un nouveau niveau de compréhension du comportement de ces cellules en fonction d'un environnement donné. L'élucidation de ces mécanismes pourrait permettre la création d'outils permettant d'exacerber ou au contraire d'inhiber certaines réactions immunitaires en fonction d'une situation physiopathologique donnée.

# Partie 1. L'épissage alternatif

---

## 1.1 Les différentes étapes de l'épissage

### 1.1.1 Transcription

L'expression d'un gène est un événement finement régulé et contrôlé à plusieurs niveaux. En effet, si les cellules d'un organisme partagent toutes le même génome, l'expression de ces gènes sera variable en fonction du type cellulaire, de l'environnement rencontré ou des différents stimuli auxquelles elles peuvent être exposées. La transcription constitue la première étape de l'expression d'un gène. Celle-ci est sous l'influence d'un promoteur qui précise le site d'initiation de la transcription à son aval. Le promoteur d'un gène est lui-même contrôlé par différents facteurs de transcription variables en fonction du type cellulaire. La transcription qui donne naissance au cœur du noyau au transcrit primaire qu'est l'ARN pré-messager (pré-ARNm) est effectuée par l'ARN polymérase II. Le pré-ARNm subit ensuite plusieurs modifications à ses extrémités visant à sa stabilisation.

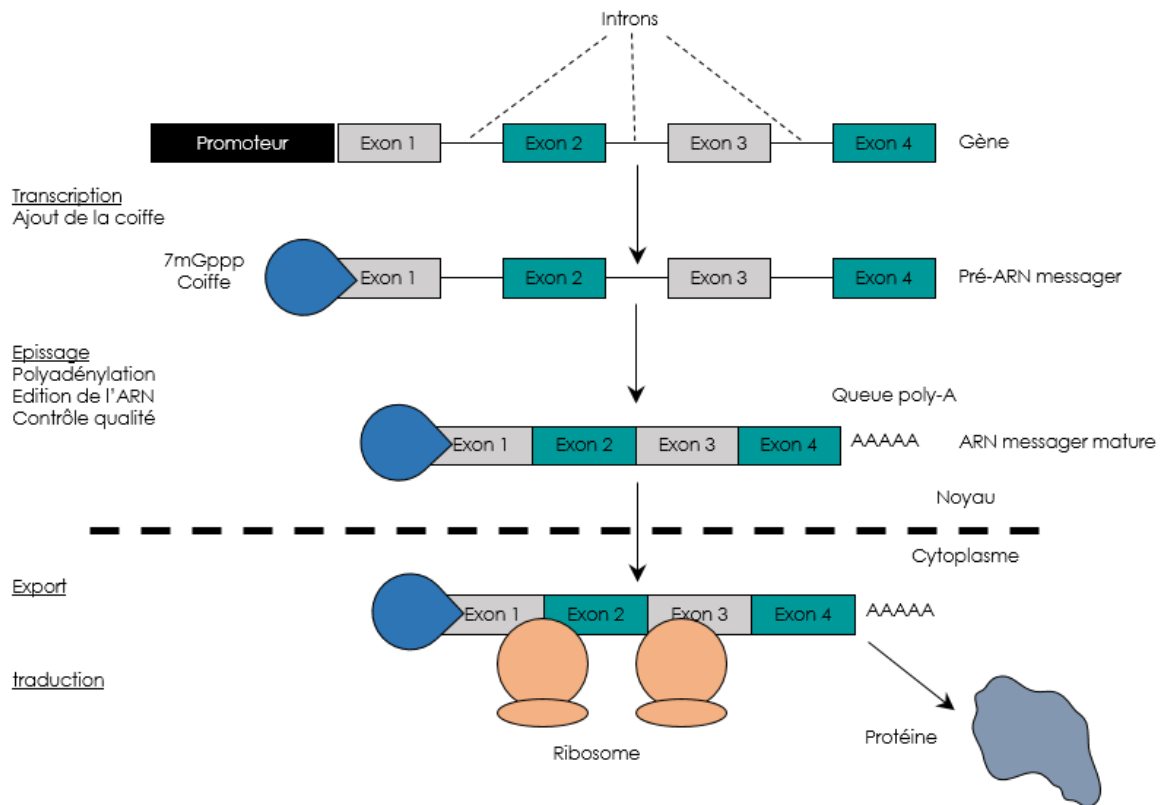
### 1.1.2 Maturation

Il y a ainsi la mise en place d'une coiffe au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN pré-messager. Cette étape est réalisée par l'activité séquentielle d'une 5'-triphosphatase, de la guanylyltransférase et d'une méthyltransférase. Le premier nucléotide de l'ARN est converti en un nucléotide diphosphate par la triphosphatase. La guanylyltransférase permet la fusion de ce nucléotide avec un GMP (Guanidine Mono Phosphate). Finalement, la méthyltransférase ajoute un groupe méthyle sur le GMP pour compléter la structure de la coiffe (Ramanathan et al., 2016) (**Figure 1**).

Il y a également l'ajout d'une queue poly-A par polyadénylation au niveau de l'extrémité 3' du pré-ARNm. Ce mécanisme est rendu possible par clivage au niveau 3' du pré-ARNm. Trois éléments définissent le signal de polyadénylation : l'hexanucléotide AAUAAA constitué de 10 à 30 nucléotides en amont du site de clivage, un élément riche en U ou GU en aval du site de clivage et le site de clivage lui-même.



L'ajout de la queue poly-A a lieu en deux étapes. Dans un premier temps, le transcrit est clivé au niveau du site spécifique de clivage, puis la polyadénylation est réalisée par une Poly(A) polymérase. La polyadénylation augmente la stabilité de l'ARNm (Richard and Manley, 2009) (**Figure 1**).



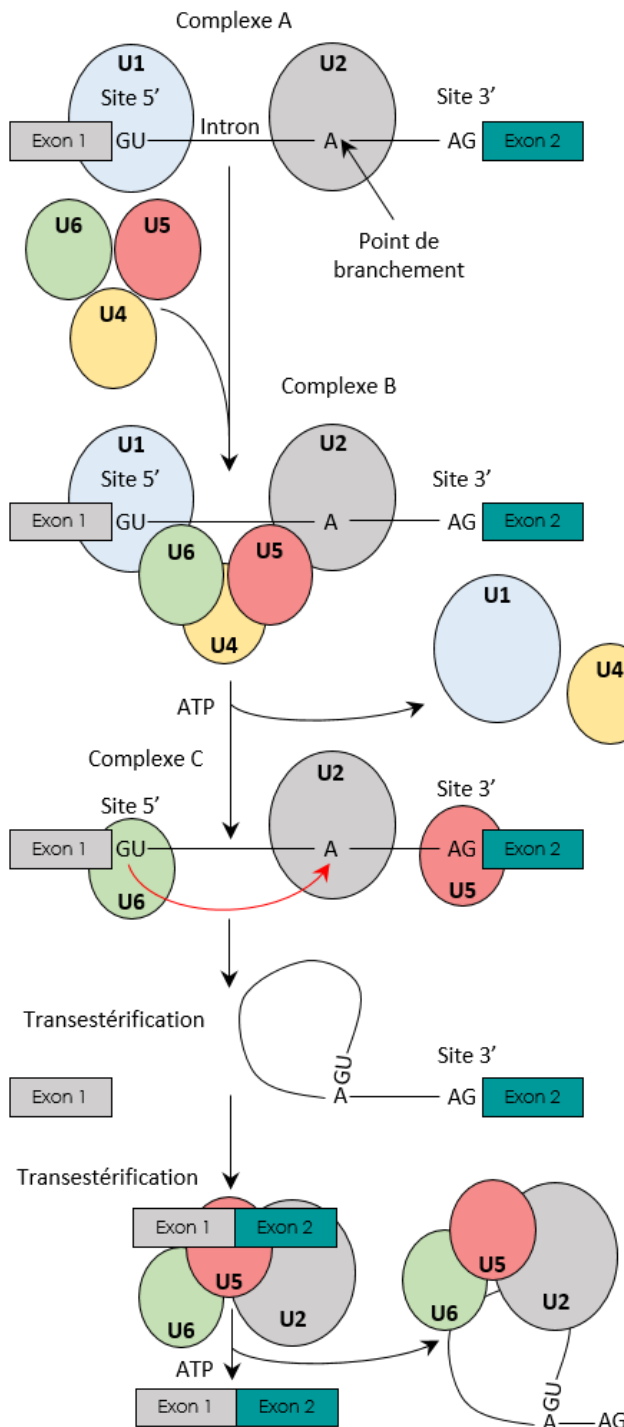
**Figure 1 : Les grandes étapes de l'expression d'un gène.**

La maturation de l'ARN messenger comprend plusieurs étapes. Il y a d'abord la mise en place d'une coiffe au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN pré-messenger. Vient ensuite l'épissage, au cours duquel les introns sont éliminés. Il y a également l'ajout d'une queue poly-A par polyadénylation au niveau de l'extrémité 3' du pré-ARNm. Après son export au niveau cytoplasmique, l'ARNm mature est traduit en protéine.

Ces deux premières étapes permettent de garantir la stabilisation et donc la traduction en protéine des pré-ARNm. S'en suit alors l'étape de maturation des pré-ARNm la plus importante, à savoir l'épissage. Depuis la fin des années 70, il est acquis que les gènes humains sont discontinus. En effet, un gène est constitué d'une alternance de séquences codantes qu'on appelle exons et de séquences non codantes, les introns. Les premiers détiennent l'information génétique nécessaire à la genèse d'une protéine et mesurent environ 150 paires de bases. Quant aux introns, leur taille est 10 fois supérieure, ce qui permet à l'ADN codant des exons d'être

protégé d'éventuelles mutations. Leur élimination intervient lors de l'étape d'épissage où toutes les séquences exoniques codantes sont mises bout à bout pour donner naissance à l'ARN messager mature qui à son tour sera traduit en protéine une fois exporté dans le cytoplasme de la cellule (Shi, 2017).

### 1.1.3 Épissage



**Figure 2 : Mécanisme d'épissage.**

L'épissage du pré-ARNm se fait en plusieurs étapes. Elle intervient grâce à l'action des différents acteurs du spliceosome, les snRNP. U1 se fixe au niveau du site donneur de l'ARN, puis U2 vient se fixer au niveau du site de branchement pour former le complexe A de pré-épissage. Les snRNP U4/U6 et U5 interagissent avec le complexe A pour former le complexe B d'épissage. Ce dernier est ensuite converti en un complexe C actif par un réarrangement conformationnel. Une première réaction de transestérification a lieu entre le site 5' et le site de branchement grâce à U4/6, libérant ainsi l'exon en 5' de l'intron. L'exon est pris en charge par U5 qui le dirige vers l'extrémité 3' de l'intron. Une seconde réaction de transestérification a lieu entre l'extrémité 3' de l'exon libéré et le site accepteur en 3'. Elle entraîne la libération du lasso suite à la liaison entre les deux exons.

Lors de l'épissage, les différents exons que comporte le pré-ARNm sont unis les uns aux autres tout en respectant impérativement le cadre de lecture (**Figure 2**). C'est pourquoi le mécanisme d'épissage doit être extrêmement précis afin de ne pas générer une protéine non conforme. L'épissage est effectué par le spliceosome, une immense machinerie moléculaire comportant plus de 200 protéines.

Ce dernier comporte entre autre 5 ribonucléoprotéines (snRNP) U1, U2, U4/U6 et U5, capables de reconnaître des séquences précises d'un intron. Les frontières entre les exons et les introns sont définies grâce à des sites d'épissage 5' et 3'. Le site 5' également appelé site donneur, est reconnu par U1 qui initie alors le début de l'épissage de l'intron. Une fois que U1 est fixé à l'ARN, U2 vient se fixer au niveau du site de branchement pour former le complexe A de pré-épissage. Les snRNP U4/U6 et U5 interagissent avec le complexe A pour former le complexe B d'épissage. Ce dernier est converti en un complexe C actif par un réarrangement conformationnel. Une première réaction de transestérification a lieu entre le site 5' et le site de branchement grâce à U4/6, libérant ainsi l'exon en 5' de l'intron. L'exon est pris en charge par U5 qui le dirige vers l'extrémité 3' de l'intron. Une seconde réaction de transestérification a lieu entre l'extrémité 3' de l'exon libéré et le site accepteur en 3'. Elle entraîne la libération du lasso suite à la liaison entre les deux exons (Lee and Rio, 2015).

La mise en place de l'épissage nécessite l'intervention de facteurs d'épissage comme les protéines SR (Serine Rich) ou les particules ribonucléoprotéiques hétérogènes nucléaires (hnRNP).

## 2.1 Régulation de l'épissage alternatif

### 2.1.1 Protéines SR

À travers des expériences menées chez la drosophile, il fut découvert que d'autres facteurs étaient tout autant nécessaires à l'épissage que les snRNPs (Kraimer and Maniatis, 1985). Les protéines SR en font partie et sont constituées d'une portion N-terminale analogue à celle des snRNPs qui leur permet d'interagir avec l'ARN. Les protéines SR comportent également une partie C-terminale de taille variable riche en sérine (S) et en arginine (R). Ces protéines sont connues pour favoriser l'épissage. Elles peuvent exercer cette activité de manière exon-dépendante ou indépendante. Pour le premier cas, elles ont besoin d'interagir avec une séquence

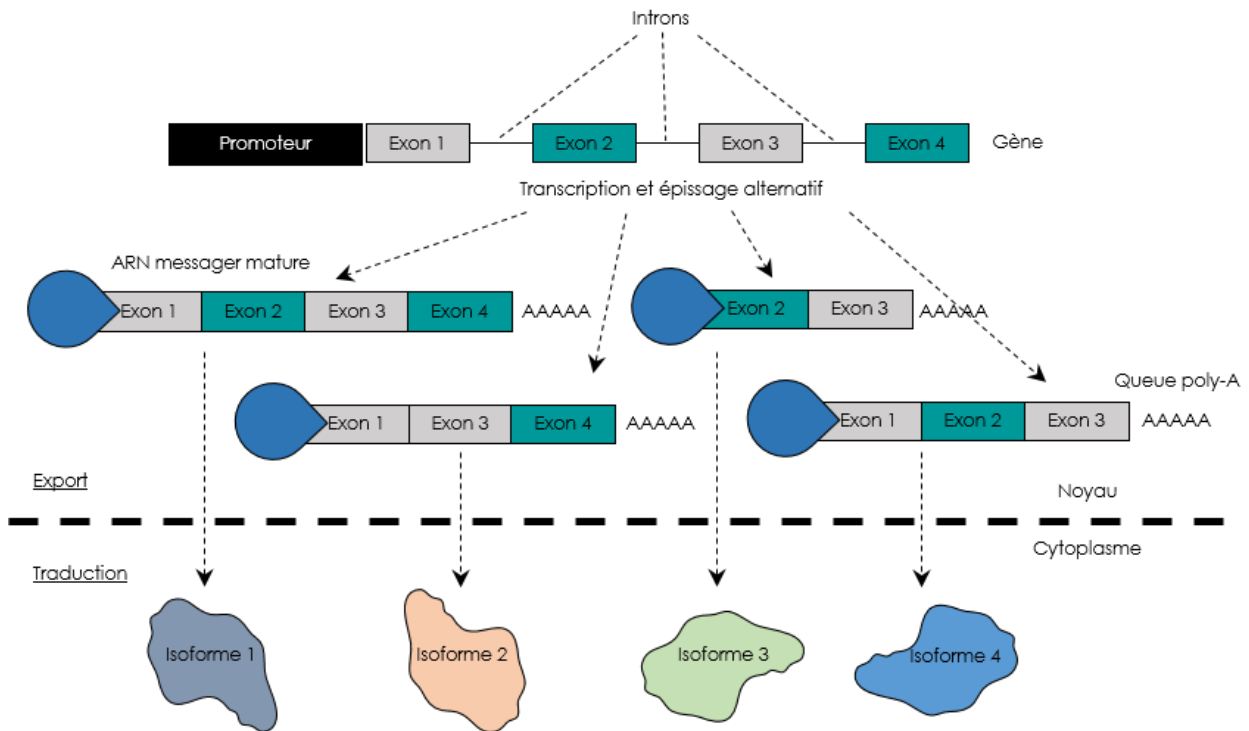
exonique pour exercer leur activité. Pour le second, elles interagissent directement avec les snRNPs du spliceosome notamment avec U1 et U2 pour garantir leur fixation sur les sites d'épissage (**Figure 2**).

### 2.1.2 Protéines hnRNPs

Les ribonucléoprotéiques hétérogènes nucléaires forment une importante famille de protéines se liant à l'ARN. Elles interviennent dans presque toutes les étapes de la production de l'ARNm et même dans sa traduction en protéine (Dreyfuss et al., 1993). Il a en effet été démontré que les hnRNPs pouvaient se fixer au niveau du promoteur d'un gène pour en induire la transcription (Michelotti et al., 1996). De plus, en restant fixées à l'ARNm mature, les hnRNPs sont capables de stabiliser et de favoriser l'export de ce dernier dans le cytoplasme (Yugami et al., 2007). Les hnRNPs peuvent également se fixer au niveau des portions 5' et 3' UTR de l'ARN et contrôlent ainsi l'initiation ou l'inhibition de la traduction de l'ARNm en protéine (Seo et al., 2017). Néanmoins, le rôle le plus connu de ces protéines réside dans leur capacité à induire l'exclusion d'exons, en prévenant la fixation des snRNP U1 et/ou U2 sur le pré-ARNm (Busch and Hertel, 2012).

### 2.2.3 Épissage alternatif

Depuis la découverte de l'épissage alternatif (EA) à la fin des années 70 (Chow et al., 1977), il est admis que l'épissage ne sert pas seulement à éliminer les introns du pré-ARN messenger. On sait maintenant que ce phénomène moléculaire qui concerne 98% des pré-ARNm est aussi un formidable vecteur d'accroissement de la diversité transcriptomique et protéomique. Ainsi par le jeu d'inclusions et d'exclusions d'exon ou d'intron, l'EA permet d'obtenir à partir d'un seul et même gène, plusieurs protéines fonctionnelles ayant leurs activités propres (**Figure 3**).



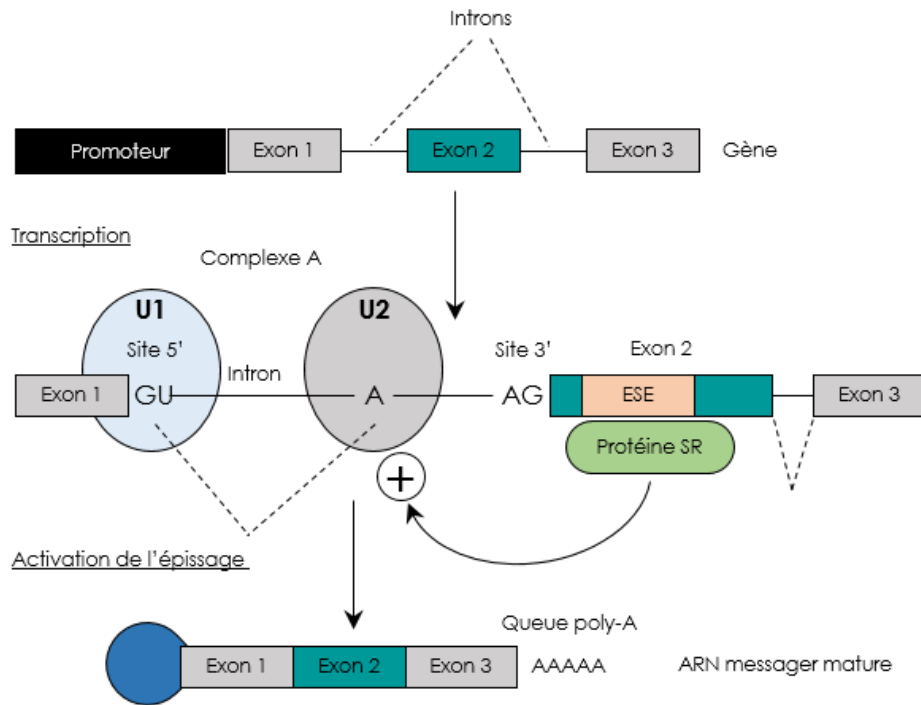
**Figure 3 : Epissage alternatif.**

L'épissage alternatif permet d'accroître la diversité transcriptomique puis protéomique en donnant naissance à plusieurs protéines possédant potentiellement des fonctions différentes.

#### 2.2.4 Régulation de l'épissage alternatif par les protéines SR et hnRNPs

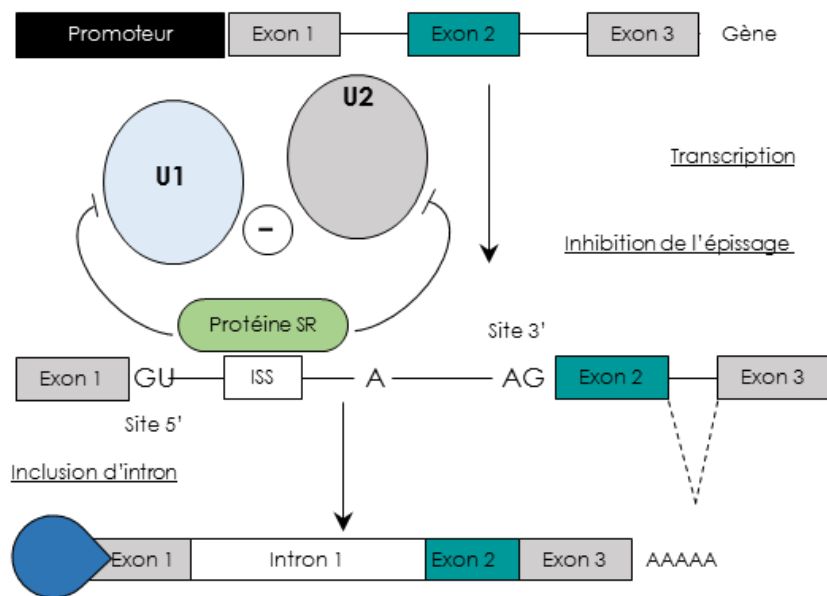
La régulation de l'EA est un mécanisme complexe qui fait appel à plusieurs acteurs. Outre les snRNPs qui régissent le fonctionnement du spliceosome, les protéines se liant à l'ARN que sont les protéines SR et les hnRNPs ont une activité fondamentale dans la régulation de l'EA. Ces protéines agissent en se fixant sur des séquences du pré-ARNm dites « cis régulatrices ». Ces séquences peuvent être exoniques ou introniques.

Concernant les protéines SR, leur action est principalement inclusive. En effet, en venant se fixer au niveau de séquences cis régulatrices appelées ESE pour *Exonic Splicing Enhancer*, les protéines SR favorisent la fixation des snRNPs U1 et U2 qui, on l'a vu auparavant, initient l'épissage (**Figure 4**).



**Figure 4 : Influence des protéines SR sur l'épissage.**

Les protéines SR favorisent l'inclusion des exons du pré-ARNm en régulant positivement la fixation des snRNPs U1 et U2 au niveau des sites donneurs et accepteurs.

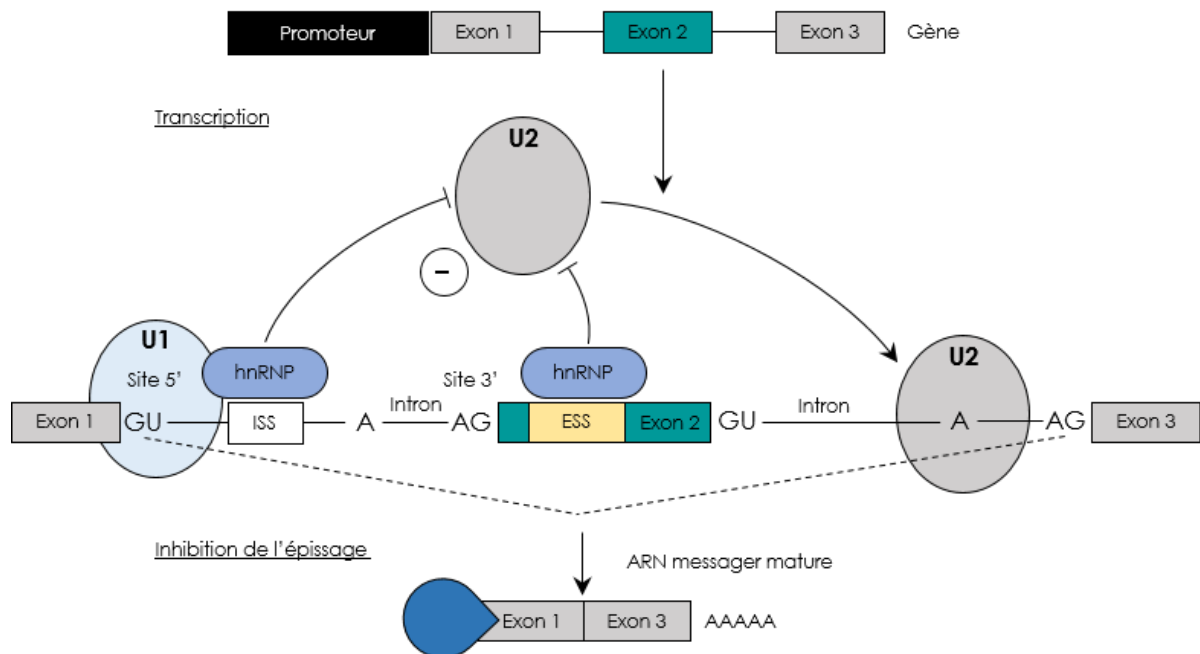


**Figure 5 : Influence des protéines SR dans l'inclusion des introns.**

Lorsqu'une protéine SR se fixe au niveau d'une région cis régulatrice intronique, aussi appelée ISS (Intron Splicing Silencer), celle-ci induit l'inclusion de l'intron concerné.

Cependant lors de circonstances relativement rares, il arrive que les protéines SR aient une activité menant à l'inhibition de la fixation des snRNPs U1 et U2. Cela intervient lorsqu'une protéine SR se fixe avec une haute affinité sur une région cis régulatrice d'un intron que l'on appelle ISS pour *Intron Splicing Silencer*. Il en résulte alors une inclusion d'intron (**Figure 5**).

Les hnRNPs ont quant à elle une activité purement répressive. Elles se fixent au niveau des séquences cis régulatrices inhibitrices que ce soit sur un exon ou un intron. En empêchant la snRNP U2 de se fixer au niveau du point de branchement, on assiste alors à un saut d'exon (**Figure 6**).



**Figure 6 : Activité inhibitrice de l'épissage des hnRNPs.**

Lorsqu'une protéine hnRNP vient se fixer sur une séquence cis régulatrice ISS (*Intron Splicing Silencer*) ou ESS (*Exon Splicing Silencer*) celle-ci prévient la fixation de la snRNP U2 au niveau du point de branchement du pré-ARNm. Il en résulte un saut d'exon puisque c'est le site de branchement en aval qui est alors pris en charge par le spliceosome.

Ces deux types de facteurs d'épissage ayant dans certaines conditions un rôle antagoniste, l'apparition ou non d'un transcrit alternatif dépend parfois du résultat d'une compétition qui s'engage entre protéines SR et hnRNPs. Il a même été démontré récemment que les protéines SR pouvaient elles-mêmes entrer en compétition ou bien coopérer ensemble (Pandit et al., 2013).

### 2.2.5 Le cas des protéines se liant à l'ARN de manière tissu-spécifique

Outre les protéines SR et les hnRNPs, il existe des protéines tissu-spécifiques se liant à l'ARN ne faisant pas partie de ces deux catégories. On trouve par exemple au niveau cérébral la protéine Nova-1 qui régule des événements d'EA aussi importants que les canaux calciques (Allen et al., 2010). Dans les muscles, les facteurs d'épissages Rbfox garantissent le maintien de la masse musculaire d'un individu (Singh et al., 2018).

### 2.2.6 La modification des histones

De nouveaux mécanismes de régulation de l'épissage émergent depuis peu. Il est désormais admis que l'EA du pré-ARNm peut intervenir directement au cours de la transcription d'un gène (Pandya-Jones, 2011). Dans ce contexte, de nouvelles études ont montré l'impact de l'épigénétique sur l'EA. En effet, lors de la transcription, la méthylation des histones de la chromatine entraîne la fixation d'une protéine appelée MRG15 (*MORF (Mortality Factor on chromosome 4) Related Gene on chromosome 15*). Cette dernière recrute alors le facteur d'épissage PTB (*Polypyrimidine Tract-binding Protein*) se liant préférentiellement à des séquences cis régulatrices inhibitrices de l'épissage menant à l'exclusion de l'exon concerné (Luco et al., 2010).

### 2.2.7 La vitesse d'élongation de l'ARN pré-messager

La vitesse avec laquelle l'ARN polymérase II travaille à la formation du pré-ARNm semble également déterminante dans la genèse de transcrits alternatifs. Une vitesse de transcription lente a d'ailleurs été superposée avec une augmentation de saut d'exons (Dujardin et al., 2014). En effet, lorsque la vitesse est lente, des protéines pouvant se lier à l'ARN comme ETR-3 (*Elav-Type RNA-binding protein 3*) ont le temps de venir se fixer à ce dernier avant qu'il ne soit épissé de façon standard.



### 2.2.8 Contrôle qualité de l'ARN messenger

Le contrôle qualité de l'ARNm autrement appelé *Nonsense-Mediated Decay* (NMD), est un mécanisme moléculaire visant à élimination des ARNm détenant au sein de leur séquence un codon stop prématuré. Cela peut se produire lors d'une erreur de transcription, d'une mutation, ou de la formation d'un transcrit alternatif aberrant. Ce contrôle est exercé par des complexes protéiques appelés EJC (*Exon Junction Complex*). Ces derniers viennent se fixer au niveau des jonctions exon-exon de l'ARNm au niveau cytoplasmique. Lorsqu'un codon stop apparaît en amont d'un EJC, un codon stop prématuré est alors détecté et l'ARNm est dégradé (Kurosaki et al., 2019).

Les acteurs entrant en jeu lors de la régulation de l'épissage sont pléthore, il suffit que l'un d'entre eux soit altéré pour que surviennent des événements d'EA aberrants, pouvant mener à des situations pathologiques très variées.

En accroissant considérablement la diversité génétique, l'EA offre aux cellules une grande capacité d'adaptation. Quelles cellules ont plus besoin de ces caractéristiques que celles du système immunitaire ? Ces dernières font partie de celles les plus évoluées chez les vertébrés. De la circulation sanguine au ganglion, du site inflammatoire envahit par les virus ou les bactéries, en passant par la tumeur, ces cellules doivent en permanence s'adapter à des environnements changeants pour répondre de la façon la plus efficace possible.

### 2.2.9 Autre source de diversité protéique : les longs ARN non codants

Depuis le séquençage complet du génome humain en 2003, il est désormais établi que seulement 2% des 3 milliards de bases qui composent l'ADN codent pour des protéines. L'expression de ces gènes est sous l'influence d'une partie des 98% restant notamment grâce aux séquences des promoteurs sur lesquelles les facteurs de transcription viennent se fixer. Néanmoins, grâce à l'avènement des technologies de séquençage ARN, on sait maintenant que le rôle de l'ADN non codant dans la régulation de l'expression des gènes ne s'arrête pas là. En effet, il a rapidement été souligné que de nombreux ARN que l'on pensait inopérants car non traduits en protéines avaient une fonction de poids dans la régulation de l'expression génique. Si l'on connaissait déjà des ARN non codants comme les ARN de transfert permettant

la traduction de l'ARNm en protéine, ou encore les microARN permettant l'inactivation spécifique des ARNm, on sait maintenant que la majorité des ARN non codant font partie d'une autre catégorie à part entière, à savoir celle des long ARN non codants lncARN (Mattick, 2003).

Les lncARN sont décrits comme ayant une taille dépassant 200 nucléotides et pour leur incapacité presque totale à coder pour des protéines. Ils sont aussi définis en fonction de la position de leur séquence correspondante au sein du génome qui peut être soit intragénique, soit intergénique. Les séquences intragéniques des lncARN peuvent par ailleurs chevaucher partiellement et même entièrement un gène. De plus, la transcription de ces ARN peut s'effectuer dans le sens opposé de celle du gène concerné. Il a d'ailleurs été démontré que ces lncARN dits anti-sens, pouvaient ainsi réguler négativement l'expression d'un gène à travers l'activation de cette transcription en sens inverse (Coupland et al., 2016). Il existe aussi des lncARN localisés au niveau intronique mais leur fonction biologique demeure peu connue.

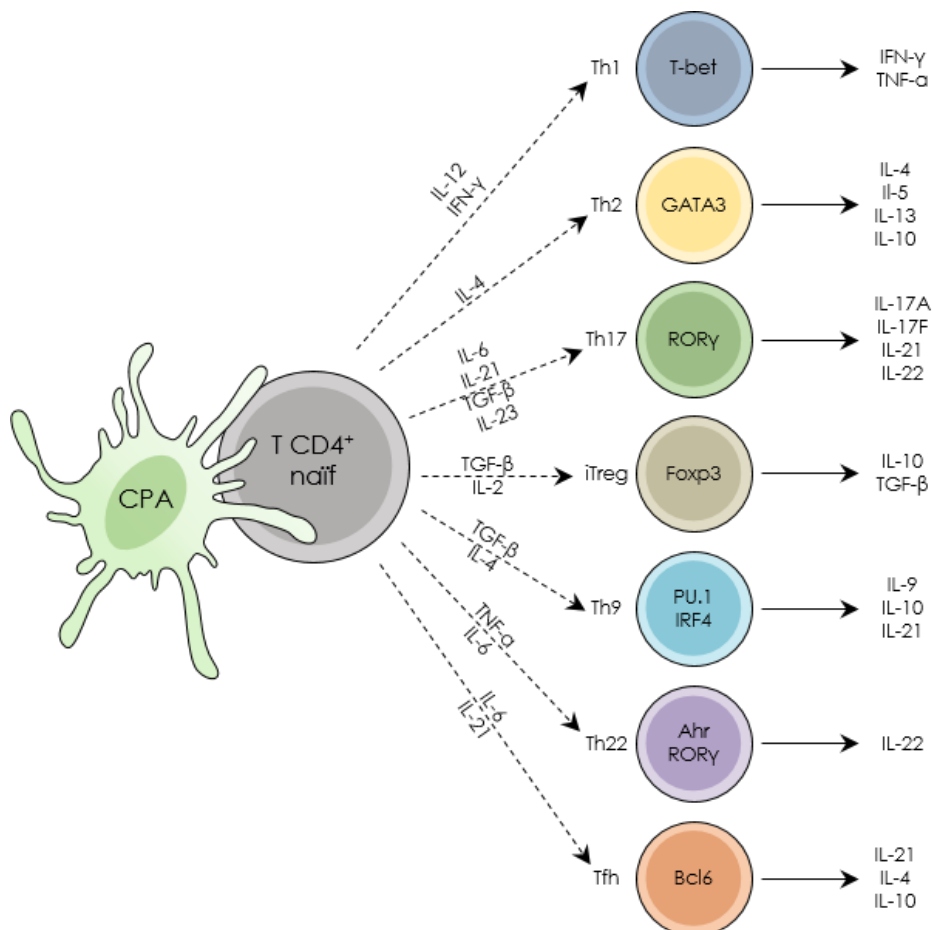
Les lncARN sont principalement connus pour leur capacité à moduler l'expression des gènes à travers différents mécanismes. Ils sont par exemple capables de se lier puis d'activer des méthyltransférases qui vont alors méthyler et par conséquent prévenir l'expression du gène ciblé (Rinn et al., 2007). Ils peuvent également activer ou réprimer la fixation de facteurs de transcription sur leur promoteur cible ou encore moduler la fixation à l'ADN d'acteurs cruciaux de la machinerie transcriptionnelle comme l'ARN polymérase II. En outre, les lncARN ont aussi été décrits comme ayant un rôle protecteur des ARNm. En effet, en interagissant avec les microARN, ils empêchent la destruction des ARNm ciblés par ces derniers (Salmena et al., 2011). Enfin, ils ont aussi été décrits comme ayant un rôle important dans la régulation de l'épissage alternatif en venant se fixer au niveau de sites d'épissage engendrant ainsi à travers le saut d'exons ou autre, l'apparition de variants (Zong et al.).

De plus en plus d'études tendent à montrer le rôle prééminent des lncARN dans de nombreux processus biologiques. À ce propos, on sait maintenant que ceux-ci sont d'une importance cruciale dans le développement du tissu cardiaque. Quand les cellules souches embryonnaires cardiaques sont privées de certains lncARN, elles deviennent incapables de se différencier en cardiomyocytes (Klattenhoff et al., 2013).

Les lncARN viennent souligner toute l'importance de l'étude de la fonction d'un gène avec tout ce qui gravite autour de lui, qu'ils s'agissent de l'épissage alternatif, mais aussi des lncARN, et les interrelations qui peuvent exister entre ces différents phénomènes.

## Partie 2. Activité anti-tumorale des lymphocytes Th1

Une fois sortis du thymus, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs (LTN) migrent vers les organes lymphoïdes secondaires que sont les ganglions ou la rate. C'est ici qu'ils seront exposés à une cellule présentatrice d'antigène comme la cellule dendritique. Il y a alors engagement du TCR (*T Cell Receptor*), qui associé aux signaux de costimulation participe à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. En fonction du type d'agression qu'elle aura rencontré, la cellule dendritique se sera différenciée et sécrètera une cytokine particulière. C'est cet environnement cytokinique qui oriente la différenciation lymphocytaire T CD4<sup>+</sup> en imposant un programme transcriptionnel inhérent à chaque sous-type (**Figure 7**).



**Figure 7 : Différenciation des différents sous-types de T CD4<sup>+</sup> (d'après O'Shea and Paul, 2010).**

Les signaux du TCR (*T Cell Receptor*), de costimulation, et l'environnement cytokinique imposés par la cellule présentatrice de l'antigène (CPA), permettent l'orientation des cellules T CD4<sup>+</sup> en différents sous-types au programme transcriptionnel et aux fonctions différentes.

En 1986, Mosmann et Coffman identifièrent les deux premières populations de lymphocytes T *helper*, les lymphocytes Th1 et les lymphocytes Th2 (Mosmann et al., 1986). Ces derniers, diffèrent de par leur profil sécrétoire ainsi que par leurs fonctions. Au cours des vingt années qui suivirent cette découverte, cinq sous-types de T *helper* furent identifiés. Ainsi, on distingue aujourd'hui 7 sous-types différents à savoir : les Th1, Th2, Th17, iTreg, Th9, Th22 et les Tfh (**Figure 7**). Chaque sous-type T *helper* identifié a son activité propre. Les cellules Th1 ont été découvertes pour leur propension à sécréter de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et contribuent à l'élimination des agents pathogènes intracellulaires. Les cellules Th2 libèrent quant à elles de l'interleukine 4 (IL-4), de l'IL-5 et de l'IL-13 et participent à la lutte contre les helminthes et les agressions extracellulaires (Zhou et al., 2009). Troisième T *helper* identifié, les cellules Th17 mirent un terme au paradigme selon lequel il n'y aurait que deux populations. Ces dernières sont en charge de la clairance des bactéries et des champignons extracellulaires (Zhou et al., 2009). Les lymphocytes T régulateurs (Tregs), ont quant à eux des propriétés immunosuppressives et anti-inflammatoires à travers leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor  $\beta$* ). Les cellules Th22 et Th9 ont récemment été identifiées pour leur libération d'IL-22 et d'IL-9 respectivement (Duhon et al., 2009; Jabeen and Kaplan, 2012). Pour finir, les T folliculaires *helper* (Tfh) ont été isolés au sein des centres germinatifs où ils soutiennent activement les cellules B folliculaires et permettent la mise en place des plasmocytes pérennes (Johnston et al., 2009).

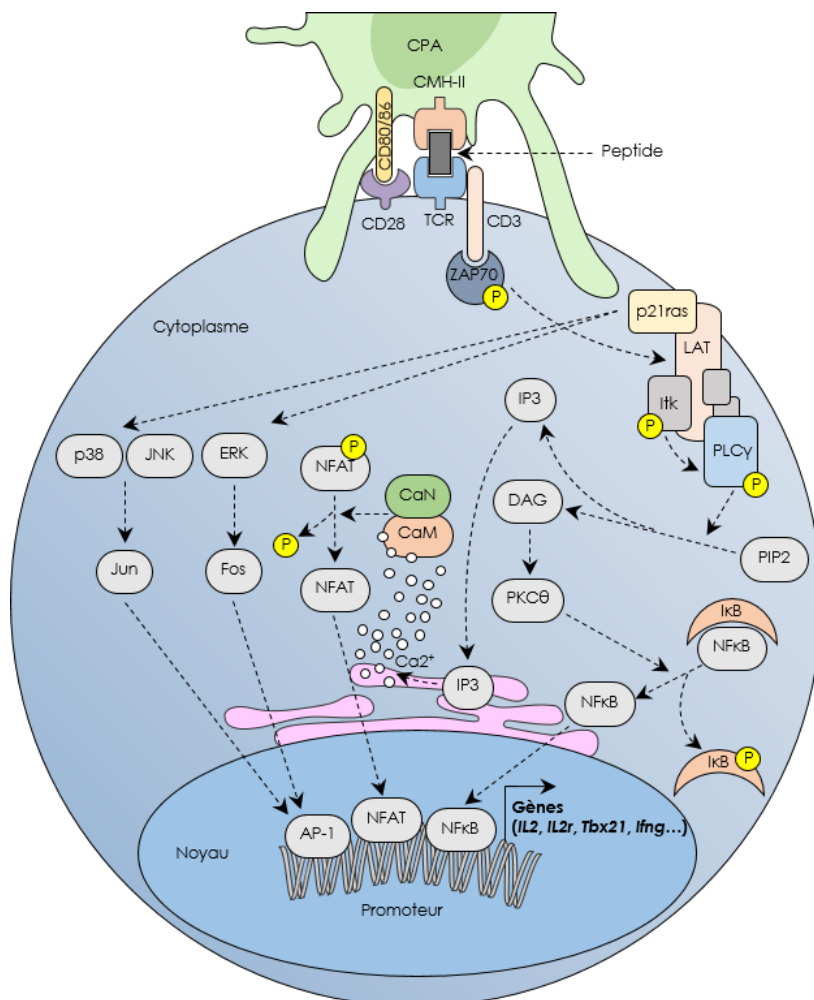
Parmi ces sous-types cellulaires, certains ont été identifiés comme ayant une action activatrice de la réponse immunitaire anti-tumorale et d'autres une action immunosuppressive. Dans ce contexte, les cellules Th1 émergent comme étant celles le plus souvent associées à un bon pronostic lorsqu'elles infiltrant une tumeur (Fridman et al., 2012).

## 2.1 Différenciation des lymphocytes Th1

Lorsqu'une cellule dendritique reconnaît via ses récepteurs de type Toll (TLR pour *Toll Like Receptor*) des motifs moléculaires associés aux pathogènes viraux ou bactériens (PAMP, acronyme pour *Pathogen-Associated Molecular Pattern*), cette dernière s'active et phagocyte la cellule contaminée. Elle entame alors sa différenciation et sa migration vers un organe lymphoïde secondaire, où elle va présenter son antigène à un lymphocyte T naïf et sécréter de l'IL-12.

### 2.1.1 Engagement du TCR

L'interaction entre le TCR et le CMH de classe 2 est une étape cruciale de l'activation lymphocytaire T CD4<sup>+</sup>. Cette étape contribue largement à la survie et à la prolifération cellulaire. Lors de ce processus, le TCR coopère avec la molécule de costimulation CD28 pour activer des voies de signalisation menant à l'activation et à l'expression des protéines AP-1 (Activator protein 1), NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) et NFκB (Nuclear Factor-kappa B).

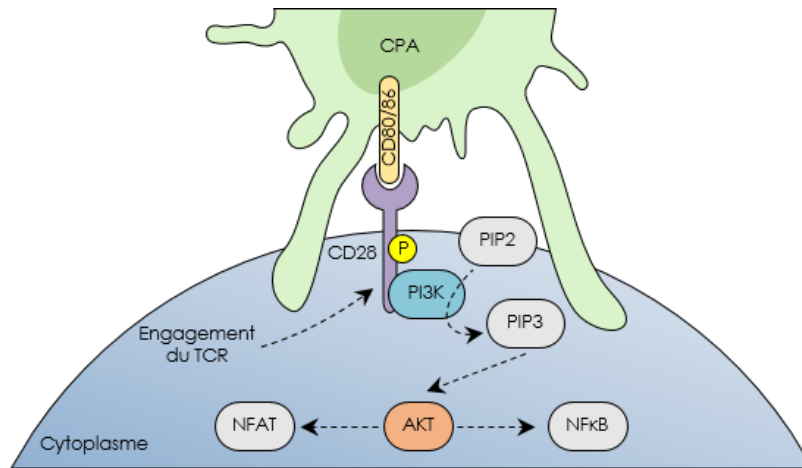


**Figure 8 : Signalisations induites par l'engagement du TCR.**

L'engagement du TCR induit différentes voies de signalisation qui entraînent l'activation de plusieurs facteurs de transcription, notamment les protéines de la famille NFAT, NF-κB et AP-1. La succession de phosphorylation de CD3 et du recrutement de ZAP70 induit l'activation de la protéine adaptatrice LAT. Cette dernière initie ensuite la cascade de signalisation des MAPK p38, JNK et ERK conduisant à l'expression des facteurs AP-1. La protéine LAT recrute également la protéine adaptatrice Itk capable d'activer la PLCγ et permettant ainsi la production d'IP3 et de DAG. L'IP3 induit une sortie d'ions calciques responsables de l'activation de la calcineurine qui induit à son tour l'activation d'NFAT par déphosphorylation. Le DAG active la PKCθ, conduisant à la dégradation des protéines IκB qui sont responsables de la séquestration des dimères de NF-κB dans le cytosol. Dans le noyau, ces facteurs coopèrent afin d'initier l'activation et la prolifération des cellules T.

Dans un premier temps, l'engagement du TCR provoque la phosphorylation de la protéine membranaire CD3. Celle-ci va alors recruter la tyrosine kinase ZAP70 (*Zeta chain Associated Protein kinase 70*) qui est alors phosphorylée. Cette dernière va phosphoryler à son tour la protéine adaptatrice LAT (*Linker for Activation of T cell*). Celle-ci forme un point d'ancrage pour de nombreuses protéines telles que p21ras, Itk, ou encore PLC $\gamma$  (Phosphoinositide phospholipase C  $\gamma$ ). P21ras induit la cascade de signalisation de la voie des MAP-kinases, à travers l'activation de Mek (*MAP Erk Kinase*) qui va à son tour activer par phosphorylation les kinases, Erk (*Extracellular signal-Regulated Kinases*), p38 et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*). Il en résulte l'activation des protéines Fos et Jun qui ensemble forment le facteur de transcription AP-1 (*Activator Protein-1*). D'autre part, le complexe protéique organisé autour de LAT comprend aussi la kinase Itk (*Interleukin-2-Inducible Kinase*). Une fois activée par ZAP70 et LAT, celle-ci phosphoryle à son tour PLC $\gamma$  (Phosphoinositide phospholipase C) qui s'active et clive le phospholipide membranaire PIP2 (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en IP3 (Inositol trisphosphate) et DAG (Diacylglycérols). L'IP3 diffuse alors jusqu'au réticulum endoplasmique ce qui entraîne une libération massive d'ions calcium. On parle alors de flash calcique cytoplasmique. La calmoduline se lie au calcium et active la calcineurine qui à son tour déphosphoryle et par là-même active le facteur de transcription NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*). Le DAG libéré précédemment active quant à lui la PKC $\theta$  (*Protein Kinase C theta*). Cette dernière active les kinases IKK (I $\kappa$ B Kinase) qui vont phosphoryler I $\kappa$ B ce qui provoque la libération du facteur de transcription NF $\kappa$ B (*Nuclear Factor-kappa B*) (**Figure 8**).

En potentialisant le signal du TCR, la molécule de costimulation CD28 est aussi importante dans l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Lors de l'engagement du TCR, la portion intracytoplasmique de CD28 est phosphorylée. Cela engendre le recrutement de la PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) qui va phosphoryler le PIP2 membranaire en PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate). Le PIP3 va alors recruter les kinases Itk et PLC $\gamma$  décrites ci-dessus et AKT. Cette dernière est impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire et renforce l'activation des facteurs de transcription NF $\kappa$ B et NFAT (**Figure 9**).



**Figure 9 : Co-stimulation par le récepteur membranaire CD28.**

Le recrutement de la PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase) après l'engagement de la protéine membranaire CD28 avec CD80/86 provoque la phosphorylation du PIP2 membranaire en PIP3 (Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate). Le PIP3 va alors recruter les kinases I $\kappa$ k et PLC $\gamma$  et AKT. Cette dernière est impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire et active les facteurs de transcription NF $\kappa$ B et NFAT.

La perturbation de ce phénomène de signalisation complexe peut engendrer des défauts de différenciation lymphocytaire Th1. En effet, il a été démontré qu'en utilisant un inhibiteur ciblant I $\kappa$ k, la différenciation Th1 était fortement inhibée à travers une importante baisse de sécrétion d'IFN- $\gamma$  (Cho et al., 2015).

Le facteur de transcription NFAT comporte cinq acteurs : NFAT1 (NFATp ou NFATc2), NFAT2 (NFATc ou NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx ou NFATc3) et NFAT5. Ils agissent très souvent en coopération avec le facteur de transcription AP-1 notamment au niveau du promoteur de l'*IL2*, une cytokine essentielle pour la prolifération et la survie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Par ailleurs, il a aussi été démontré par des expériences d'inactivation génétique que NFAT1 et NFAT4 étaient importants pour la différenciation des cellules Th1 à travers leur fixation sur les promoteurs de *Tbx21* et de l'*Ifng*. Leur absence engendre ainsi une transdifférenciation en un profil de cellule Th2 (Lee et al., 2018).

NF $\kappa$ B est lui aussi subdivisé en 5 acteurs : RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- $\kappa$ B1 (p105) et NF- $\kappa$ B2 (p100). Ils partagent un domaine N-terminal RHD (Domaine d'homologie Rel), responsable de la liaison à l'ADN et de l'homodimérisation ou de l'hétérodimérisation entre différents acteurs. Les sous-unités p65, c-Rel et RelB détiennent un domaine



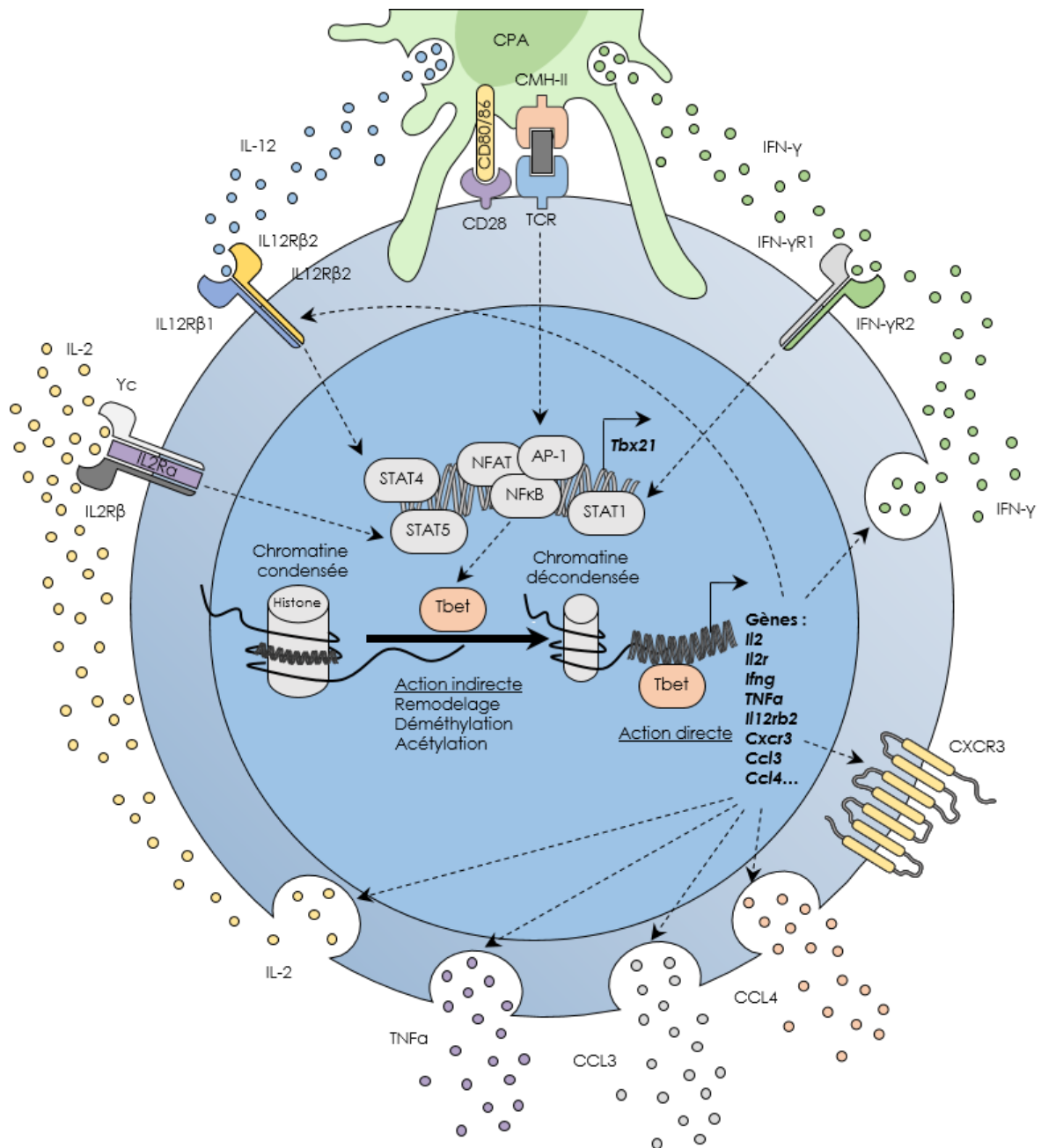
d'activation transcriptionnelle. Il a été démontré que chez des souris surexprimant la protéine responsable de la séquestration d'NFκB (IκB) la différenciation en cellule Th1 était largement impactée (Aronica et al., 1999). Par des expériences d'inactivation génétique, c-Rel s'est révélé être important dans la régulation transcriptionnelle du promoteur de l'*Ifng* (Hilliard et al., 2002). Il a aussi été démontré que RelA agissait au niveau du même promoteur en tant qu'homodimère ou en s'hétérodimérisant avec c-Rel (Das et al., 2001).

Pour finir, il a été démontré que la voie mTORC1/AKT pouvait mener à l'activation du facteur de transcription STAT4 qui lui-même active l'expression du facteur de transcription T-bet (Delgoffe et al., 2011).

### 2.1.2 Rôle du facteur de transcription T-bet

Le facteur de transcription T-bet est au centre des régulations transcriptionnelles menant au profil cellulaire Th1. Comme nous l'avons vu précédemment, l'expression de T-bet est sous l'influence des signaux qui succèdent l'engagement du TCR. Néanmoins, l'expression de T-bet est également induite par l'IL-12 sécrétée par la CPA qui active STAT4 (Thieu et al., 2008).

T-bet induit l'expression de l'IFN-γ de façon directe en interagissant avec différentes régions de son promoteur. Cependant, T-bet agit également de manière indirecte en recrutant des enzymes en lien avec des modifications épigénétiques. Ainsi lorsque le complexe de déméthylase d'H3K27 Jmdj3 est recruté, le statut du promoteur change et la transcription a lieu (Miller and Weinmann, 2010). Mais T-bet est aussi capable de recruter des complexes de méthyltransférase comme Set7/9 qui au contraire inhibe l'expression d'un gène comme celui codant pour l'IL-4 en bloquant l'action de GATA3 (Kanhere et al., 2012). Cela permet de parer à toute transdifférenciation en cellule Th2. En empêchant la transcription de *Rorc*, T-bet prévient une transdifférenciation en cellule Th17 (Oestreich and Weinmann, 2012). Par ailleurs, en coopérant avec STAT4, T-bet régite de façon positive l'acétylation des histones (Aune et al., 2009; Thieu et al., 2008). De plus, la régulation de l'expression de l'IFN-γ est aussi sous l'influence des facteurs de transcription HLX (*H2.0-like homeobox protein*) et de RUNX3 (Runt-related transcription factor 3) tous deux eux même sous l'influence de T-bet (Djuretic et al., 2007).



**Figure 10 : Rôle du facteur de transcription T-bet dans la différenciation lymphocytaire Th1.**

L'expression du facteur de transcription T-bet est finement régulée. Elle dépend de l'engagement du TCR qui mène à l'activation des facteurs de transcription NFAT, AP-1 et NFκB. L'IL-12 et l'IFN-γ sécrétés par la CPA engendrent l'activation des facteurs de transcription STAT4 et STAT1 qui transactivent Tbx21. L'IL-2 sécrétée grâce à T-bet engendre à nouveau l'expression de ce dernier via l'activation de STAT5. Tbet permet l'expression de nombreux gènes importants dans la différenciation Th1 : Il2, Il2r, Ifng, Tnfa, Il12rb2, Cxcr3, Ccl3, Ccl4, etc...

L'expression de l'IFN- $\gamma$  forme une boucle d'auto-amplification à travers l'activation de STAT1 qui lui-même induit l'expression de T-bet (Lugo-Villarino et al., 2003). Ce dernier induit également l'expression de IL-2 qui garantit la prolifération cellulaire et induit l'activation de STAT5 (Hwang et al., 2005). Ce dernier régulant également l'expression de l'IFN- $\gamma$ , une nouvelle boucle d'amplification se forme. De plus, T-bet induit l'expression de la sous-unité  $\beta 2$  du récepteur de l'IL-12 ce qui a pour effet d'amplifier la signalisation en lien avec l'IL-12 (Thieu et al., 2008). T-bet est aussi responsable de l'expression du TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) (Jenner et al., 2009) et active l'expression de gènes responsables de la migration des cellules Th1 vers l'origine de l'inflammation. En effet, il provoque l'expression du récepteur membranaire CXCR3 qui reconnaît les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXL11 (Groom and Luster, 2011) (**Figure 10**).

En outre T-bet est capable d'activer l'expression des gènes codant pour les chimiokines CCL3 et CCL4 (Hertweck et al., 2016). Agissant seules ou sous forme d'hétérodimères (Guan et al., 2001), ces molécules permettent d'attirer les macrophages, les monocytes et les neutrophiles.

### 2.1.3 Rôle du facteur de transcription IRF1

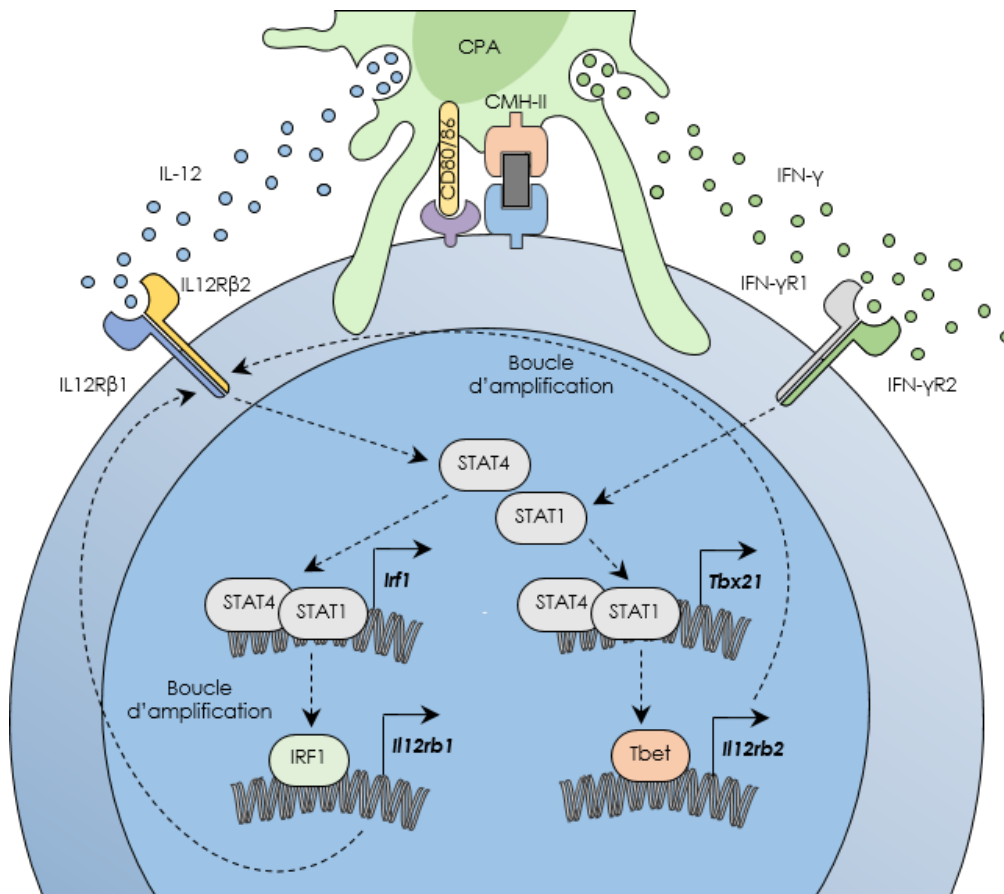
En somme T-bet constitue le facteur de transcription maître de la différenciation lymphocytaire Th1. Cependant, il a été démontré que d'autres facteurs de transcriptions étaient essentiels au cours du processus de différenciation.

Le facteur de transcription IRF1 (*Interferon Regulatory Factor 1*) fait partie d'une famille comportant neuf membres. Il a été identifié pour sa capacité à induire l'expression du gène codant pour l'IFN- $\beta$  (Miyamoto et al., 1988). Par la suite, il a été décrit pour son rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire à la suite de dommages à l'ADN (Tanaka et al., 1996). Selon le type cellulaire, IRF1 est capable d'agir seul mais aussi en coopération avec p53 (ou TP53 pour *Tumor Protein 53*) (Yanai et al., 2012). Ainsi, IRF1 est un suppresseur de tumeur et joue également un rôle dans la réponse immunitaire.

Dans les cellules Th1, l'expression d'IRF1 dépend soit de STAT1 via l'IFN- $\gamma$  ou de STAT4 via l'IL-12. Ce facteur de transcription a été décrit comme étant indispensable à l'expression de la sous-unité  $\beta 1$  du récepteur de l'IL-12 (Kano et al., 2008a; Unutmaz and Vilcek, 2008). En effet, en agissant en coopération avec T-bet, IRF1 permet

l'expression d'un récepteur fonctionnel pourvu des sous-unités  $\beta 1$  et  $\beta 2$ . Cela a pour effet l'amplification du signal cytokinique de l'IL-12 ce qui soutient une orientation lymphocytaire Th1. Des expériences de délétion du gène codant pour IRF1 ont ainsi montré une baisse drastique de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des cellules Th1 privées de ce facteur de transcription. Par ailleurs, il a aussi été démontré qu'IRF1 réprime l'expression du gène codant l'IL-4 en venant se fixer au niveau de l'extrémité 3' UTR aussi bien dans les cellules Th1 que dans les Th2 (Maruyama et al., 2015a) (**Figure 11**).

Par ailleurs, le facteur de transcription EOMES (Eomesodermin) a lui aussi son importance dans la régulation de l'expression de l'IFN- $\gamma$  (Yagi et al., 2010).



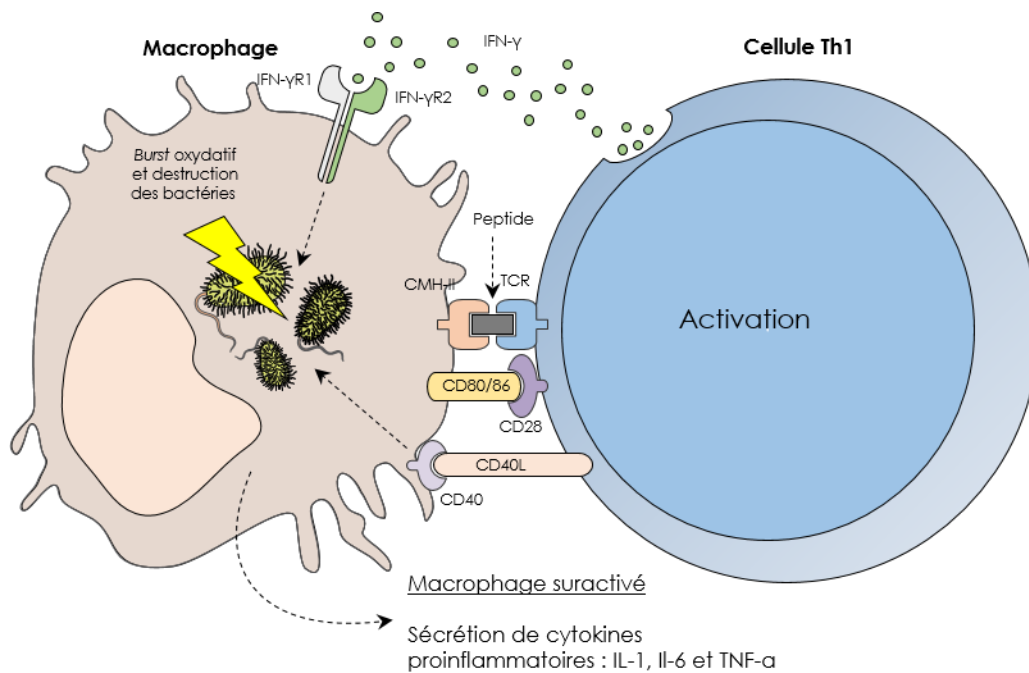
**Figure 11 : Boucle d'amplification du signal de l'IL-12 à travers la coopération de T-bet avec IRF1.**

L'expression du gène codant *IRF1* dépend soit de *STAT1* via l'IFN- $\gamma$  ou de *STAT4* via l'IL-12. *IRF1* permet à son tour l'expression du gène codant l'*IL12Rβ1*. À terme, cela engendre l'amplification de la signalisation cytokinique de l'IL-12, ce qui soutient la polarisation lymphocytaire Th1.

## 2.2 Rôle des cellules Th1 dans la résolution des infections

### 2.2.1 Activation des macrophages et des cellules NK

Le rôle principal des cellules Th1 est de lutter contre les pathogènes intracellulaires. *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes* ou encore *Leishmania major* sont des bactéries qui après avoir généré une phase d'inflammation aiguë, provoquent souvent une inflammation chronique. En effet, bien qu'elles aient été phagocytées par des macrophages, ces derniers ne sont pas en capacité de les détruire sans assistance.



**Figure 12 : Les cellules Th1 aident les macrophages à détruire des bactéries intracellulaires.**

L'interaction entre la protéine membranaire CD40 du macrophage et le CD40L de la cellule Th1, ainsi que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  de cette dernière sous l'influence de l'engagement du TCR, induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote nécessaires à l'élimination de bactéries intracellulaires. Le macrophage produit aussi des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$ .

C'est ici qu'interviennent les cellules Th1. Attirées par les chimiokines émises par le macrophage en difficulté, la cellule Th1 migre jusqu'au site de l'inflammation. Les deux cellules vont alors interagir à travers la présentation de l'antigène via le CMH de classe 2 porté par le macrophage, et le TCR à la surface de la cellule Th1. Cette dernière va alors s'activer, et sécréter de l'IFN- $\gamma$  ce qui a pour effet l'augmentation de l'expression du CMH de classe 2 à la membrane du macrophage

(Giroux et al., 2003a). La cellule Th1 engage également via CD40L, le CD40 du macrophage. Il s'en suit une cascade de signalisations au sein du macrophage menant à ce qu'on appelle un *burst* oxydatif. Des espèces réactives toxiques de l'oxygène et de l'azote sont alors produites et le macrophage peut annihiler les bactéries qui le parasitent. De plus, la forme suractivée du macrophage produit les cytokines proinflammatoires que sont l'IL-1, l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  (**Figure 12**).

Cependant, la coopération entre les cellules Th1 et les macrophages ne s'arrête pas là. Les macrophages stimulés par l'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules Th1 produisent de l'IL-12 (Grohmann et al., 2001; Ma et al., 1996). L'inflammation est alors entretenue par cette boucle d'amplification. Pour éviter que la machine ne s'emballe, les cellules Th1 se mettent à sécréter une cytokine immunosuppressive, l'IL-10 (Ma et al., 2015). Le mécanisme régissant l'expression de cette cytokine dans les cellules Th1 est longuement resté vague. Une étude récente a déterminé que le métabolisme du cholestérol était impliqué dans l'expression de l'IL-10, en activant l'expression du facteur de transcription c-Maf qui a déjà été décrit comme activant l'expression de cette cytokine dans les cellules Th2 (Perucha et al., 2019). De plus, il a aussi été démontré que l'IL-4 sécrétée par les cellules Th2 pouvait induire l'expression de l'IL-1 par les cellules Th1 (Mitchell et al., 2017). Ces phénomènes de rétrocontrôles négatifs sont donc autant de freins permettant d'éviter l'apparition d'inflammations chroniques délétères et autres maladies auto-immunes.

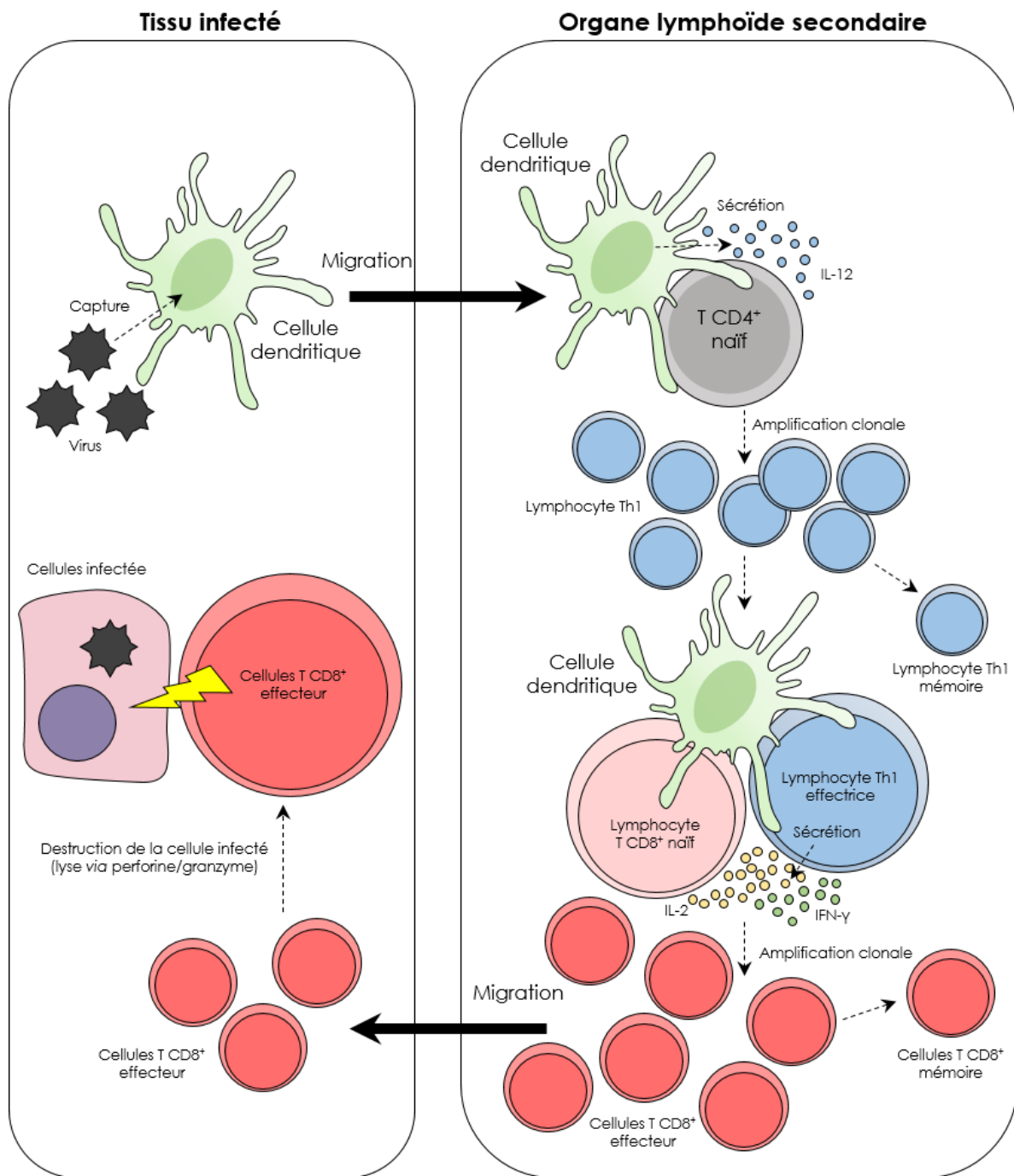
À travers leur sécrétion massive d'IFN- $\gamma$ , les cellules Th1 sont aussi capables d'activer un autre type cellulaire appartenant à l'immunité innée, les cellules NK (*Natural Killer*). Leur rôle principal est de détecter des anomalies à la surface des cellules de l'organisme. Pour se faire, les cellules NK disposent de deux types de récepteurs membranaires. Le récepteur NKR (*NK Receptor*) activateur permet de reconnaître des signaux de stress à la surface de cellules, qu'elles soient infectées ou même cancéreuses. Le récepteur NKR inhibiteur permet quant à lui de reconnaître le soi comme par exemple un CMH de type I. Si aucune molécule du soi n'est détectée, ou si une molécule prouvant l'existence d'un stress est trouvée, la cellule est alors lysée par le système perforine-granzyme ou par le biais des ligands FASL ou TRAIL qui induisent l'apoptose. Comme les cellules Th1, les cellules NK ont besoin d'IL-12 pour s'activer et proliférer. Elles sont aussi capables de sécréter de l'IFN- $\gamma$ , et certaines études ont montré que les cellules NK pourraient-elles-mêmes activer les cellules Th1

par ce biais (Wei et al., 2009). Les cellules Th1 et NK coopèrent donc entre elles puisqu'elles s'activent tour à tour.

### 2.2.2 Activation des lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques

Lorsqu'une cellule dendritique rencontre une cellule infectée par un virus au sein d'un tissu, celle-ci capte des antigènes viraux par phagocytose. Elle va alors se différencier et migrer vers l'organe lymphoïde secondaire le plus proche, en empruntant le réseau lymphatique. Une fois dans l'aire T d'un ganglion, la cellule dendritique mature coopère avec un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> en lui présentant l'antigène viral *via* son CMH de classe 2. Puisque qu'il s'agit d'une contamination virale, la cellule dendritique oriente la différenciation du lymphocyte T CD4<sup>+</sup> vers un profil de cellule Th1. Il y a alors prolifération et génération de cellules Th1 effectrices et mémoires.

La cellule dendritique va alors rencontrer un autre type de lymphocyte T, le lymphocyte T CD8<sup>+</sup> cytotoxique (Ltc). Une coopération se met alors en place entre la cellule dendritique et le Ltc par l'intermédiaire du CMH de classe 1. En sécrétant de l'IL-2 et de l'IFN- $\gamma$ , la cellule Th1 va alors catalyser la prolifération cellulaire qui intervient lors de l'amplification clonale, et la différenciation du Ltc en Ltc effecteur (Huang et al., 2007). Ce dernier va alors migrer jusqu'au tissu infecté, attiré par les chimiokines proinflammatoires. Les cellules infectées seront alors détruites grâce au système perforine-granzyme déployé par le Ltc effecteur (**Figure 13**).



**Figure 13 : Coopération entre cellule dendritique, lymphocyte T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>.**

La cellule dendritique capte des virus au sein du tissu infecté. Elle se différencie et migre jusqu'à un ganglion où elle présente le peptide d'origine virale à une cellule T CD4<sup>+</sup> naïve. Celles-ci se différencient en cellules Th1 et prolifèrent. S'enclenche alors la coopération entre les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs, les cellules dendritiques et les cellules Th1. Cela favorise la prolifération et l'activation des cellules T CD8<sup>+</sup> qui migrent alors jusqu'au site infectieux pour éliminer la menace virale.



## 2.3 Rôles physiopathologiques des lymphocytes Th1

Les lymphocytes Th1 sont très largement retrouvés comme étant responsables de l'apparition de maladies auto-immunes. Celles-ci peuvent survenir de par l'alliance de différents facteurs qui peuvent être génétiques, hormonaux ou encore environnementaux. Cette rupture de la tolérance du soi peut se produire au sein d'un organe précis, ou bien de façon systémique. Les cellules Th1 ne sont pas les seules à être impliquées dans ces maladies. À leur côté on trouve aussi, les lymphocytes Th17 mais aussi les lymphocytes T cytotoxiques.

### 2.3.1 Sclérose en plaques

La sclérose en plaque est une affection neurologique démyélinisante causée par un dérèglement du système immunitaire qui attaque les antigènes de la myéline. Elle touche des individus génétiquement prédisposés mais elle peut aussi apparaître par l'intermédiaire de facteurs environnementaux (Hauser and Oksenberg, 2006). La dégradation progressive de la gaine de myéline induit des dommages graves au système nerveux, qui a de plus en plus de mal à transmettre des messages. Il en résulte des symptômes physiques et mentaux plus ou moins sévères. Il existe une forme dite progressive qui évolue de manière linéaire dans le temps et une forme rémittente qui elle progresse par poussées.

Le modèle d'étude de la sclérose en plaque chez l'animal est l'EAE (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*). Ici la maladie auto-immune est induite par immunisation avec des antigènes de myéline accompagnés par l'adjuvant de Freund. Ces expériences ont montré que les cellules Th1 étaient largement impliquées dans le développement de la maladie. L'IL-12 est un hétérodimère composé de l'IL-12p40 et de l'IL-12p35. En invalidant l'expression de l'IL-12p40 nécessaire à la différenciation lymphocytaire Th1, les souris déficientes se montraient alors plus résistantes à l'EAE (Panitch et al., 1987). Cependant, les souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  développaient plus d'EAE (Ferber et al., 1996). L'explication fût trouvée lors de la découverte de l'IL-23. En effet, cette dernière forme un hétérodimère composé de l'IL-23p19 et de l'IL-12p40. Ainsi lorsque les souris étaient invalidées pour l'IL-12p40 ou pour l'IL-23p19 elles étaient résistantes à l'EAE alors que l'invalidation de l'IL-12p35 n'impactait pas le développement dans la maladie (Cua et al., 2003). L'IL-23 étant importante pour l'expansion de cellules T CD4<sup>+</sup> sécrétrices d'IL-17, les lymphocytes

Th17 sont donc impliqués dans le développement de l'EAE. Si ces résultats tendaient à désigner les cellules Th17 comme étant plus importantes que les cellules Th1 dans l'évolution de la l'EAE, de nouvelles études ont montré que ces deux cellules avaient des rôles distincts dans l'installation de celle-ci. Les cellules Th1 seraient les premières à franchir la barrière hématoencéphalique, et installeraient alors l'inflammation qui attire par la suite les cellules Th17 (O'Connor et al., 2008). Néanmoins, en transférant ces deux sous-types indépendamment, l'EAE est tout de même induite. La communication et la dynamique de migration entre les cellules Th1 et Th17 demeure toujours obscure. De plus, le caractère plastique des Th17 qui peuvent sécréter de l'IFN- $\gamma$  (Kebir et al., 2009) dans certaines conditions, et l'intervention des Ltc (Friese and Fugger, 2009) combinée au rôle joué par les Treg (McGeachy et al., 2005) compliquent encore l'équation.

### 2.3.2 Autres maladies auto-immunes

La maladie de Crohn est une maladie intestinale causée par une inflammation chronique d'une ou plusieurs portions de l'appareil digestif. Son apparition pourrait avoir une composante génétique ou environnementale. Comme précédemment décrit pour la sclérose en plaque, les principales cellules impliquées dans ce dysfonctionnement de la tolérance du soi, sont les Th1 et les Th17.

## 2.4 Activité anti-tumorale des cellules Th1

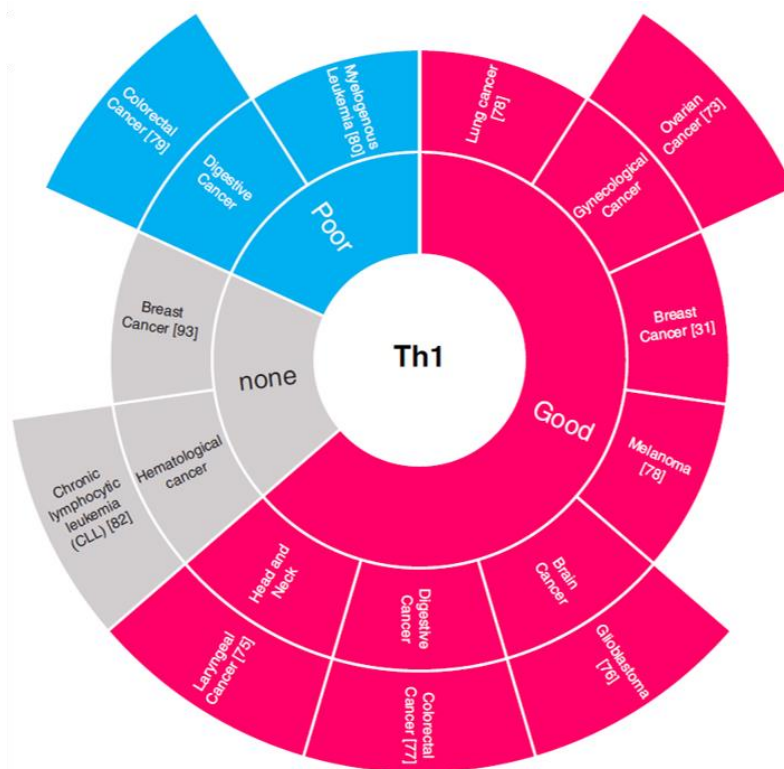
### 2.4.1 Immunosurveillance et immunoediting

La théorie de l'immunosurveillance anti-tumorale fût énoncée au cours de la deuxième moitié de XX<sup>ème</sup> siècle par Frank Macfarlane Burnett et Lewis Thomas. Ils attribuaient alors un rôle fondamental au système immunitaire dans la progression des tumeurs. Ils s'appuyèrent notamment sur les observations du chirurgien William Colley, qui constata un lien de cause à effet entre la régression de sarcomes osseux, et une infection post-opératoire. De nos jours, on parle de théorie des 3E. Proposée par Robert Schreiber, celle-ci stipule qu'il existe trois phases distinctes lors du développement du cancer : Une phase d'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire, une phase d'équilibre, c'est-à-dire qu'il y a autant de nouvelles cellules tumorales qui apparaissent qu'il y en a de détruites, et pour conclure la phase

d'échappement, ou le système immunitaire n'est plus à même de juguler la prolifération des cellules tumorales.

### 2.4.2 Lymphocytes Th1 et cancer

Cela fait maintenant plusieurs années que le rôle prépondérant des cellules Th1 dans la progression tumorale a été démontré (Kennedy and Celis, 2008; Ostrand-Rosenberg, 2005). Leur activité anti-tumorale implique les mêmes cellules mobilisées dans la lutte contre les infections à médiation cellulaire, à savoir les macrophages, les Ltc, et les cellules NK. Cependant les cellules Th1 peuvent également avoir une action directe sur les cellules tumorales via les molécules qu'elles sécrètent. De plus, il a clairement été souligné que les cellules Th1 étaient le plus souvent retrouvées comme étant de bon pronostic lorsqu'elles infiltrent de nombreux types de cancers (Chraa et al., 2019) (Figure 14).



**Figure 14: Impact des cellules Th1 dans le pronostic de plusieurs cancers. (D'après Chraa et al., 2019).**

Les cellules Th1 sont décrites comme étant de bon pronostic lorsqu'elles infiltrent une tumeur. Ce n'est pas le cas des Treg et des Th2 qui sont quant à eux souvent associés à un pronostic défavorable.

#### 2.4.2.1 Action des cellules Th1 sur la tumeur

Les cellules Th1 sont connues pour leur capacité à sécréter des quantités importantes d'IFN- $\gamma$ . Cette cytokine peut permettre aux cellules Th1 d'exercer un effet anti-tumoral sur les cellules tumorales. En effet, l'IFN- $\gamma$  est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la nécroptose des cellules tumorales. Que ce soit dans le cancer colorectal (Wang et al., 2015), le cancer du sein (Kochupurakkal et al., 2015) ou le cancer du foie (Li et al., 2012), l'IFN- $\gamma$  induit l'arrêt du cycle cellulaire en augmentant l'expression des protéines inhibitrices du cycle cellulaire que sont p27Kip, p16 ou p21. L'IFN- $\gamma$  est important dans le cadre du mélanome, car par l'intermédiaire de la stimulation de STAT1, il induit l'augmentation de la quantité du micro ARN miR-29a/b qui bloque l'expression de CDK6 (*Cycline-dependent kinase 6*), une protéine importante pour la transition G1/S du cycle cellulaire (Schmitt et al., 2012). Par ailleurs, il a été démontré que l'IFN- $\gamma$  pouvait également réprimer l'angiogenèse tumorale, en inhibant l'expression du VEGF (Kammertoens et al., 2017; Kawano et al., 2000). Pour finir, l'IFN- $\gamma$  est aussi capable d'accroître l'immunogénicité tumorale en augmentant l'expression des CMH de type 1 et 2 ce qui facilite la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire (Giroux et al., 2003b; Martini et al., 2010). Cependant, l'IFN- $\gamma$  est également décriée pour sa capacité à augmenter l'expression par les tumeurs de la molécule de tolérance du système immunitaire qu'est PD-L1 (*Programmed Death-ligand 1*) (Zou et al., 2016). L'engagement de cette molécule avec la protéine membranaire PD1, portée entre autres par les cellules NK et les Ltc, entraîne la rupture de leurs activités lytiques des cellules tumorales.

L'action cytotoxique des cellules Th1 réside également dans leur capacité à sécréter du TNF- $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha). Cette cytokine ayant été identifiée pour sa capacité à induire la nécrose d'une tumeur transplantée, est plutôt un vecteur apoptotique. En se fixant sur son récepteur, le TNF- $\alpha$  induit l'activation de la Caspase-8 qui initie la cascade de clivage des caspases effectrices 3 et 7. Cela aboutit à la fragmentation de l'ADN par des endonucléases comme EndoG, puis à la mort de la cellule (Degterev et al., 2003). Néanmoins, le rôle du TNF- $\alpha$  reste encore controversé car si ce dernier peut induire l'apoptose, il peut aussi provoquer la survie de la cellule cancéreuse en activant d'autres voies de signalisation menant à l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B (van Horssen, 2006).

Dans certaines conditions, les cellules Th1 sont capables d'avoir un effet cytotoxique induisant la lyse de la cellule reconnue spécifiquement (Schultz et al., 2000). On parle alors de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> cytotoxiques. Le facteur de transcription T-bet, déjà impliqué dans l'expression de la perforine et du granzyme dans les Ltc, pourrait être impliqué dans ce phénomène (Takeuchi and Saito, 2017). Néanmoins, ce type d'action ne reste que peu décrit en contexte tumoral mais davantage en conditions infectieuses (**Figure 15**).

#### 2.4.2.2 Activation d'acteurs de l'immunité innée et acquise

Les cellules Th1 sont capables d'activer certaines cellules de l'immunité innée ayant des propriétés anti-tumorales. Cette action passe en grande partie par l'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules Th1. Cela induit comme on l'a vu précédemment pour les infections, une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (NO) chez les macrophages ce qui leur confère une action anti-tumorale plus importante (Spear et al., 2012). Par ailleurs, le microenvironnement tumoral induit souvent la conversion des macrophages anti-tumoraux ou M1 en des macrophages ayant un phénotype M2 pro-tumoral. Ces derniers sécrètent notamment d'importantes quantités de VEGF augmentant la vascularisation tumorale, mais aussi des cytokines immunosuppressives telles que le TFG- $\beta$  (Liu et al., 2018; Wang et al., 2013). Dans ce contexte, il a été démontré que l'IFN- $\gamma$  pouvait engendrer la conversion des macrophages M2 délétères en macrophages M1 anti-tumoraux (Jeong et al., 2014). De plus, les cellules Th1 accentuent la migration des macrophages au niveau tumoral de par leur sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Enfin, les lymphocytes Th1 peuvent aussi activer les cellules NK augmentant l'expression de leur facteurs lytiques, la perforine et le granzymes. (Townsend et al., 2004) (**Figure 15**).

#### 2.4.2.3 Activation des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques

L'activation des Ltc peut passer par l'activation de cellules dendritiques par les lymphocytes Th1. Pour ce faire, il y a au préalable activation de la cellule Th1 à travers l'engagement de son TCR. Il y également un signal de costimulation, via l'interaction entre les protéines membranaires CD28 et CD80 à la surface des cellules Th1 et dendritiques respectivement. Les lymphocytes Th1 ainsi activés voient l'expression de la protéine membranaire CD40L augmenter et interagissent avec CD40 à la membrane des cellules dendritiques. Ce signal associé à la sécrétion massive d'IFN- $\gamma$

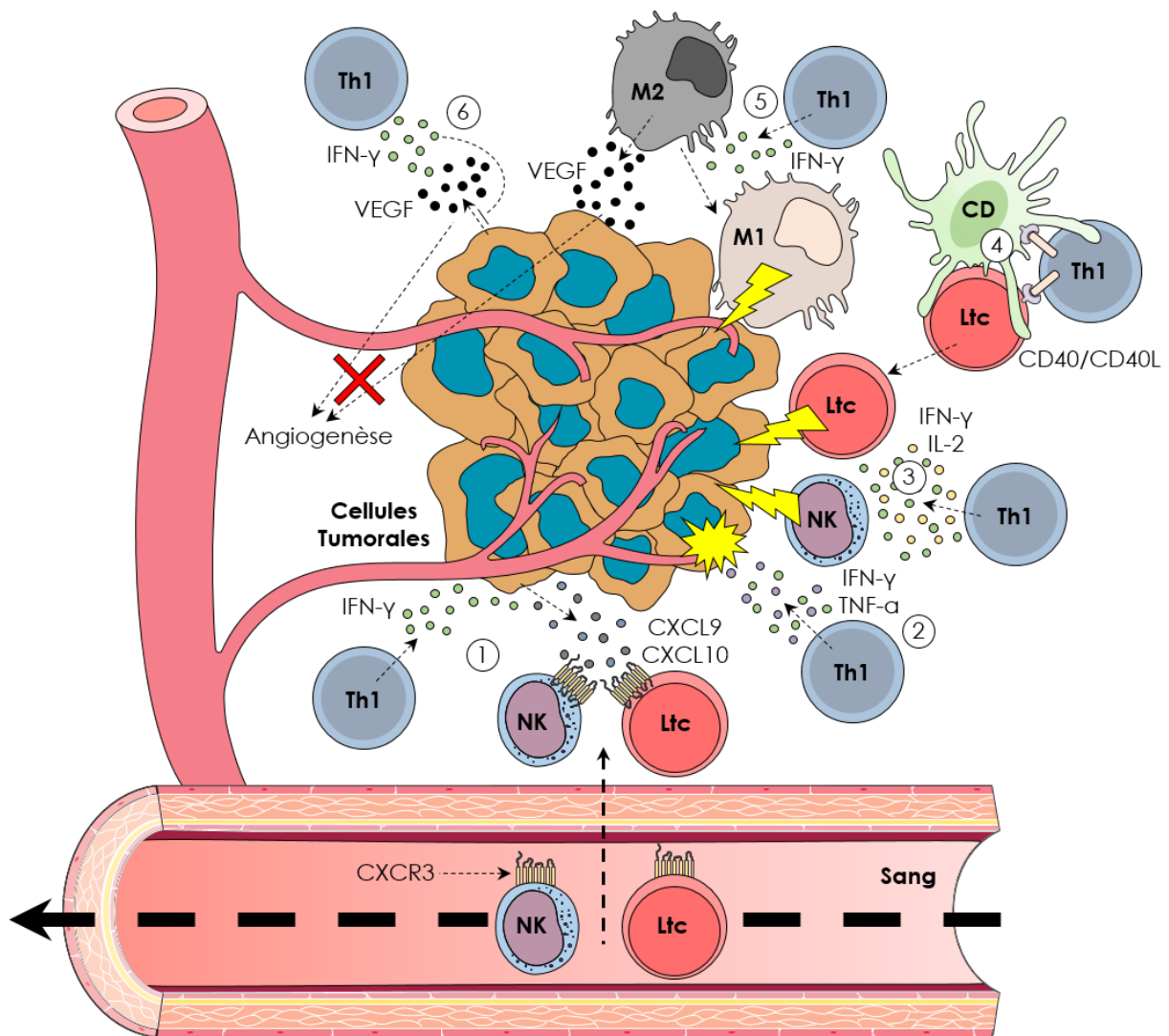
par les cellules Th1 achève d'activer les cellules dendritiques. Celles-ci vont alors exprimer davantage de CMH et de molécules de costimulation (CD80, CD86, CD70) à leur membrane, ce qui a pour effet d'activer les Ltc (Bennett et al., 1998).

Comme cela a été présenté précédemment, les cellules Th1 sont capables comme dans le cadre d'une infection d'activer la prolifération et la différenciation des Ltc via leur sécrétion d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ . Il a d'ailleurs été démontré que le transfert de cellules Th1 pouvait activer la réponse anti-tumorale des Ltc (Ding et al., 2012). De plus, il a été observé que les cellules Th1 pouvaient interagir directement avec les Ltc par l'intermédiaire de CD40L. La coopération qui opère entre les cellules Th1 et les Ltc permet une expansion clonale primaire efficace mais aussi une réponse secondaire d'autant plus importante quand l'antigène tumoral est rencontré à nouveau (Bourgeois et al., 2002). En outre, en sécrétant de l'IFN- $\gamma$ , les cellules Th1 entraînent la sécrétion de chimiokines telles que CXCL9 ou CXCL10 directement par les cellules tumorales. En se fixant au récepteur de chimiokines CXCR3, ces molécules ont donc le pouvoir d'attirer d'autres cellules Th1 mais également les Ltc (Bos and Sherman, 2010; Wong et al., 2008).

Cependant, si de nombreux modèles démontrent le caractère indispensable des cellules Th1 dans l'activation des Ltc, d'autres montrent que ces derniers peuvent agir seuls (Côté et al., 2011; Zimmerli et al., 2005). En effet, lorsque les Ltc interagissent avec une forte affinité ils peuvent sécréter leur propre IL-2 afin de catalyser leur amplification clonale de façon autocrine. Pour ce qui est des interactions de plus faible affinité, comme avec les peptides dérivés du soi comme ceux provenant des cellules cancéreuses, l'aide apportée par les cellules Th1 deviendrait des plus précieuses pour espérer obtenir une réponse anti-tumorale des Ltc. D'autres démonstrations affirment que les cellules dendritiques seules peuvent activer les Ltc par l'intermédiaire d'une de leur molécule de surface, CD70 (Keller et al., 2009). Toutefois, sans interaction entre les molécules membranaires CD40 et CD40L portées par les cellules dendritiques et les cellules Th1 respectivement, les cellules dendritiques sont moins à même d'augmenter l'expression à leur membrane de CD70 (Bullock and Yagita, 2005).

Même si certaines études tendent à montrer que l'aide des cellules Th1 est dispensable, il ressort globalement que leur assistance lors de l'activation initiale des

Ltc est essentielle à leur prolifération et à l'établissement d'une mémoire immunitaire pérenne (Rocha and Tanchot, 2004; Sun et al., 2004) (**Figure 15**).



**Figure 15 : Activité anti-tumorale des cellules Th1.**

(1) En sécrétant de l'IFN- $\gamma$ , les cellules Th1 induisent la sécrétion des chimiokines CXCL9 et CXCL10 qui attirent au site tumoral les cellules NK et les Ltc (Lymphocytes T CD8+ cytotoxique). (2) La sécrétion d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  par les cellules Th1 a un effet cytotoxique sur les cellules tumorales. (3) L'IFN- $\gamma$  et l'IL-2 sécrétés par les cellules Th1 induisent l'activation de l'activité cytotoxique et la prolifération des Ltc et des NK. (4) Les cellules Th1 activent les CD (Cellules dendritiques) et les Ltc grâce à leur CD40 membranaire. (5) Les cellules Th1 favorisent un profil anti-tumoral M1 plutôt que M2 chez les macrophages grâce à leur sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Ce dernier induit également l'augmentation des ROS et du NO (Espèces réactives de l'oxygène et de l'azote) ce qui accroît l'activité anti-tumorale des macrophages M1. (6) L'IFN- $\gamma$  sécrété par les cellules Th1 inhibe la sécrétion de VEGF par les cellules tumorales ce qui diminue par conséquent l'angiogenèse.

## 2.5 Immunosuppression des cellules Th1

L'immunosuppression du système immunitaire fait partie des facteurs qui contribuent à l'échappement de la tumeur et à sa progression. Il existe pléthore de mécanismes menant à l'inhibition du système immunitaire. Certains mettent en jeu des protéines membranaires appelées *checkpoint inhibitors* telles que PD-1 et CTLA-4 rendues populaires par les nouvelles stratégies d'immunothérapie. D'autres concernent l'environnement cytokinique imposé par la tumeur elle-même ou bien par certains acteurs immunosuppresseurs du système immunitaire. Parmi les molécules sécrétées, le TGF- $\beta$  et l'IL-10 sont les principales molécules causant l'inhibition du système immunitaire et par conséquent la progression tumorale.

### 2.5.1 Impact du TGF- $\beta$ dans la différenciation des cellules Th1

Le TGF- $\beta$  est une cytokine au rôle complexe. En condition normale, le TGF- $\beta$  contribue à l'homéostasie de nombreux tissus en garantissant leur régénération et leur croissance (Xu et al., 2018). Ce dernier a en revanche un rôle ambigu en contexte tumoral. Il peut à la fois induire l'apoptose et la cytotaxe des cellules tumorales, ou entraîner leur prolifération si celles-ci inactivent certaines voies de signalisation du TGF- $\beta$  par mutation (David and Massagué, 2018; Pickup et al., 2017). De plus, si le TGF- $\beta$  est bénéfique lors d'infections de par sa capacité à limiter l'emballement de l'inflammation en inhibant le système immunitaire inné et acquis, il contribue aussi largement à l'inhibition du système immunitaire en contexte tumoral (Flavell et al., 2010; Sanjabi et al., 2017).

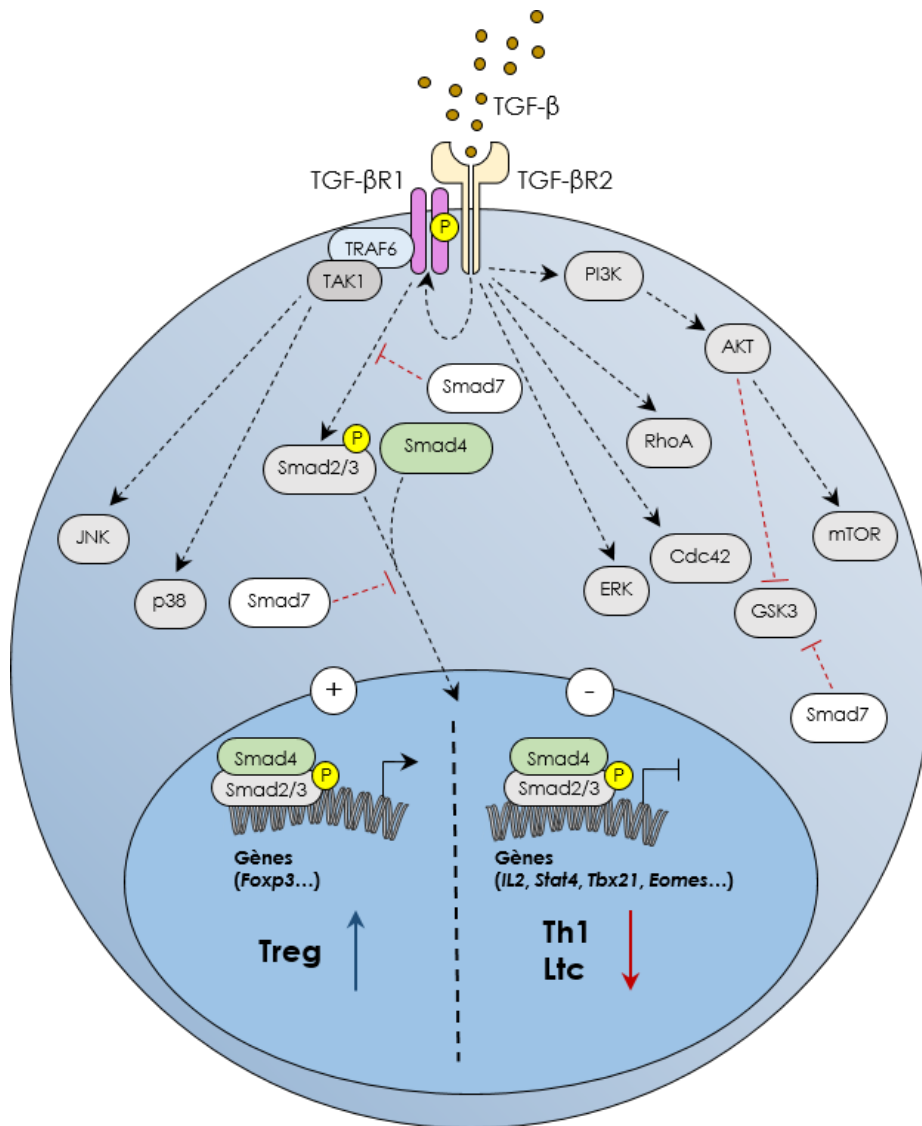
#### 2.5.1.1 Signalisation induite par le TGF- $\beta$

Le récepteur du TGF- $\beta$  est un tétramère membranaire à activité tyrosine kinase constitué de deux récepteurs TGF- $\beta$ R1 (TGF- $\beta$  récepteur 1) et deux TGF- $\beta$ R2. La signalisation cellulaire qui découle de la fixation du TGF- $\beta$  à ce récepteur dépend de la coopération entre ces 4 sous-unités. Le TGF- $\beta$  peut être sécrété par les cellules tumorales ou stromales, mais aussi par les Treg et les macrophage M2. Les trois formes du TGF- $\beta$  à savoir le TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et TGF- $\beta$ 3 se lient d'abord aux récepteurs TGF- $\beta$ R2. Ce dernier phosphoryle alors la portion cytoplasmique des récepteurs TGF- $\beta$ R1. Il s'en suit alors de multiples signalisations intracellulaires (David and Massagué, 2018).



La fixation du TGF- $\beta$  à son récepteur mobilise les protéines de la famille des Smads. Celles-ci sont composées de huit membres divisés en 3 catégories : les R-Smads (*Receptor regulated Smads*), les Co-Smads (*Common-mediator Smads*) et les I-Smad (*Inhibitory Smads*). Les R-Smads sont composées des Smad2 et 3 qui interviennent dans la signalisation du TGF- $\beta$  et des Smad1, 5 et 8 qui sont impliquées dans la signalisation des BMP (*Bone Morphogenetic Protein*). Smad2 et Smad3 sont phosphorylées par le TGF- $\beta$ R1 puis prises en charge par la Co-Smad Smad4 qui permet leur entrée dans le noyau où cet hétérotrimère aura son activité transcriptionnelle. Ce complexe souvent aidé de cofacteurs, impacte fortement la différenciation des cellules Th1 en inhibant l'expression des gènes codant pour T-bet et STAT4 (Gorelik et al., 2002; Lin et al., 2005). Il en résulte une importante diminution de l'expression de l'IFN- $\gamma$  sous l'influence de ces derniers (Gorelik et al., 2002). Par ailleurs, il a été démontré que les souris invalidées pour le récepteur TGF- $\beta$ R2 ont des réponses Th1 exacerbées (Marie et al., 2006). De plus, toujours par l'intermédiaire du complexe Smad2/3/4, le TGF- $\beta$  inhibe l'expression de l'IL-2, ce qui diminue la prolifération cellulaire (Brabletz et al., 2015; McKarns et al., 2004; Mu et al., 2002; Tzachanis et al., 2001). Le complexe induit aussi la cytotase en inhibant l'expression de c-Myc qui intervient dans le cycle cellulaire (Genestier et al., 1999) (**Figure 16**).

Par ailleurs, de par sa capacité à induire l'expression de Foxp3, le complexe Smad2/3/4 aidé par NFAT, induit la différenciation en lymphocyte Treg (Chen et al., 2003). Ces derniers vont à leur tour accentuer l'immunosuppression en sécrétant du TGF- $\beta$  et de l'IL-10 (Maloy and Powrie, 2001).



**Figure 16 : Voies de signalisation induites par le TGF- $\beta$  et immunosuppression des cellules Th1.**

Le TGF- $\beta$  se lie aux récepteurs de type 1 à la surface de la cellule. L'activation du TGF- $\beta$ R2 qui en résulte conduit à la phosphorylation de Smad2 et Smad3, qui vont former un complexe avec les facteurs SMAD4. Les complexes activés s'accumulent dans le noyau où ils participent à la régulation transcriptionnelle de gènes cibles. Smad7 limite l'activation de la voie de signalisation des Smads en participant à la dégradation du récepteur TGF- $\beta$ R1, en limitant l'interaction entre Smad2/3 et SMAD4 ou encore en inhibant la fixation du complexe Smad2/3/4 à l'ADN. Le TGF- $\beta$  participe également à l'activation d'autres voies telles que celle de TAK1 conduisant à l'activation des MAPK p38 et JNK. L'activation du TGF- $\beta$ R conduit également à l'activation de transducteurs du signal tels que les Rho kinases RhoA et Cdc42, la MAPK ERK et la PI3K.

La famille des I-Smad est composée de Smad6 et Smad7. Celles-ci sont induites par le complexe Smad2/3/4. Smad7 intervient en tant qu'inhibiteur de la voie des Smads, ce qui permet un rétrocontrôle négatif de la voie de signalisation du TGF- $\beta$ . En outre Smad7 est capable d'induire la dégradation du TGF- $\beta$ R1 via le recrutement de l'ubiquitine ligase Smurf2 (*SMad Ubiquitin Regulatory Factors 2*) (Kavsak et al., 2000). En se fixant au TGF- $\beta$ R1 Smad7 limite aussi par compétition l'activation des R-Smad (Yan et al., 2009). Smad7 présente une séquence consensus de fixation à l'ADN similaire à celle du complexe Smad2/3/4, prévenant sa fixation et inhibant son activité transcriptionnelle. Quant à Smad6, celle-ci inhibe la voie de signalisation des BMP (**Figure 16**).

Le TGF- $\beta$  est aussi capable d'activer d'autres voies en dehors de la voie canonique des Smads, comme celle de PI3K/AKT qui mène à l'inhibition de GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*). À l'état actif, GSK3 phosphoryle la  $\beta$ -caténine, induisant sa dégradation par le protéasome. Lorsque GSK3 est inactif, la  $\beta$ -caténine persistante permet l'activation du facteur de transcription TCF/LEF (*T-Cell-dependent Factor/Lymphoid Enhancer binding Factor*) (Cadigan and Waterman, 2012). L'ubiquitine ligase TRAF6 (*Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6*) est constitutivement liée au récepteur du TGF- $\beta$ . Quand ce dernier vient s'y fixer, TRAF6 s'active et ubiquitine la sérine thréonine kinase TAK1 (*TGF- $\beta$ -Activated kinase 1*) menant à son activation. Cette dernière déclenche alors une cascade de signalisation menant à l'activation des kinases p38 et JNK (Yamashita et al., 2008a) (**Figure 16**).

### 2.5.2 Immunosuppression par les *immune checkpoints*

Les deux principales cibles des immunothérapies anti-cancéreuses sont les *immune checkpoints* PD-1 et CTLA-4. Ces protéines membranaires permettent d'éviter l'emballement du système immunitaire notamment lorsque ce dernier doit répondre à des infections. Ce phénomène se répète au niveau tumoral où les *immune checkpoints* entravent la réponse immunitaire. CTLA-4 est surexprimé à la suite de l'engagement du TCR des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ou des Ltc. Ce dernier entre alors en compétition avec CD28 pour interagir avec le ligand B7 (Krummel and Allison, 1995). Le signal de costimulation est alors amoindri et la réponse immunitaire moins importante. PD-1 est quant à lui exprimé plus tardivement au cours de l'activation des

cellules T et son engagement avec son ligand PD-L1 ou PD-L2 atténue très largement les cascades de signalisation sous le TCR, en mobilisant des phosphatases (Chemnitz et al., 2004).

En dehors de l'action immunosuppressive de l'interaction entre PD-1 et PD-L1, il a récemment été découvert que celle-ci pouvait avoir un impact dans la plasticité des cellules Th1. L'inter-conversion entre différents sous-types de lymphocytes T *helper* en fonction de l'environnement cytokinique est plus souvent décrit chez les lymphocytes Treg et Th17. Les lymphocytes Treg peuvent se transformer en Th17 sous l'influence de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-6 qui activent STAT3 (Koenen et al., 2008). Quant aux lymphocytes Th17, il a été décrit qu'ils peuvent adopter un phénotype Th1 sous l'influence de l'IL-12 et de l'activation de STAT4 qui en résulte (Mukasa et al., 2010). Concernant les lymphocytes Th1, ils sont décrits au côté des lymphocytes Th2 comme étant relativement stables par rapport aux deux autres sous-types précédemment évoqués (O'Shea and Paul, 2010). Néanmoins, il a été observé que les cellules Th1 deviennent plastiques et se transdifférencient en lymphocytes Treg quand ils interagissent avec PD-L1 (Amarnath et al., 2011). Il y a alors une importante baisse de l'expression de T-bet, de l'IFN- $\gamma$ , mais aussi de l'IL-2 et du TNF- $\alpha$  et en contraste, une augmentation de l'expression du facteur de transcription maître de la différenciation lymphocytaire Treg, Foxp3. L'explication de ce phénomène provient de l'action des phosphatases SHP1 et SHP2, activées par l'engagement de PD-1 avec son ligand PD-L1. Si celles-ci sont majoritairement décrites pour inhiber par déphosphorylation la cascade de signalisation sous le TCR, elles sont aussi capables de déphosphoryler les STATs dont celles indispensables à la différenciation des cellules Th1, STAT1 et STAT4. Ce phénomène a été décrit comme étant aussi important qu'une exposition de cellules Th1 à du TGF- $\beta$  et de l'IL-10, ou à une co-culture avec des lymphocytes Treg. De plus, de façon pour le moment inexpliquée, l'engagement avec PD-L1 de PD-1 engendre aussi une déméthylation du locus TSDR (*Treg-Specific Demethylated Region*) du gène codant Foxp3. Ainsi, en utilisant des inhibiteurs de SHP1/2 et des anticorps anti-PD-1, il serait possible de stabiliser le profil Th1 dans le cadre de thérapies cellulaires anti-tumorales.

La réponse immunitaire orchestrée par les cellules Th1 est un phénomène finement régulé. De nombreux types cellulaires coopèrent pour répondre à des agressions aussi diverses et variées qu'une infection bactérienne ou le développement d'un cancer. Dans ce processus, l'EA peut être un allié de poids pour la réponse immunitaire, en lui apportant flexibilité et adaptabilité. Mais dans certaines circonstances, l'EA peut déployer des mécanismes de rétrocontrôle pouvant entraver cette réponse qui dans le cadre d'un cancer doit être totale pour pouvoir l'éliminer.

## Partie 3. Epissage alternatif : cancer et immunité

---

### 3.1 Epissage alternatif et cancer

En conditions physiologiques, l'EA engendre l'augmentation de la diversité génétique en permettant d'obtenir plusieurs transcrits et donc plusieurs protéines à partir d'un seul et même gène. Néanmoins, si ce phénomène accorde aux cellules saines flexibilité et adaptabilité, il peut parfois s'avérer délétère et contribuer à leur transformation en cellules cancéreuses. De plus en plus d'études montrent ainsi que l'EA a un rôle prépondérant dans le développement de cancers (Chabot and Shkreta, 2016; David and Manley, 2010; Scotti and Swanson, 2016).

Il existe de nombreux exemples attestant de l'impact d'anomalies d'épissage dans le cancer. Récemment, une étude explorant une trentaine de cancers a démontré que certains évènements d'EA pouvaient être utilisés pour établir un pronostic. Il a ainsi été démontré dans le cadre du cancer de la prostate, que l'EA de KLK2 (Kallikrein-2), une protéine hautement exprimée dans ce type de tissu, était de mauvais pronostic (Zhang et al., 2019a).

#### 3.1.1 Epissage alternatif de p53

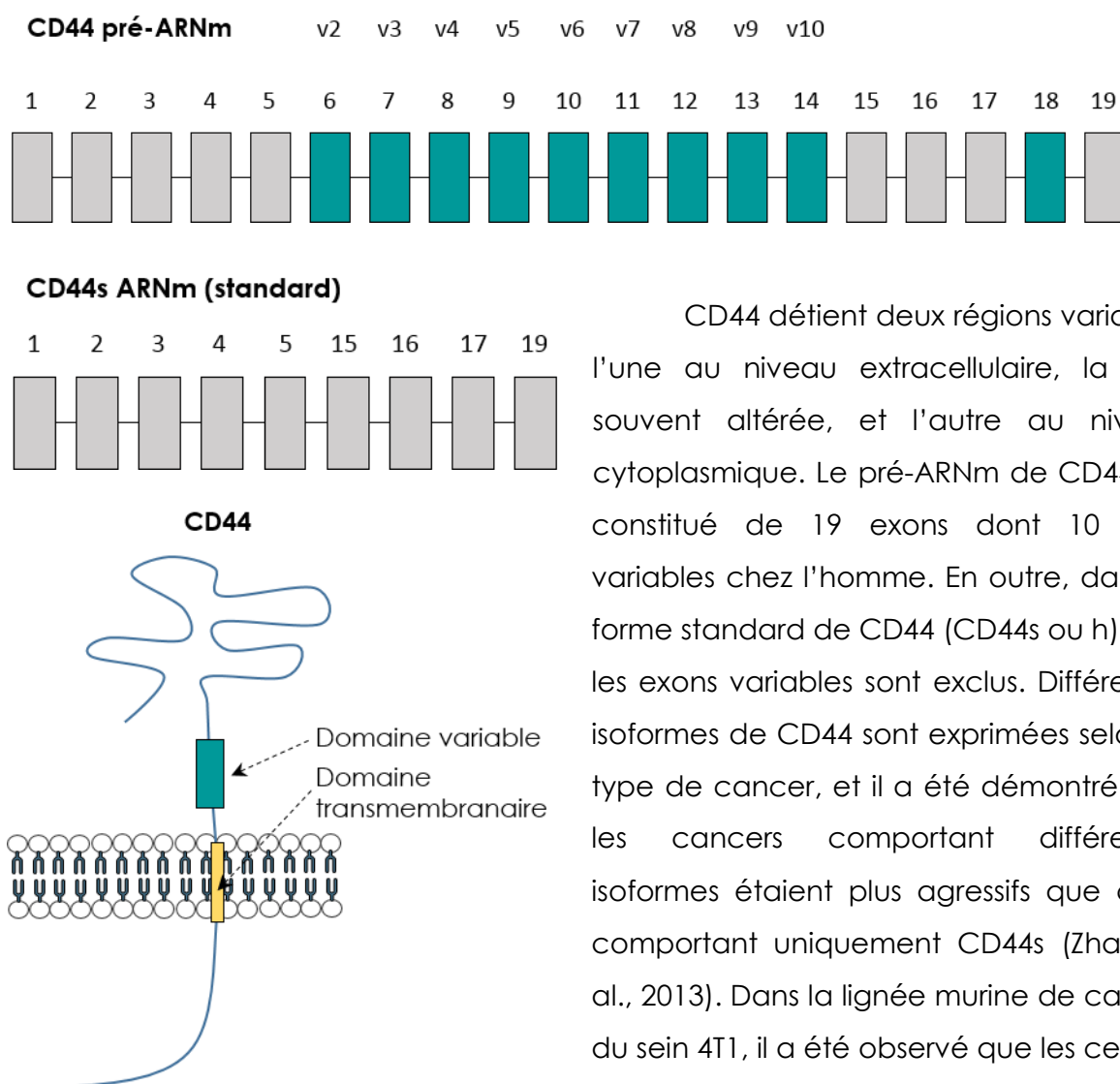
Le facteur de transcription p53 (ou TP53 *Tumor protein 53*) est d'une importance majeure de par son rôle dans la régulation de nombreux gènes impliqués dans le cycle cellulaire, l'autophagie, le métabolisme et l'apoptose. Dans plus de 50% des cancers, le gène codant pour p53 est muté ce qui annihile ses capacités anti-prolifératives et apoptotiques. Cependant jusqu'à il y a peu, les études autour de p53 ne se focalisaient que sur le transcrit principal de ce gène et non aux différents transcrits et à leurs activités potentiellement variables. Ainsi, il a été démontré que p53 pouvait être muté au niveau de sites d'épissage introniques donnant lieu à des protéines tronquées tout aussi inactives que pour une mutation somatique. Lorsque qu'un site d'épissage est touché, des transcrits aberrants de p53 sont produits et les gènes habituellement sous son influence voient leur expression diminuer (Smeby et al., 2019).

Il existe au total 9 isoformes alternatives connues de ce facteur de transcription. Ces isoformes sont exprimées de façon tissu spécifique et pourraient expliquer pourquoi certains réagissent différemment aux stress comme les radiations ionisantes (Bouvard et al., 2000; Fei et al., 2002).

### 3.1.2 Epissage alternatif de Bcl-2

Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) est une protéine impliquée dans la régulation de la mort cellulaire. Elle permet notamment en association avec d'autres protéines de sa famille comme Bax (*Bcl-2-associated X protein*) et Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*), de réguler la perméabilité mitochondriale. En permettant la libération de cytochrome c et de ROS, celle-ci induit une cascade signalétique pouvant aboutir à l'apoptose de la cellule. Il existe une version apoptotique de Bcl-2 appelée Bcl-XS, et une version anti-apoptotique appelée Bcl-XL. Cette dernière résulte de l'exclusion de l'exon 2 lors de l'épissage. Ce phénomène d'EA est accru dans de nombreux cancers et mène à une résistance à l'apoptose d'ordinaire induite par les chimiothérapies employées pour les traiter. Des traitements sont actuellement en cours de développement autour de l'usage d'oligonucléotides véhiculés par des nanoparticules lipidiques. Les résultats sont concluants dans des modèles de métastases pulmonaires utilisant les cellules cancéreuses B16F10 (Bauman et al., 2010).

### 3.1.3 Epissage alternatif de CD44



**Figure 17 : Structure moléculaire de CD44.**

CD44 détient deux régions variables l'une au niveau extracellulaire, la plus souvent altérée, et l'autre au niveau cytoplasmique. Le pré-ARNm de CD44 est constitué de 19 exons dont 10 sont variables chez l'homme. En outre, dans la forme standard de CD44 (CD44s ou h) tous les exons variables sont exclus. Différentes isoformes de CD44 sont exprimées selon le type de cancer, et il a été démontré que les cancers comportant différentes isoformes étaient plus agressifs que ceux comportant uniquement CD44s (Zhao et al., 2013). Dans la lignée murine de cancer du sein 4T1, il a été observé que les cellules exprimant l'isoforme alternative CD44v8-10 incluant la portion variable de l'exon 8 à 10 avaient un potentiel métastatique bien plus

élevé que celles n'exprimant que la forme standard de CD44. Par ailleurs, l'expression de différentes isoformes de CD44 peut conférer aux cellules tumorales de nombreux cancers un profil de cellules souches. Ces cellules tumorales peuvent donner naissance à plusieurs types de cellules tumorales et sont donc hautement tumorigènes et rendent la tumeur plus difficile à éliminer (Prochazka et al., 2014). Un autre variant cette fois incluant l'exon variable 6 (CD44v6), a été identifié comme étant responsable de l'apparition de métastases dans le cadre du carcinome colorectal (Wielenga et al., 1993). Il a aussi été relevé que ce variant est impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse dans le cancer de la prostate (Ni et al., 2014). Dans certains cancers comme celui du carcinome squameux de la tête et du coup,



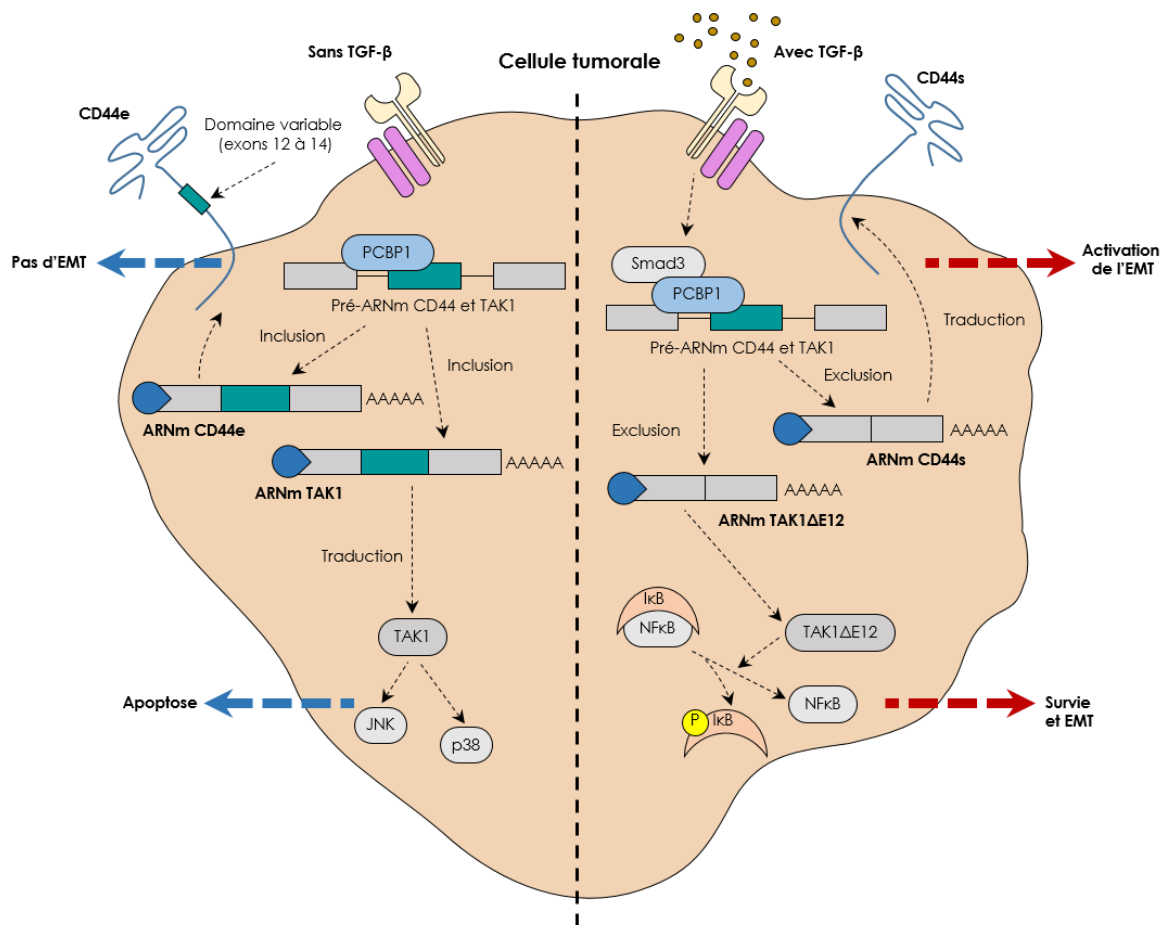
la disparition de l'isoforme CD44v6 est associée à un moins bon pronostic. De plus, d'autres études montrent que c'est la forme standard de CD44 qui est impliquée dans l'apparition de l'EMT (Biddle et al., 2013). L'explication pourrait provenir de l'acide hyaluronique (HA) qui interagit avec toutes les isoformes de CD44, et qui semble être un facteur universel dans l'établissement de l'EMT. Les différences ainsi observées selon le type de tissu ou de cancer, viendraient donc de la quantité d'HA ou encore de la spécificité des différentes isoformes de CD44 pour cette molécule (Toole, 2009). Néanmoins, la régulation de l'apparition de ces différents variants et l'impact des facteurs d'épissage et de leurs mutations potentielles restent obscures (**Figure 17**).

### 3.1.8 Influence du TGF- $\beta$ dans l'épissage alternatif

Il est maintenant clairement admis que si le TGF- $\beta$  a une action anti-proliférative sur les cellules normales, il favorise la transition épithélio-mesenchymateuse des cellules cancéreuses et accentue l'apparition de métastases. Cet effet passe notamment par l'intermédiaire de Smad3, l'un des facteurs de transcription activés par la voie du TGF- $\beta$ . En effet, celle-ci est capable d'interagir avec une protéine pouvant se lier à l'ARN, PCBP1 (*Poly(RC) Binding Protein 1*). Ce faisant, ce complexe peut alors interagir avec les régions variables du pré-ARNm de CD44 (décrit ci-dessus), et prévenir la fixation de la machinerie moléculaire du spliceosome. Il en résulte alors l'apparition de la forme standard de CD44 au détriment de la forme épithéliale CD44e (CD44v12-14). Dans ce contexte, CD44s augmente le pouvoir migratoire des cellules cancéreuses (Tripathi et al., 2016) (**Figure 18**).

À côté de la voie canonique du TGF- $\beta$  mobilisant les Smads, on trouve la kinase TAK1. À travers son action activatrice de JNK et p38, elle joue aussi un rôle critique dans les fonctions apoptotiques et l'EMT causées par le TGF- $\beta$  (Yamashita et al., 2008b). TAK1 est aussi impliquée dans l'activation de NF $\kappa$ B un autre acteur de l'EMT mais aussi de la survie cellulaire (Arsura et al., 2003; Huber et al., 2004). Le gène codant pour TAK1 comporte 17 exons dont les exons 12 et 16 sont variables, donnant naissance à quatre isoformes. Il a été démontré que l'exclusion de l'exon 12 de TAK1 intervenait majoritairement pendant l'EMT, mais le lien entre ces deux états de fait est longtemps resté flou (Shapiro et al., 2011). Récemment, il a été identifié que l'exclusion de l'exon 12 de TAK1 durant une exposition au TGF- $\beta$  est provoquée à nouveau par le complexe Smad3/PCBP1 aidé par une autre protéine se liant à l'ARN, Rbfox2 (RNA-

*binding complex containing Fox-1 homolog 2*). Il a aussi été découvert que cette isoforme perdant l'exon 12, autrement appelée TAK1 $\Delta$ E12 favorisait l'EMT à travers l'activation de NF $\kappa$ B. Il a aussi été observé que l'action de la forme complète de TAK1, TAK1FL, ne concernait que l'apoptose (Tripathi et al., 2019). Par ailleurs, il a été noté qu'il était possible d'empêcher l'exclusion de l'exon 12 via l'usage d'oligonucléotides, limitant ainsi l'EMT causée par le TGF- $\beta$  (**Figure 18**).



**Figure 18 : Rôle du TGF- $\beta$  dans l'EMT à travers l'épissage alternatif de CD44 et de TAK1.**

Sous l'influence du TGF- $\beta$ , Smad3 s'active et vient se fixer au facteur d'épissage PCBP1. Ce complexe induit l'exclusion des exons variables de CD44 pour former l'isoforme standard de CD44 (CD44s) favorisant l'EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition). Ce complexe induit aussi l'exclusion de l'exon 12 de TAK1. Cette isoforme alternative en activant NF $\kappa$ B, induit la survie cellulaire mais aussi l'EMT.

### 3.1.4 Epissage alternatif du VEGF-A

Le VEGF-A est le facteur angiogénique le plus proéminent parmi les membres de la famille du VEGF. Il est d'une importance majeure entre autre dans la cicatrisation, le développement embryonnaire mais aussi dans des maladies cardiovasculaires et le cancer (Hoeben et al., 2004). Le gène codant pour le VEGF-A est composé de 8 exons et il est maintenant établi que les évènements d'épissage interviennent au niveau des exons 5, 6, 7 et 8. Néanmoins, les deux isoformes majeures du VEGF-A sont le VEGF-xxx<sub>a</sub> et le VEGF-xxx<sub>b</sub>. La première est pro-angiogénique et la seconde anti-angiogénique. L'expression du VEGF-xxx<sub>b</sub> est souvent diminuée dans les cancers. Il en résulte une angiogénèse accrue qui accélère la croissance tumorale (Ferrara et al., 2003).

### 3.1.5 Mutations d'acteurs du spliceosome

Il est à relever qu'une mutation germinale d'un des acteurs du spliceosome n'est en aucun cas viable. Cela souligne toute l'importance biologique du phénomène moléculaire qu'est l'épissage. Néanmoins, on trouve des mutations acquises dans certains cancers comme dans le syndrome myélodysplasique (MDS) qui se caractérise par une hématoïèse inefficace aboutissant à une cytopénie. Chez la moitié des patients atteints par cette affection, les gènes codant pour les acteurs du spliceosome que sont SF3B1, SRSF2, U2AF1 and ZRSR2 sont mutés de façon mutuellement exclusive (Haferlach et al., 2014). Il a été démontré que SF3B1 (*Splicing Factor 3b subunit 1*) était capital pour la stabilisation de la sous unité U2 du spliceosome au niveau du site de branchement du pré-ARNm (Gozani et al., 1996). Lorsque ce dernier est muté et inopérant, il en résulte des défauts de reconnaissance du site d'épissage 3', qui aboutissent à l'apparition de nombreux transcrits aberrants comprenant des codons stop prématurés au sein des cellules myéloïdes malignes (Shirai et al., 2015; Yip et al., 2017). Ces transcrits sont alors dégradés via la NMD ce qui réduit considérablement l'expression des gènes ciblés par SF3B1. L'un des gènes cible de SF3B1 est le transporteur de fer mitochondrial ABCB7 (*ATP binding cassette subfamily B member 7*). Il y a alors une importante accumulation de fer au niveau mitochondrial. Ces dernières sont souvent regroupées autour du noyau ce qui forme une couronne dite sidéroblastique. Le fer stocké au niveau mitochondrial n'est alors plus disponible pour la synthèse d'hémoglobine.

### 3.1.6 Mutations de facteurs d'épissage

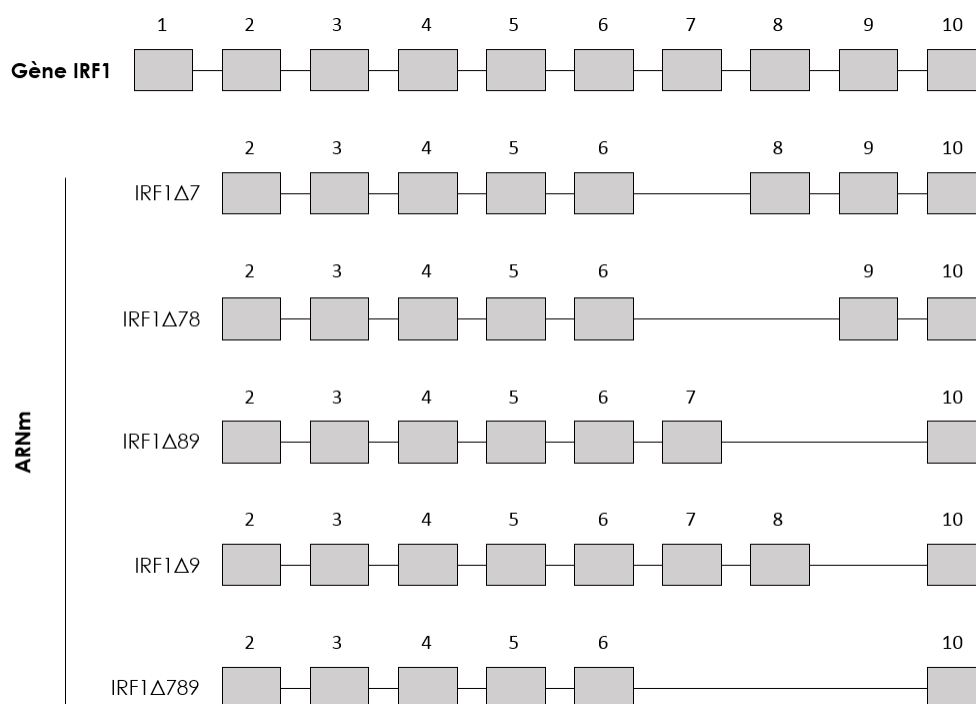
Les facteurs d'épissage sont d'une importance fondamentale dans la régulation de l'épissage. Leur mutation dans le cadre des cancers peut précipiter la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse, ou encore empirer la situation si la mutation est acquise au cours du développement du cancer. Les facteurs d'épissage se liant chacun à plus d'une centaine de gènes, la modification de leur expression ou leur mutation mène à des perturbations transcriptomiques de grande ampleur, perturbant de façon conséquente la biologie des cellules touchées. Par exemple, dans les syndromes myélodysplasiques le facteur d'épissage SRSF2 (*Serine And Arginine Rich Splicing Factor 2*) est fréquemment identifié comme étant muté. Cela conduit à l'apparition d'aberration d'épissage pour plus d'une centaine de gènes dont l'un d'une grande importance, EZH2 (Kim et al., 2015). Ce dernier est impliqué dans la régulation négative de la transcription de nombreux gènes par méthylation. Ainsi, de nombreux gènes autrefois éteints s'expriment alors de façon incontrôlée. Les cellules hématopoïétiques mutées pour SRSF2 détiennent une version d'EZH2 incluant un exon délétère pour son activité méthyltransférase. Les facteurs d'épissage hnRNPs sont aussi impliqués dans la progression tumorale. En effet, il a été démontré que la surexpression d'hnRNPA1 dans les hépatocarcinomes était associée avec l'apparition de métastases via l'augmentation de l'isoforme v6 de CD44 (Zhou et al., 2013).

De plus, l'action des facteurs d'épissage peut être également perturbée par des voies de signalisation qui peuvent être suractivées dans certains cancers. Les protéines SR étant principalement régulées par phosphorylation, leur suractivation peut poser problème. SRSF1 est responsable de l'inclusion d'un exon de la caspase-9 qui donne lieu à la Caspase-9a ou à la Caspase-9b. L'activité de SRSF1 étant principalement régulée par AKT, une kinase constitutionnellement active dans de nombreux cancers comme celui du poumon, cela conduit à un dysfonctionnement de la Caspase-9 qui mène à une résistance accrue des cellules tumorales à l'apoptose (Pandit et al., 2013).

Bien d'autres facteurs d'épissages sont touchés dans de nombreux cancers et tendent à devenir de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

### 3.1.7 Epissage alternatif d'IRF1

Outre son rôle avéré dans le système immunitaire, le facteur de transcription IRF1 détient aussi des activités faisant de lui un suppresseur de tumeur. Toutefois dans plusieurs cancers, les fonctions d'IRF1 dans la mort cellulaire et dans la régulation du cycle cellulaire sont altérées. Dans le cadre de la leucémie il a ainsi été démontré que la région chromosomique contenant la partie codante d'IRF1 était délétée (Green et al., 1999). La liaison avec une nucléophosmine, un facteur catalysant l'assemblage des ribosomes, entraîne également dans la leucémie et la MDS une perte de la fonction de suppresseur de tumeur d'IRF1 (Kondo et al., 1997). Dans le cadre du cancer cervical, il a été démontré que l'oncoprotéine E7 des HPV-16 et 18 (*Human papillomavirus*) pouvait réprimer les régulations transcriptionnelles régulées par IRF1 en venant se fixer à ce dernier (Um et al., 2002).



**Figure 19 : Isoformes alternatives du facteur de transcription IRF1 dans le cancer cervical.**

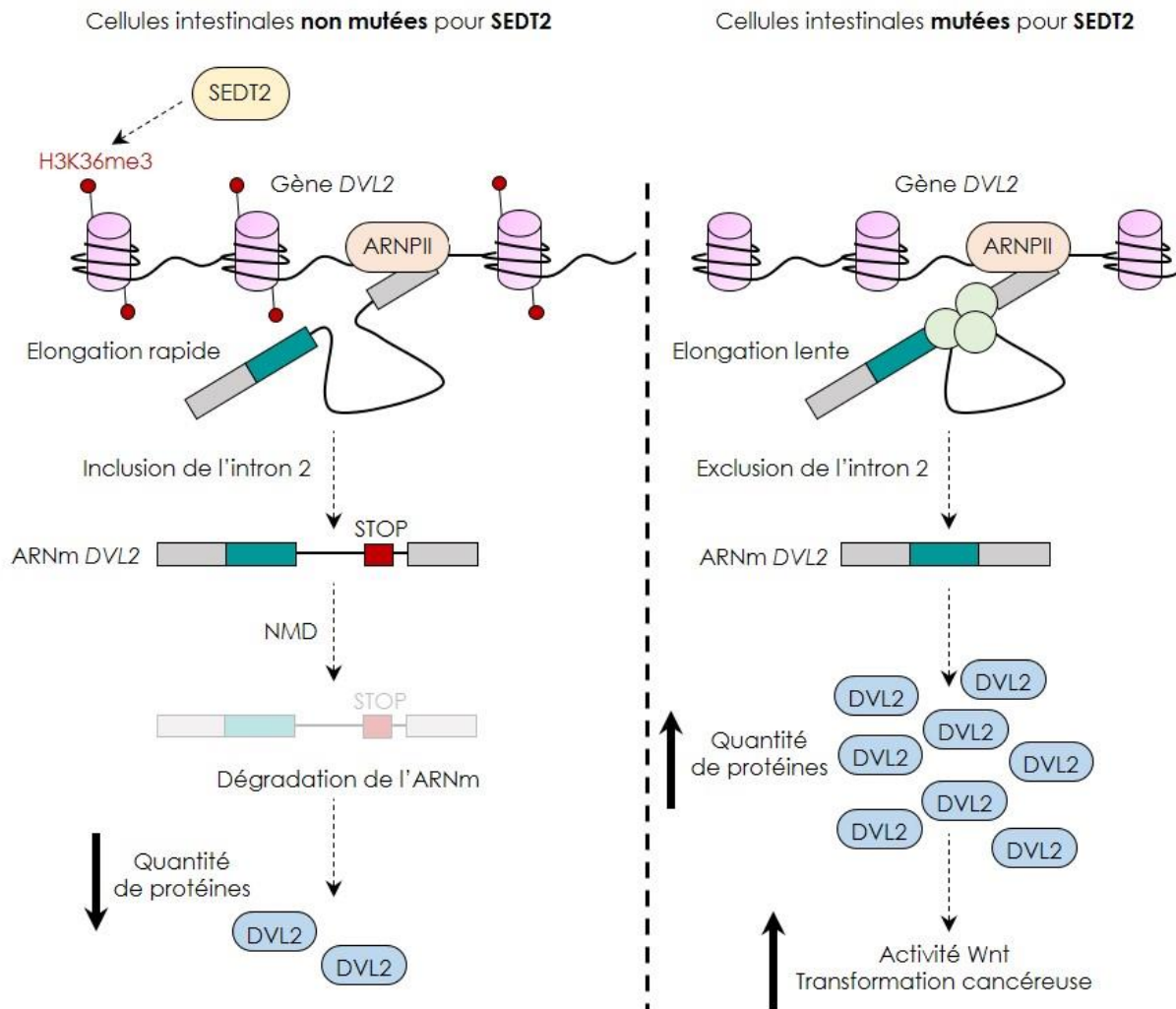
Dans les cellules leucémiques, deux isoformes alternatives d'IRF1 perdant l'exon 2 ou les exons 2 et 3 ont été identifiées. Néanmoins, ces isoformes perdant par la même leur domaine de liaison à l'ADN, elles ne peuvent donc pas exercer leur rôle de facteur de transcription et leur présence ne semble pas perturber l'activité de la forme standard d'IRF1 (Tzoanopoulos et al., 2002). Cependant cette fois dans le cadre

du cancer cervical, quatre transcrits alternatifs ont été identifiés comme étant plus exprimés dans le tissu cancéreux par rapport au tissu sain (**Figure 19**). Par l'intermédiaire d'expériences utilisant des stratégies de clonage, il a été observé que ces isoformes avaient une activité répressive sur l'activité transcriptionnelle de la forme standard d'IRF1. Ces isoformes alternatives semblaient aussi plus stables dans le temps. IRF1 étant responsable de la régulation de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur (p73, FHIT, TGS101), ces isoformes aggravent la prolifération et l'agressivité de ce type de cancer (Lee et al., 2006a).

### 3.1.8 Impact de l'épigénétique sur l'épissage alternatif et le cancer

De nombreuses études montrent que l'épigénétique est dérégulée de façon globale dans de nombreux cancers (Jones and Baylin, 2002). Il en est de même pour l'épissage alternatif mais très peu d'études font le lien entre ces deux phénomènes et les conséquences potentielles de leur relation (Sveen et al., 2016). Dans ce contexte, il a récemment été démontré qu'il existait un lien entre ces deux phénomènes moléculaires dans le cancer du côlon (Kornblihtt, 2017).

La protéine SETD2 (*SET Domain Containing 2*), une méthyltransférase très souvent mutée dans de nombreux cancers, est en charge de la méthylation de l'histone H3K36. Contrairement à la méthylation d'H3K9 et d'H3K27, celle-ci est permissive et permet l'expression du gène ciblé. L'expression de SETD2 et la méthylation d'H3K36 sont diminuées dans le cancer colorectal humain par rapport à du tissu sain. La diminution de la méthylation de cette histone est superposable à une augmentation d'isoformes alternatives aberrantes telles que DVL2, un acteur clé dans la voie de signalisation de Wnt. L'explication provient du fait qu'en temps normal, la méthylation permissive du gène codant pour DVL2 entraîne une élongation transcriptionnelle plus rapide de l'ARN polymérase II. Par conséquent, l'intron 2 de ce gène contenant un codon STOP prématuré est alors inclus dans l'ARNm, ce qui entraîne plus tard sa dégradation par NMD. Quand SETD2 est muté, ce n'est plus le cas car l'élongation transcriptionnelle se fait de façon plus lente. L'intron est alors exclu par épissage, et DVL2 peut alors participer à la voie Wnt qui encourage le phénomène de transformation cancéreuse (**Figure 20**).



**Figure 20 : Impact de l'épigénétique sur l'épissage alternatif dans le cancer du côlon (d'après Kornblihtt, 2017).**

Lorsque le gène DVL2 est méthylé par SEDT2, la progression de l'ARN polymérase II est lente. Il y a alors inclusion de l'intron 2 contenant un codon STOP prématuré induisant la dégradation de l'ARN par (NMD Nonsense Mediated Decay). En revanche quand SEDT2 est mutée, l'absence de méthylation engendre une progression plus rapide de l'ARN polymérase II. DVL2 est alors exprimée et active la voie Wnt qui accentue la transformation cancéreuse.

### 3.2 Epissage alternatif et immunité

De façon générale, bon nombre d'études associent l'EA à des systèmes complexes, où l'information génétique doit être traitée en fonction de facteurs temporels et/ou contextuels comme pour la guidance des axones (Yap and Makeyev, 2016), ou le système immunitaire (Pan et al., 2008). Dans le système immunitaire, des isoformes alternatives ont été identifiées dans des contextes physiologiques et d'autres dans des contextes pathologiques, que ce soit dans le système immunitaire inné, ou acquis (Schaub and Glasmacher, 2017). Pour les macrophages, 81 évènements d'EA ont ainsi été relevés lors d'une stimulation au LPS (O'Connor et al., 2015). Les cellules dendritiques développent elles aussi différents profils d'épissage alternatif, en fonction du statut de leur différenciation et de leur maturité (Shalek et al., 2013). Concernant les lymphocytes T, ce sont pas moins de 1319 évènements d'EA qui émergent lors de la stimulation du TCR et 1575 lors de l'engagement du TCR et de la costimulation de CD28 (Butte et al., 2012), dont des gènes impliqués dans la réponse immunitaire (Martinez et al., 2012). Enfin plus de 90% des gènes multi-exoniques des lymphocytes B subissent un épissage alternatif (Toung et al., 2011). Néanmoins, le rôle des isoformes alternatives dans l'immunité reste vague. De plus le rôle de l'épissage n'a pas encore été caractérisé dans tous les types cellulaires qui composent le système immunitaire, et encore moins pour les cellules infiltrant une tumeur (**Figure 21**).



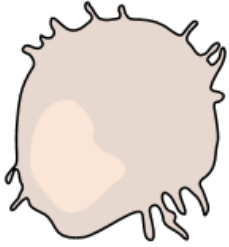
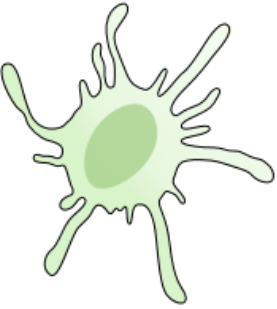
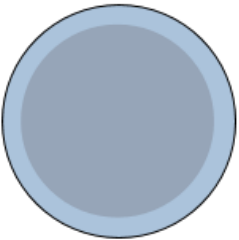
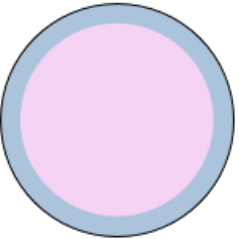
	Analyse génomique	Exemples décrits
 Macrophages	81 évènements d'EA au contact du LPS  791 évènements d'EA sous l'influence Du facteur d'épissage SF3A1	TLR4  MyD88  IL-6  IL-10
 Cellules dendritiques	Lien entre maturité/différenciation et profil d'EA  Evènements d'EA après une stimulation au LPS	MyD88  IL-6  IL-10
 Lymphocytes T	90% des gènes multi-exoniques Subissent un EA	CD44  CD45  MALT1  FOXP3
 Lymphocytes B	1319 évènements d'EA après engagement du TCR  1575 évènements d'EA après engagement du TCR et de CD28	IgM/IgD  IgM  IgE

Figure 21 : Evènements d'épissage alternatif dans différentes cellules de l'immunité innée ou acquise (d'après Schaub and Glasmacher, 2017).

### 3.2.1 Immunité innée

#### 3.2.1.1 Rôle du facteur d'épissage SF3A1

L'importance de l'EA dans les macrophages a été démontrée à travers l'inhibition du facteur d'épissage SF3A1 qui régule l'épissage de gènes impliqués dans la voie de signalisation sous les TLRs (O'Connor et al., 2015). En effet, cela engendre une diminution de la production de régulateurs importants de cette voie, comme CD14, IRAK1 (*Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*) ou encore IKK $\beta$  (Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta). Cela montre toute l'importance de l'EA dans la propension du système inné à s'activer au contact du non soi par l'intermédiaire des TLRs.

#### 3.2.1.2 Epissage alternatif de MyD88

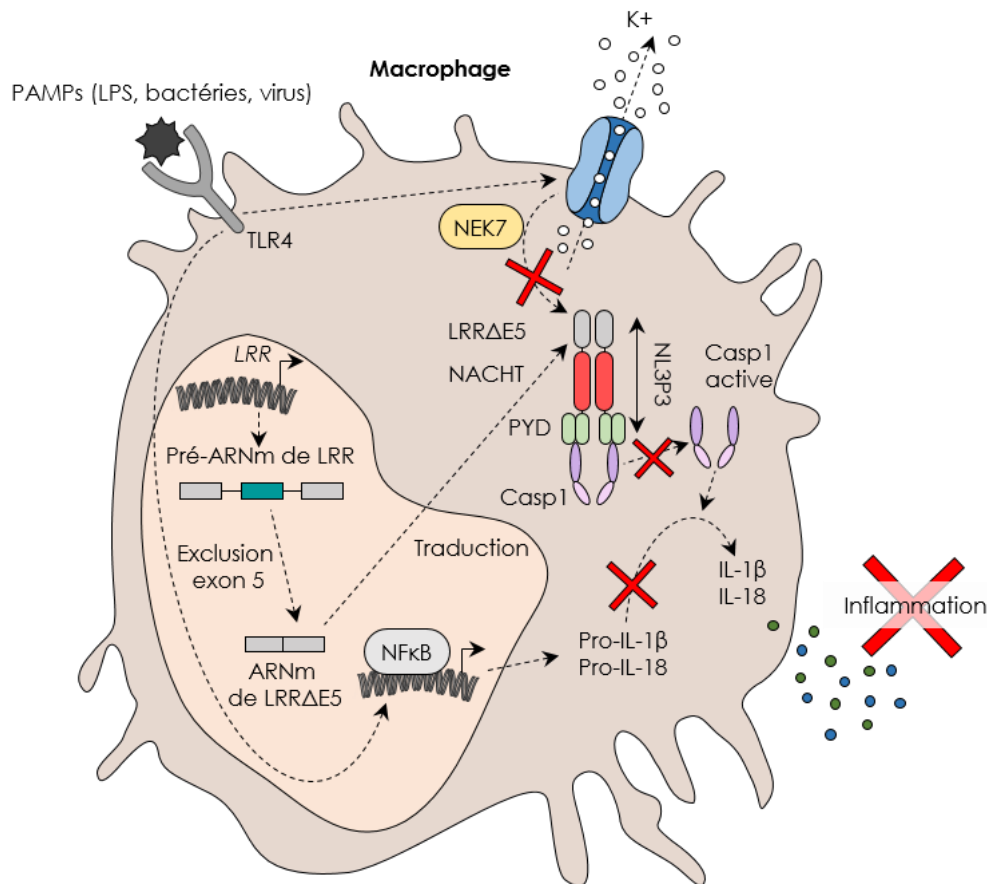
La protéine MyD88 (*Myeloid differentiation primary response 88*) est d'une grande importance dans la voie de signalisation sous les TLRs. Il existe une isoforme longue de MyD88, MyD88L qui est responsable de l'activation de l'immunité innée et une isoforme alternative plus courte MyD88S qui au contraire restreint la réponse immunitaire en bloquant la voie de signalisation. Il a été observé dans ce contexte que les facteurs d'épissage SF3A1, SF3A2, SF3A3 et SF3B1 étaient indispensables à la formation de la forme longue de MyD88 et que leur invalidation génétique causait une inhibition de la réponse immunitaire innée (De Arras and Alper, 2013). Par ailleurs, ces observations sont valables autant dans les macrophages que pour les cellules dendritiques.

#### 3.2.1.3 Epissage alternatif de TLR4

Il a aussi été démontré dans les macrophages et les cellules dendritiques qu'il existait une forme soluble de TLR4 avec une insertion de 144 paires de bases entre l'exon 2 et 3 menant à l'apparition d'un codon STOP prématuré. L'apparition de cette isoforme alternative de TLR4 intervient lors d'une stimulation au LPS. Il en résulte une diminution de la sécrétion de TNF- $\alpha$  et une diminution de l'activation de NF $\kappa$ B (Iwami et al., 2000).

### 3.2.1.4 Epissage alternatif de NLRP3

La protéine NLRP3 (*NOD-Like Receptor family, Pyrin domain containing 3*) intervient dans l'activation de l'inflammasome également composé de ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) et de la Caspase-1. Majoritairement exprimée dans les macrophages, NLRP3 appartient à la famille des PRR (Pattern recognition receptor), des récepteurs permettant de détecter des molécules associées aux pathogènes. Lorsque ces derniers sont détectés, NLRP3 et ASC forment un complexe d'activation de la Caspase-1 qui va alors cliver la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 en IL-1 $\beta$  et IL-18, des cytokines pro-inflammatoires.



**Figure 22 : Effet de l'épissage alternatif du domaine LRR de NLRP3 sur l'inflammation induite par les macrophages.**

Lorsque le TLR4 reconnaît un motif du non soi comme un virus ou une bactérie, ce dernier engendre une sortie d'ions potassiques qui active la kinase NEK7 (NIMA (Never In Mitosis A)-related Kinase 7). NEK7 est essentielle pour l'activation de l'inflammasome, en réaction à la détection du non soi. Pour se faire NEK7 doit interagir avec le domaine LRR (Leucine-Rich Repeat) de NLRP3. Seulement dans certaines circonstances, une isoforme sans exon 5 du domaine LRR est produite. Il n'y a alors plus d'interaction avec NEK7 et l'inflammasome ne s'active pas. L'engagement du TLR4 induit aussi l'activation d'NF $\kappa$ B qui entraîne l'expression de la pro-IL-1 $\beta$  et de la pro-IL-18. Sans l'inflammasome qui active la Caspase 1, ces précurseurs cytokiniques ne sont pas clivés, et l'inflammation est inhibée.

NLRP3 est composé de trois domaines fonctionnels : PYD (*N-terminal Pyrin Domain*), le domaine NACHT et le domaine LRR (*Leucine-Rich Repeat*). Une récente étude a montré l'existence de plusieurs isoformes alternatives de NLRP3 chez l'homme, perdant soit l'exon 5 ou l'exon 7 ou conjointement l'exon 5 et l'exon 7 (Hoss et al., 2019). En dehors de la forme complète de NLRP3, c'est l'isoforme perdant l'exon 5 qui a été trouvée comme étant la plus exprimée dans les macrophages. L'exclusion de l'exon 5 affecte directement le domaine LRR de NLRP3 qui est impliqué dans les interactions protéines-protéines. Par ce fait, le domaine LRR $\Delta$ E5 n'interagit plus avec la protéine NEK7 (*NIMA (Never In Mitosis A)-related Kinase 7*) (He et al., 2016), activée par la sortie d'ions potassiques qui intervient lorsque TLR4 reconnaît une molécule du non soi. Cette interaction conditionne en absence d'EA la mise en place de l'inflammasome. Par conséquent, la Caspase 1 n'est plus à même de convertir la pro-IL-1 $\beta$  et la pro-IL-18 produites sous l'influence d'NF $\kappa$ B en IL-1 $\beta$  et en IL-18. Ainsi, en utilisant des oligonucléotides antisens, il serait possible d'orienter l'épissage alternatif vers une exclusion de l'exon 5 afin de limiter le déclenchement de l'inflammation (Hoss et al., 2019) (**Figure 22**).

#### 3.2.1.5 Epissage alternatif et maturité des cellules dendritiques

Une expérience de séquençage ARN (*Single cell*) a montré qu'il existait différents profils d'épissage alternatif en fonction de la maturité et de la différenciation des cellules dendritiques exposées au LPS (Shalek et al., 2013). Cependant, l'impact fonctionnel de ces différents profils d'épissage n'a pas été élucidé.

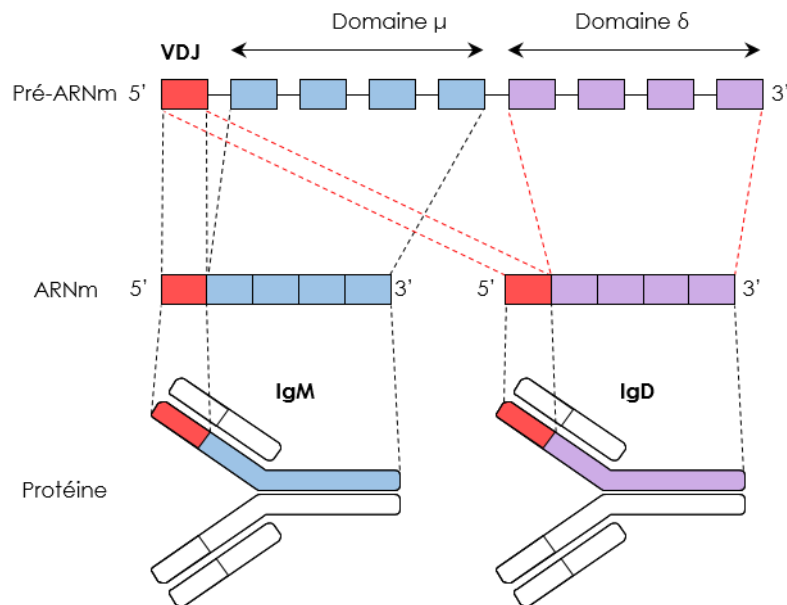
En somme, les mécanismes précédemment décrits sont autant de boucles de rétrocontrôle négatif prévenant l'emballement du système immunitaire inné lorsqu'il doit faire face à une infection.

### 3.2.2 Immunité acquise

#### 3.2.2.1 Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont des acteurs importants de l'immunité adaptative, de par leur propension à sécréter des quantités importantes d'anticorps dirigés contre une multitude de pathogènes. Dans le but de reconnaître de nombreux antigènes, les cellules B réarrangent la portion variable de leurs chaînes lourdes et légères au sein

de la moelle osseuse. Ces cellules encore immatures expriment à leur surface l'IgM (Immunoglobuline M). Une fois testées pour leur capacité à réagir avec le soi, les cellules conformes migrent vers les organes lymphoïdes secondaires tels que la rate ou les ganglions lymphatiques. C'est alors l'IgD qui est exprimé à la surface membranaire. La raison de cette transition de l'IgM vers l'IgD n'est pas encore pleinement élucidée.



**Figure 23 : Transition de l'isotype IgM à IgD par l'intermédiaire de l'épissage alternatif.**

Lors du départ des lymphocytes B vers les organes lymphoïdes secondaires, l'épissage alternatif qui autrefois menait à l'expression de IgM, s'oriente vers une production concomitante des deux isotypes IgM (inclusion du domaine  $\mu$ ) et IgD (inclusion du domaine  $\delta$ ).

Cependant, il a été observé que l'EA était à l'origine de la transition de l'isotype IgM vers l'isotype IgD. Le pré-ARNm codant la chaîne lourde des IgM contient le domaine variable de reconnaissance des antigènes VDJ, le domaine  $\mu$ , mais aussi la séquence codant les IgD (domaine  $\delta$ ). Lors du départ des lymphocytes B vers les organes lymphoïdes secondaires, l'épissage alternatif qui autrefois menait à l'expression d'IgM, s'oriente vers une production concomitante des deux isotypes (Maki et al., 1981). Si le rôle exact de ce changement n'est pas encore totalement connu, on sait en revanche que la protéine se liant à l'ARN Zfp318 (*Zinc finger protein 318*) pourrait être un des acteurs de la régulation de cet EA. En effet, dans les lymphocytes B folliculaires, dont la réponse dépend des lymphocytes T, Zfp318 augmente la quantité d'IgD au détriment des IgM (Enders et al., 2014) (**Figure 23**).

En fonction de leur état de maturité, les cellules B sont également capables de sécréter des IgG, des IgA et des IgE. Il a été noté que les IgE possédaient plusieurs isoformes apparaissant en fonction de différents stimuli et du niveau de maturité des lymphocytes B (Saxon et al., 1997).

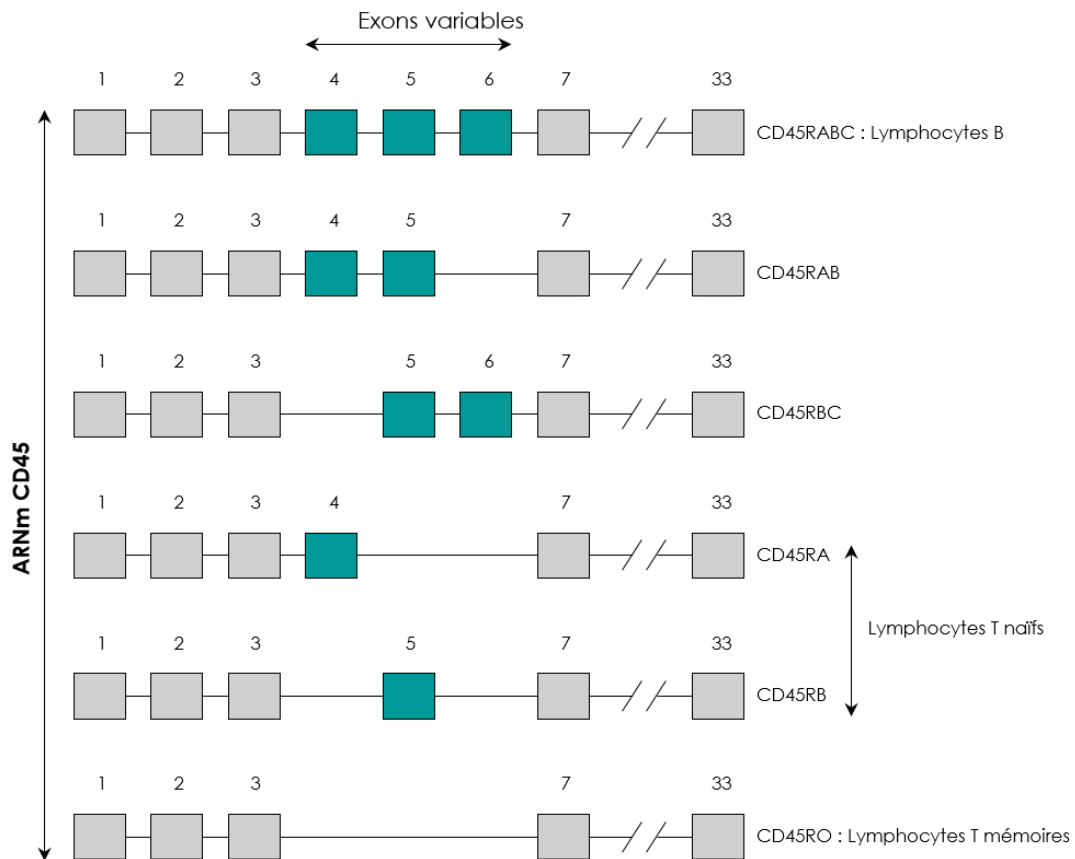
### 3.2.2.2. Lymphocytes T

L'EA est important dans l'établissement de la réponse immunitaire à travers la régulation de son activation mais aussi en orientant sa différenciation.

#### 3.2.2.2.1 Epissage alternatif de CD45

L'un des premiers gènes subissant un EA à avoir été identifié chez les lymphocytes fut *Ptprc* qui code la protéine CD45. Cette tyrosine phosphatase est trouvée en abondance à la surface des lymphocytes T et B puisqu'elle représente environ 10% des protéines membranaires totales. CD45 est connu pour contrôler la signalisation du TCR en modulant la phosphorylation de la kinase Lck. En effet, cette dernière est responsable de l'activation de ZAP70 qui active bon nombre de voies sous le TCR. Le pré-ARNm de *Ptprc* possède 3 exons variables 4, 5 et 6 qui génèrent les isoformes CD45RA, RB, RC, RO. Dans les lymphocytes B, CD45 est exprimé avec la totalité des exons variables on parle alors de CD45RABC ou B220 (Cyster et al., 1996). En revanche dans les lymphocytes T naïfs, CD45 est exprimé soit avec l'exon variable 4 ou avec l'exon variable 5 à savoir CD45RA et CD45RB. Par opposition, il a été observé que chez les lymphocytes T mémoires tous les exons étaient exclus pour former CD45RO (McNeill et al., 2004) (**Figure 24**).

Il existe des différences fonctionnelles entre les isoformes de CD45. Si les isoformes possédant un exon variable permettent de diminuer le seuil d'activation du TCR, l'isoforme sans exons variables CD45RO atténue l'activation de celui-ci en formant un homodimère source d'auto-inhibition (Tong et al., 2005). La transition qui s'opère lors de l'apparition de CD45RO à la membrane des lymphocytes T est finement régulée par des facteurs d'épissages hnRNP ou SR, eux même sous l'influence de voies de signalisation qui succèdent à l'engagement du TCR. La régulation compétitive qui s'engage entre les facteurs d'épissage de manière contexte-dépendante est un phénomène complexe.



**Figure 24 : ARNm des différentes isoformes de CD45**

### *HnRNPL*

La protéine hnRNPL fût l'une des première identifiée pour sa capacité à réguler l'EA de *Ptprc*. Celle-ci est sous l'influence de la signalisation du TCR, et se fixe sur des motifs ARS (*Activation Reponse Sequence*), un enchainement de nucléotides localisés au sein même de séquences *cis*-régulatrices des exon 4, 5 et 6. Il a été démontré qu'à l'état basal, hnRNPL induit l'exclusion des exons 4, 5 et 6 de CD45 donnant les isoformes alternatives CD45RA (exon 4 seul) et CD45RB (exon 5 seul) (Motta-Mena et al., 2010). Néanmoins, le mécanisme de régulation menant à l'une ou l'autre de ces isoformes demeure obscure (**Figure 25**).

### *HnRNPLL*

L'expression de la protéine hnRNPLL (*hnRNPL-Like*) augmente fortement lors de l'engagement du TCR des cellules T à l'état basal ou naïves. Cette expression est également importante dans les cellules mémoires (Khodor et al., 2012). Grâce à des expériences de mutagénèse dirigée, il a été démontré qu'hnRNPLL se fixe sur le motif ARS des exons 4 et 6 pour induire leur exclusion (Oberdoerffer et al., 2008). Contrairement à hnRNPL, hnRNPLL ne se fixe pas sur le motif ARS de l'exon 5 (**Figure 25**).

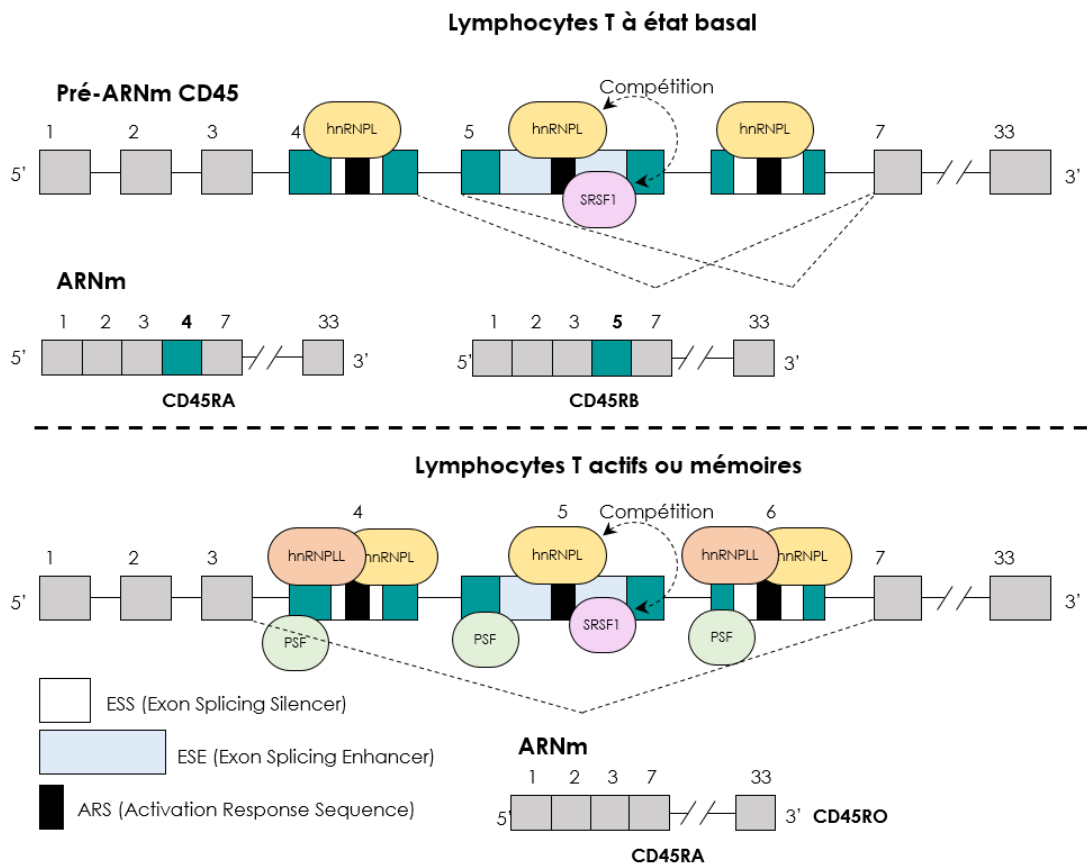
### *PSF*

PSF (*Polypyrimidine-Tract-Binding Protein (PTB)-Associated Splicing Factor*) est une protéine de type hnRNP qui a également été identifiée pour sa propension à induire l'exclusion des exons variables de CD45 (Heyd and Lynch, 2010). Contrairement aux protéines hnRNPL et hnRNPLL, PSF ne se lie pas aux motifs ARS mais à des motifs ayant une séquence riche en purines. L'activation de PSF dépend de son état de phosphorylation. À l'état basal, PSF est phosphorylé par GSK3. Dans cet état, la protéine TRAP150 peut interagir avec PSF et l'empêche de pénétrer à l'intérieur du noyau pour exercer son rôle de facteur d'épissage. En revanche, lors de l'engagement du TCR, la cascade de signalisation qui en découle engendre l'activation de la kinase AKT, qui va alors phosphoryler GSK3. Cette dernière est alors inactivée et ne peut plus phosphoryler PSF qui peut alors entrer dans le noyau pour se fixer au pré-ARNm dont elle est spécifique (**Figure 25**).

### *SRSF1*

SRSF1 (*Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 1*) fait partie de la famille des facteurs d'épissage SR. Elle est impliquée dans l'épissage alternatif de plusieurs pré-ARNm intervenant dans la réponse immunitaire dont CD45. SRSF1 a été décrite comme se fixant au niveau de la séquence ESE (*Exon Splicing Enhancer*) de l'exon 5 pour en induire l'inclusion. Le motif ARS de l'exon 5 est placé au milieu de la séquence ESE. C'est sur ce motif qu'hnRNPL vient interagir pour induire l'exclusion de l'exon 5 de CD45. Ainsi il en ressort que l'inclusion ou l'exclusion de l'exon 5 de CD45 dépend d'une compétition entre ces deux facteurs d'épissage qui se fixent au niveau de séquences très proches (Moulton and Tsokos, 2010) (**Figure 25**).





**Figure 25 : Régulation de l'épissage alternatif de CD45 dans les lymphocytes T.**

À l'état basal une compétition qui s'engage dans les lymphocytes T entre les facteurs d'épissage *hnRNPL* et *SRSF1*. Cela aboutit à la formation des isoformes alternatives caractéristiques des lymphocytes T naïfs, *CD45RA* et *CD45RB*. Dans les cellules mémoires, la coopération qui s'opère entre les facteurs d'épissage *hnRNPL*, *hnRNPLL*, *SRSF1* et *PSF* au niveau de différentes séquences cis régulatrices du pré-ARNm, donne naissance à l'isoforme *CD45RO*, caractéristique des cellules mémoires.

L'apparition de *CD45RO* est un mécanisme de rétrocontrôle sous l'influence de l'EA dont la régulation est importante pour parer à tout emballement de la machinerie immunitaire.

#### 3.2.2.2 Epissage alternatif de CD44 via Sam68

CD44 joue un rôle important dans la migration des lymphocytes en permettant notamment le phénomène d'adhérence de roulement puis d'adhérence ferme avec les cellules endothéliales vasculaires exprimant HA (DeGrendele et al., 1997). Des isoformes alternatives de CD44 ont été observées dans les lymphocytes actifs. La plus exprimée d'entre elles inclut l'exon variable 5 (voir partie sur CD44 dans le cancer), et son apparition dépend de la protéine se liant à l'ARN Sam68 (Matter et al., 2002). Il a été démontré que Sam68 était activée par la cascade de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK suivant l'engagement du TCR. Une fois active, Sam68 forme un complexe avec la protéine SR SRm160 qui interagit avec la séquence ESE de l'exon 5 ce qui induit son inclusion. Cette interaction avec le pré-ARNm de CD44 facilite la reconnaissance des sites d'épissage par le spliceosome. Il a aussi été démontré qu'en s'associant à la protéine Brm, Sam68 est capable de ralentir la progression de l'ARN polymérase II ce qui induit l'inclusion de l'exon 5. Les sites d'épissage faibles sont moins attractifs à travers leur séquence pour le spliceosome qui préfère se fixer au niveau de sites d'épissage forts. Ce ralentissement permet ainsi aux acteurs du spliceosome de se fixer aux sites d'épissage dits faibles encadrant l'exon 5. Pour le moment, peu de choses sont connues quant à l'action potentielle de cette isoforme alternative dans la réponse immunitaire. Il est néanmoins connu que cette isoforme incluant l'exon 5 est plus exprimée dans certaines maladies autoimmunes (Puré and Cuff, 2001).

#### 3.2.2.3 Epissage alternatif de la protéine MALT1

Après l'engagement du TCR et de la protéine membranaire de costimulation CD28, survient l'activation des tyrosine kinases que sont PI3K et PLC $\gamma$ , qui à leur tour activent PKC $\theta$ . Cette dernière phosphoryle alors CARMA1 (*Caspase-recruitment domain (CARD)-containing membrane associated guanylate kinase protein 1*) qui change de conformation. Cela induit le recrutement de BCL-10 (*B-cell lymphoma 10*) et de MALT1 (*Mucosa-associated-lymphoid-tissue lymphoma-translocation gene 1*). Cette dernière est importante dans l'activation des lymphocytes T (Ruefli-Brasse et al., 2003). En effet, elle permet le recrutement de l'ubiquitine-ligase TRAF6 et de la kinase TAK1 qui vont alors ubiquitinyler et phosphoryler respectivement I $\kappa$ B. Cela va entraîner la libération du facteur de transcription essentiel à l'activation des lymphocytes qu'est NF $\kappa$ B, qui va pouvoir se transloquer dans le noyau.

MALT1 possède deux isoformes MALT1A et MALT1B. La différence entre elles réside dans le fait que l'une possède l'exon 7 et l'autre non. MALT1B est majoritaire dans les lymphocytes T naïfs ce qui a pour effet de réguler négativement leur activation. En effet, l'exon 7 de MALT1 absent chez MALT1B et codant pour 11 acides aminés, est essentiel dans le recrutement de TRAF6, et donc dans l'activation subséquente de NFκB. Il a été démontré que l'exclusion de l'exon 7 est sous l'influence de la protéine hnRNP, et que l'inactivation de son gène encourage l'activité des lymphocytes T à travers une augmentation de l'expression de MALT1A. Cette tendance se confirme dans les lymphocytes T actifs qui expriment davantage MALT1A (Meininger et al., 2016).

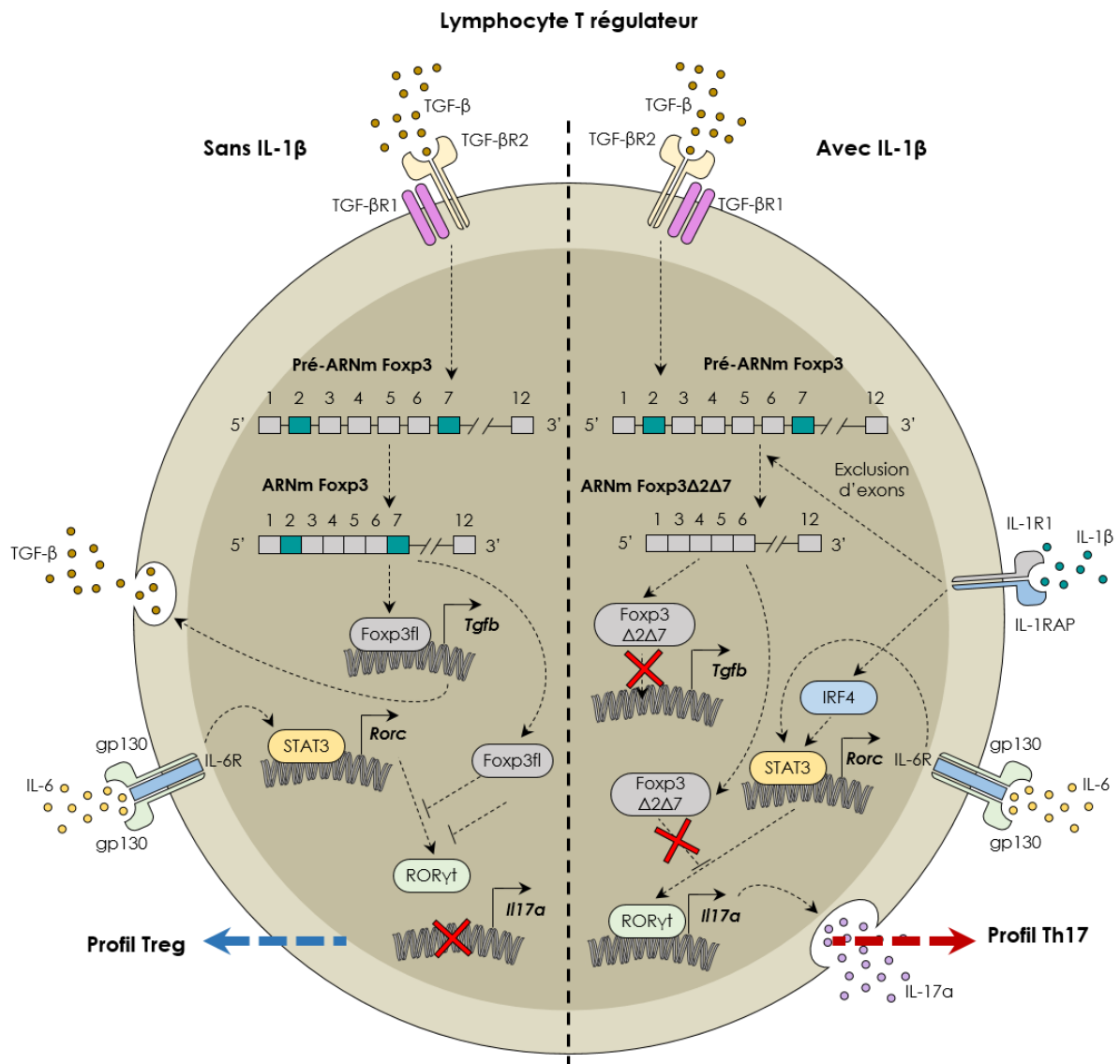
#### 3.2.2.2.4 Épissage alternatif de Foxp3

Le facteur de transcription Foxp3 est d'une grande importance dans deux types de lymphocytes T régulateurs (Treg), à savoir les nTreg et les iTreg. Les premiers sont générés directement dans le thymus de par leur propension à reconnaître avec une forte avidité un CMH de classe 2 présentant un peptide du soi (Jordan et al., 2001). Une fois différenciés ils partent en périphérie pour endiguer d'éventuelles réactions autoimmunes en sécrétant la cytokine immunosuppressive qu'est le TGF-β. Les iTreg sont quant à eux directement différenciés en périphérie à partir de lymphocyte T CD4<sup>+</sup> naïfs ayant reconnu un antigène dans un environnement immunosuppresseur (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Comme les nTregs, ils sécrètent du TGF-β. Il existe un troisième type de Treg, le Tr1. Ce dernier est induit comme les iTregs, mais n'exprime pas le facteur de transcription Foxp3, et sécrète majoritairement la cytokine immunosuppressive qu'est l'IL-10.

Au total trois isoformes de Foxp3 ont été décrites : une complète Foxp3<sup>fl</sup>, une autre perdant l'exon 2 Foxp3<sup>Δ2</sup> et enfin une dernière perdant à la fois l'exon 2 et l'exon 7, Foxp3<sup>Δ2Δ7</sup>. Les différentes isoformes de Foxp3 n'ont pas toutes le même effet sur la différenciation lymphocytaire Treg. En effet, quand les deux premières qui sont les plus exprimées permettent de maintenir le caractère immunosuppresseur des lymphocytes Tregs, la dernière n'y parvient pas. Il a d'ailleurs été montré que lorsque Foxp3<sup>fl</sup> et Foxp3<sup>Δ2Δ7</sup> étaient coexprimées dans des proportions comparables, Foxp3<sup>Δ2Δ7</sup> agit comme un dominant négatif et inhibe l'activité de Foxp3<sup>fl</sup> (Mailer et al., 2009). Il a aussi été observé que l'exon 7 est d'une grande importance pour Foxp3.

Chez des individus mutés au niveau du site d'épissage donneur de l'intron 7, l'exon 7 est exclu. Il en résulte un sévère dérèglement du système immunitaire aboutissant au syndrome IPEX (*Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*) qui se manifeste par une polyendocrinopathie et une entéropathie auto-immune (Harbuz et al., 2010).

Une autre étude a également décrit l'impact de l'épissage alternatif du facteur de transcription Foxp3 dans la plasticité des lymphocytes Treg. Ils ont tout d'abord observé une augmentation importante de l'isoforme alternative Foxp3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et dans des biopsies intestinales de patients souffrant de la maladie de Crohn par rapport à des patients en bonne santé. Ils ont ensuite constaté que les Treg exposés à la cytokine pro-inflammatoire qu'est l'IL-1 $\beta$  expriment davantage Foxp3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7. Cependant, le mécanisme permettant d'expliquer l'augmentation de l'exclusion des deux exons variables de Foxp3 n'est pour l'instant pas expliqué. Il est possible que cela soit dû à l'activation de facteurs d'épissage dans la voie de signalisation sous le récepteur de l'IL-1 $\beta$  (composé des sous unités IL-R1 et IL-RAP). Néanmoins, il a été constaté que les cellules qui expriment davantage cette isoforme alternative sécrètent aussi davantage d'IL-17a, la cytokine caractéristique de la différenciation Th17 (Mailier et al., 2015). Cela est dû au fait que cette isoforme alternative contrairement à Foxp3fl n'est pas capable de se fixer au facteur de transcription ROR $\gamma$ t pour l'empêcher d'induire la transcription du gène codant l'IL-17a. L'IL-6, une cytokine très représentée dans la maladie de Crohn, se fixe sur son récepteur constitué de l'IL-6R et de deux glycoprotéines 130 (gp10) et active via STAT3 la transcription de *Rorc* qui une fois traduit en ROR $\gamma$ t peut alors induire l'expression de l'IL-17a car Foxp3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 ne réprime pas son activité (**Figure 26**).



**Figure 26 : L'IL- $\beta$  induit la transdifférenciation des lymphocytes Treg à travers l'épissage alternatif du facteur de transcription Foxp3.**

Dans les cellules Treg, le facteur de transcription Foxp3 permet l'expression du gène codant pour le TGF- $\beta$ . Il empêche également toute transdifférenciation en cellule Th17, en bloquant la fixation du facteur de transcription ROR $\gamma$ t sur le promoteur de l'Il17 $\alpha$ . Seulement, en présence d'IL-1 $\beta$ , le pré-ARNm de Foxp3 subit un épissage alternatif donnant Foxp3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7. Cette isoforme qui ne peut ni induire l'expression du TGF- $\beta$ , ni bloquer l'action de ROR $\gamma$ t, fait pencher la balance en faveur d'une différenciation Th17.

Ainsi dans cette configuration l'EA de Foxp3 vers l'isoforme Foxp3 $\Delta$ 2 $\Delta$ 7 a un double effet négatif dans la maladie de Crohn. L'inflammation est accrue de par la diminution de la population Treg mais aussi à travers l'augmentation de la population Th17 largement impliquée dans cette maladie. L'Il- $\beta$  pourrait donc être une cible thérapeutique de choix pour diminuer l'inflammation et les atteintes tissulaires intestinales qui en résultent (Ueno et al., 2018).

### 3.3 Epissage alternatif et immunothérapie anticancéreuse

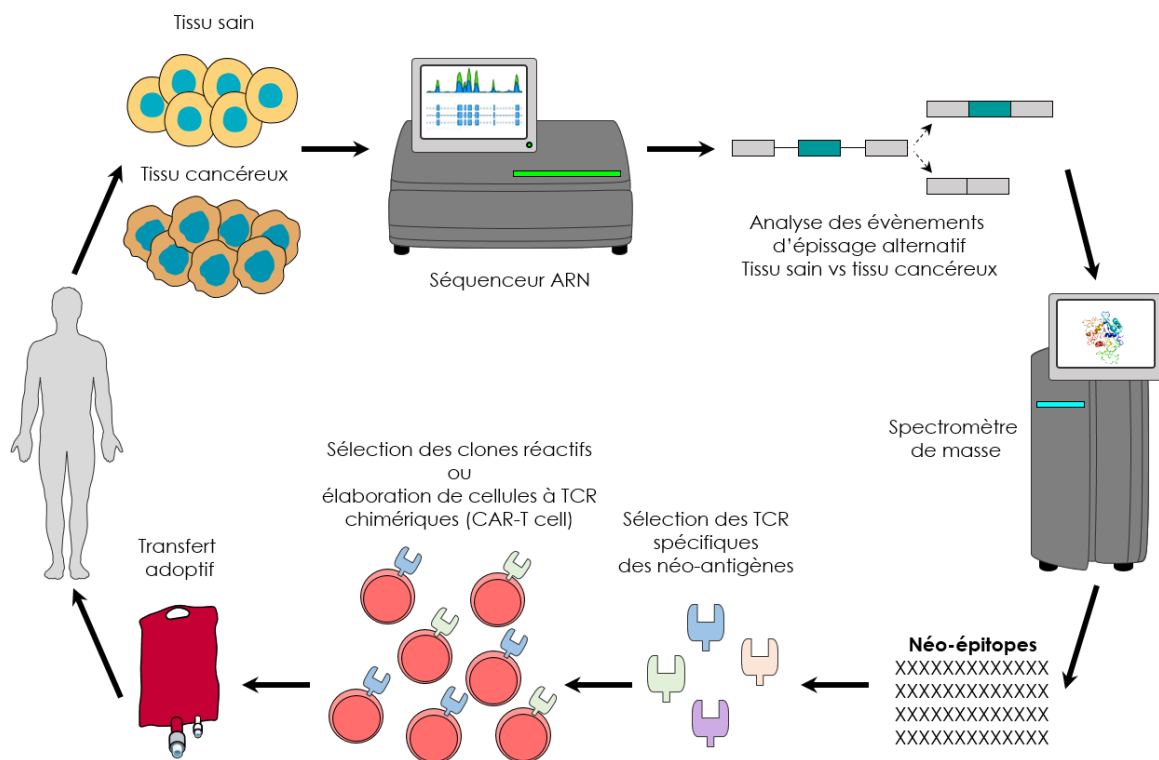
#### 3.3.1 Epissage alternatif et néo-épitopes tumoraux

Il a récemment été démontré au sein d'une étude chez plus de 8705 patients, que les tumeurs comportaient plus de 30% d'évènements d'EA supplémentaires par rapport à des échantillons de tissu sain (Kahles et al., 2018). En se concentrant sur des tumeurs de l'ovaire et du sein qui détenaient en plus des données transcriptomiques des données de spectrométrie de masse (SM), il a été déterminé que 68% des tumeurs ont un ou plusieurs néo-épitopes tumoraux dérivés de l'EA. En revanche, seulement 30% des tumeurs détiennent des néo-épitopes tumoraux issus de mutations somatiques. Ainsi, cela souligne toute l'importance que peut avoir l'analyse des évènements d'EA au sein des tumeurs afin d'identifier de nouvelles cibles. De plus, une autre étude utilisant la SM a démontré que la plupart des antigènes tumoraux issus de 2 lignées murines et de sept tumeurs primaires humaines, provenaient de la traduction d'exons codants en dehors du cadre de lecture, mais aussi de régions non codantes de l'ADN. Autant d'évènements qui peuvent très probablement provenir de dérégulations de l'EA dans ces tumeurs (Laumont et al., 2018).

L'immunothérapie ciblant les *immune checkpoints* tels que PD-1 (*Programmed cell death 1*) ou CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*), est une véritable révolution dans le traitement de nombreux cancers (Ribas and Wolchok, 2018). Dans ce contexte, il a été observé que les tumeurs comportant une haute charge mutationnelle présentent davantage de peptides tumoraux à leur surface *via* les CMH de classe I et II (Segal et al., 2008). Cependant, si de nombreuses études montrent une corrélation positive entre le niveau de mutation des tumeurs et la réponse aux inhibiteurs de *checkpoints* (Samstein et al., 2019), d'autres les contredisent en montrant que des patients parfois très mutés ne répondent pas aux traitements, alors que d'autres peu mutés répondent

(Rizvi et al., 2015). Dans ce cadre, il a été démontré que les patients présentant des mutations somatiques générant de nouveaux sites d'épissage, répondent mieux aux immunothérapies ciblant PD-L1 (Jayasinghe et al., 2018). Ce type de mutation pourrait alors être un nouveau biomarqueur clinique de choix dans la réponse aux inhibiteurs de *checkpoints*.

Les nouvelles technologies telles que le séquençage ARN ou la SM permettent désormais d'identifier des néo-antigènes tumoraux. Grâce à l'avènement des techniques de thérapies cellulaires, il est maintenant possible de cibler ces antigènes en sélectionnant un clone de Ltc spécifique d'un antigène tumoral donné, puis de l'amplifier et de réaliser un transfert adoptif de ces cellules. Il est aussi envisageable d'utiliser des Ltc ayant été reprogrammés génétiquement pour exprimer un TCR chimérique permettant de reconnaître un antigène tumoral précis (CAR-T cells (*Chimeric Antigen Receptor T cells*)) (Figure 27).



**Figure 27 : Immunothérapie anti-cancéreuse et néo-épitopes tumoraux issus de l'épissage alternatif (D'après Frankiw et al., 2019).**

Par séquençage ARN, il est possible d'isoler des événements d'épissage menant à la formation de néoépitopes tumoraux. La spectrométrie de masse permet de déterminer la composition peptidique de ces antigènes. Il est ensuite possible soit d'exposer des cellules T CD8<sup>+</sup> à ces antigènes pour sélectionner et amplifier un clone répondeur, soit de reprogrammer génétiquement le TCR de ces cellules pour qu'il reconnaisse spécifiquement un néoantigène tumoral donné (CAR-T cell).

Néanmoins, il reste de nombreux obstacles à la mise en place de stratégies thérapeutiques permettant de cibler spécifiquement ces antigènes. Il est premièrement capital de déterminer si le néo-antigène tumoral est bien spécifique de la tumeur. L'EA étant régulé de façon tissu-spécifique, il est indispensable d'analyser si l'évènement d'EA trouvé au sein de la tumeur n'a pas lieu ailleurs dans l'organisme et pas seulement dans le tissu sain avoisinant la tumeur (Baralle and Giudice, 2017). Les bases de données transcriptomiques disponibles pour chaque organe pourraient répondre à cette problématique afin d'éviter toutes réponses immunitaires aspécifiques pouvant avoir des effets dramatiques. De plus, il est encore difficile de déterminer les évènements d'EA au niveau sous clonal dans la tumeur. Le séquençage ARN sur cellules uniques pourrait être la clé pour surpasser cette difficulté technique, mais le matériel de départ utilisé pour cette technique est pour le moment trop faible pour espérer observer autre chose que l'expression de transcrits très représentés dans les cellules (Stegle et al., 2015). Cependant, de nouveaux algorithmes semblent prometteurs dans l'identification de transcrits alternatifs à partir de séquençages ARN ayant une couverture relativement faible (Zhang et al., 2019b). Concernant la SM, d'autres problèmes viennent s'opposer à l'usage des néo-antigènes tumoraux issus de l'EA. En effet, le seuil de détection est souvent très haut et nécessite une quantité importante de cellules pour détecter des évènements mineurs d'EA au niveau protéique (Caron et al., 2015). De plus, il est important de tester l'immunogénicité des néo-épitopes tumoraux issus de l'EA. En effet, dans le mélanome et le glioblastome, 51,7-66% des néo-épitopes présentés par le CMH de classe II engendrent une réponse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, et seulement 16-43% de ceux présentés par celui de classe I induisent une réponse des Ltc. Des facteurs tels que la spécificité des peptides pour le CMH, leur abondance mais aussi l'efficacité de leur présentation sont à prendre en ligne de compte. Néanmoins, il apparaît que bon nombre de néo-épitopes issus de l'EA ont un pouvoir immunogénique (Andersen et al., 2013; Kobayashi et al., 2009; Slager et al., 2004).

D'énormes progrès ont été réalisés autour des immunothérapies anti-cancéreuses durant ces dix dernières années (Frankiw et al., 2019). Les néo-épitopes issus de l'EA au niveau tumoral sont peu à peu pris en considération pour élaborer de nouvelles thérapies cellulaires prometteuses pour les patients.



### 3.3.2 Impact de l'épissage alternatif dans les thérapies cellulaires

L'antigène CD19 est exprimé à la surface de la majorité des cellules B des leucémies aiguës lymphoblastiques. La thérapie cellulaire utilisant des lymphocytes T à TCR chimériques reconnaissant spécifiquement cet antigène donne de très bons résultats. Cependant, dans 10 à 20% des cas une rechute est constatée après ce traitement de part une diminution de l'expression de cet épitope (Topp et al., 2014). Il a récemment été découvert que la plupart de ces rechutes étaient dues à un EA de CD19 (Sotillo et al., 2015). L'isoforme alternative CD19 $\Delta$ ex2 n'étant pas reconnue par les CAR-T-19 cela explique les rechutes observées chez certains patients. La modification de l'EA de ce transcrite est sous l'influence du facteur d'épissage SRSF3, mais l'activation de ce dernier au cours de la rechute reste incomprise. Cette découverte a cependant isolé une nouvelle cible issue de l'EA qui permettra de prévenir bon nombre de rechutes chez les personnes atteintes par cette maladie et traitées par CAR-T cells.

L'impact de l'EA dans la réponse immunitaire reste un sujet émergent qui pourrait apporter bon nombre de réponses à des champs d'investigation en immunologie qui demeurent obscures. Néanmoins, si ce mécanisme est bien décrit dans les cellules tumorales, il est toujours très peu exploré chez les cellules qui régissent en partie leur progression, à savoir les celles du système immunitaire. Comprendre les évènements d'EA qui pourraient intervenir au sein du microenvironnement tumoral chez ces cellules permettrait de mieux les utiliser dans le cadre d'immunothérapies anti-cancéreuses.

## Partie 4. Objectifs du travail de thèse

---

Les lymphocyte T CD4<sup>+</sup> sont décrits comme étant de véritables chefs d'orchestre de la réponse immunitaire. En fonction de leur différenciation, ils coordonnent, activent et régulent l'activité de nombreux types cellulaires. Ils ont ainsi un rôle prépondérant dans la résolution de situations pathologiques très variées allant de l'infection bactérienne, jusqu'au cancer. Le nouveau champ d'investigation dans le domaine de l'immunologie qu'est l'épissage alternatif, pourrait apporter des réponses à des problématiques toujours obscures. Ce phénomène moléculaire permettant d'accroître considérablement le transcriptome en fonction d'un contexte donné, pourrait apporter quelques clés pour comprendre comment les cellules immunitaires évoluent dans des environnements changeants. La caractérisation des mécanismes en jeu lors de la polarisation lymphocytaire reste un enjeu majeur sur le plan fondamental et clinique afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce cadre, notre équipe s'attache à la caractérisation des réponses immunitaires anti-tumorales des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. C'est pourquoi ce projet cherche à déterminer si l'épissage alternatif dans ces cellules est impacté par le microenvironnement tumoral. Il a aussi pour objectif de déterminer si l'épissage alternatif peut avoir un impact dans la biologie des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, et potentiellement dans leur réponse anti-tumorale.

---

# MATÉRIEL ET MÉTHODES

---

## Souris

Tous les animaux ont été maintenus dans des installations spécifiques sans agents pathogènes (SPF) au centre zootechnique de Dijon. L'utilisation et l'entretien des animaux ont été approuvés par le Comité d'éthique des expériences animales de l'Université de Bourgogne (protocole approuvé n ° 2212), conformément à la Fédération des associations de laboratoires de sciences animales (FELASA). Seules les femelles entre 6 et 10 semaines ont été utilisées pour les expériences. Les femelles C57BL/6J ont été achetées chez Charles River Laboratories (Saint-Germain sur l'Arbresle, France). Les souris IL-9-eGFP ont été fournies par le Pr R. Flavell.

## Différenciation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> in vitro

### Souris

Les cellules T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> naïves ont été obtenues à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 de type sauvage (WT). Un premier tri magnétique négatif reposant sur le marquage des cellules non-CD4 avec un cocktail d'anticorps biotinylés (anti-CD8a, anti-CD11b, anti-CD45R, anti-CD49b et anti-Ter-119) permet d'isoler les lymphocytes T CD4 totaux. Un second tri magnétique positif, ciblant le CD62L est réalisé afin de purifier les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves (CD62L<sup>+</sup>) (130-093-227, Miltenyi Biotec). La pureté de la population de cellules T isolées dépasse habituellement 95%. Les cellules T naïves ( $2,5 \times 10^6$  cellules/ml) sont ensuite cultivées durant des temps variables en présence d'anticorps anti-CD3 (2 µg/ml) et anti-CD28 (2 µg/ml) nécessaires à leur activation et d'un cocktail de cytokines et d'anticorps bloquants afin d'orienter leur différenciation (**Tableau 1**). Les pré-traitements avec l'inhibiteur de PI3K, LY-294002 (Merck) sont réalisés durant 1h à 0,1 µg/ml. Les cellules ont été cultivées à 37°C, en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans du RPMI 1640 complété avec 10% (vol / vol) de sérum de veau fœtal, 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco), 1% de pénicilline, streptomycine, amphotéricine B et 4 mM d'HEPES (Gibco). Les anticorps anti-CD3 (clone 145-2C11, #BE0001-1), anti-CD28 (clone PV-1, #BE0015-5), anti-IL-4 (clone 11B11, #BE0045) et anti-IFN-γ (clone XMG1.2, #BE0055) ont été obtenus chez BioXcell (West Lebanon, NH, USA). Les cytokines IL-12, IL-6, TGF-β et IL-4 proviennent de chez R & D Systems.

## Humain

Les cellules T CD4<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> naïves ont été obtenues à partir de poches de sang de donneurs sains (Etablissement Français du Sang, Besançon, France). Un premier isolement est effectué via le kit RosetteSep™ d'enrichissement de cellules T CD4<sup>+</sup> humaines. Les cellules isolées sont ensuite marquées avec les anticorps Biologend anti-CD45RA-BV510 (HI100) et anti-CD4-FITC (RPA-T4) et le marqueur de viabilité BD Bioscience FVS700. Les cellules FVC700 négatives, CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> sont triées avec FACSAria™ III (BD Biosciences). Les cellules T naïves (2,5x10<sup>6</sup> cellules/ml) sont ensuite cultivées durant des temps variables en présence d'anticorps anti-CD3 (2 µg/ml) et anti-CD28 (2 µg/ml) nécessaires à leur activation et d'un cocktail de cytokines et d'anticorps bloquants afin d'orienter leur différenciation (**Tableau 1**). Les cellules ont été cultivées à 37°C, en présence de 5% de CO<sub>2</sub> dans du AIM V. Les anticorps anti-CD3, anti-CD28, anti-IL-4 (clone) et anti-IFN-γ ont été obtenus chez BioXcell (West Lebanon, NH, USA). Les cytokines IL-12, IL-6, TGF-β et IL-4 proviennent de chez R & D Systems.

**Tableau 1 : Concentrations des cytokines et anticorps bloquants utilisées pour les différentes différenciations T CD4<sup>+</sup> murine et humaines.**

	anti-IFN-γ	anti-IL-4	IL-12	IL-4	IL-6	TGF-β
<b>Th0</b>	10 µg/ml	10 µg/ml				
<b>Th1</b>		10 µg/ml	10 ng/ml			
<b>Th2</b>	10 µg/ml			10 ng/ml		
<b>Th17</b>	10 µg/ml				20 ng/ml	2 ng/ml
<b>Treg</b>	10 µg/ml					4 ng/ml

## Extraction d'ARNm, rétro-transcription, qPCR et PCR standard

L'ARN total des cellules T a été extrait à l'aide de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'extraction consiste en une séparation de phase Trizol/chloroforme, puis à une précipitation des acides nucléiques par l'isopropanol, suivie de lavages à l'éthanol (75%). Les culots d'ARN sont ensuite séchés et réhydratés avec de l'eau ultra pure (RNase et DNase Free).

La rétrotranscription des ARNm en ADNc est réalisée à l'aide du kit M-MLV reverse transcriptase (28025-013, Invitrogen) et du thermocycleur Veriti (Applied Biosystem). Dans un premier temps, 300 ng d'ARNm totaux sont dénaturés (5min, 65°C) en présence de 100ng/µl d'amorces aléatoires (Random Primers), de 0,5 mM de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) ainsi que d'eau ultrapure pour un volume final de 15 µl. Au cours d'une seconde étape (1h, 42°C puis 15min, 70°C), l'ARN est rétrotranscrit en ADNc en présence de 4 µl de First-Strand Buffer 5X, 200 UI de M-MLV, 5 µM DTT et 40 UI de RNase-OUT (Thermo Scientific).

La quantité d'ADNc est mesurée à l'aide de la méthode de RT-qPCR et du kit PowerUp™ SYBR™ Green PCR Master Mix (A25742, Applied Biosystems) contenant l'enzyme de réplication (Taq polymerase), un mélange des 4 dNTPs constitutifs de l'ADN et un intercalant de l'ADN (SYBR® Green). Cette réaction a pour but d'amplifier de manière exponentielle un fragment d'ADNc déterminé par des amorces spécifiques (**Tableau 2**). Cette réaction est réalisée à l'aide du thermocycleur StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Les PCR standard en point final sont réalisées à l'aide de la Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity (11304011, Thermo Scientific) et d'amorces spécifiques (**Tableau 2**) à partir de l'ADNc généré par rétrotranscription. Cette réaction est réalisée à l'aide du thermocycleur Veriti (Applied Biosystem). Le produit de PCR est ensuite chargé dans un gel d'agarose 1% contenant 2% de bromure d'éthidium. Une fois la migration terminée, le gel est révélé via une exposition aux UV.

## PCR digitale

Les PCR digitales sont réalisées grâce au ddPCR™ Supermix avec des dUTP (Bio-Rad), des sondes Takyon™ No ROX Probe 2X MasterMix UNG (Eurogentec, Seraing, Belgium) à 300 nM, des amorces spécifiques (**Tableau 2**) à 300 nm et avec de l'ADNc généré par RT-PCR comme décrit précédemment. L'ensemble est ensuite mélangé à de l'huile permettant de générer des gouttelettes par émulsion via le Droplet Generator (Bio-Rad). Les gouttelettes obtenues sont alors placées dans un thermocycleur Veriti (Applied Biosystem) 2 min à 50°C, 10 min à 95°C puis 40 cycles de 30 sec à 94°C et de 60 sec à 60°C, et pour finir 10 min à 98°C. L'ensemble est ensuite placé dans le Droplet Reader (Bio-Rad) pour mesurer automatiquement la fluorescence de chaque gouttelette avec le réglage de quantification absolue. Les données obtenues sont analysées via le logiciel QuantaSoft™ software (Bio-Rad) qui permet de déterminer la quantité absolue de copies par µl.

**Tableau 2 : Séquences des amorces utilisées en qPCR et PCR standard (stdr).**

	<b>Cibles</b>	<b>Amorces sens 5'→3'</b>	<b>Amorces antisens 5'→3'</b>
<b>Souris</b>	<i>β-actine</i> (qPCR)	GAAGATCAAGCGAGGCTCCA	CCTTCCTGCATTCATCGTA
	<i>Foxp3</i> (qPCR)	CTCGTCTGAAGGCAGAGTCA	TGGCAGAGAGGTATTGAGGG
	<i>Gata3</i> (qPCR)	AGGATGTCCCTGCTCTCCTT	GCCTGCGGACTCTACCATAA
	<i>Hnmpf</i> (qPCR)	GTCTGCATCCTCCGGCT	CGAACTCAAACCTCCACCCGA
	<i>hnmpf1</i> (qPCR)	CAGATAGATTGGAAGAGACCTCAA	AGCATCTTCATGGGTTGCGA
	<i>Ifng</i> (qPCR)	ACAGCAAGGCGAAAAAGGA	ACAGCAAGGCGAAAAAGGA
	<i>Ii12rb1</i> (qPCR)	CAGCCGAGTGATGTACAAGG	TGGATAAACGGGAAATCTGC
	<i>Irf1-full</i> (qPCR)	CCTGAATAGAGGGCGGCAG	CCTGAATAGAGGGCGGCAG
	<i>Irf1-short</i> (qPCR)	TGTGTGGAGATGTTAGCCCG	CTGTGCGGCTGGAGTTAIG
	<i>Psf</i> (qPCR)	GGGTGGTGGTGGAAACAATGA	AAAGCGCTCAGTACGCATGT
	<i>Rorc</i> (qPCR)	GGTGATAACCCCGTAGTGGA	CTGCAAAGAAGACCCACACC
	<i>Tbx21</i> (qPCR)	ATCCTGTAATGGCTTGTTGGG	TCAACCAGCACCAGACAGAG
	<i>Irf1</i> exon 3 (stdr)	GTCCCGAGCTGGGCCATTC	
	<i>Irf1</i> exon 4 (stdr)	GGAGAAAAAGAGCCAGATCC	
	<i>Irf1</i> exon 5 (stdr)	AAAGTCCAAGTCCAGCCGAG	
	<i>Irf1</i> exon 6 (stdr)	CCACTCAGGGCTACCTGGGT	
	<i>Irf1</i> exon 7 (stdr)	GTCACCGTGTGTCGTCAGCA	
	<i>Irf1</i> exon 8 (stdr)	AACAGACGAGGATGAGGAAG	
	<i>Irf1</i> exon 5 (stdr)		CTGGTTTTGCTCTTAGTGT
	<i>Irf1</i> exon 6 (stdr)		TTATGTCCTTTCATATCC
<i>Irf1</i> exon 7 (stdr)		CGGAGGTGGAAGGCATGGGT	
<i>Irf1</i> exon 8 (stdr)		CATAAGGTCTCGGCTATCT	

	<i>Irf1</i> exon 9 (stdr)		GAGGGCTGTCAATCTCTGGT
	<i>Irf1</i> exon 10 (stdr)		GGTGACAAGGAATGGCCTG
	<i>Tbx21</i> exon 1 (stdr)	AGCAACCACCTGTTGTGGTC	
	<i>Tbx21</i> exon 2 (stdr)	GAGCGGCAAGTGGTGCACT	
	<i>Tbx21</i> exon 3 (stdr)	CTAAAGCTCACCAACAACA	
	<i>Tbx21</i> exon 4 (stdr)	TGCCTGCAGTGCTTCTAACA	
	<i>Tbx21</i> exon 3 (stdr)		GTCTGGGTGGACATATAAGC
	<i>Tbx21</i> exon 4 (stdr)		GCGTCTGGTAGGCAGTCAC
	<i>Tbx21</i> exon 5 (stdr)		ATCCTTTGGCAAAGGGGTTG
	<i>Tbx21</i> exon 6 (stdr)		GTGGGTCCAGGTGGCGAGG

	<b>Cibles</b>	<b>Amorces sens 5'→3'</b>	<b>Amorces antisens 5'→3'</b>
<b>Humain</b>	<i>BACTIN</i> (qPCR)	GTTGTCGACGACGAGCG	GCACAGAGCCTCGCCTT
	<i>IFNG</i> (qPCR)	GAGTGTGGAGACCATCAAGGA	GTATTGCTTTGCGTGGACA
	<i>IL12RB1</i> (qPCR)	TGTGCGTCCCCCTGAAAAC	CTGGGTGGCTGCTCTTICA
	<i>IRF1-full</i> (qPCR)	GCTCCACTCTGCCTGATGAC	GCTCCACTCTGCCTGATGAC
	<i>IRF1-short</i> (qPCR)	CCTCATCCTCATCTGTGTAGCTGG	CCGACTGCTCCAAGAGCTCAGAGG
	<i>IRF1</i> exon 6 (stdr)	ACTGGAGGTGGAGCAGGCC	
	<i>IRF1</i> exon 7 (stdr)	CCATGCCCTCCACCTCTGAA	
	<i>IRF1</i> exon 8 (stdr)	ATTACCTGAGGACATCATGA	
	<i>IRF1</i> exon 8 (stdr)		CTCCTCATCCTCATCTGTT
	<i>IRF1</i> exon 9 (stdr)		TGCCACTCCGACTGCTCCAA
	<i>IRF1</i> Exon 10 (stdr)		CTGTAGACTCAGCCCAATAT

Les niveaux d'ARNm relatifs sont déterminés en utilisant la méthode  $\Delta C_t$ . Les valeurs sont normalisées par rapport à l'actine- $\beta$  (expression relative).



## ELISA (dosage d'immunoabsorption par enzyme liée)

Après 72h de polarisation, les surnageants de culture des lymphocytes T sont dosés par ELISA pour l'IFN $\gamma$  (555138, BD Biosciences) selon le protocole du fabricant. Brièvement, un anticorps de capture monoclonal est déposé sur la nuit à 4°C au fond des puits. Le lendemain, après avoir bloqué les sites aspécifiques à l'aide de PBS + SFV 10% pendant 1h à température ambiante, les surnageants et la gamme étalon sont déposés et incubés sur la nuit à 4°C. Par la suite, un anticorps monoclonal de détection couplé à la biotine ainsi que l'enzyme HRP couplée à l'avidine sont déposés 1h à température ambiante. L'ajout du substrat de l'HRP permet de révéler la présence de cytokines. L'ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> permet l'arrêt de la réaction, l'absorbance est lue à 450nm par un spectrophotomètre lecteur de plaques UVM 340 Asys (BioServ). La concentration en cytokine est alors déterminée à l'aide de la gamme étalon.

## Analyse Western Blot (WB)

Les cellules sont lysées dans du tampon boiling contenant 1% de SDS, 1 mM d'orthovanadate de sodium et 10 mM de Tris (pH 7,4) additionné d'un cocktail d'inhibiteur de protéases et phosphatases (Pierce) pendant 20 minutes à 4°C. Les lysats cellulaires sont soumis à une sonication (10 secondes à 30%) pour permettre la fragmentation de l'ADN et libérer certaines protéines fixées à celui-ci. La concentration protéique est évaluée par un test de Lowry. Les protéines sont dénaturées par chauffage à 95°C pendant 5 minutes en présence d'un tampon de charge (pH 6,8) composé de 10% de DTT (1M), 187,5 mM de Tris-HCl, 6% de SDS, 0,03% de Rouge phénol et 30% de glycérol. 20  $\mu$ g de protéines sont déposés et séparés par SDS-PAGE, puis transférés sur des membranes de nitrocellulose (Schleicher & Schuell). Après le blocage des sites aspécifiques à l'aide de PBS additionné de 5% de lait non gras et 0,1% de Tween 20 (PBST-lait 5%), les membranes sont incubées sur la nuit avec un anticorps primaire (**Tableau 3**) dilué (1  $\mu$ g/ml) dans du PBST-BSA 5%. Le lendemain, les membranes sont lavées et incubées 1 heure avec un anticorps secondaire anti espèce couplé à l'enzyme HRP. Après des lavages supplémentaires, les membranes sont incubées 1 minute avec le substrat de l'enzyme (Santa Cruz Biotechnology) avant d'être révélées à l'aide du système Chemidoc™ XRS+ (Bio-Rad).

**Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés pour les Western blot (WB).**

Cible	Clone	Isotype	Fournisseur
$\beta$ -actine	AC-15	Mouse	Sigma-Aldrich
HSC70	B-6	Mouse	Santa Cruz
IRF1-N-ter	Polyclonal	Rabbit	Aviva systems biology

### Clonage

Le clonage des isoformes longues (*Irf1-full*) et courtes d'*Irf1* (*Irf1-short*) est réalisé à partir d'une première PCR encadrant la forme longue d'*Irf1* avec des amorces spécifiques de la forme longue et à l'aide de la Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity, puis d'une migration sur gel. Les deux bandes qui apparaissent sont extraites du gel puis séquencées via la technologie Sanger. La bande la plus légère correspond à la forme courte d'*Irf1*. Celle-ci comprend une exclusion de l'exon 7 et une inclusion de l'intron 8 avec un codon STOP en phase avec le cadre de lecture. La forme courte est donc amplifiée avec des amorces placées au niveau de l'exon 2 où se trouve l'ATG, et au niveau de l'extrémité de l'intron 8 (au niveau du codon STOP). Différentes amorces et plasmides sont utilisés en fonction de l'expérience réalisée (**Tableau 4**).

La construction luciférase *Il12rb1-luc* a été obtenues en insérant 154 pb (Kano et al., 2008b) du promoteur murin de *Il12rb1* au niveau du site de multiclonaage du vecteur basique pGI3 (Promega, Charboniere, France). Le fragment inséré est amplifié à partir d'ADNg de souris C57BL/6 par PCR, à l'aide de la Platinum™ Taq DNA Polymerase High Fidelity et d'amorces spécifiques (**Tableau 4**).

Les tag histidine sont ajoutés en incluant leur séquence dans les amorces antisens pour positionner l'histidine à l'extrémité C-ter de la protéine. Un codon STOP est également inclus après les nucléotides codant l'histidine pour que l'YFP du plasmide ne soit pas exprimée. Les isoformes taguées avec l'YFP ont des amorces antisens sans codon stop pour que l'YFP du plasmide soit en phase et exprimée. La ligation des fragments d'ADN a été réalisée avec In-Fusion® HD Cloning Plus (Takara).

**Tableau 4 : Liste des amorces et plasmides nécessaires à la réalisation des différents clonages.**

Test	Cible	Plasmide	Amorces sens 5'→3'	Amorces antisens 5'→3'
<b>ChIP</b>	<i>lrf1-full</i>	pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO	CTCAAGCTTCGAATTATG CCAATCACTCGAATGCGG	TGGTGCACAAGGAATGGCCT
	<i>lrf1-full-his</i>	pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO	CTCAAGCTTCGAATTATG CCAATCACTCGAATGCGG	CTCGAGTTAATGGTGATGGTGAT GGTGTGGTGCACAAGGAATGGCCT
	<i>lrf1-short</i>	pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO	CTCAAGCTTCGAATTATG CCAATCACTCGAATGCGG	CGAGGGCTGACTCAGAGCCG
	<i>lrf1-short-his</i>	pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO	CTCAAGCTTCGAATTATG CCAATCACTCGAATGCGG	CTCGAGTTAATGGTGATGGTGATG GTGCGAGGGCTGACTCAGAGCCG
	<i>Il12rb1</i>	pGL3	AGGCTTACTCACCCCAGGT	CTCATTGTCTCCAGGCCAGT
<b>Test luciférase</b>	<i>lrf1-full</i>	pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO	CTCAAGCTTCGAATTATG CCAATCACTCGAATGCGG	TGGTGCACAAGGAATGGCCT
	<i>lrf1-short</i>	pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO	CTCAAGCTTCGAATTATG CCAATCACTCGAATGCGG	CGAGGGCTGACTCAGAGCCG
	<i>Il12rb1</i>	pGL3	AGGCTTACTCACCCCAGGT	CTCATTGTCTCCAGGCCAGT
<b>FLIM-FRET</b>	<i>lrf1-full</i>	mVenus N1	CTCAAGCTTCGAATTATGC CAATCACTCGAATGCGG	GTCGACTGCAGAATTTTG GTGCACAAGGAATGGCCT
	<i>lrf1-short</i>	mCerulean C1	CTCAAGCTTCGAATTAATG CCAATCACTCGAATGCGG	GTCGACTGCAGAATTCA CGAGGGCTGACTCAGAG
<b>Transduction rétrovirale</b>	<i>lrf1-short</i>	pMXs-IRES-GFP	GGTGGTACGGGAATTAT GCCAATCACTCGAATG	GGCCTTGCAGGAATTTAGC CGAGACTCAGTCGGGAGC

## Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Des cellules 293T cultivées en DMEM 4,5 g/L de glucose et 10% SVF, sont transfectées de manière transitoire pendant 48 heures à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec le plasmide comprenant le promoteur de l'*l12rb1* (plasmide pGL3), et avec les plasmides d'expression pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO-lrf1-full, pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO-lrf1-full-His, pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO-lrf1-short, pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO-lrf1-short-His (Invitrogen). L'immunoprécipitation de la Chromatine (ChIP) été effectuée selon les instructions du fabricant (53009, ChiP-IT Express Enzymatic; Active Motif). 10x10<sup>6</sup> cellules ont été fixées dans une solution contenant 37% de formaldéhyde pendant 10 minutes, la réaction est stoppée par l'ajout de glycine à 0,125 mol/L. La chromatine est isolée puis fragmentée à une longueur moyenne de 300 à 500 pb en utilisant le M220 Focused-ultrasonicator (Covaris®). 7 µg d'ADNg sont incubés avec 3 µg d'anticorps spécifique ou contrôle (**Tableau 5**) sur la nuit à 4°C. Après l'éluion de la chromatine, le cross-link entre les protéines et l'ADN est inversé, puis purifié. L'ADN immunoprécipité est analysé par RT-qPCR à l'aide d'amorces spécifiques (**Tableau 5**).

**Tableau 5 : Liste des anticorps et amorces utilisées pour les ChIP.**

Anticorps	Cible	Clone	Isotype	Fournisseur
	GFP	Polyclonal	Rabbit	Thermo Scientific
	Histidine	HIS.H8	Mouse	Thermo Scientific
Amorces	Cible	Amorces sens 5'→3'		Amorces antisens 5'→3'
	<i>l12rb1</i>	AGGCTTACTCACCCCAGGT	CTCATGTCTCCAGGCCAGT	

## Immunoprécipitation d'ARN

50x10<sup>6</sup> de cellules Th1 murines ou humaines ont été utilisées pour chaque expérience. L'immunoprécipitation de l'ARN (RIP) a été réalisée avec le kit d'immunoprécipitation des protéines se liant à l'ARN Magna RIP™ (Merck), conformément aux instructions du fabricant. Les ARN ont été immunoprécipités avec 5 µg d'anticorps anti-PSF (Abcam). Les ARN ont été soumis à une rétrotranscription en ADNc et analysés par PCR quantitative comme décrit précédemment.

## Transfection de siRNA

L'extinction d'expression par siRNA est réalisée à partir de siRNA validés contrôle ou spécifiques pour *Psf* (S105783848, QIAGEN) et des siRNA spécialement mis au point pour éteindre *Irf1-full* et *Irf1-short* (Life technologies). 3x10<sup>6</sup> lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs sont ensemencés en plaque 24 puits dans du RPMI 1640 additionné de 10% de SVF décomplémenté. Le mix de transfection est composé de milieu sans sérum (Opti-MEM), du réactif de transfection TransIT-TKO (MIR2154, Mirus) et du siRNA à 25 nM. Le mélange est déposé sur les cellules qui incubent durant 24h. Celles-ci sont alors mises en différenciation comme décrit précédemment.

## Test luciférase

Des cellules 293T cultivées en DMEM 4,5 g/L de glucose et 10% SVF, sont transfectées de manière transitoire pendant 48 heures à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec le plasmide luciférase, le plasmide contrôle pSV-β-Galactosidase et les différents plasmides d'expression, pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO-Irf1-full et pcDNA6.2/C-YFP-GW/TOPO-Irf1-short (Invitrogen) (**Tableau 4**). L'activité luciférase est mesurée en utilisant le système de dosage Dual-Glo® Luciferase (E2920, Promega) selon les instructions du fabricant. Suite aux 48h de transfection, le réactif Dual Glo Luciferase® est ajouté aux cellules préalablement lysées. Après 10 minutes d'incubation, la luminescence de type « firefly » est mesurée avec un luminomètre Wallac 1440 Victor2 (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). La réaction est ensuite interrompue avec le réactif Stop and Glo®, après 10 minutes, la luminescence de type « renilla » est mesurée. L'activité « firefly » luciférase est ensuite normalisée en

fonction de l'activité  $\beta$ -Galactosidase mesurée au préalable avec le même lysat cellulaire.

### Immunofluorescence

$1 \times 10^6$  cellules T naïves purifiées ont été différenciées pendant 24 heures. Les cellules sont lavées, puis fixées pendant 10 min à 4° C avec 4% de PFA et sont perméabilisées avec du méthanol 100% glacial sur de la glace. Les cellules sont incubées 45 minutes à température ambiante dans un tampon PBS-0,5% BSA et Triton X-100 afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques et faire perdurer la perméabilisation. Les échantillons sont ensuite incubés sur la nuit à 4°C avec des anticorps primaires (**Tableau 6**). Le lendemain, les cellules sont lavées puis incubées pendant 1 h à température ambiante avec un anticorps secondaire fluorescents Alexa Fluor 568 (**Tableau 6**). Les cellules sont ensuite déposées sur une lame Superfrost Ultra Plus® (Thermo Scientific) où une goutte de milieu de montage contenant du DAPI (P36931; Molecular Probes) est ajoutée au préalable. Les lames sont observées avec un microscope vertical équipé d'un appareil à couplage de charge (Zeiss), les cellules sont photographiées au grossissement X40 ou X63 avec une ouverture numérique de 1,4. Les images sont analysées par le logiciel ZEN (Zeiss).

**Tableau 6 : Anticorps nécessaire à la réalisation de l'immunofluorescence.**

Cible	Clone	Isotype	Fournisseur
PSF	Polyclonal	Rabbit, IgG	Abcam
IgG Rabbit	Polyclonal	Goat, IgG	Thermo Scientific

## Durée de vie de fluorescence (FLIM & FRET)

Des cellules 293T cultivées en DMEM 4,5 g/L de glucose et 10% SVF, sont transfectées de manière transitoire pendant 48 heures à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec le plasmide mVenus-C1-IRF1-full et mCerulean-C1-IRF1-short (Addgene) (**Tableau 4**). Les images de durée de vie de fluorescence (FLIM) ont été collectées à l'aide d'un module de comptage de photons uniques (TCSPC) corrélé dans le temps (PicoQuant) sur un microscope à balayage Nikon A1-MP. L'imagerie a été réalisée avec un objectif × 60 Apo IR (NA: 1.27, Water Immersion, Nikon). L'excitation biphotonique à 820 nm était fournie par un laser IR (Chameleon, Coherent) qui délivrait des impulsions femtosecondes à un taux de répétition de 80 MHz. L'émission de fluorescence de CFP a été collectée à travers un filtre d'émission passe-bande FF01-494 / 20 (Semrock) en utilisant un détecteur à diode à avalanche à photon unique. L'enregistrement de la durée de vie TCSPC a été effectué sur 200 canaux temporels (résolution finale 0,64 ps). Nous avons effectué une analyse globale de la durée de vie des régions d'intérêt des images FLIM à l'aide du logiciel SymPhoTime (PicoQuant). Les durées de vie de la fluorescence ont été calculées en ajustant la queue de la décroissance de la fluorescence avec un modèle biexponentiel.

## Transduction rétrovirale

La surexpression d'IRF1-short dans les cellules a été réalisée par infection rétrovirale, pour cela *Irf1-short* a été cloné dans le vecteur rétroviral pMYs-IRES-GFP (Cell Biolabs).

Les particules rétrovirales sont générées à partir des cellules platinum-E. La lignée cellulaire Platinum-E (Plat-E) a été générée à partir de cellules 293T modifiées afin de produire des particules rétrovirales. La présence du promoteur fort EF1a assure une forte expression et une meilleure stabilité des gènes rétroviraux (Gag, Pol, ecotrope env). Les plasmides permettant la surexpression d'IRF1-short sont transfectés dans les cellules plat-E à l'aide de la Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

Après 48h le surnageant contenant les particules rétrovirales est récolté et mis au contact des lymphocytes T CD4 naïfs en prolifération en présence de sulfate de protamine (10µg/ml, APP Pharmaceutics) dans une plaque de 24 puits coatée

avec des anticorps anti-CD3 (2 µg/ml) et anti-CD28 (2 µg/ml). La plaque est alors centrifugée pendant 90 minutes à 1000 g à 32 ° C. Les cellules T CD4<sup>+</sup> naïves infectées sont récoltées après 2 jours et triées par cytométrie en flux selon l'expression de la GFP. Les cellules positives pour la GFP sont ensuite différenciées en lymphocytes Th1 comme décrit précédemment.

### Cytométrie de flux

Les cellules sont marquées avec différents anticorps (**Tableau 7**) pendant 15 minutes à température ambiante. Après le marquage membranaire, 2 ml de solution de lyse des globules rouges (349202, BD Biosciences) sont ajoutés pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite centrifugées (400 g, 5 minutes) et remises en suspension dans un tampon de cytométrie en flux (00-4222-26, eBiosciences). Tous les événements sont acquis par un cytomètre BD LSR-II équipé du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences) et les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon).

Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont cultivées pendant 5 jours puis stimulées pendant 4 heures à 37° C dans un milieu de culture contenant du 13-acétate de 12-myristate de phorbol (PMA, 50 ng/mL, Sigma-Aldrich), de la ionomycine (1 µg/mL ; Sigma-Aldrich) et de la monensine (GolgiStop; 1 µL/mL; BD Biosciences). Après le marquage des marqueurs membranaires, les cellules sont fixées et perméabilisées 15 minutes à température ambiante (00-5521-00, Foxp3 Fixation / Permeabilization kit, eBiosciences), puis marquées pour l'IL-9 intracellulaire (APC, RM9A4, Biolegend) 45 minutes à température ambiante.



**Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés en cytométrie.**

	<b>Cible</b>	<b>Clone</b>	<b>Isotype</b>	<b>Fournisseur</b>
<b>Souris</b>	VioBlue CD4	GK1.5	Rat	Miltenyi Biotec
	PE IFN-γ	REA638	Human	Miltenyi Biotec
	PE CD62L	MEL14-H2.100	Rat	Miltenyi Biotec
	FITC CD4	H129.29	Rat	BD Biosciences
	VioGreen CD45	30-F11	Rat	Miltenyi Biotec
	APC CXCR3 (CD183)	CXCR3-173	Hamster	Miltenyi Biotec
	PE-Vio770 CCR6 (CD196)	REA277	Human	Miltenyi Biotec
<b>Humain</b>	PE CD62L	DREG-56	Mouse	BD Biosciences
	APC CD45RA	REA562	Mouse	Miltenyi Biotec
	BV510 CD45RA	HI100	Mouse	Biolegend
	FITC CD4	RPA-T4	Mouse	Biolegend
	BV421 CD4	L200	Mouse	BD Biosciences
	APC-Cy7 CXCR3 (CD183)	G025H7	Mouse	Biolegend
	BV421 CD25	2A3	Mouse	BD Biosciences
	BV605 CCR6 (CD196)	G034E3	Mouse	Biolegend
	Alexa Fluor 647 CXCR5 (CD185)	RF8B2	Rat	BD Biosciences
	PE PD-1 (CD279)	EH12.2H7	Mouse	Biolegend
	PerCP-Cy5.5 IL7-Rα (CD127)	A019D5	Mouse	Biolegend
	PE-Cy7 CCR4 (CD194)	1G1	Mouse	BD Biosciences
	Fixable Viability Stain 700			BD Biosciences

## Analyse NGS

Pour la préparation de la banque de RNA-Seq, l'ARN total des cellules T a été extrait à l'aide de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). L'ARNr a été supprimé à l'aide du kit d'élimination des ARNr de Ribo-zero (Illumina, San Diego, CA, États-Unis). 100 ng d'ARN appauvri en ARNr ont été utilisés pour la préparation de la banque en utilisant le TruSeq Stranded Total RNA Library Prep kit (Illumina) en suivant les instructions du fabricant. Le séquençage de l'ARN a été effectué sur l'appareil NextSeq (Illumina). Les banques RNA-seq ont été séquencées par lecture de 75 pb en double sens. Les fichiers FASTQ ont été alignés en utilisant BWA (version mm10 du génome *Mus Musculus*) pour Illumina. L'analyse a été effectuée en utilisant TopHat pour Illumina. Les fichiers générés ont été traités avec un logiciel Cufflinks pour obtenir des gènes exprimés annotés dans chaque sous-type étudié. Ensuite, l'expression différentielle

entre les échantillons a été analysée avec Cuffdiff. Le regroupement hiérarchique non supervisé des échantillons a été effectué en utilisant le logiciel Gene Cluster 3.0 et visualisé avec le logiciel ClustVis. Les expressions géniques ont été normalisées et centrées par rapport à la moyenne. Le regroupement hiérarchique a été effectué à l'aide des mesures de corrélation et de l'analyse complète des liens.

### **Expériences de croissance tumorale**

Les cellules de mélanome murine MC38, CT-26 et B16-F10 ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans du DMEM contenant 4,5 g/L de glucose additionné de 10% de sérum de veau foetal, 1% de pénicilline, Streptomycine, amphotéricine B (Gibco), 4 mM d'HEPES (Gibco) et 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco). Les cellules ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). Toutes les cellules ont été régulièrement testées pour la contamination par les mycoplasmes en utilisant le kit de détection Mycoalert Mycoplasma (Lonza) et ont été jugées négatives. Pour induire la formation de tumeur,  $2 \times 10^5$  cellules ont injectées en sous-cutanée chez les souris. Après une semaine, la taille de la tumeur est mesurée quotidiennement avec un pied à coulisse électronique. Selon notre conseil éthique institutionnel, les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale, après avoir été anesthésiés, lorsque la taille tumorale maximale (2000 mm<sup>3</sup>) a été atteinte ou lorsqu'une nécrose supérieure à 2 mm a été observée. Toutes les expériences de croissance tumorale sont approuvées par le Comité d'éthique des expériences animales de l'Université de Bourgogne (protocole approuvé n°2212).

## **Analyses statistiques**

Les résultats sont exprimés en moyenne SD, et les ensembles de données sont comparés en utilisant le test t de Student (groupe test par rapport au groupe témoin) ou le test ANOVA bidirectionnelle lorsque nécessaire. Les différences dans les nombres de foyers tumoraux sont évaluées en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Les calculs statistiques sont effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism 6 (La Jolla, Ca, USA). Tous les tests sont de nature bilatérale, et une valeur de  $P < 0,05$  est considérée comme statistiquement significative pour toutes les expériences.

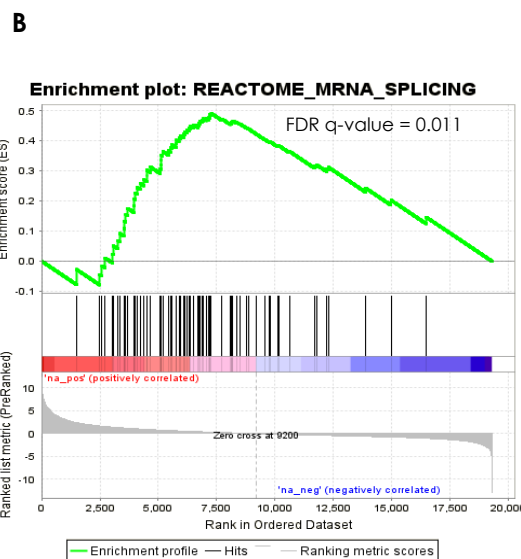
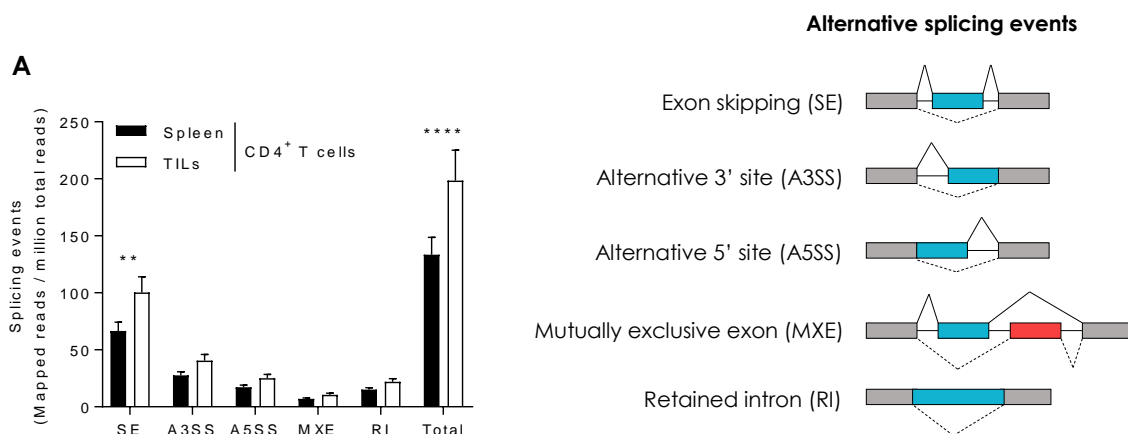
---

# RÉSULTATS

---

# I. Le microenvironnement tumoral impacte l'épissage alternatif des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>

Dans un premier temps, nous avons analysé par séquençage ARN le profil global d'EA dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés de rates et de tumeurs coliques (MC38). De façon intrigante, nous avons observé une augmentation généralisée des différents types d'évènements d'EA dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés de tumeurs par rapport à ceux provenant de rates (**Figure 28A**). Afin de déterminer si ce phénomène pouvait provenir d'une perturbation de l'expression de facteurs d'épissages, nous avons réalisé une analyse GSEA (Gene Set Enrichment Analysis). Il apparaît que de nombreux gènes codant pour des facteurs d'épissage sont enrichis au sein des tumeurs (**Figure 28B**).



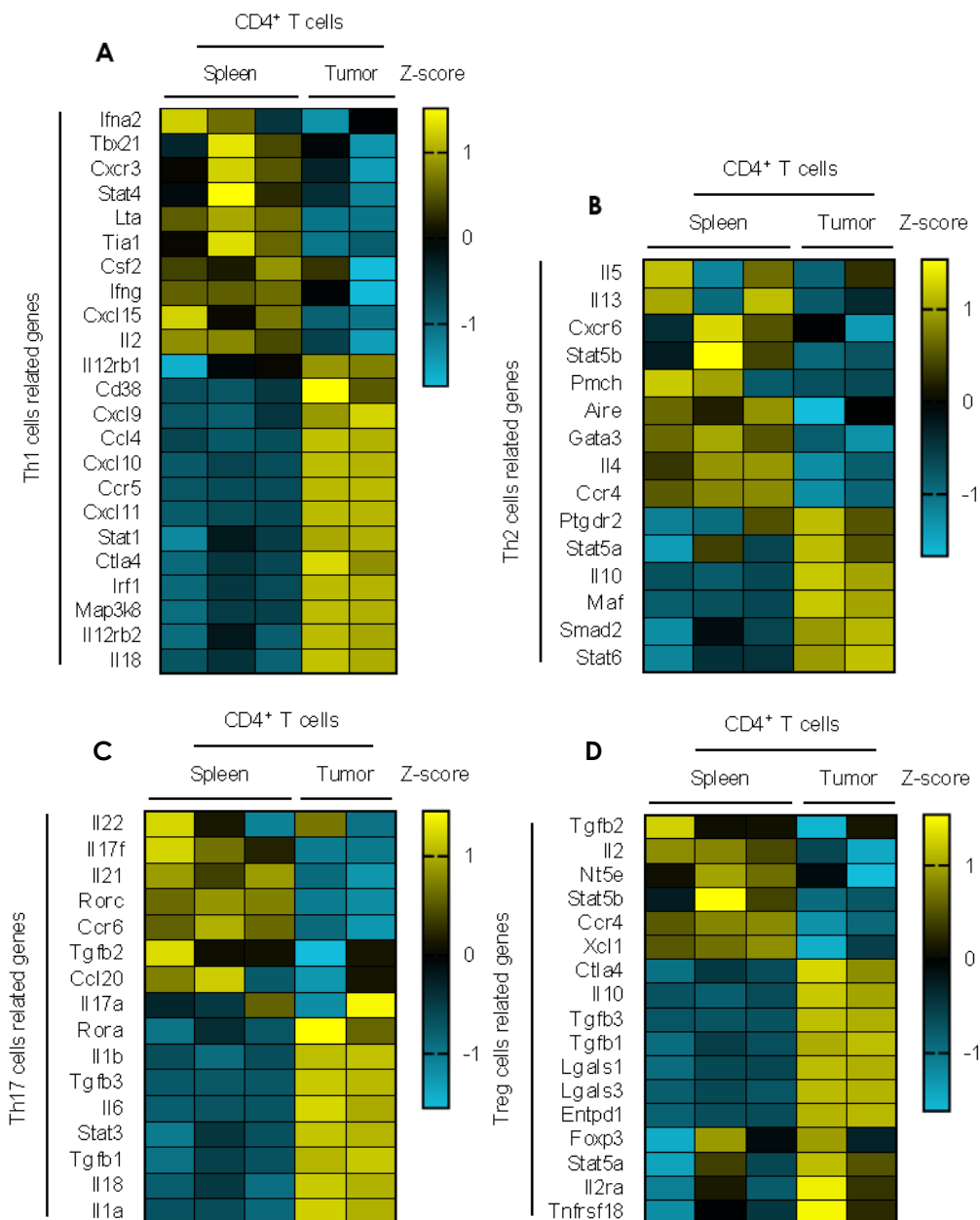
**Figure 28 : Le microenvironnement tumoral modifie l'épissage alternatif des pré-ARNm des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.**

(A) Profil d'EA obtenu par séquençage de l'ARN de cellules T CD4<sup>+</sup> à partir de rates et de tumeurs MC-38.

(B) Analyse GSEA des données de séquençage de l'ARN de cellules T CD4<sup>+</sup> de rates et de tumeurs MC-38. Ensemble de gènes : Épissage d'ARNm (Reactome).

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

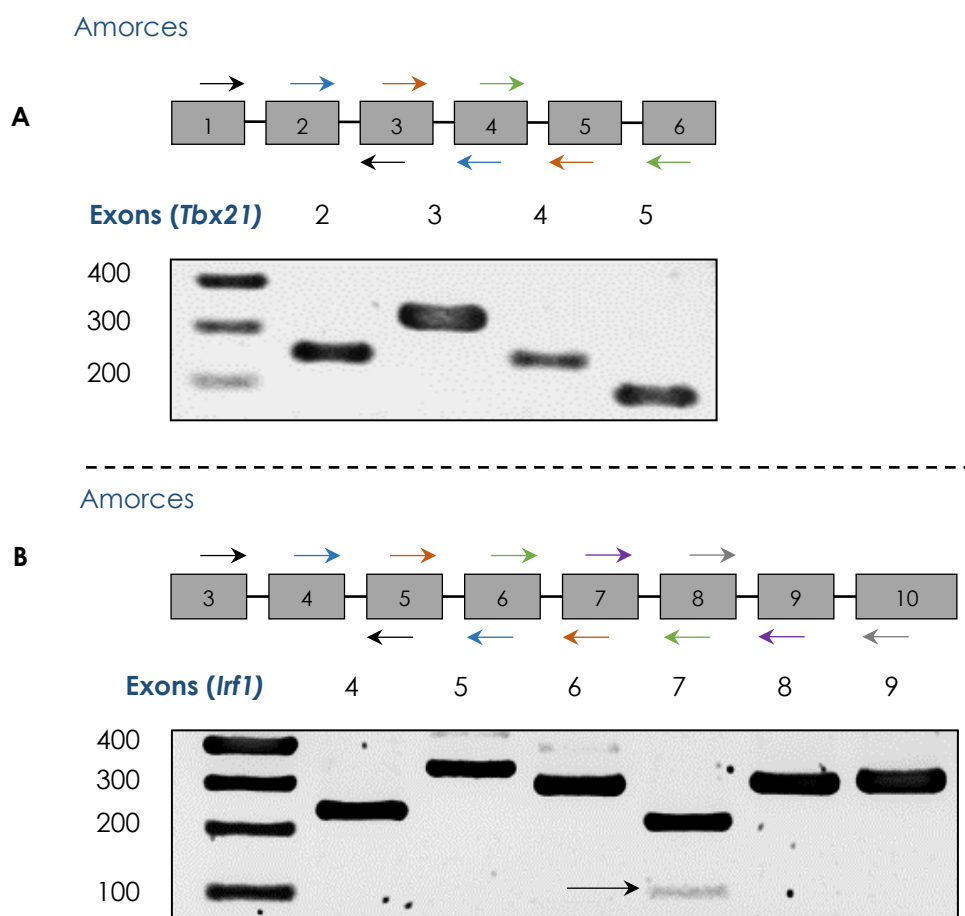
Nous avons alors comparé toujours pas séquençage ARN le profil transcriptomique des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> isolés de rate, et de tumeur et nous avons constaté que le microenvironnement tumoral a clairement un impact sur l'expression des gènes en lien avec les populations Th1 (**Figure 29A**), Th2 (**Figure 29B**), Th17 (**Figure 29C**) et Treg (**Figure 29D**). Puisque les lymphocytes Th1 sont les plus souvent décrits comme étant de bon pronostic lorsqu'ils infiltrent une tumeur, (Fridman et al., 2012) nous avons décidé de focaliser notre attention sur ce sous type.



**Figure 29 : Le microenvironnement tumoral modifie l'expression des gènes en lien avec les populations lymphocytaire Th1, Th2, Th17 et Treg.**

Heat map obtenu par une analyse de séquençage ARN, montrant l'expression des gènes en lien avec le sous-type Th1 (**A**), Th2 (**B**), Th17 (**C**), Treg (**D**) dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de rates et de tumeurs.

Nous nous sommes alors demandé si les facteurs de transcription d'une grande importance pour les cellules Th1 que sont T-bet et IRF1 pouvaient avoir des isoformes alternatives. Pour ce faire, nous avons réalisé une différenciation lymphocytaire Th1 à partir de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves isolées de rates et de ganglions. Le pic d'expression d'*Irf1* dans ce sous-type a précédemment été identifié dans l'équipe comme intervenant après 2h de différenciation (Végran et al., 2014). C'est pour cette raison que nous avons décidé de récupérer les cellules Th1 après ce laps de temps. Nous avons alors réalisé des PCR en point final avec des amorces ciblant les exons décrits comme étant variables par Ensembl.

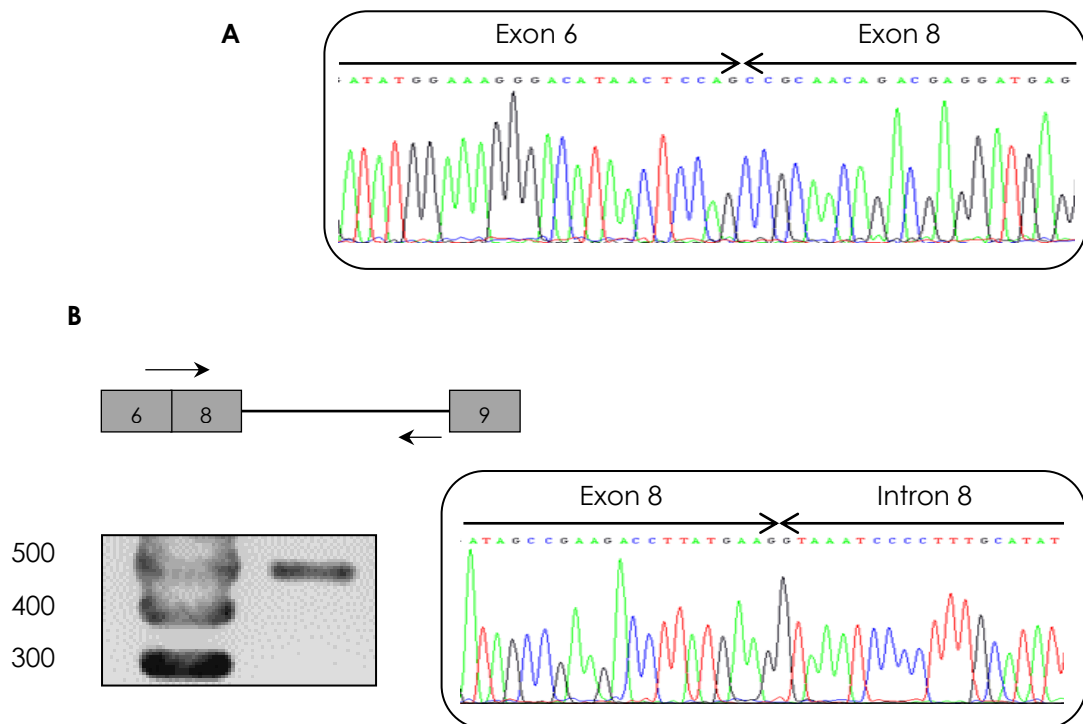


**Figure 30 : *Irf1* subit un épissage alternatif lors d'une différenciation lymphocytaire *in vitro* mais pas *Tbx21*.**

(A) RT-PCR ciblant les exons de *Tbx21* dans des lymphocytes Th1 différenciés durant 2h (gel d'agarose).

(B) RT-PCR ciblant les exons variables d'*Irf1* dans des lymphocytes Th1 différenciés durant 2h (gel d'agarose).

Ce faisant, nous n'avons identifié aucun évènement d'épissage pour *Tbx21*, codant pour le facteur de transcription maître de la différenciation lymphocytaire Th1, T-bet (**Figure 30A**). Cependant, nous avons isolé une exclusion de l'exon 7 d'*Irf1* (flèche) (**Figure 30B**). Nous avons confirmé cette observation par un séquençage de Sanger de cette bande plus légère (**Figure 31A**). Les données bioinformatiques d'Ensembl suggèrent l'existence d'une telle isoforme se terminant par l'exon 8. Néanmoins, cette isoforme ne dispose pas d'un codon STOP. Nous avons alors réalisé une PCR ciblant la jonction exon 6 / exon 8 et l'extrémité 3' de l'intron 8 d'*Irf1*. Un séquençage Sanger de la bande obtenue par migration sur gel nous a alors appris la présence d'une inclusion de l'intron 8 d'*Irf1* comprenant un codon STOP en phase avec le cadre de lecture (**Figure 31B**).



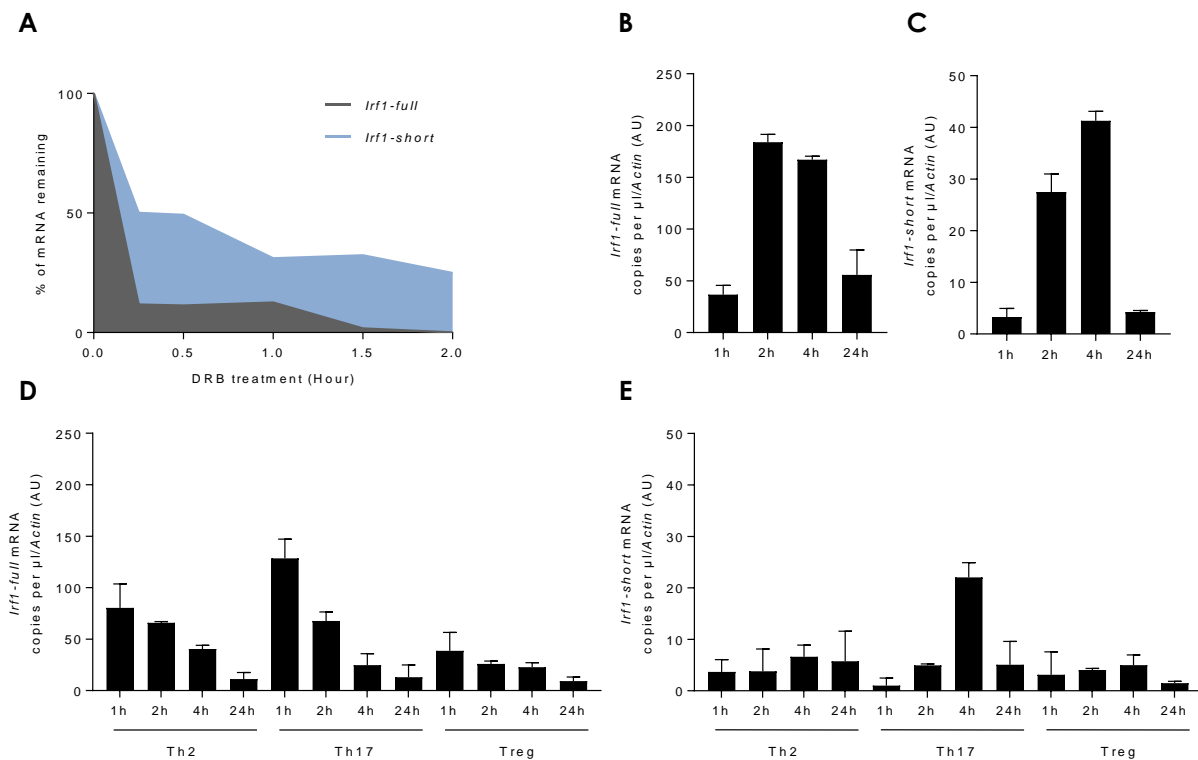
**Figure 31 : *Irf1* possède une isoforme alternative courte perdant l'exon 7 et incluant l'intron 8 possédant un codon STOP.**

(A) Séquençage de Sanger de la bande légère (Figure 32A) dans des lymphocytes Th1 différenciés durant 2h.

(B) RT-PCR ciblant la jonction exon 6 / exon 8 et l'extrémité 3' de l'intron 8 d'*Irf1* dans des lymphocytes Th1 différenciés durant 2h.



L'isoforme alternative courte d'*lrf1* ainsi identifiée fût nommée *lrf1-short* et la forme complète *lrf1-full*. Les transcrits alternatifs étant fréquemment éliminés notamment lorsqu'ils possèdent un codon STOP prématuré, nous avons réalisé un test de dégradation de l'ARNm à l'aide d'une molécule bloquant la transcription (DRB). Nous avons alors constaté qu'*lrf1-short* était plus stable dans le temps qu'*lrf1-full* (**Figure 32A**). Pour déterminer si ce phénomène était spécifique de la population lymphocytaire Th1, nous avons effectué une cinétique de l'expression des deux isoformes d'*lrf1* lors de différenciations Th1, Th2, Th17 et Treg *in vitro*. La quantification absolue obtenue par PCR digitale montre que le pic d'expression d'*lrf1-full* intervient après 2h (**Figure 32B**) de différenciation lymphocytaire Th1 et après 4h pour *lrf1-short* (**Figure 32C**).



**Figure 32 : *lrf1-short* est stable dans le temps et Th1 spécifique *in vitro*.**

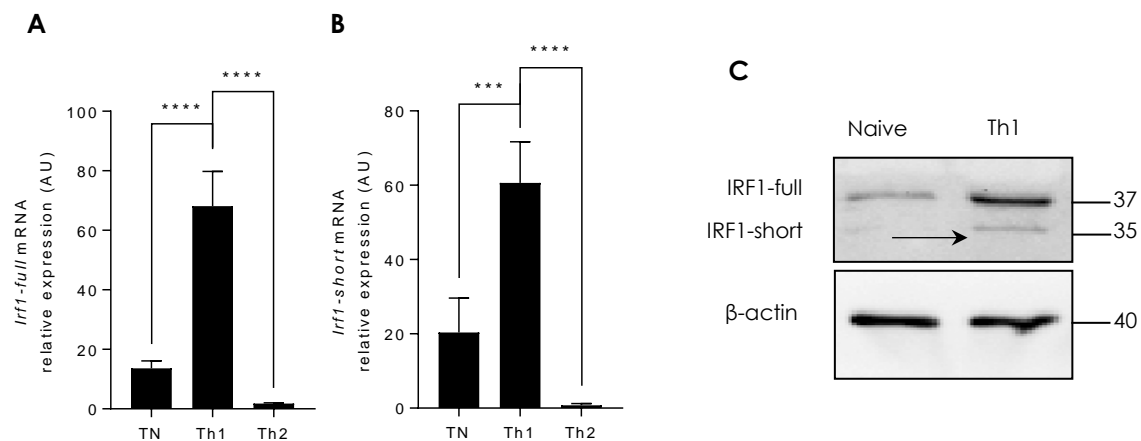
(A) Analyse de l'expression relative d'*lrf1-full* et *short* par RT-PCR dans des lymphocytes Th1 différenciés durant 2h puis traités au DRB (20 $\mu$ M). 100% représente le niveau d'expression de l'isoforme d'intérêt au moment du début du traitement. Amorces spécifiques pour *lrf1-short* en ciblant la jonction exon 6 / exon 8.

(B, C, D et E) Analyse de l'expression d'*lrf1-full* (B et D) et *short* (C et E) par PCR digitale dans des Th1 (B et C) ou des Th2, Th17 et Treg (D et E) différenciés durant 1, 2 4 et 24h. (Plaques coatées avec des anticorps anti-CD3 et CD28)

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

En outre, bien que plus faible que pour les cellules Th1, une induction de l'expression d'*Irf1*-full et *short* est également observable avec une cinétique similaire dans les cellules Th17 (**Figure 32D et E**). Cependant, les Th2 et les Treg n'expriment ni l'isoforme courte ni l'isoforme complète d'*Irf1* (**Figure 32D et E**).

Nous avons également confirmé l'expression d'*Irf1*-short dans des lymphocytes Th1 *in vivo* triés à partir de rates (**Figure 33A et B**). Afin de déterminer si *Irf1*-short existe au niveau protéique, nous avons réalisé un Western blot à partir d'une différenciation Th1 de 24h, avec un anticorps reconnaissant la portion N-ter conservée entre les isoformes d'IRF1. Nous avons détecté deux bandes distinctes à 37 et 35 KDa (flèche) superposables au poids moléculaires prédits par les séquences respectives d'*Irf1*-full et *short* (**Figure 33C**).



**Figure 33 : *Irf1*-short est exprimé *in vivo* et existe au niveau protéique *in vitro*.**

(**A et B**) Analyse de l'expression d'*Irf1*-full (**A**) et *short* (**B**) par RT-PCR dans des T naïfs, Th1 et Th2 triés à partir de rates.

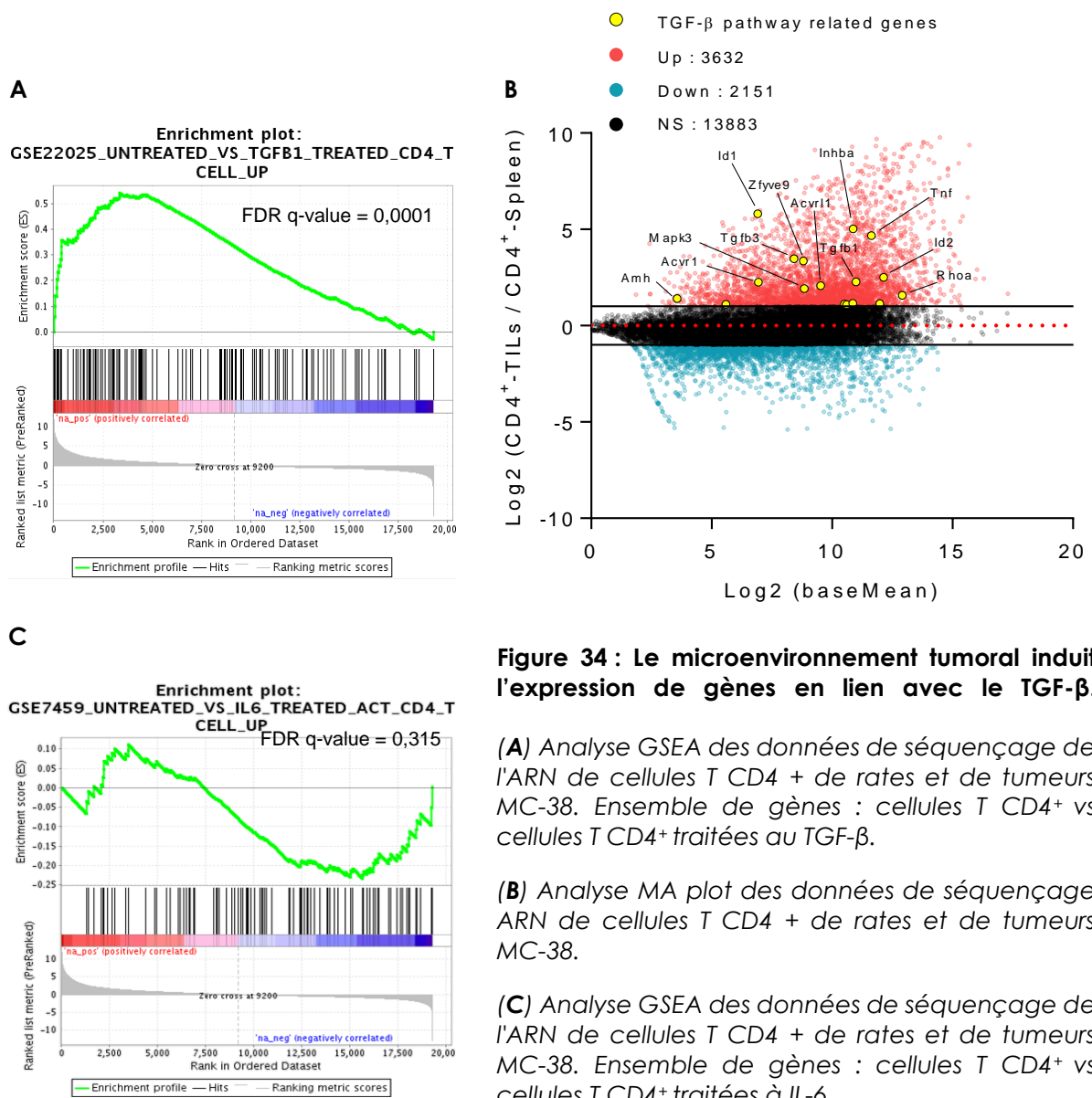
(**C**) Western blot utilisant un anticorps ciblant la portion N-ter d'IRF1 confirmant l'existence de l'isoforme courte d'IRF1 dans des Th1 différenciés durant 24h. (Plaques coatées avec des anticorps anti-CD3 et CD28)

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

En somme, ces résultats indiquent que le microenvironnement tumoral affecte l'épissage alternatif des pré-ARNm des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, mais aussi l'expression des gènes en lien avec la population lymphocytaire Th1. Nous avons également observé que le facteur de transcription intervenant dans la différenciation Th1 avaient une isoforme courte exprimée *in vitro*, *in vivo* et au niveau protéique.

## II. Le TGF- $\beta$ affecte l'apparition de l'isoforme alternative *lrf1-short*

Le TGF- $\beta$  fait partie des cytokines les plus communément trouvées dans le microenvironnement tumoral (Trapani, 2005). De plus, il a été décrit que cette molécule a un impact sur l'EA des cellules tumorales (Tripathi et al., 2019). En comparant les profils transcriptomiques des cellules T CD4<sup>+</sup> isolées de rates et de tumeurs, nous avons souligné par GSEA un enrichissement des gènes en lien avec un traitement de cellules T CD4<sup>+</sup> au TGF- $\beta$  (**Figure 34A**).



**Figure 34 : Le microenvironnement tumoral induit l'expression de gènes en lien avec le TGF- $\beta$ .**

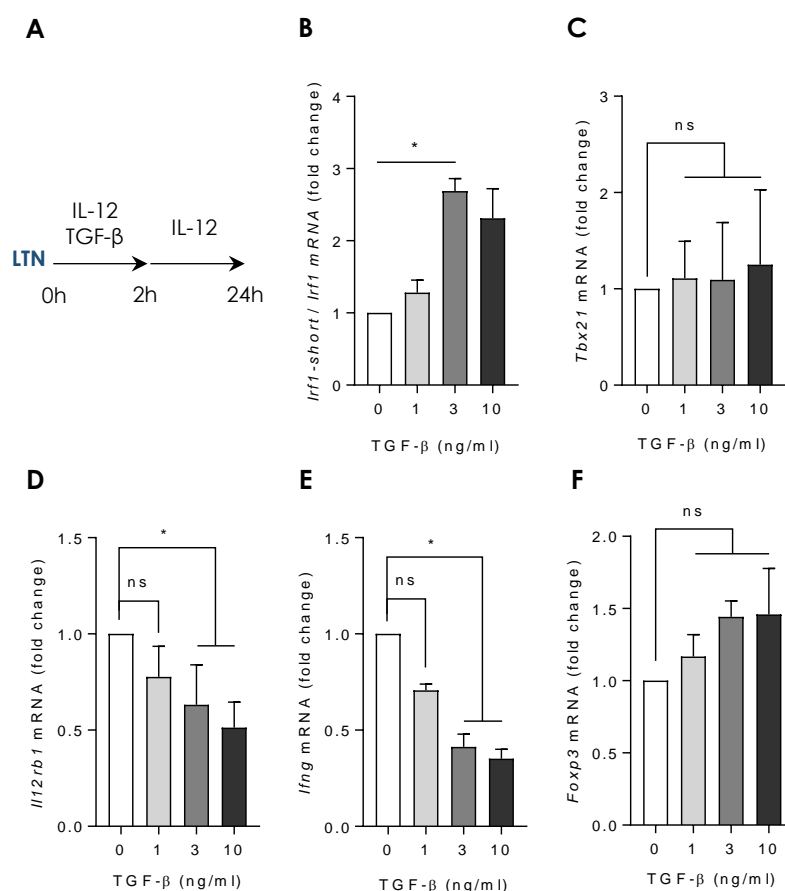
(A) Analyse GSEA des données de séquençage de l'ARN de cellules T CD4<sup>+</sup> de rates et de tumeurs MC-38. Ensemble de gènes : cellules T CD4<sup>+</sup> vs cellules T CD4<sup>+</sup> traitées au TGF- $\beta$ .

(B) Analyse MA plot des données de séquençage ARN de cellules T CD4<sup>+</sup> de rates et de tumeurs MC-38.

(C) Analyse GSEA des données de séquençage de l'ARN de cellules T CD4<sup>+</sup> de rates et de tumeurs MC-38. Ensemble de gènes : cellules T CD4<sup>+</sup> vs cellules T CD4<sup>+</sup> traitées à IL-6.

Nous avons confirmé cette tendance à travers une analyse d'expression différentielle par MA plot, dans laquelle nous confirmons la surexpression de gènes en lien avec une exposition au TGF- $\beta$  (**Figure 34B**). Par ailleurs, les gènes en lien avec l'IL-6, une autre cytokine largement représentée au niveau tumoral, n'étaient pas enrichis (**Figure 34C**).

À partir de ces observations, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le TGF- $\beta$  pourrait être impliqué dans l'augmentation de l'épissage alternatif constatée au niveau tumoral. Pour y répondre, nous avons exposé des lymphocytes T naïfs à des doses croissantes de TGF- $\beta$  et à une dose stable d'IL-12 durant 2h. Après un lavage, les cellules ont ensuite été exposées à de l'IL-12 uniquement pendant 24h (**Figure 35A**).



**Figure 35 : Le TGF- $\beta$  augmente l'épissage alternatif des pré-ARNm d'Irf1 in vitro.**

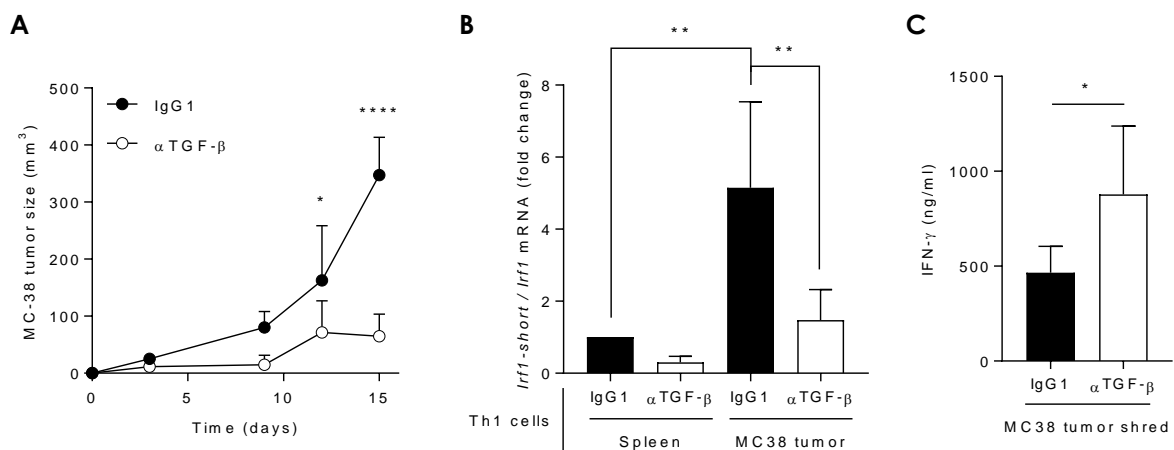
(A) Déroulement de l'expérience d'exposition au TGF- $\beta$  et à l'IL-12 de lymphocytes T naïfs.

(B, C, D, E et F) Analyse de l'expression de *Irf1-short* / *Irf1-full* (B), *Tbx21* (C), *Il12rb1* (D), *Ifng* (E) et *Foxp3* (F) par RT-PCR dans des T naïfs exposés durant 2h à des doses croissantes de TGF- $\beta$  (0, 1, 3, 10, 30 ng/ml) et à une dose stable d'IL-12 (B) puis différenciés en présence d'IL-12 seule durant 24h (C, D, E et F) (Plaques revêtues avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Ce faisant, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'isoforme courte d'*Irf1* par rapport à *Irf1-full* après 2h d'exposition à des doses croissantes de TGF- $\beta$  et à une dose croissante d'IL-12 (**Figure 35B**). De plus, après 24h de différenciation sans TGF- $\beta$ , si l'expression de *Tbx21* (**Figure 35C**) reste stable, celle de *Il12rb1* (**Figure 35D**) et de *Irfng* (**Figure 35E**) chuter de manière dose dépendante. Par ailleurs, l'expression de *Foxp3* ne semble pas être impactée par ce traitement (**Figure 35F**).

Afin de déterminer si l'effet du TGF- $\beta$  visible *in vitro* était transposable *in vivo*, nous avons réalisé des croissances tumorales MC38 dans des souris C57/Bl6 traitées ou non avec des anticorps bloquants le TGF- $\beta$ . Les injections sont pratiquées au moment où la tumeur sous-cutanée devient palpable.



**Figure 36 : Le TGF- $\beta$  augmente l'épissage alternatif des pré-ARNm d'*Irf1* *in vivo*.**

(A) Des souris C57/Bl6 ont été injectées en sous-cutané avec des MC38, et ont été traitées avec des anticorps control IgG1 ou des anticorps anti-TGF- $\beta$ .

(B) Analyse de l'expression d'*Irf1-short* / *Irf1-full* par RT-PCR dans des cellules Th1 isolées de rates ou de tumeurs (A).

(C) Test ELISA IFN- $\gamma$  réalisé sur le broyat des tumeurs (A).

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

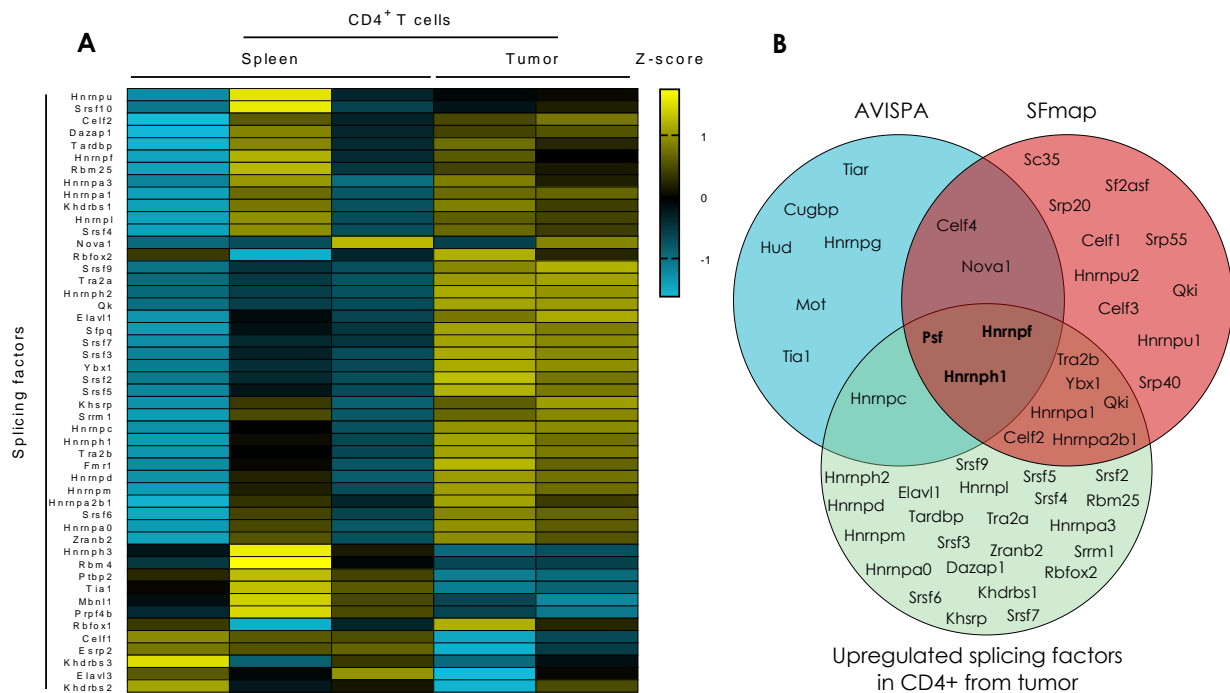
Nous avons relevé une nette diminution de la croissance tumorale pour le groupe de souris traitées avec des anticorps bloquants le TGF- $\beta$  (**Figure 36A**). Nous avons aussi trié par cytométrie en flux les lymphocytes Th1 de rates et de tumeurs dans lesquels nous avons noté une augmentation d'*Irf1-short* dans les tumeurs par rapport aux rates (**Figure 36B**).

En revanche, l'expression d'*Irf1-short* diminue drastiquement dans les lymphocytes Th1 du groupe de souris traitées avec des anticorps bloquant le TGF- $\beta$  (**Figure 36B**). De plus, nous avons aussi observé une hausse de la quantité d'IFN- $\gamma$  dans le broyat tumoral (**Figure 36C**).

Ces résultats soulignent l'implication du TGF- $\beta$  dans l'EA des pré-ARNm d'*Irf1* *in vitro* mais aussi *in vivo*.

### III. Le facteur d'épissage PSF régule l'épissage alternatif des pré-ARNm d'*Irf1*

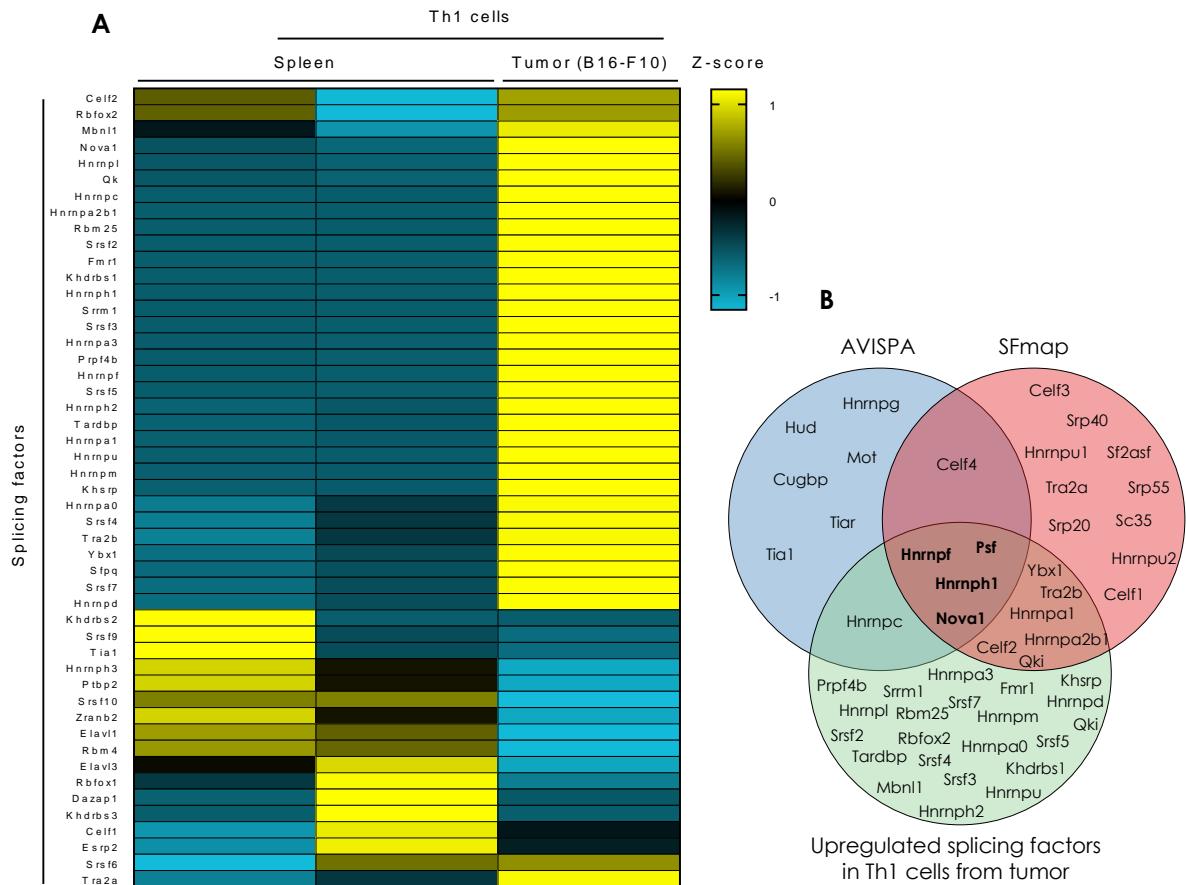
Forts de nos observations autour du rôle du TGF- $\beta$  dans l'EA d'*Irf1*, nous nous sommes alors questionnés quant au mécanisme de l'apparition de l'isoforme courte d'*Irf1*. En comparant les profils transcriptomiques des cellules T CD4<sup>+</sup> isolées de rates et de tumeurs, nous avons isolés 35 facteurs d'épissage surexprimés en contexte tumoral. Nous avons ensuite réalisé des analyses *in silico* avec les logiciels SFmap et AVISPA qui permettent de déterminer la probabilité de fixation de facteurs d'épissage en fonction de la séquence d'un pré-ARNm donné. En croisant ces analyses avec celles obtenues par séquençage ARN, nous avons identifié trois facteurs d'épissage à savoir *Hnrnpf*, *Hnrnp1* et *Psf*, surexprimés dans les cellules T CD4<sup>+</sup> de tumeurs et pouvant potentiellement se fixer au pré-ARNm d'*Irf1* (**Figure 37A et B**).



**Figure 37 : Les facteurs d'épissage *Hnrnp1*, *Hnrnpf* et *Psf* sont surexprimés dans les cellules CD4<sup>+</sup> de tumeurs MC38.**

(A) Heat map obtenu par une analyse de séquençage ARN, montrant l'expression des facteurs d'épissage dans des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de rates et de tumeurs.

(B) Diagramme de Venn croisant les 35 facteurs d'épissage surexprimés au niveau tumoral et l'analyse *in silico* réalisée avec SFmap et AVISPA qui permettent de détecter les sites de fixation de facteurs d'épissage sur le pré-ARNm d'*Irf1*.



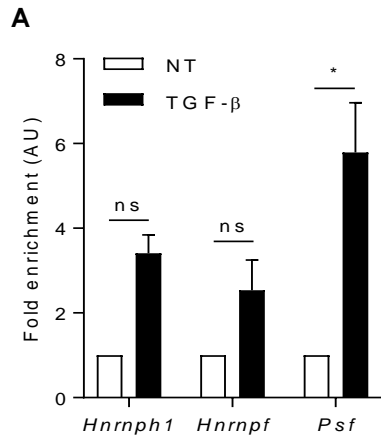
**Figure 38 : Les facteurs d'épissage *Hnrnp*, *Hnrnpf* et *Psf* sont surexprimés dans les cellules Th1 de tumeurs B16-F10.**

**(A)** Heat map obtenu par une analyse de séquençage ARN, montrant l'expression des facteurs d'épissage dans des lymphocytes Th1 de rates et de tumeurs B16-F10.

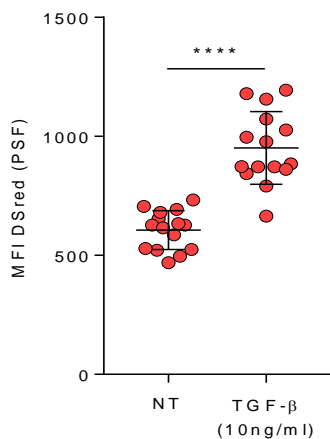
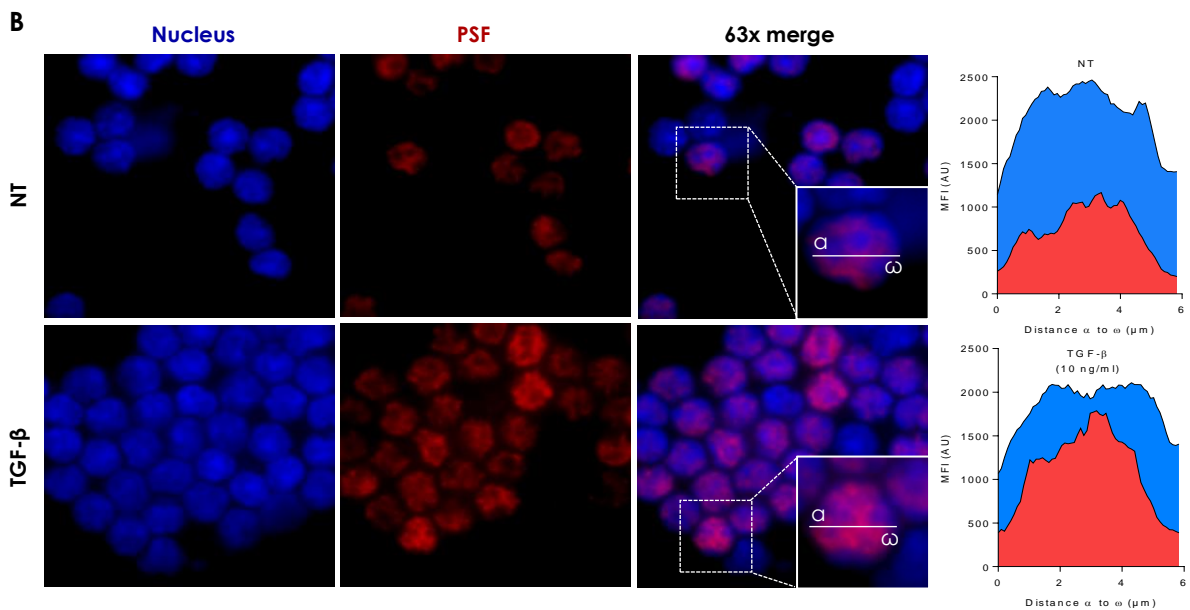
**(B)** Diagramme de Venn croisant les 35 facteurs d'épissage surexprimés au niveau tumoral et l'analyse *in silico* réalisée avec SFmap et AVISPA qui permettent de détecter les sites de fixation de facteurs d'épissage sur le pré-ARNm d'*Irf1*.

Nous avons reproduit les résultats obtenus dans les cellules T CD4<sup>+</sup> isolées de tumeurs MC38 dans des lymphocytes Th1 isolés de tumeurs B16-F10 où nous avons isolé les mêmes facteurs d'épissage (**Figure 38A et B**).





Pour confirmer le lien entre les facteurs d'épissage précédemment identifiés et le microenvironnement tumoral, nous avons exposé des lymphocytes T naïfs à du TGF-β et à de l'IL-12. PSF est le facteur d'épissage qui montre la surexpression la plus marquée lors d'une exposition au TGF-β (**Figure 39A**).



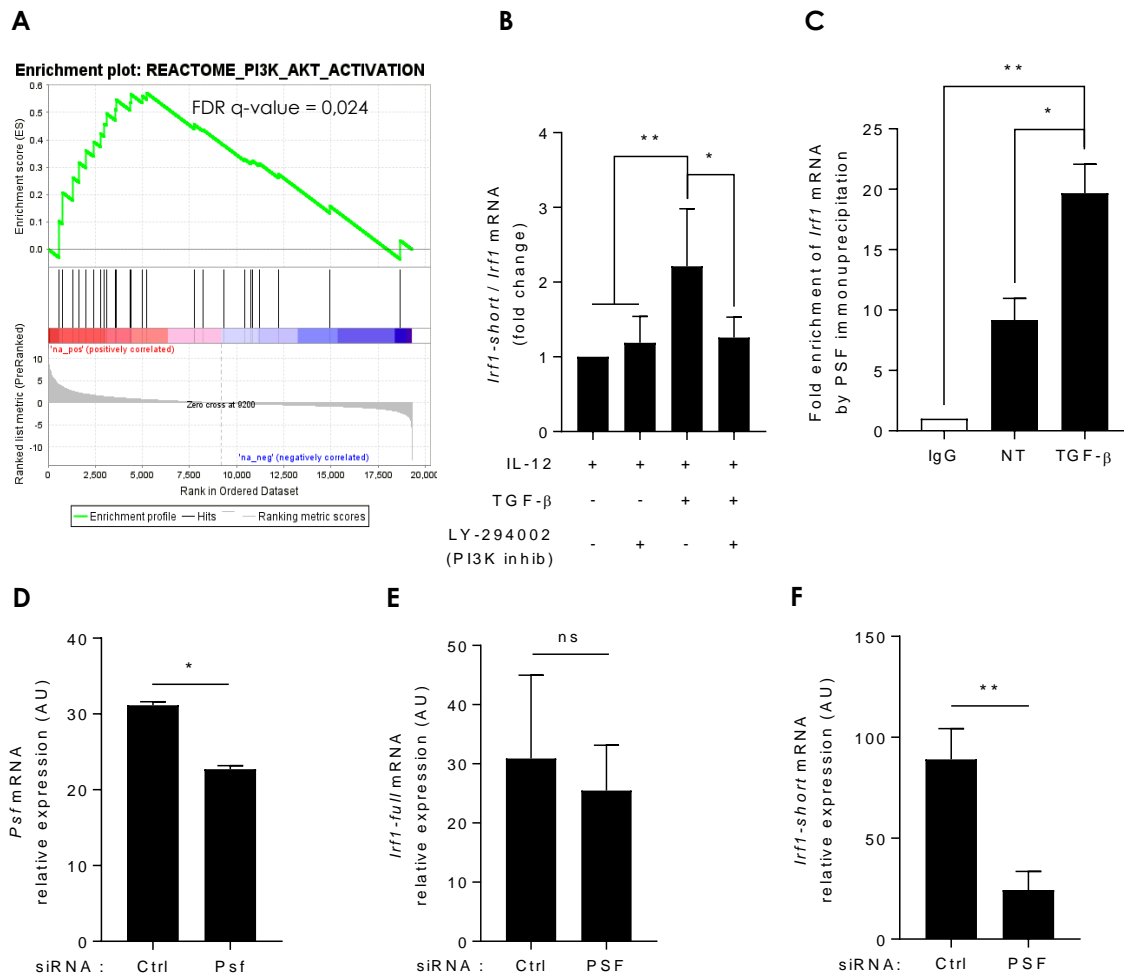
**Figure 39 : L'expression et la présence au niveau nucléaire de PSF augmentent en présence de TGF-β.**

(A) Analyse de l'expression d'Hnrnp1, Hnrnpf et Psf par RT-PCR dans des cellules T naïves exposées ou non au TGF-β (10 ng/ml) et à de l'IL-12 durant 2h (Plaques coatées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

(B) Immunofluorescence de PSF (rouge) réalisé dans les mêmes conditions que (A). Les noyaux sont marqués au DAPI. Échelle : 6 μm.

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

De plus, grâce à une expérience d'immunofluorescence, nous avons visualisé une augmentation de la présence de PSF au niveau nucléaire lorsque les cellules T naïves sont exposées à des doses conjointes de TGF- $\beta$  et d'IL-12, par rapport à la condition avec uniquement de l'IL-12 (**Figure 39B**).



**Figure 40 : PSF interagit avec le pré-ARNm d'*Irf1* et régule son épissage alternatif.**

(A) Analyse GSEA des données de séquençage de l'ARN de cellules T CD4<sup>+</sup> de rates et de tumeurs MC-38. Ensemble de gènes : Reactome PI3K/AKT activation.

(B) Analyse de l'expression d'*Irf1-short / Irf1-full* par RT-PCR dans des cellules T naïves traitées ou non au TGF- $\beta$  (10 ng/ml) et pré-traitées ou non avec un inhibiteur LY-294002 de PI3K. Les cellules sont toutes exposées à l'IL-12 (Plaques coatées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

(C) Analyse d'une immunoprécipitation d'ARN avec un anticorps ciblant PSF dans des cellules T naïves traitées ou non au TGF- $\beta$  (10 ng/ml) et à l'IL-12 (Plaques coatées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

(E, F et G) Analyse de l'expression de *Psf* (D), *Irf1-full* (E) et *Irf1-short* (F), dans des cellules T naïves transfectées durant 24h avec un ARNi ciblant *Psf* puis différenciées en condition Th1 durant 2h (Plaques coatées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

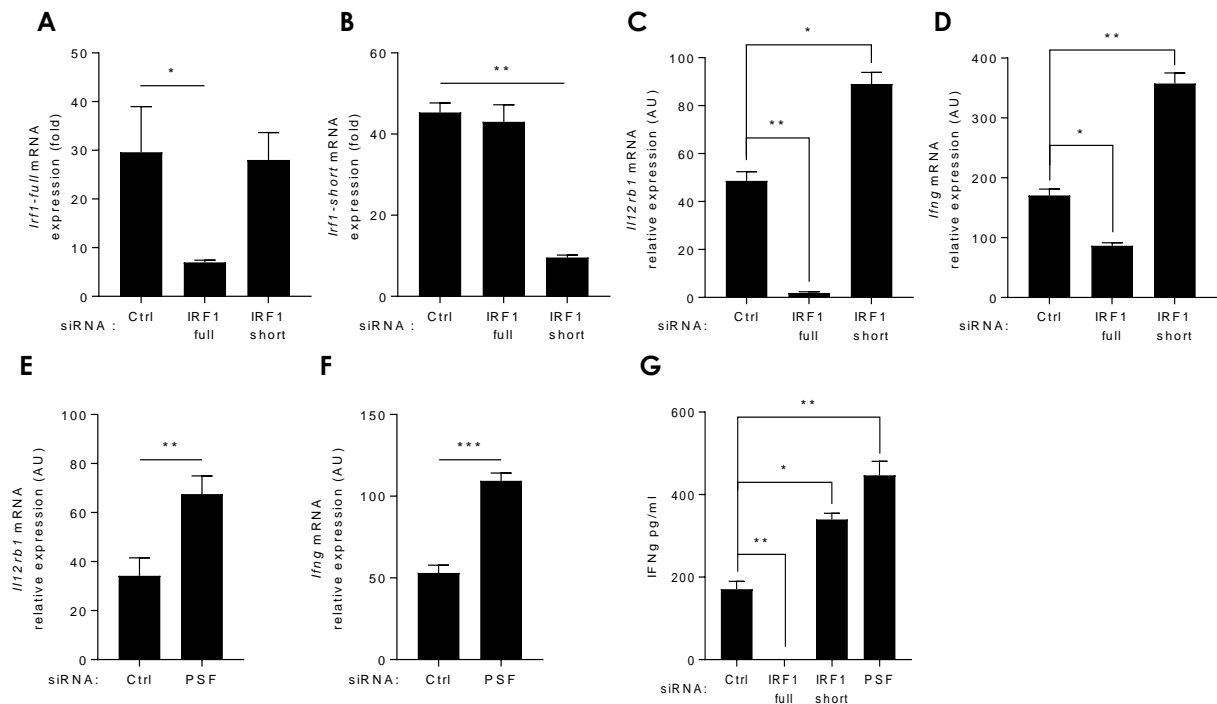
ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

L'activité de PSF a été décrite comme étant régulée par phosphorylation à travers la voie PI3K / AKT menant à sa fixation sur le pré-ARNm de CD45 qui subit alors une exclusion de ses exons variables (Heyd and Lynch, 2010). En réalisant une analyse GSEA, nous avons montré que les gènes en relation avec l'activation de la voie PI3K /AKT étaient enrichis dans les cellules T CD4<sup>+</sup> isolées de tumeurs (**Figure 40A**). Pour confirmer cette observation, nous avons effectué un pré-traitement avec l'inhibiteur LY-294002 ciblant la kinase PI3K. Il apparaît alors que l'augmentation d'*Irf1-short* constatée en présence de TGF- $\beta$  est annihilée lorsque PI3K est inhibé (**Figure 40B**). Par la suite, pour définir si PSF est réellement capable d'interagir avec le pré-ARNm d'*Irf1*, et si le TGF- $\beta$  modifie cette interaction, nous avons réalisé une immunoprécipitation d'ARN (RIP) avec un anticorps ciblant PSF dans des cellules T naïves exposées à l'IL-12 avec ou sans traitement au TGF- $\beta$ . Les résultats obtenus attestent une interaction de PSF avec IL-12 seule, mais aussi que cette fixation est décuplée en présence de TGF- $\beta$  (**Figure 40C**). Pour finir, nous avons réalisé une extinction par interférence ARN (ARNi) de PSF dans des cellules T naïves que nous avons ensuite différenciées en condition Th1 durant 2h. À travers l'extinction de *Psf* (**Figure 40D**), il émerge que PSF n'impacte pas l'expression d'*Irf1-full* (**Figure 40E**), mais régule l'apparition de l'isoforme alternative d'*Irf1*, *Irf1-short* (**Figure 40F**).

Ensemble, ces données soulignent le rôle prépondérant de PSF dans l'épissage alternatif d'*Irf1*.

## IV. IRF1-short inhibe la différenciation des cellules Th1

Après avoir décrypté l'impact du TGF- $\beta$  et du microenvironnement tumoral ainsi que le rôle du facteur d'épissage PSF dans l'induction de l'isoforme courte d'IRF1, nous nous sommes interrogés quant à l'impact potentiel de celle-ci dans la différenciation lymphocytaire Th1. Pour répondre à cette interrogation, nous avons ciblé spécifiquement *Irf1-short* avec un ARNi se fixant au niveau de la jonction exon 6 / exon 8 d'*Irf1*.



(A) Analyse de l'expression d'Irf1-full (A), Irf1-short (B), Il12rb1 (C) et Ifng (D) par RT-PCR dans des cellules T naïves transfectées durant 24h avec des ARNi ciblant spécifiquement Irf1-full ou Irf1-short puis différenciées en condition Th1 durant 2h (A et B) ou 24h (C et D) (Plaques coâtées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

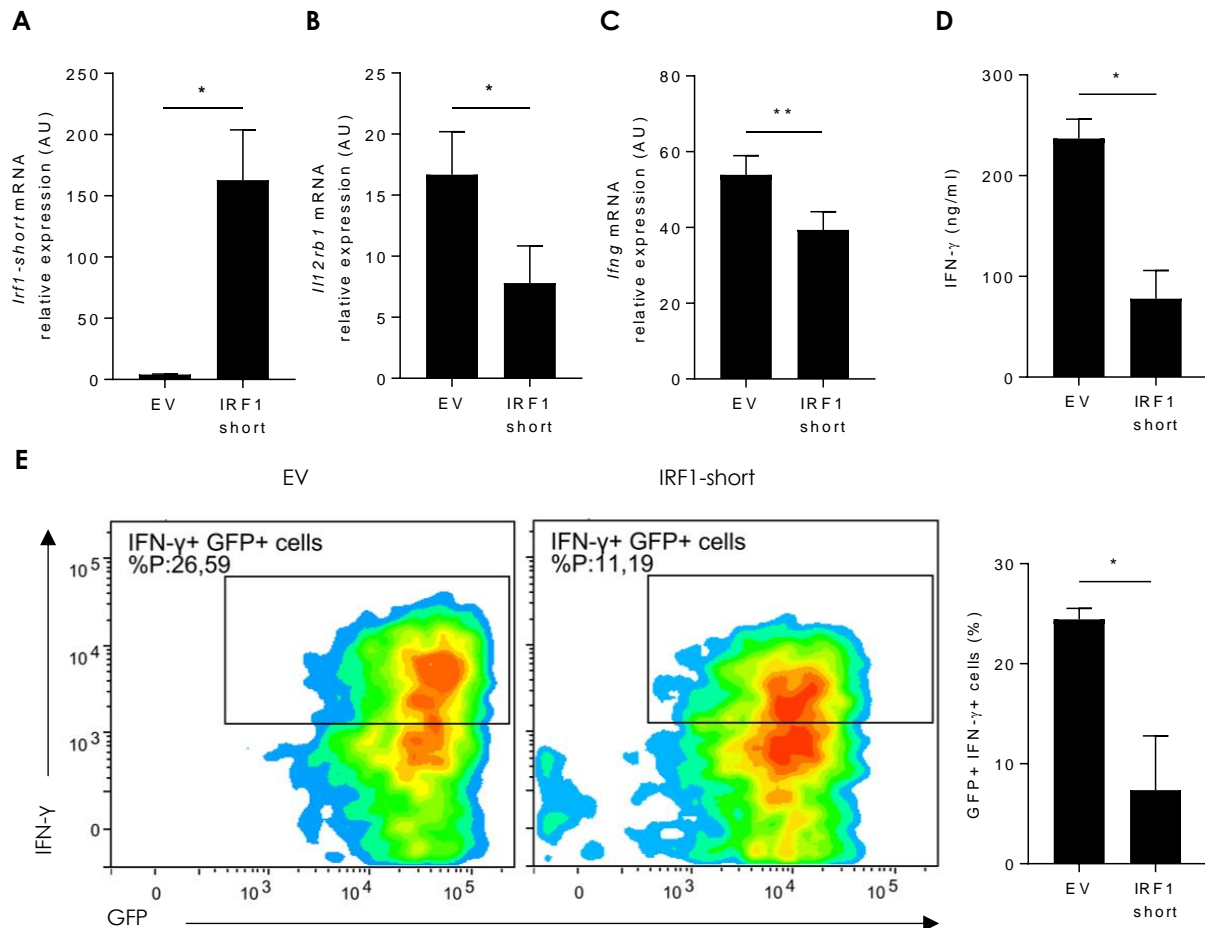
(B) Analyse de l'expression de l'Il12rb1 (C), Ifng (D) par RT-PCR dans des cellules T naïves transfectées durant 24h avec un ARNi ciblant spécifiquement Psf puis différenciées en condition Th1 durant 24h (Plaques coâtées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

(C) Analyse de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par ELISA dans des cellules T naïves transfectées durant 24h avec des ARNi ciblant spécifiquement Irf1-full, Irf1-short ou Psf puis différenciées en condition Th1 durant 72h (Plaques coâtées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Nous observons une action spécifique des ARNi ciblant spécifiquement *Irf1-full* (Figure 41A) et *Irf1-short* (Figure 41B). De plus, nous confirmons l'importance d'IRF1-full dans la régulation de l'expression de l'Il12rb1 de par la nette diminution de celui-ci lorsque la forme complète du facteur de transcription est ciblée (Figure 41C). De manière intéressante, nous avons relevé que quand *Irf1-short* était ciblé, l'expression de l'Il12rb1 augmente (Figure 41C). Les mêmes constatations ont été notées pour l'expression de l'Ifng, qui diminue lorsqu'*Irf1-full* est ciblé, et qui augmente

quand *Irf1-short* est ciblé (**Figure 41D**). En outre, l'extinction du facteur d'épissage *Psf* vient corroborer son rôle dans l'induction d'*Irf1-short*, puisque les mêmes résultats que pour l'extinction d'*Irf1-short* sont observés concernant l'expression de l'*Il12rb1* (**Figure 41E**) et de l'*Ifnγ* (**Figure 41F**). En réalisant un test ELISA, nous avons confirmé les résultats obtenus par RT-PCR autour de l'expression de l'*Ifnγ* (**Figure 41G**).



**Figure 42 : La surexpression d'IRF1-short réprime l'expression de l'*Il12rb1* et la sécrétion d'IFN-γ des lymphocytes Th1.**

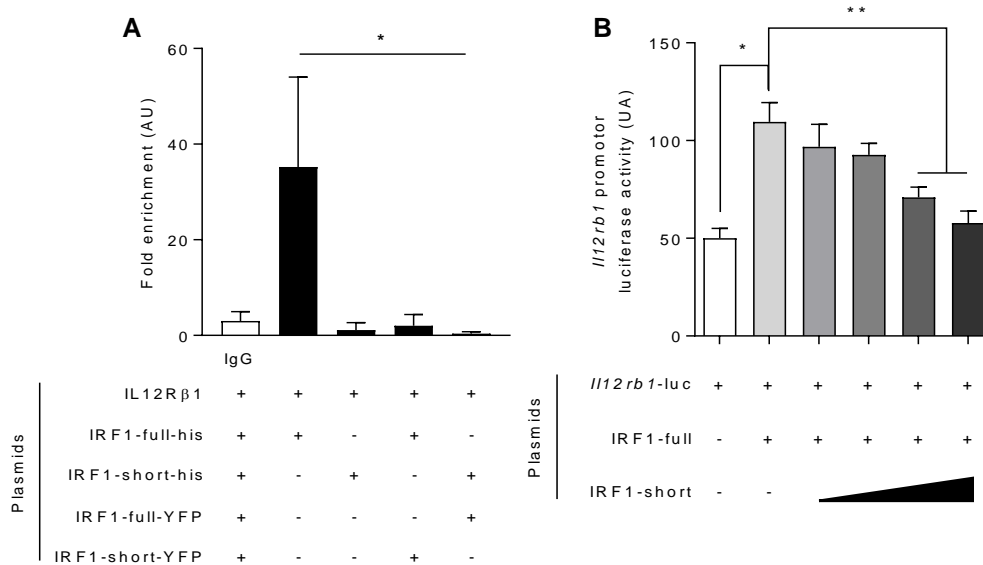
(**A, B et C**) Analyse de l'expression d'*Irf1-short* (**A**), *Il12rb1* (**B**) et *Ifnγ* (**C**) par RT-PCR dans des cellules T naïves GFP<sup>+</sup> triées 48h après avoir subi une infection rétrovirale avec un vecteur vide GFP (EV) ou IRF1-short-GFP, puis différenciées en conditions Th1 pendant 2h (**A et B**) ou 72h (**C**) (Plaques coâtées avec des anticorps CD3 et CD28).

(**D**) Analyse de la sécrétion d'IFN-γ par ELISA par des cellules traitées comme en (**C**).

(**E**) Analyse par cytométrie en flux des cellules Th1 IFN-γ<sup>+</sup> GFP<sup>+</sup> traitées comme en (**C**).

ns, non significatif ; \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Pour valider l'impact d'IRF1-short dans la différenciation Th1, nous avons accompli des expériences d'infections rétrovirales dans le but de surexprimer l'isoforme courte d'IRF1 (**Figure 42A**). Les cellules infectées positives pour la GFP ont été triées, puis différenciées en Th1. De manière contrastée par rapport aux expériences d'extinction par ARNi, nous observons une diminution de l'expression de l'*Il12rb1* (**Figure 42B**) et de l'*Ifng* (**Figure 42C**). Les résultats obtenus par RT-PCR pour l'*Ifng* sont superposables à ceux obtenus par ELISA avec une importante baisse de la sécrétion (**Figure 42D**). Ce phénomène est aussi observable par cytométrie en flux où le nombre de cellules GFP<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> diminue lorsque la forme courte d'IRF1 est surexprimée (**Figure 42E**).



**Figure 43 : IRF1-short inhibe l'activité transcriptionnelle d'IRF1-full au niveau du promoteur de l'Il12rb1.**

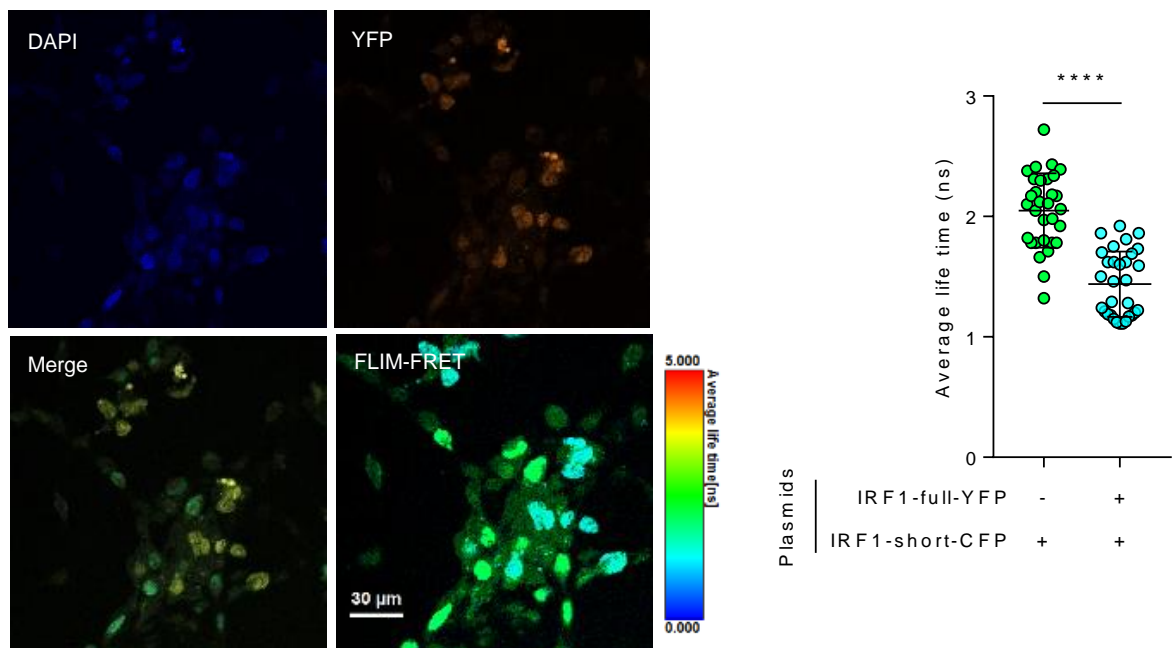
(A) Analyse par ChIP de la fixation d'IRF1-full et short au promoteur de l'*Il12rb1* dans des cellules 293T transfectées avec un plasmide codant pour le promoteur de l'*Il12rb1* et avec des plasmides codant pour IRF1-full et short tagués histidine ou YFP. Les données sont présentées sont relatives à celles obtenues avec l'IgG contrôle.

(B) Analyse par test luciférase de la transactivation du promoteur de l'*Il12rb1* dans des cellules 293T transfectées avec une quantité stable de plasmide codant pour IRF1-full et une dose croissante d'IRF1-short.

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Pour élucider comment IRF1-short impacte l'expression de l'*Il12rb1* et donc par conséquent de l'*Ifng*, nous avons réalisé une ChIP afin de déterminer si IRF1-short peut interagir avec l'ADN. Nous nous sommes placés dans un modèle artificiel utilisant des

cellules 293T transfectées avec un plasmide codant 154 paires de bases du promoteur de l'*l112rb1* et 18 paires de bases en aval du site d'initiation de la traduction (Kano et al., 2008a). De plus, nous avons aussi transfecté des plasmides d'expression codant pour IRF1-full et short tagués avec l'histidine ou l'YFP. Comme escompté, lorsqu'IRF1-full est transfecté seul un enrichissement en promoteur de l'*l112rb1* est observé, venant confirmer l'interaction de la forme complète du facteur de transcription avec cette séquence (**Figure 43A**). Concernant IRF1-short, l'absence d'enrichissement infirme la capacité de cette isoforme à se lier à cette portion d'ADN (**Figure 43A**). Cependant, quand les deux isoformes d'IRF1 sont transfectées conjointement, une importante diminution de l'enrichissement en promoteur de l'*l112rb1* est observée (**Figure 43A**). Pour confirmer ces observations, nous avons mené des tests luciférases qui finissent de dévoiler l'action inhibitrice d'IRF1-short sur l'activité transcriptionnelle d'IRF1-full. En effet, si la transfection d'IRF1-full seule parvient à induire une transactivation du promoteur de l'*l112rb1*, l'augmentation progressive de la forme alternative d'IRF1-short la réprime de manière dose dépendante (**Figure 43B**).



**Figure 44 : IRF1-short interagit avec IRF1-full.**

Analyse de la durée de vie de fluorescence FLIM-FRET dans des cellules 293T transfectées avec des plasmides IRF1-full-Venus (YFP) et IRF1-short-Cerulean (CFP)

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Au vu des résultats obtenus par ChIP et par test luciférase, nous avons formulé l'hypothèse selon laquelle IRF1-short pourrait moduler l'activité transcriptionnelle d'IRF1-full en interagissant avec ce dernier ce qui l'empêcherait alors d'interagir avec le promoteur de l'*Il12rb1*. Pour répondre à cette problématique, nous avons utilisé la technologie FLIM-FRET qui permet d'identifier une proximité de moins de 5 nm. Brièvement, lorsque le donneur est proche de son accepteur, la fluorescence décroît plus rapidement car captée par ce dernier. Dans notre expérience, le donneur est matérialisé par IRF1-short-CFP et l'accepteur par IRF1-full-YFP. Nous avons cotransfecté des cellules 293T avec les plasmides codant ces derniers. Nos données indiquent une diminution notable de la durée de vie de fluorescence d'IRF1-short-CFP dans les cellules où IRF1-full-YFP est coexprimé par rapport aux cellules avec IRF1-short-CFP seul (**Figure 44**). Ces observations suggèrent une potentielle interaction entre IRF1-full et IRF1-short.

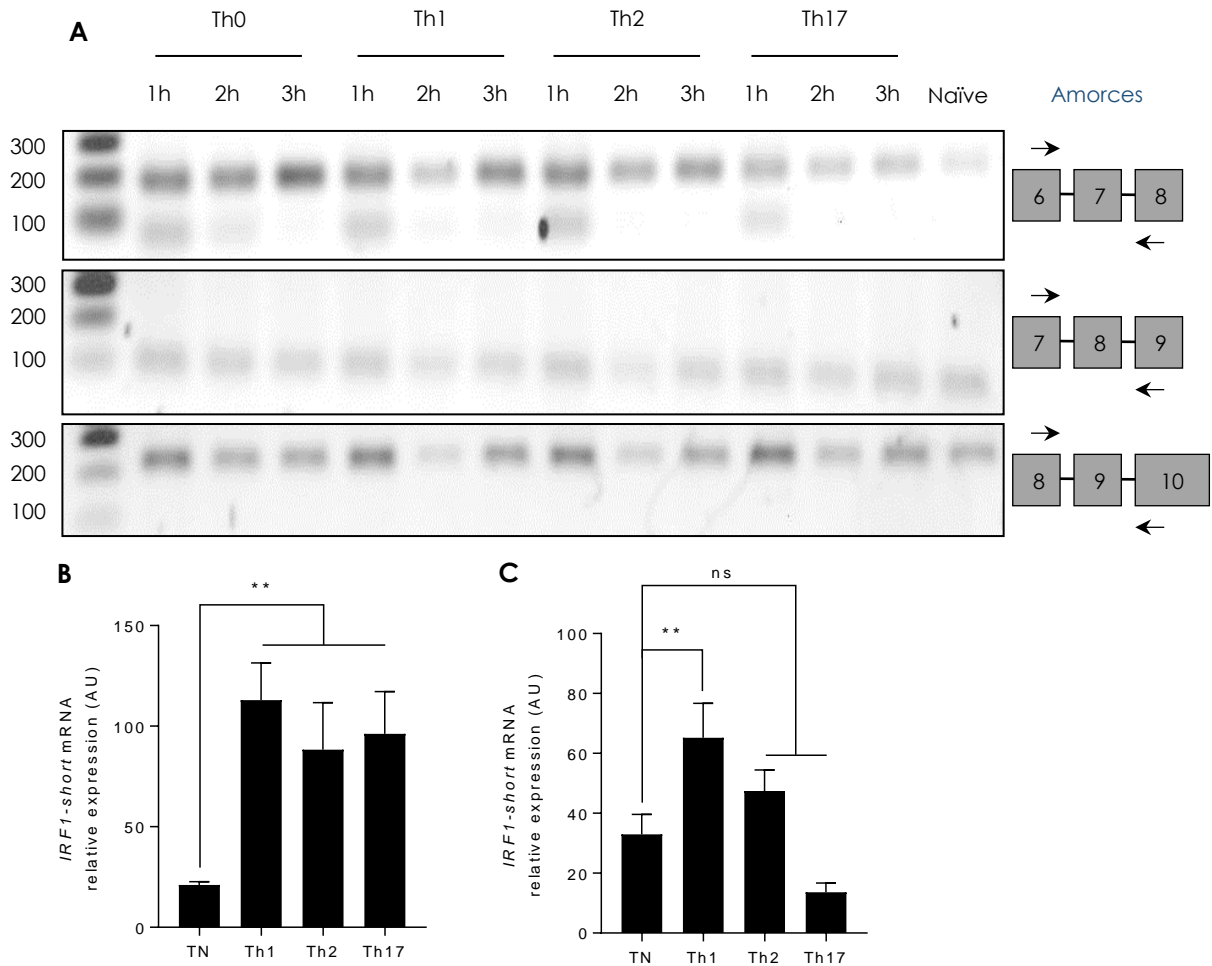
Ces démonstrations mettent en lumière le rôle répressif d'IRF1-short dans l'activité transcriptionnelle d'IRF1-full qui en interagissant avec ce dernier, l'empêche d'interagir avec le promoteur de l'*Il12rb1*.

## V. Une isoforme alternative d'IRF1 existe dans les lymphocytes Th1 humains et module leur activité

Pour aller plus loin, nous nous sommes demandé si les observations entreprises chez la souris quant au rôle négatif d'IRF1-short dans la différenciation Th1 étaient transposables chez l'Homme. Dans un premier temps, nous avons réalisé des différenciations lymphocytaires *in vitro* Th0, Th1, Th2 et Th17 à partir de cellules T naïves isolées de poches de sang de donneurs sains. Par PCR en point final et migration sur gel, nous avons identifié une exclusion de l'exon 7 d'*Irf1* après une heure de différenciation lymphocytaire Th0, Th1 Th2 et Th17, mais pas dans les cellules T naïves (**Figure 45A**). Cette isoforme alternative humaine que nous avons également appelée *IRF1-short*, partage donc des similitudes avec celle observée chez la souris. Comme le confirme l'analyse par qPCR, l'expression d'*IRF1-short* chez l'homme n'est pas inhérente à la différenciation Th1, car on la retrouve aussi dans les lymphocytes Th2 et



Th17 *in vitro* (Figure 45B). Néanmoins l'expression d'*IRF1-short* semble davantage spécifique des cellules Th1 *in vivo* (Figure 45C).



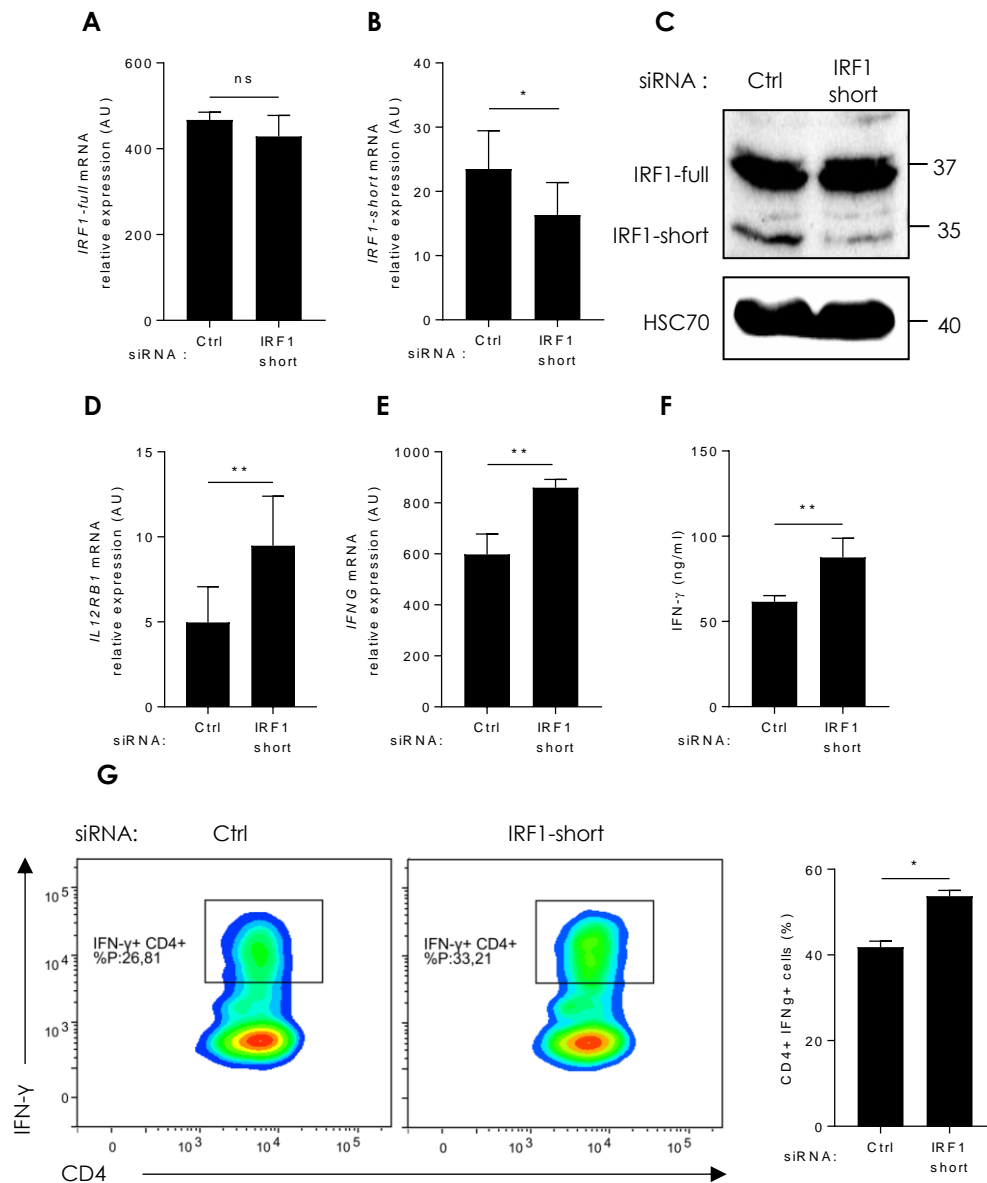
**Figure 45 : *IRF1* subit un épissage alternatif chez l'Homme à travers l'exclusion de l'exon 7.**

(A) RT-PCR ciblant les exons 6, 8 et 9 d'*Irf1* dans des lymphocytes T naïfs ou Th0, Th1, Th2 et Th17 différenciés durant 1h, 2h et 3h (gel d'agarose).

(B) Analyse de l'expression d'*IRF1-short* par RT-PCR dans des T lymphocytes naïfs ou Th0, Th1, Th2 et Th17 différenciés durant 1h. Amorces spécifiques pour *IRF1-short* en ciblant la jonction exon 6 / exon 8.

(C) Analyse de l'expression d'*IRF1-short* par RT-PCR dans des T lymphocytes naïfs ou Th1, Th2 et Th17 triés par cytométrie en flux.

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.



**Figure 46 : IRF1-short diminue l'expression de l'IL12RB1 et la sécrétion d'IFNG chez l'homme.**

**(A et B)** Analyse de l'expression d'IRF1-full **(A)**, IRF1-short **(B)** par RT-PCR dans des cellules T naïves transfectées durant 24h avec des ARNi ciblant spécifiquement IRF1-short puis différenciées en condition Th1 durant 1h (Plaques coâtées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

**(C)** Western blot utilisant un anticorps ciblant la portion N-ter d'IRF1 dans des cellules traitées comme en **(A)** mais différenciées 24h.

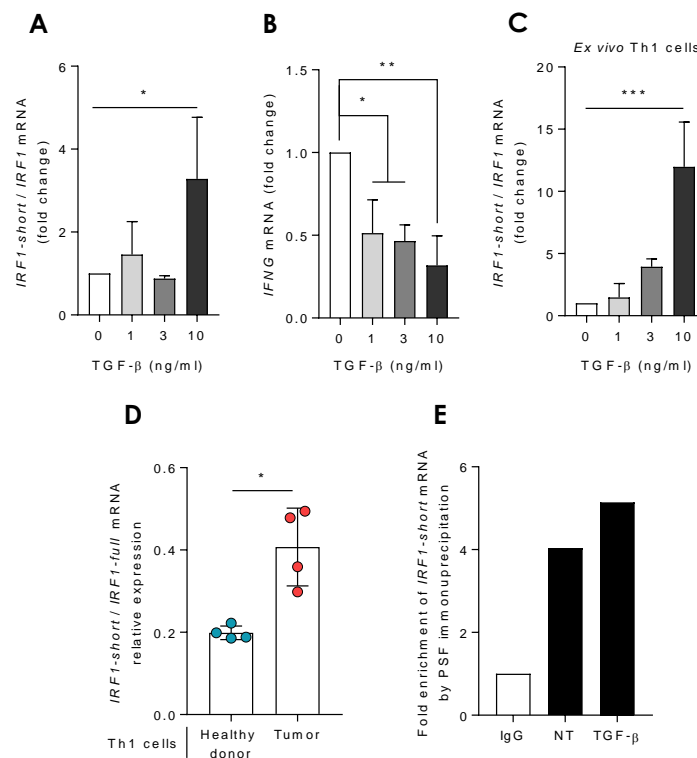
**(D et E)** Analyse de l'expression de l'IL12RB1 **(D)**, et de l'IFNG **(E)** par des cellules traitées comme en **(A)** mais différenciées 72h.

**(F)** Analyse de la sécrétion d'IFN-γ par ELISA de cellules traitées comme en **(A)** mais différenciées 72h.

**(G)** Analyse par cytométrie en flux de cellules Th1 IFN-γ+ GFP+ traitées comme en **(A)** mais différenciées 72h.

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Puisque nous avons démontré chez la souris que la forme courte d'IRF1 inhibe l'expression de l'*Il12rb1* et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des cellules Th1, nous nous sommes demandé si cet effet pouvait être comparable dans les lymphocytes Th1 humains. Pour répondre à cette question, nous avons ciblé spécifiquement par ARNi le transcrite de l'isoforme alternative d'*Irf1*. Nous obtenons une diminution spécifique d'*IRF1-short* et non d'*IRF1-full* que ce soit en RT-PCR (**Figure 46A et B**) ou en Western blot (**Figure 46C**). En outre, il résulte de cette extinction une augmentation de l'expression de l'*IL12RB1* (**Figure 46D**) et de l'*IFNG* (**Figure 46E**), mais aussi une augmentation de la sécrétion (**Figure 46F**) et du nombre de cellules positives pour l'IFN- $\gamma$  (**Figure 46G**).



**Figure 47 : Le TGF- $\beta$  et le microenvironnement tumoral augmentent l'épissage alternatif des pré-ARNm d'IRF1.**

(A et B) Analyse de l'expression d'IRF1-short / IRF1-full (B) et de l'IFNG (D) par RT-PCR dans des T naïfs exposés durant 1h à des doses croissantes de TGF- $\beta$  (0,1, 3, 10, 30 ng/ml) et à une dose stable d'IL-12 (B) puis différenciés en présence d'IL-12 seule durant 24h. (Plaques coatées avec des anticorps anti-CD3 et CD28)

(C) Analyse de l'expression d'IRF1-short / IRF1-full dans des cellules Th1 triées par cytométrie en flux puis traitées de la même façon qu'en (A).

(D) Analyse de l'expression d'IRF1-short / IRF1-full par RT-PCR dans des cellules Th1 triées par cytométrie en flux de sang de donneurs sains et de tumeurs coliques de patients.

(E) Analyse d'une immunoprécipitation d'ARN avec un anticorps ciblant PSF dans des cellules T naïves traitées ou non au TGF- $\beta$  (10 ng/ml) et à l'IL-12 (Plaques coatées avec des anticorps anti-CD3 et CD28).

ns, non significatif ; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ . Les données sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Afin de déterminer si les effets du TGF- $\beta$  et du microenvironnement tumoral observés chez la souris étaient similaires chez l'homme, nous avons exposé des lymphocytes T naïfs humains à des doses croissantes de TGF- $\beta$  et à une dose stable d'IL-12 durant 1h. Après un lavage, les cellules ont ensuite été exposées à de l'IL-12 uniquement pendant 24h. Nous avons observé une augmentation de l'expression de l'isoforme courte d'*IRF1* par rapport à *IRF1-full* après 1h d'exposition à des doses croissantes de TGF- $\beta$  et à une dose croissante d'IL-12 (**Figure 47A**). De plus, après 24h de différenciation sans TGF- $\beta$ , les cellules Th1 voient l'expression de l'*IFNG* chuter de manière dose dépendante (**Figure 47B**). En réalisant la même expérience cette fois avec des Th1 triés directement à partir de sang de donneurs sains, nous avons constaté la même augmentation de l'expression d'*IRF1-short* par rapport à *IRF1-full* (**Figure 47C**). Nous avons aussi constaté une augmentation de l'expression de l'isoforme courte d'*IRF1* dans les Th1 isolés de tumeurs coliques de patients par rapport aux Th1 isolés de sang de donneurs sains (**Figure 47D**). Par la suite, pour définir si PSF interagit avec le pré-ARNm d'*IRF1* chez l'homme, et si le cas échéant, le TGF- $\beta$  modifie cette interaction, nous avons réalisé une immunoprécipitation d'ARN (RIP) avec un anticorps ciblant PSF dans des cellules T naïves exposées à l'IL-12 avec ou sans traitement au TGF- $\beta$ . Les résultats obtenus montrent une interaction de PSF avec IL-12 seule, et que cette fixation augmente légèrement en présence de TGF- $\beta$  (**Figure 47E**).

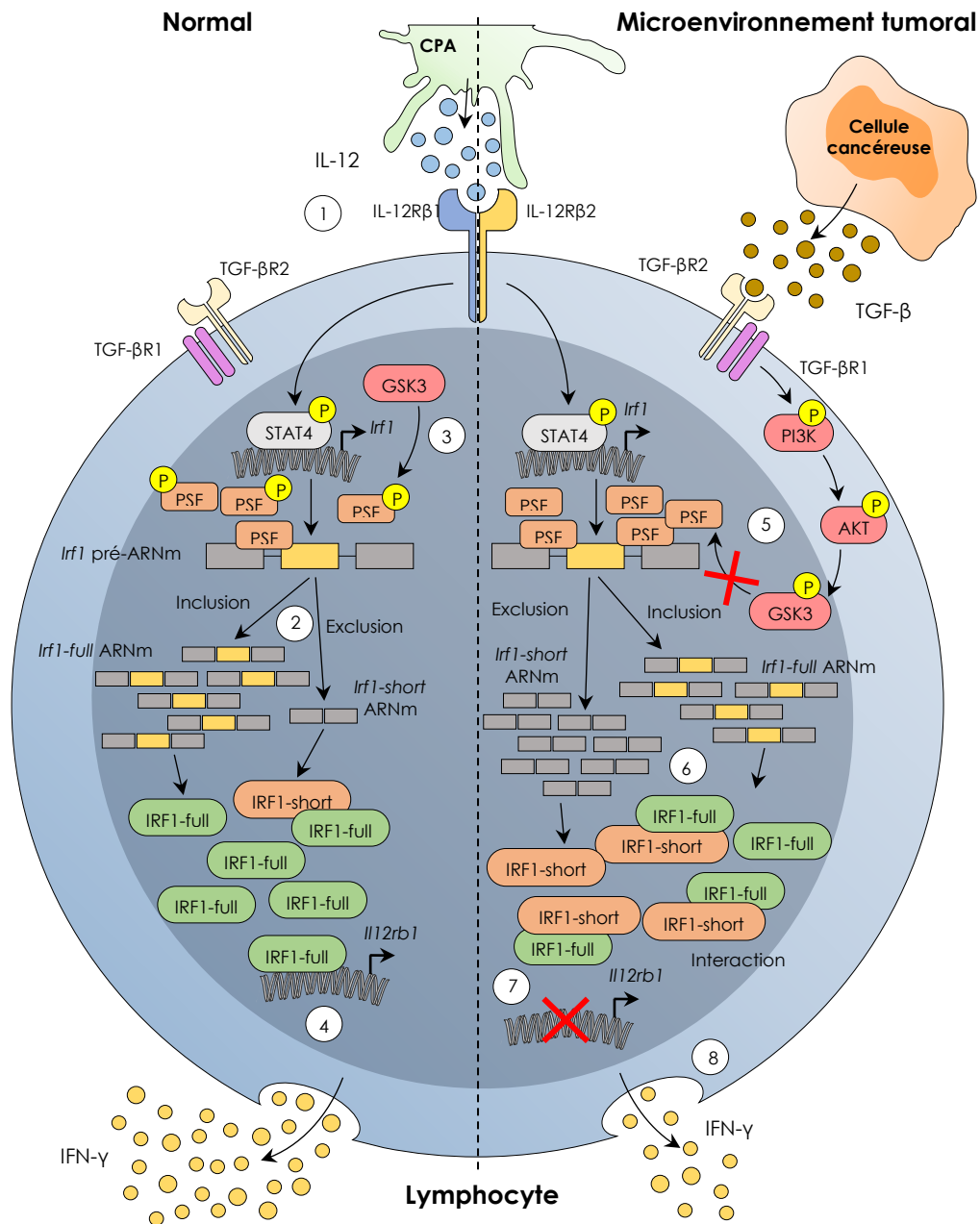
Ensembles, ces résultats illustrent que l'isoforme alternative courte d'*IRF1* est également exprimée dans différents sous types T *helper* et en particulier dans les lymphocytes Th1 chez l'Homme. En outre, de façon analogue à ce que nous avons décrit dans notre modèle murin, *IRF1-short* diminue l'activité des lymphocytes Th1 en réduisant notamment la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . Enfin, le TGF- $\beta$  et le microenvironnement tumoral semblent impliqués dans l'augmentation de cette isoforme alternative.

---

# DISCUSSION

---

Ce travail nous a permis de mettre en lumière l'impact du microenvironnement tumoral et en particulier du TGF- $\beta$ , dans l'EA du pré-ARNm d'*Irf1* dans des cellules Th1 *in vitro* et *in vivo*. En effet, nous avons démontré que si l'expression de la forme courte d'*Irf1* intervient lors d'une différenciation Th1 standard, celle-ci est décuplée en contexte tumoral et lors d'une exposition au TGF- $\beta$ . De plus, nous montrons que le facteur d'épissage PSF est impliqué dans l'apparition d'*IRF1-short* à travers la l'activation de la voie PI3K / AKT par le TGF- $\beta$ . Nous soulignons aussi l'action répressive d'*IRF1-short* dans la différenciation lymphocytaire Th1, qui en interagissant avec la forme complète d'*IRF1*, prévient sa liaison avec le promoteur de l'*Il12rb1*. En somme, l'augmentation de l'expression d'*IRF1-short* au niveau tumoral, alliée à la baisse de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  qui en résulte, font de cette isoforme une cible potentielle pour exacerber l'action des lymphocytes Th1, et accroître potentiellement leur pouvoir anti-tumoral (**Figure 48**).



**Figure 48 : Mécanisme d'induction de l'isoforme alternative IRF1-short, et son effet dans la différenciation lymphocytaire Th1. (1)** Lors d'une différenciation lymphocytaire classique, la stimulation à l'IL-12 entraîne l'activation du facteur de transcription STAT4 par phosphorylation, qui induit l'expression du gène *Lrf1*. **(2)** Le pré-ARNm d'*Lrf1* est épissé en *Lrf1-full* et épissé alternativement en *Lrf1-short*. **(3)** L'isoforme courte d'*Lrf1* apparaît à travers l'action du facteur d'épissage PSF, actif sous sa forme non phosphorylée. **(4)** Le facteur de transcription IRF1-full interagit avec le promoteur du gène de l'*IL12rb1* formant une boucle d'amplification de la signalisation de l'IL-12, source d'une sécrétion importante d'IFN- $\gamma$ . **(5)** En contexte tumoral, le TGF- $\beta$  induit l'activation de la voie de signalisation PI3K / AKT aboutissant à la phosphorylation de GSK3 qui n'est ensuite plus capable de phosphoryler PSF. **(6)** PSF peut interagir avec davantage de pré-ARNm d'*Lrf1*. **(7)** IRF1-short interagit avec IRF1-full en l'empêchant d'interagir avec le promoteur de l'*IL12rb1*. **(8)** Moins d'IFN- $\gamma$  est alors sécrété quand la quantité d'IRF1-short augmente.

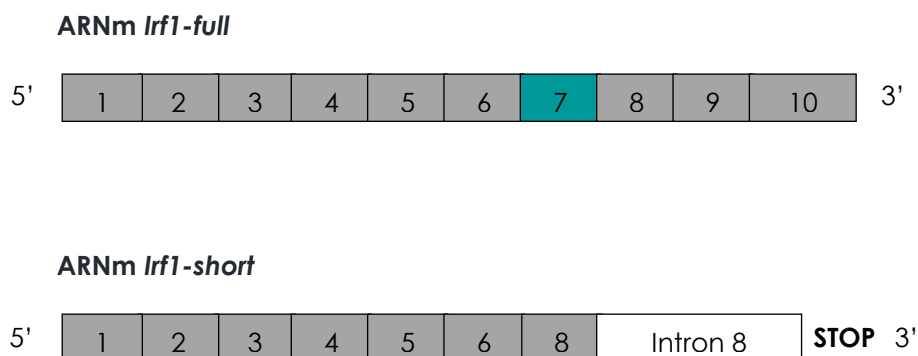
Il est désormais clairement établi que les évènements d'EA augmentent drastiquement au sein d'une tumeur par rapport au tissu sain (Kahles et al., 2018). Ce phénomène s'explique partiellement à travers l'accumulation de mutations somatiques par les cellules tumorales qui touchent parfois des gènes codant des facteurs d'épissage (Sveen et al., 2016). Il en résulte l'apparition de transcrits aberrants, qui peuvent encourager la progression d'un cancer. Par ailleurs, une masse tumorale n'est plus décrite comme étant constituée uniquement de cellules cancéreuses. Certaines études affirment qu'elle est en réalité composée de près de 50% de cellules non malignes allant du fibroblaste au lymphocyte T. Cependant les évènements d'EA qui interviennent dans ces cellules en contexte tumoral ne sont que peu ou pas caractérisés.

Nos données apportent la preuve que l'augmentation de l'EA au niveau tumoral ne concerne pas seulement les cellules malignes, mais aussi les cellules du système immunitaire que sont les lymphocytes T CD4+. En effet, nous observons une augmentation globale de l'EA dans ces cellules lorsqu'elles proviennent de tumeurs par rapport à celles isolées de rates. Il a été démontré que les cellules immunitaires isolées de tumeurs présentent un profil transcriptomique différent de celui trouvé dans celles isolées d'organes lymphoïdes secondaires (Newman et al., 2015). Nos résultats vont dans ce sens avec notamment une modification importante de l'expression des gènes en lien avec la population lymphocytaire Th1. On trouve par exemple une diminution de l'expression des gènes codant pour l'IFN- $\gamma$ , T-bet ou encore CXCR3. Néanmoins, une augmentation de l'expression de *Il12rb1* et de *Il12rb2* est également observée. Ces récepteurs membranaires étant partagés avec d'autres sous-types de T *helper* comme les cellules Th17 pour l'IL12R $\beta$ 1 (Kano et al., 2008b), ces résultats sont à considérer avec précaution et pourraient être confirmés à travers une nouvelle analyse de séquençage ARN avec des cellules Th1 isolées de tumeurs. De plus, les modifications transcriptomiques observées ne sont pas inhérentes aux gènes en lien avec le profil Th1. Pour les gènes représentatifs des cellules Th2 on observe par exemple une diminution de l'expression de *Gata3* et de *Il4* et pour les cellules Th17 une baisse de l'expression de *Rorc*. Quant aux gènes du profil Treg, on constate une augmentation des gènes caractéristiques de l'immunosuppression engendrée par ce sous-type de par l'augmentation de l'expression des gènes *Tgfb1* et *Il10*.



Si nous nous sommes orientés sur l'étude des évènements d'EA dans la population lymphocytaire Th1 du fait de leur fort potentiel anti-tumoral (Fridman et al., 2012), nous aurions aussi pu nous axer sur les sous-types Th2 et Treg qui sont décrits comme étant souvent pro-tumoraux afin de déterminer si l'EA joue un rôle dans cet état de fait. En outre, les cellules Th17 sont souvent décrites comme ayant un comportement ambigu dans les cancers en étant tantôt immunosuppressives et tantôt inflammatoires (Asadzadeh et al., 2017). Il serait intéressant de déterminer si la balance entre ces deux états est sous l'influence d'évènement d'EA qui apparaîtraient en contexte tumoral. Par ailleurs, il a été démontré que sous l'influence de l'IL-1 $\beta$ , les cellules Treg se transdifférencient en lymphocytes Th17 de par l'EA de Foxp3 (Mailier et al., 2015). Étudier l'EA du pré-ARNm de *Foxp3* en contexte tumoral pourrait nous en apprendre davantage sur les phénomènes de plasticité cellulaire observés dans le microenvironnement tumoral.

Dans la différenciation lymphocytaire Th1, nous avons identifié que le pré-ARNm codant pour le facteur de transcription IRF1 subit un EA à travers l'exclusion de l'exon 7 et l'inclusion de l'intron 8 (**Figure 49**). Nous avons confirmé la stabilité et la traduction de ce transcrit que nous avons appelé *lrf1-short*. Si une isoforme alternative d'*lrf1* excluant l'exon 7 est déjà décrite comme apparaissant dans le cadre du cancer cervical humain (Lee et al., 2006b), l'inclusion de l'intron 8 d'*lrf1* générant un codon STOP prématuré n'est en revanche pas référencée.



**Figure 49 : Isoformes longue (full) et courte (short) d'*lrf1*.** Exclusion de l'exon 7 et inclusion de l'intron 8 comportant un codon stop prématuré dans les lymphocytes Th1.

Le niveau d'expression d'*Irf1-short* est plus important dans les cellules Th1 que dans les autres sous-types T *helper*. Nous constatons tout de même une expression de cette isoforme alternative dans les cellules Th17. Il a été démontré que la différenciation lymphocytaire Th17 est encouragée dans des souris *Irf1* *-/-* (Karwacz et al., 2017). L'étude de l'effet de la nouvelle isoforme alternative d'IRF1 que nous avons identifiée pourrait nous en apprendre plus sur la biologie de ce sous type.

Le TGF- $\beta$  fait partie des cytokines les plus communément trouvées au sein du microenvironnement tumoral (Papageorgis and Stylianopoulos, 2015). Il peut être sécrété par les cellules tumorales, mais aussi par les cellules non malignes que sont les lymphocytes Treg et les macrophages de type M2. Il a été démontré dans les cellules cancéreuses que le TGF- $\beta$  est capable d'induire l'EA du récepteur membranaire CD44. Il en résulte l'apparition d'une isoforme alternative favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse et la dissémination de métastases (Tripathi et al., 2016).

Ici nous montrons que les gènes en lien avec une exposition au TGF- $\beta$  sont surexprimés en contexte tumoral. Nous observons également *in vitro* qu'un traitement précoce au TGF- $\beta$  lors d'une différenciation lymphocytaire Th1 augmente la quantité d'*Irf1-short* par rapport à *Irf1-full*. En parallèle, l'expression de *Il12rb1* décrite comme étant sous l'influence d'IRF1 (Kano et al., 2008a) diminue ainsi que celle de l'IFN- $\gamma$ . Par ailleurs, dans cette configuration l'expression de Foxp3 connue pour être modulée par le TGF- $\beta$  n'est pas impactée significativement. Il est possible qu'une exposition plus longue à cette cytokine induirait davantage l'expression de ce facteur de transcription représentatif de la différenciation lymphocytaire Treg.

Nous montrons que les cellules Th1 isolées de tumeurs expriment davantage l'isoforme courte d'*Irf1* par rapport à celles isolées de rates. En revanche, lorsque les souris sont traitées avec des anticorps bloquant le TGF- $\beta$ , l'augmentation de l'expression d'*Irf1-short* autrefois relevée dans les cellules Th1 de tumeurs disparaît. L'exposition au TGF- $\beta$  au niveau tumoral étant sûrement durable, il serait fructueux de déterminer la cinétique d'induction de l'isoforme courte d'*Irf1* dans ce contexte. La nouvelle technique de séquençage sur cellule unique pourrait aussi permettre de superposer le statut de différenciation d'une cellule Th1 isolée de tumeur, à l'EA induisant la production d'*Irf1-short*.

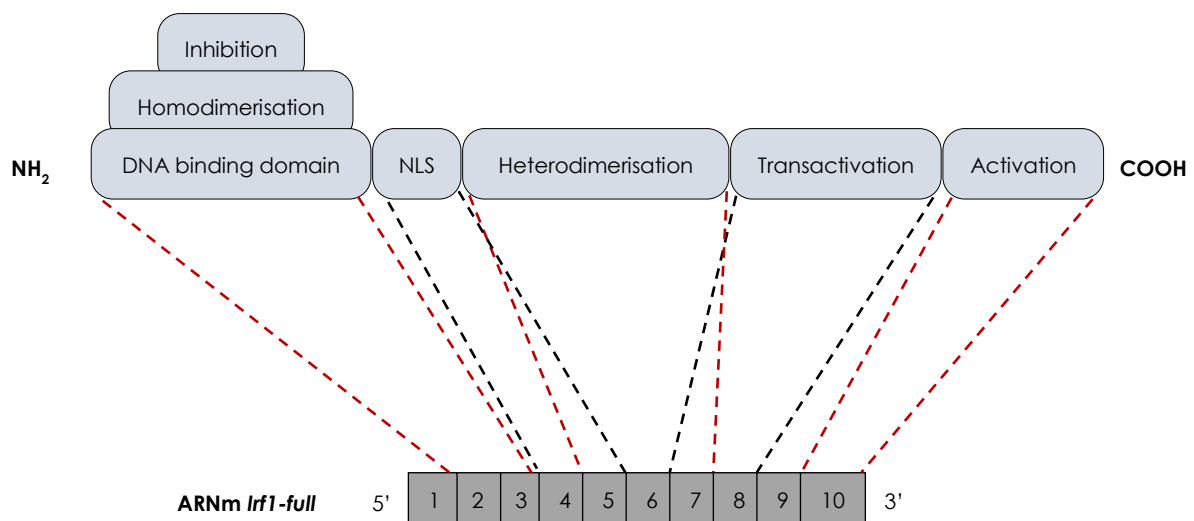
Les facteurs d'épissage sont les régulateurs clé de l'activité du spliceosome puisqu'ils modulent sa liaison au pré-ARNm (Matera and Wang, 2014). Leur activité est finement régulée, notamment par les signaux extracellulaires. Ainsi, en fonction d'un contexte donné, leurs activités divergent (Fu and Ares, 2014).

Nos résultats montrent que trois facteurs d'épissage sont surexprimés dans le microenvironnement tumoral et sont spécifiques de la séquence du pré-ARNm d'*Irf1*. Parmi eux, *Psf* est celui dont l'expression augmente le plus lorsqu'une différenciation lymphocytaire Th1 est exposée au TGF- $\beta$ . Nous avons également constaté par immunoprécipitation de l'ARN que PSF interagit avec le pré-ARNm d'*Irf1* lors d'une différenciation lymphocytaire Th1 standard et que cette interaction est décuplée par un traitement au TGF- $\beta$ . De plus, lorsque PSF est ciblé par ARNi, l'expression d'*Irf1-short* est considérablement réduite. Ce facteur d'épissage a été décrit dans les cellules T humaines comme participant au saut des 3 exons variables de CD45 pour produire CD45RO lors de l'engagement du TCR (Heyd and Lynch, 2010). Cette isoforme plus courte de CD45 est moins active que la forme complète et tempère l'activation des lymphocytes. Lorsque PSF est phosphorylé par GSK3, il reste inactif du fait de sa séquestration par TRAP150. En revanche, lors d'une stimulation antigénique du TCR, l'activation de la voie PI3K / AKT induit la phosphorylation de GSK3 ce qui l'inactive. PSF n'est alors plus phosphorylé et peut librement entrer dans le noyau pour exercer son rôle de facteur d'épissage. Chez la souris, nous n'avons constaté aucune différence d'expression de l'isoforme alternative d'*Irf1* entre des cellules T naïves et des cellules Th0 uniquement exposées à l'engagement du TCR. Cependant, pour exclure totalement le rôle de la signalisation du TCR dans notre modèle, nous pourrions aussi exposer des cellules T naïves à de l'IL-12 avec et sans stimulation du TCR.

Le facteur de transcription IRF1 a été identifié dans la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes, et ce, dans différents types cellulaires (Kim et al., 2004; Lohoff et al., 1997; Ogasawara et al., 1998; Penninger et al., 1997). IRF1 soutient notamment le développement des lymphocytes Th1 via le contrôle de l'expression du gène *Il12rb1* (Kano et al., 2008). Dans les cellules Treg et Th2, IRF1 régule négativement l'expression des gènes *Foxp3* et *Il4* respectivement (Fragale A et al., 2008; Maruyama et al., 2015b). Cependant, l'impact de l'EA d'*Irf1* dans ces populations cellulaires est encore largement sous-exploré. Toutefois, des expériences ont révélé l'existence de

cinq isoformes alternatives d'IRF1 dans des échantillons de tissus cervicaux humains tumoraux. Cette étude a également montré que ces variants étaient capables d'inhiber l'activité transcriptionnelle de l'isoforme principale d'IRF1.

Dans ce contexte, nous montrons qu'IRF1-short joue un rôle négatif dans la différenciation lymphocytaire Th1. Par le fait, lorsque nous éteignons l'expression de cette dernière, nous observons une augmentation de l'expression de l'*Ifng* et de l'*Il12rb1*. En surexprimant IRF1-short nous avons confirmé cet effet négatif. Cependant, contrairement à ce qui a été démontré autour des isoformes alternatives d'IRF1 dans le cancer cervical et des promoteurs de gènes suppresseurs de tumeur, ici IRF1-short n'interagit pas avec le promoteur de l'*Il12rb1*.



**Figure 50 : Domaines fonctionnels d'IRF1.** Exons correspondants aux différents domaines d'IRF1.

Cela peut être dû à la présence de l'intron 8 dans sa séquence qui pourrait donner une conformation protéique masquant le domaine de liaison à l'ADN. De plus, à travers l'exclusion de l'exon 7 dans cette isoforme alternative, le domaine responsable de la transactivation est partiellement tronqué (Kim et al., 2003) (**Figure 50**). En outre, l'inclusion de l'intron 8 ajoutant un codon STOP prématuré, le domaine responsable de l'activation transcriptionnelle est quant à lui totalement absent puisque localisé au sein de l'exon 10 (Kirchhoff et al., 2000) (**Figure 50**). Nous avons alors montré que l'action répressive d'IRF1-short passe en réalité par son interaction avec IRF1-full. Ce faisant, IRF1-full est dans l'incapacité d'interagir avec le

promoteur de l'*IL12rb1*. Il serait d'un grand intérêt de réaliser une expérience de séquençage de la chromatine immunoprécipitée avec un anticorps ciblant IRF1, dans des cellules Th1 où IRF1-short est soit réprimé par ARNi ou bien surexprimé par stratégie rétrovirale. Ainsi, il serait possible d'identifier si le phénomène observé pour le promoteur de l'*IL12rb1* se répète pour les autres gènes régulés par IRF1. Il a été démontré qu'IRF1 intervient fréquemment dans les régulations transcriptionnelles dans lesquelles il est impliqué sous forme d'homodimère (Kirchhoff et al., 1998). Il est probable qu'IRF1-short puisse perturber ce phénomène en interagissant avec IRF1-full. De plus, l'exclusion de l'exon 7 d'IRF1-short tronque aussi le domaine d'hétérodimérisation d'IRF1 (Bovolenta et al., 1994). Il est envisageable que si IRF1-short est dans l'incapacité d'interagir avec d'autres protéines comme IRF8 ou STAT1 (Langlais et al., 2016; Moitreyee et al., 2000), il oriente alors uniquement son interaction envers la forme complète d'IRF1.

Ensemble ces résultats soulignent le rôle négatif d'IRF1-short dans la différenciation lymphocytaire Th1. Puisque cette isoforme augmente en contexte tumoral, la cibler pourrait ainsi potentialiser l'activité anti-tumorale de ces cellules.

La technologie de séquençage ARN a permis d'établir qu'environ 95% des gènes humains sont épissés de manière alternative (Sultan et al., 2008). Cependant, peu d'études ont analysé l'impact de l'EA sur l'homéostasie du système immunitaire humain (Martinez and Lynch, 2013). Notre étude indique que comme chez la souris, une isoforme alternative d'*IRF1* sans l'exon 7 existe chez l'homme. Cependant, si *IRF1-short* ne semble pas être exprimé différemment selon le sous-ensemble T helper *in vitro*, cette expression est majoritaire dans les cellules Th1 *in vivo*. Par ailleurs, lorsque nous avons ciblé *IRF1-short* par ARNi, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'*IL12RB1* et de l'*IFNG*. Cette isoforme semble donc posséder les mêmes propriétés inhibitrices dans la différenciation lymphocytaire Th1. Nous avons aussi noté que par rapport aux cellules Th1 de sang de donneurs sains, les cellules Th1 de la tumeur avaient un niveau d'expression d'*IRF1-short* plus élevé. Nous avons également constaté que cet effet du microenvironnement tumoral pourrait également passer par le TGF- $\beta$  puisque ce dernier augmente l'expression d'*IRF1-short* par rapport à celle d'*IRF1-full*.

---

# CONCLUSION

---

Ce travail participe à la compréhension de l'influence de l'épissage alternatif dans la réponse immunitaire. Nous ouvrons par la même un nouveau champ d'exploration autour de l'impact du microenvironnement tumoral sur ce phénomène moléculaire dans les cellules immunitaires. Nos résultats illustrent l'effet négatif d'une isoforme alternative d'IRF1 sur l'isoforme principale dans les lymphocytes Th1. En effet, en interagissant avec IRF1-full, IRF1-short prévient son interaction avec le promoteur de l'*Il12rb1*. Il en résulte une diminution de la signalisation de l'IL-12 et par conséquent une baisse de sécrétion de la cytokine principalement sécrétée par les cellules Th1 qu'est l'IFN- $\gamma$ . IRF1-short étant davantage exprimé en contexte tumoral sous l'influence du TGF- $\beta$ , il est très probable que cet événement d'épissage alternatif diminue le pouvoir anti-tumoral des cellules Th1. Cibler cette isoforme pourrait potentialiser la réponse immunitaire Th1 qui coordonne l'action d'autres cellules immunitaires au pouvoir anti-tumoral avéré comme les cellules NK ou les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques.

De nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des oligonucléotides anti-sens donnent des résultats probants dans le cadre de la myopathie de Duchenne (Koo and Wood, 2013). Cette maladie musculaire touchant un homme sur quatre-mille, est liée à la mutation d'un site d'épissage du gène codant la dystrophine. Il en résulte l'apparition d'une forme tronquée de cette dernière, inopérante dans les cellules musculaires. Les capacités contractiles des muscles des individus touchés décroissent progressivement jusqu'à ce que le cœur soit concerné. Deux oligonucléotides sont désormais commercialisés et permettent de prévenir l'exclusion de l'exon 50 de la dystrophine qui autrefois menait à l'apparition d'un codon STOP prématuré. L'usage de ces outils thérapeutiques est encore très peu répandu dans le cancer où des événements d'épissages alternatifs aberrants sont très répandus. Des problèmes dans la distribution des oligonucléotides anti-sens au sein de la masse tumorale sont souvent rencontrés. Si dans le cadre de la myopathie de Duchenne des injections au niveau musculaire font preuve d'efficacité, les injections intratumorales restent pour le moment sans effets (Bauman et al., 2010). Néanmoins, il serait possible de prévenir l'apparition d'évènements d'épissage alternatif dans le cadre de thérapies cellulaires employant des cellules immunitaires anti-tumorales. Si l'on prend l'exemple de notre étude, il serait intéressant de cibler IRF1-short dans des cellules Th1 avant de les injecter à des souris porteuses de tumeurs pour déterminer si l'efficacité anti-tumorales des cellules Th1 est exacerbée dans ces conditions.

La littérature scientifique autour de l'épissage alternatif dans les cellules immunitaires décrit souvent ce phénomène comme représentant une forme de rétrocontrôle négatif de la réponse immunitaire. C'est par exemple le cas pour l'épissage alternatif de NLRP3 dans les macrophages qui aboutit à une baisse de l'inflammation (Hoss et al., 2019), ou pour celui de CD45 qui en générant l'isoforme CD45RO, augmente le seuil de stimulation du TCR des cellules T (McNeill et al., 2004). Il est possible qu'il en soit de même pour l'épissage alternatif d'IRF1, qui en produisant IRF1-short, limite la réponse immunitaire Th1 à travers la baisse de la sécrétion d'IFN- $\gamma$ . C'est pourquoi il serait intéressant d'explorer le rôle que pourrait avoir l'épissage alternatif d'*Irf1* dans les maladies autoimmunes telles que la sclérose en plaque ou encore la maladie de Crohn (Brand, 2009).



# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

## A

Allen, S.E., Darnell, R.B., and Lipscombe, D. (2010). The neuronal splicing factor Nova controls alternative splicing in N-type and P-type CaV2 calcium channels. *Channels*.

Amarnath, S., Mangus, C.W., Wang, J.C.M., Wei, F., He, A., Kapoor, V., Foley, J.E., Massey, P.R., Felizardo, T.C., Riley, J.L., et al. (2011). The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci. Transl. Med.* 3.

Andersen, R.S., Andersen, S.R., Hjortsø, M.D., Lyngaa, R., Idorn, M., Køllgård, T.M., Met, O., Thor Straten, P., and Hadrup, S.R. (2013). High frequency of T cells specific for cryptic epitopes in melanoma patients. *Oncoimmunology* 2, e25374.

Aronica, M.A., Mora, A.L., Mitchell, D.B., Finn, P.W., Johnson, J.E., Sheller, J.R., and Boothby, M.R. (1999). Preferential role for NF-kappa B/Rel signaling in the type 1 but not type 2 T cell-dependent immune response in vivo. *J. Immunol.* 163, 5116–5124.

De Arras, L., and Alper, S. (2013). Limiting of the innate immune response by SF3A-dependent control of MyD88 alternative mRNA splicing. *PLoS Genet.* 9, e1003855.

Arsura, M., Panta, G.R., Bilyeu, J.D., Cavin, L.G., Sovak, M.A., Oliver, A.A., Factor, V., Heuchel, R., Mercurio, F., Thorgeirsson, S.S., et al. (2003). Transient activation of NF-kB through a TAK1/IKK kinase pathway by TGF-β1 inhibits AP-1/SMAD signaling and apoptosis: Implications in liver tumor formation. *Oncogene* 22, 412–425.

Asadzadeh, Z., Mohammadi, H., Safarzadeh, E., Hemmatzadeh, M., Mahdian-Shakib, A., Jadidi-Niaragh, F., Azizi, G., and Baradaran, B. (2017). The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell. Immunol.* 322, 15–25.

Aune, T.M., Collins, P.L., and Chang, S. (2009). Epigenetics and T helper 1 differentiation. *Immunology*.

## B

Baralle, F.E., and Giudice, J. (2017). Alternative splicing as a regulator of development and tissue identity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 437–451.

Bauman, J.A., Li, S.D., Yang, A., Huang, L., and Kole, R. (2010). Anti-tumor activity of splice-switching oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 38, 8348–8356.

Bennett, S.R.M., Carbone, F.R., Karamalis, F., Flavell, R.A., Miller, J.F.A.P., and Heath, W.R. (1998). Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*.

Biddle, A., Gammon, L., Fazil, B., and Mackenzie, I.C. (2013). CD44 Staining of Cancer Stem-Like Cells Is Influenced by Down-Regulation of CD44 Variant Isoforms and Up-Regulation of the Standard CD44 Isoform in the Population of Cells That Have Undergone Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *PLoS One* 8.

Bourgeois, C., Veiga-Fernandes, H., Joret, A.-M., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002). CD8 lethargy in the absence of CD4 help. *Eur. J. Immunol.* 32, 2199–2207.

Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C.,

Nieruchalski, M., and May, E. (2000). Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* 19, 649–660.

Bovolenta, C., Driggers, P.H., Marks, M.S., Medin, J.A., Politis, A.D., Vogel, S.N., Levy, D.E., Sakaguchi, K., Appella, E., Coligan, J.E., et al. (1994). Molecular interactions between interferon consensus sequence binding protein and members of the interferon regulatory factor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5046–5050.

Brabletz, T., Pfeuffer, I., Schorr, E., Siebelt, F., Wirth, T., and Serfling, E. (2015). Transforming growth factor beta and cyclosporin A inhibit the inducible activity of the interleukin-2 gene in T cells through a noncanonical octamer-binding site. *Mol. Cell. Biol.* 13, 1155–1162.

Brand, S. (2009). Crohn's disease: Th1, Th17 or both? The change of a paradigm: new immunological and genetic insights implicate Th17 cells in the pathogenesis of Crohn's disease. *Gut* 58, 1152–1167.

Bullock, T.N.J., and Yagita, H. (2005). Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J. Immunol.* 174, 710–717.

Busch, A., and Hertel, K.J. (2012). Evolution of SR protein and hnRNP splicing regulatory factors. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.*

Butte, M.J., Lee, S.J., Jesneck, J., Keir, M.E., Haining, W.N., and Sharpe, A.H. (2012). CD28 costimulation regulates genome-wide effects on alternative splicing. *PLoS One* 7.

## C

Cadigan, K.M., and Waterman, M.L. (2012). TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 4.

Caron, E., Kowalewski, D.J., Chiek Koh, C., Sturm, T., Schuster, H., and Aebersold, R. (2015). Analysis of Major Histocompatibility Complex (MHC) Immunopeptidomes Using Mass Spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 14, 3105–3117.

Chabot, B., and Shkreta, L. (2016). Defective control of pre-messenger RNA splicing in human disease. *J. Cell Biol.* 212, 13–27.

Chemnitz, J.M., Parry, R. V, Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* 173, 945–954.

Chen, W., Jin, W., Hardegen, N., Lei, K., 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 . *J. Exp. Med.* 198, 1875–1886.

Cho, H.-S., Shin, H.M., Haberstock-Debic, H., Xing, Y., Owens, T.D., Funk, J.O., Hill, R.J., Bradshaw, J.M., and Berg, L.J. (2015). A Small Molecule Inhibitor of ITK and RLK Impairs Th1 Differentiation and Prevents Colitis Disease Progression. *J. Immunol.*

Chow, L.T., Gelinas, R.E., Broker, T.R., and Roberts, R.J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 12, 1–8.

Chraa, D., Naim, A., Olive, D., and Badou, A. (2019). T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *J. Leukoc. Biol.* 105, 243–255.

Côté, A.L., Byrne, K.T., Steinberg, S.M., Zhang, P., and Turk, M.J. (2011). Protective CD8 memory T cell responses to mouse melanoma are generated in the absence of CD4 T cell help. *PLoS One* 6, e26491.

Coupland, K. G., Kim, W. S., Halliday, G. M., Hallupp, M., Dobson-Stone, C., & Kwok, J. B. J. (2016). Role of the Long Non-Coding RNA MAPT-AS1 in Regulation of Microtubule Associated Protein Tau (MAPT) Expression in Parkinson's Disease. *PloS One*, 11(6), e0157924.

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*.

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.

Cyster, J.G., Healy, J.I., Kishihara, K., Mak, T.W., Thomas, M.L., and Goodnow, C.C. (1996). Regulation of B-lymphocyte negative and positive selection by tyrosine phosphatase CD45. *Nature* 381, 325–328.

## D

Das, J., Chen, C.H., Yang, L., Cohn, L., Ray, P., and Ray, A. (2001). A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.* 2, 45–50.

David, C.J., and Manley, J.L. (2010). Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: Pathways and programs unhinged. *Genes Dev.* 24, 2343–2364.

David, C.J., and Massagué, J. (2018). Contextual determinants of TGFβ action in development, immunity and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 419–435.

DeGrendele, H.C., Estess, P., and Siegelman, M.H. (1997). Requirement for CD44 in activated T cell extravasation into an inflammatory site. *Science* 278, 672–675.

Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene*.

Delgoffe, G.M., Pollizzi, K.N., Waickman, A.T., Heikamp, E., Meyers, D.J., Horton, M.R., Xiao, B., Worley, P.F., and Powell, J.D. (2011). The kinase mTOR regulates the differentiation of helper T cells through the selective activation of signaling by mTORC1 and mTORC2. *Nat. Immunol.*

Ding, Z.C., Huang, L., Blazar, B.R., Yagita, H., Mellor, A.L., Munn, D.H., and Zhou, G. (2012). Polyfunctional CD4+ T cells are essential for eradicating advanced B-cell lymphoma after chemotherapy. *Blood*.

Djuretic, I.M., Levanon, D., Negreanu, V., Groner, Y., Rao, A., and Ansel, K.M. (2007). Erratum: Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells (*Nature Immunology*). *Nat. Immunol.*

Dreyfuss, G., Matunis, M.J., Piñol-Roma, S., and Burd, C.G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 289–321.

Duhen, T., Geiger, R., Jarrossay, D., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.* 10, 857–863.

Dujardin, G., Lafaille, C., de la Mata, M., Marasco, L.E., Muñoz, M.J., Le Jossic-Corcós, C., Corcos, L., and Kornblihtt, A.R. (2014). How Slow RNA Polymerase II Elongation Favors Alternative Exon Skipping. *Mol. Cell.*

## E

Enders, A., Short, A., Miosge, L.A., Bergmann, H., Sontani, Y., Bertram, E.M., Whittle, B., Balakrishnan, B., Yoshida, K., Sjollem, G., et al. (2014). Zinc-finger protein ZFP318 is essential for expression of IgD, the alternatively spliced Igh product made by mature B lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 4513–4518.

## F

Fei, P., Bernhard, E.J., and El-Deiry, W.S. (2002). Tissue-specific induction of p53 targets in vivo. *Cancer Res.* 62, 7316–7327.

Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.*

Ferrara, N., Gerber, H.-P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–676.

Flavell, R.A., Sanjabi, S., Wrzesinski, S.H., and Licona-Limón, P. (2010). The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF $\beta$  2. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 554–567.

Fragale A, Gabriele L, Stellacci E, Borghi P, Perrotti E, Ilari R, Lanciotti A, Remoli AL, Venditti M, Belardelli F, et al. (2008). IFN regulatory factor-1 negatively regulates CD4+ CD25+ regulatory T cell differentiation by repressing Foxp3 expression. *J. Immunol.* 181, 1673–1682.

Frankiw, L., Baltimore, D., and Li, G. (2019). Alternative mRNA splicing in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.*

Fridman, W.H., Pagès, F., Sautès-Fridman, C., and Galon, J. (2012). The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 12, 298–306.

Friese, M.A., and Fugger, L. (2009). Pathogenic CD8 + T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.*

Fu, X.D., and Ares, M. (2014). Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* 15, 689–701.

## G

Genestier, L., Kasibhatla, S., Brunner, T., and Green, D.R. (1999). Transforming Growth Factor  $\beta$ 1 Inhibits Fas Ligand Expression and Subsequent Activation-induced Cell

Death in T Cells via Downregulation of c-Myc. *J. Exp. Med.* 189, 231–239.

Giroux, M., Schmidt, M., and Descoteaux, A. (2003a). IFN- $\gamma$ -Induced MHC Class II Expression: Transactivation of Class II Transactivator Promoter IV by IFN Regulatory Factor-1 is Regulated by Protein Kinase C- $\alpha$ . *J. Immunol.*

Giroux, M., Schmidt, M., and Descoteaux, A. (2003b). IFN- $\gamma$ -induced MHC class II expression: transactivation of class II transactivator promoter IV by IFN regulatory factor-1 is regulated by protein kinase C- $\alpha$ . *J. Immunol.* 171, 4187–4194.

Gorelik, L., Constant, S., and Flavell, R.A. (2002). Mechanism of Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *J. Exp. Med.* 195, 1499–1505.

Gozani, O., Feld, R., and Reed, R. (1996). Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes Dev.* 10, 233–243.

Green, W.B., Slovak, M.L., Chen, I.M., Pallavicini, M., Hecht, J.L., and Willman, C.L. (1999). Lack of IRF-1 expression in acute promyelocytic leukemia and in a subset of acute myeloid leukemias with del(5)(q31). *Leukemia* 13, 1960–1971.

Grohmann, U., Belladonna, M.L., Vacca, C., Bianchi, R., Fallarino, F., Orabona, C., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. (2001). Positive regulatory role of IL-12 in macrophages and modulation by IFN- $\gamma$ . *J. Immunol.* 167, 221–227.

Groom, J.R., and Luster, A.D. (2011). CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell Res.*

Guan, E., Wang, J., and Norcross, M.A. (2001). Identification of Human Macrophage Inflammatory Proteins 1 $\alpha$  and 1 $\beta$  as a Native Secreted Heterodimer. *J. Biol. Chem.*

## H

Haferlach, T., Nagata, Y., Grossmann, V., Okuno, Y., Bacher, U., Nagae, G., Schnittger, S., Sanada, M., Kon, A., Alpermann, T., et al. (2014). Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 28, 241–247.

Harbuz, R., Lespinasse, J., Boulet, S., Francannet, C., Creveaux, I., Benkhelifa, M., Jouk, P.-S., Lunardi, J., and Ray, P.F. (2010). Identification of new FOXP3 mutations and prenatal diagnosis of IPEX syndrome. *Prenat. Diagn.* 30, 1072–1078.

Hauser, S.L., and Oksenberg, J.R. (2006). The Neurobiology of Multiple Sclerosis: Genes, Inflammation, and Neurodegeneration. *Neuron.*

He, Y., Zeng, M.Y., Yang, D., Motro, B., and Núñez, G. (2016). NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* 530, 354–357.

Hertweck, A., Evans, C.M., Eskandarpour, M., Lau, J.C.H., Oleinika, K., Jackson, I., Kelly, A., Ambrose, J., Adamson, P., Cousins, D.J., et al. (2016). T-bet Activates Th1 Genes through Mediator and the Super Elongation Complex. *Cell Rep.*

Heyd, F., and Lynch, K.W. (2010). Phosphorylation-dependent regulation of PSF by GSK3 controls CD45 alternative splicing. *Mol. Cell* 40, 126–137.

Hilliard, B.A., Mason, N., Xu, L., Sun, J., Lamhamedi-Cherradi, S.-E., Liou, H.-C., Hunter, C., and Chen, Y.H. (2002). Critical roles of c-Rel in autoimmune inflammation and helper T cell differentiation. *J. Clin. Invest.* 110, 843–850.

Hoeben, A., Landuyt, B., Highley, M.S., Wildiers, H., Van Oosterom, A.T., and De Bruijn, E.A. (2004). Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol. Rev.* 56, 549–580.

van Horssen, R. (2006). TNF- in Cancer Treatment: Molecular Insights, Antitumor Effects, and Clinical Utility. *Oncologist*.

Hoss, F., Mueller, J.L., Rojas Ringeling, F., Rodriguez-Alcazar, J.F., Brinkschulte, R., Seifert, G., Stahl, R., Broderick, L., Putnam, C.D., Kolodner, R.D., et al. (2019). Alternative splicing regulates stochastic NLRP3 activity. *Nat. Commun.* 10.

Huang, H., Hao, S., Li, F., Ye, Z., Yang, J., and Xiang, J. (2007). CD4+ Th1 cells promote CD8+ Tc1 cell survival, memory response, tumor localization and therapy by targeted delivery of interleukin 2 via acquired pMHC I complexes. *Immunology*.

Huber, M.A., Azoitei, N., Baumann, B., Grünert, S., Sommer, A., Pehamberger, H., Kraut, N., Beug, H., and Wirth, T. (2004). 2004 Huber, NF- $\kappa$ B is essential for epithelial. PDF. 114, 569–581.

Hwang, E.S., Hong, J.-H., and Glimcher, L.H. (2005). IL-2 production in developing Th1 cells is regulated by heterodimerization of RelA and T-bet and requires T-bet serine residue 508. *J. Exp. Med.*

## I

Iwami, K.I., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikacharoen, T., and Yoshikai, Y. (2000). Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J. Immunol.* 165, 6682–6686.

## J

Jabeen, R., and Kaplan, M.H. (2012). The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr. Opin. Immunol.* 24, 303–307.

Jayasinghe, R.G., Cao, S., Gao, Q., Wendl, M.C., Vo, N.S., Reynolds, S.M., Zhao, Y., Climente-González, H., Chai, S., Wang, F., et al. (2018). Systematic Analysis of Splice-Site-Creating Mutations in Cancer. *Cell Rep.* 23, 270-281.e3.

Jenner, R.G., Townsend, M.J., Jackson, I., Sun, K., Bouwman, R.D., Young, R.A., Glimcher, L.H., and Lord, G.M. (2009). The transcription factors T-bet and GATA-3 control alternative pathways of T-cell differentiation through a shared set of target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Jeong, S.K., Yang, K., Park, Y.S., Choi, Y.J., Oh, S.J., Lee, C.W., Lee, K.Y., Jeong, M.H., and Jo, W.S. (2014). Interferon gamma induced by resveratrol analog, HS-1793, reverses the properties of tumor associated macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 22, 303–310.

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.

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–428.

Jordan, M.S., Boesteanu, A., Reed, A.J., Petrone, A.L., Holenbeck, A.E., Lerman, M.A., Najj, A., and Caton, A.J. (2001). Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.* 2, 301–306.

## K

Kahles, A., Lehmann, K.-V., Toussaint, N.C., Hüser, M., Stark, S.G., Sachsenberg, T., Stegle, O., Kohlbacher, O., Sander, C., Cancer Genome Atlas Research Network, et al. (2018). Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients. *Cancer Cell* 34, 211-224.e6.

Kammertoens, T., Friese, C., Arina, A., Idel, C., Briesemeister, D., Rothe, M., Ivanov, A., Szymborska, A., Patone, G., Kunz, S., et al. (2017). Tumour ischaemia by interferon- $\gamma$  resembles physiological blood vessel regression. *Nature*.

Kanhere, A., Hertweck, A., Bhatia, U., Gökmen, M.R., Perucha, E., Jackson, I., Lord, G.M., and Jenner, R.G. (2012). T-bet and GATA3 orchestrate Th1 and Th2 differentiation through lineage-specific targeting of distal regulatory elements. *Nat. Commun.*

Kano, S.I., Sato, K., Morishita, Y., Vollstedt, S., Kim, S., Bishop, K., Honda, K., Kubo, M., and Taniguchi, T. (2008a). The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon- $\gamma$ -interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. *Nat. Immunol.*

Kano, S.I., Sato, K., Morishita, Y., Vollstedt, S., Kim, S., Bishop, K., Honda, K., Kubo, M., and Taniguchi, T. (2008b). The contribution of transcription factor IRF1 to the interferon- $\gamma$ -interleukin 12 signaling axis and TH1 versus TH-17 differentiation of CD4+ T cells. *Nat. Immunol.* 9, 34–41.

Karwacz, K., Miraldi, E.R., Pokrovskii, M., Madi, A., Yosef, N., Wortman, I., Chen, X., Watters, A., Carriero, N., Awasthi, A., et al. (2017). Critical role of IRF1 and BATF in forming chromatin landscape during type 1 regulatory cell differentiation. *Nat. Immunol.* 18, 412–421.

Klattenhoff, C. A., Scheuermann, J. C., Surface, L. E., Bradley, R. K., Fields, P. A., Steinhauser, M. L., ... Boyer, L. A. (2013). Klattenhoff C A, Scheuermann J C, Surface L E, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment.[J]. *Cell*, 2013, 152(3):570-83. *Cell*, 152(3), 570–583.

Kavsak, P., Rasmussen, R.K., Causing, C.G., Bonni, S., Zhu, H., Thomsen, G.H., and Wrana, J.L. (2000). Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell* 6, 1365–1375.

Kawano, Y., Matsui, N., Kamihigashi, S., Narahara, H., and Miyakawa, I. (2000). Effects of interferon-gamma on secretion of vascular endothelial growth factor by endometrial stromal cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 43, 47–52.

Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J.I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P., and Prat, A. (2009). Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 66, 390–402.

Keller, A.M., Xiao, Y., Peperzak, V., Naik, S.H., and Borst, J. (2009). Costimulatory ligand CD70 allows induction of CD8+ T-cell immunity by immature dendritic cells in a vaccination setting. *Blood*.

Kennedy, R., and Celis, E. (2008). Multiple roles for CD4+ T cells in anti-tumor immune responses. *Immunol. Rev.*

Khodor, Y.L., Menet, J.S., Tolan, M., and Rosbash, M. (2012). Cotranscriptional splicing efficiency differs dramatically between *Drosophila* and mouse. *RNA* 18, 2174–2186.

Kim, E.-J., Park, C.-H., Park, J.-S., and Um, S.-J. (2003). Functional dissection of the transactivation domain of interferon regulatory factor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304, 253–259.

Kim, E., Ilagan, J.O., Liang, Y., Daubner, G.M., Lee, S.C.W., Ramakrishnan, A., Li, Y., Chung, Y.R., Micol, J.B., Murphy, M.E., et al. (2015). SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. *Cancer Cell* 27, 617–630.

Kim, P.K.M., Armstrong, M., Liu, Y., Yan, P., Bucher, B., Zuckerbraun, B.S., Gambotto, A., Billiar, T.R., and Yim, J.H. (2004). IRF-1 expression induces apoptosis and inhibits tumor growth in mouse mammary cancer cells in vitro and in vivo. *Oncogene* 23, 1125–1135.

Kirchhoff, S., Schaper, F., Oumard, A., and Hauser, H. (1998). In vivo formation of IRF-1 homodimers. *Biochimie* 80, 659–664.

Kirchhoff, S., Oumard, A., Nourbakhsh, M., Levi, B.Z., and Hauser, H. (2000). Interplay between repressing and activating domains defines the transcriptional activity of IRF-1. *Eur. J. Biochem.* 267, 6753–6761.

Kobayashi, J., Torigoe, T., Hirohashi, Y., Idenoue, S., Miyazaki, A., Yamaguchi, A., Hiratsuka, H., and Sato, N. (2009). Comparative study on the immunogenicity between an HLA-A24-restricted cytotoxic T-cell epitope derived from survivin and that from its splice variant survivin-2B in oral cancer patients. *J. Transl. Med.* 7, 1.

Kochupurakkal, B.S., Wang, Z.C., Hua, T., Culhane, A.C., Rodig, S.J., Rajkovic-Molek, K., Lazaro, J.B., Richardson, A.L., Biswas, D.K., and Iglehart, J.D. (2015). RelA-induced interferon response negatively regulates proliferation. *PLoS One*.

Koenen, H.J.P.M., Smeets, R.L., Vink, P.M., van Rijssen, E., Boots, A.M.H., and Joosten, I. (2008). Human CD25<sup>high</sup>Foxp3<sup>pos</sup> regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* 112, 2340–2352.

Kondo, T., Minamino, N., Nagamura-Inoue, T., Matsumoto, M., Taniguchi, T., and Tanaka, N. (1997). Identification and characterization of nucleophosmin/B23/numatrin which binds the anti-oncogenic transcription factor IRF-1 and manifests oncogenic activity. *Oncogene* 15, 1275–1281.

Koo, T., and Wood, M.J. (2013). Clinical trials using antisense oligonucleotides in duchenne muscular dystrophy. *Hum. Gene Ther.* 24, 479–488.

Kornblihtt, A.R. (2017). Epigenetics at the base of alternative splicing changes that promote colorectal cancer. *J. Clin. Invest.* 127, 3281–3283.

Krainer, A.R., and Maniatis, T. (1985). Multiple factors including the small nuclear ribonucleoproteins U1 and U2 are necessary for Pre-mRNA splicing in vitro. *Cell*.

Krummel, M.F., and Allison, J.P. (1995). CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J. Exp. Med.* 182, 459–465.

Kurosaki, T., Popp, M.W., and Maquat, L.E. (2019). Quality and quantity control of gene expression by nonsense-mediated mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*



## L

Langlais, D., Barreiro, L.B., and Gros, P. (2016). The macrophage IRF8/IRF1 regulome is required for protection against infections and is associated with chronic inflammation. *J. Exp. Med.* 213, 585–603.

Laumont, C.M., Vincent, K., Hesnard, L., Audemard, É., Bonneil, É., Laverdure, J.-P., Gendron, P., Courcelles, M., Hardy, M.-P., Côté, C., et al. (2018). Noncoding regions are the main source of targetable tumor-specific antigens. *Sci. Transl. Med.* 10.

Lee, Y., and Rio, D.C. (2015). Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu. Rev. Biochem.*

Lee, E.-J., Jo, M., Park, J., Zhang, W., and Lee, J.-H. (2006a). Alternative splicing variants of IRF-1 lacking exons 7, 8, and 9 in cervical cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 882–888.

Lee, E.-J., Jo, M., Park, J., Zhang, W., and Lee, J.-H. (2006b). Alternative splicing variants of IRF-1 lacking exons 7, 8, and 9 in cervical cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 882–888.

Lee, J.U., Kim, L.K., and Choi, J.M. (2018). Revisiting the concept of targeting NFAT to control T cell immunity and autoimmune diseases. *Front. Immunol.*

Li, W., Huang, X., Tong, H., Wang, Y., Zhang, T., Wang, W., Dai, L., Li, T., Lin, S., and Wu, H. (2012). Comparison of the Regulation of  $\beta$ -Catenin Signaling by Type I, Type II and Type III Interferons in Hepatocellular Carcinoma Cells. *PLoS One.*

Lin, J.T., Martin, S.L., Xia, L., and Gorham, J.D. (2005). TGF- $\beta$ 1 Uses Distinct Mechanisms to Inhibit IFN- $\gamma$  Expression in CD4 + T Cells at Priming and at Recall: Differential Involvement of Stat4 and T-bet . *J. Immunol.* 174, 5950–5958.

Liu, Z., Kuang, W., Zhou, Q., and Zhang, Y. (2018). TGF- $\beta$ 1 secreted by M2 phenotype macrophages enhances the stemness and migration of glioma cells via the SMAD2/3 signalling pathway. *Int. J. Mol. Med.*

Lohoff, M., Ferrick, D., Mittrucker, H.W., Duncan, G.S., Bischof, S., Rollinghoff, M., and Mak, T.W. (1997). Interferon regulatory factor-1 is required for a T helper 1 immune response in vivo. *Immunity* 6, 681–689.

Luco, R.F., Pan, Q., Tominaga, K., Blencowe, B.J., Pereira-Smith, O.M., and Misteli, T. (2010). Regulation of alternative splicing by histone modifications. *Science* (80- ).

Lugo-Villarino, G., Maldonado-Lopez, R., Possemato, R., Penaranda, C., and Glimcher, L.H. (2003). T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 7749–7754.

## M

Ma, X., Chow, J.M., Gri, G., Carra, G., Gerosa, F., Wolf, S.F., Dzialo, R., and Trinchieri, G. (1996). The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells. *J. Exp. Med.* 183, 147–157.

Ma, X., Yan, W., Zheng, H., Du, Q., Zhang, L., Ban, Y., Li, N., and Wei, F. (2015). Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. *F1000Research.*

- Mailer, R.K.W., Falk, K., and Röttschke, O. (2009). Absence of leucine zipper in the natural FOXP3Delta2Delta7 isoform does not affect dimerization but abrogates suppressive capacity. *PLoS One* 4, e6104.
- Mailer, R.K.W., Joly, A.L., Liu, S., Elias, S., Tegner, J., and Andersson, J. (2015). IL-1 $\beta$  promotes Th17 differentiation by inducing alternative splicing of FOXP3. *Sci. Rep.* 5.
- Maki, R., Roeder, W., Traunecker, A., Sidman, C., Wabl, M., Raschke, W., and Tonegawa, S. (1981). The role of DNA rearrangement and alternative RNA processing in the expression of immunoglobulin delta genes. *Cell* 24, 353–365.
- Maloy, K.J., and Powrie, F. (2001). Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat. Immunol.* 2, 816–822.
- Marie, J.C., Liggitt, D., and Rudensky, A.Y. (2006). Cellular mechanisms of fatal early-onset autoimmunity in mice with the T cell-specific targeting of transforming growth factor-beta receptor. *Immunity* 25, 441–454.
- Martinez, N.M., and Lynch, K.W. (2013). Control of alternative splicing in immune responses: many regulators, many predictions, much still to learn. *Immunol. Rev.* 253, 216–236.
- Martinez, N.M., Pan, Q., Cole, B.S., Yarosh, C.A., Babcock, G.A., Heyd, F., Zhu, W., Ajith, S., Blencowe, B.J., and Lynch, K.W. (2012). Alternative splicing networks regulated by signaling in human T cells. *RNA* 18, 1029–1040.
- Martini, M., Testi, M.G., Pasetto, M., Picchio, M.C., Innamorati, G., Mazzocco, M., Ugel, S., Cingarlini, S., Bronte, V., Zanovello, P., et al. (2010). IFN-gamma-mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* 28, 3548–3557.
- Maruyama, S., Kanoh, M., Matsumoto, A., Kuwahara, M., Yamashita, M., and Asano, Y. (2015a). A novel function of interferon regulatory factor-1: Inhibition of T h 2 cells by down-regulating the Il4 gene during Listeria infection. *Int. Immunol.*
- Maruyama, S., Kanoh, M., Matsumoto, A., Kuwahara, M., Yamashita, M., and Asano, Y. (2015b). A novel function of interferon regulatory factor-1: Inhibition of T h 2 cells by down-regulating the Il4 gene during Listeria infection. *Int. Immunol.* 27, 143–152.
- Matera, A.G., and Wang, Z. (2014). A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 108–121.
- Matter, N., Herrlich, P., and König, H. (2002). Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* 420, 691–695.
- Mattick, J. S. (2003). Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 25(10), 930–939.
- McGeachy, M.J., Stephens, L.A., and Anderton, S.M. (2005). Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J. Immunol.* 175, 3025–3032.
- McKarns, S.C., Schwartz, R.H., and Kaminski, N.E. (2004). Smad3 Is Essential for TGF- $\beta$ 1 to Suppress IL-2 Production and TCR-Induced Proliferation, but Not IL-2-Induced Proliferation. *J. Immunol.* 172, 4275–4284.

- McNeill, L., Cassady, R.L., Sarkardei, S., Cooper, J.C., Morgan, G., and Alexander, D.R. (2004). CD45 isoforms in T cell signalling and development. *Immunol. Lett.* 92, 125–134.
- Meininger, I., Griesbach, R.A., Hu, D., Gehring, T., Seeholzer, T., Bertossi, A., Kranich, J., Oeckinghaus, A., Eitelhuber, A.C., Greczmiel, U., et al. (2016). Alternative splicing of MALT1 controls signalling and activation of CD4 + T cells. *Nat. Commun.* 7.
- Michelotti, E.F., Michelotti, G.A., Aronsohn, A.I., and Levens, D. (1996). Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K Is a Transcription Factor.
- Miller, S.A., and Weinmann, A.S. (2010). Molecular mechanisms by which T-bet regulates T-helper cell commitment. *Immunol. Rev.*
- Mitchell, R.E., Hassan, M., Burton, B.R., Britton, G., Hill, E. V., Verhagen, J., and Wraith, D.C. (2017). IL-4 enhances IL-10 production in Th1 cells: Implications for Th1 and Th2 regulation. *Sci. Rep.*
- Miyamoto, M., Fujita, T., Kimura, Y., Maruyama, M., Harada, H., Sudo, Y., Miyata, T., and Taniguchi, T. (1988). Regulated expression of a gene encoding a nuclear factor, IRF-1, that specifically binds to IFN- $\beta$  gene regulatory elements. *Cell.*
- Moitreyee, C.K., Van Den Akker, F., and Stark, G.R. (2000). Adenovirus E1A down-regulates LMP2 transcription by interfering with the binding of Stat1 to IRF1. *J. Biol. Chem.* 275, 20406–20411.
- Mosmann, T.R., Cherwinski, H., Bond, M.W., Giedlin, M.A., and Coffman, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*
- Motta-Mena, L.B., Heyd, F., and Lynch, K.W. (2010). Context-dependent regulatory mechanism of the splicing factor hnRNP L. *Mol. Cell* 37, 223–234.
- Moulton, V.R., and Tsokos, G.C. (2010). Alternative splicing factor/splicing factor 2 regulates the expression of the  $\zeta$  subunit of the human T cell receptor-associated CD3 complex. *J. Biol. Chem.* 285, 12490–12496.
- Mu, D., Cambier, S., Fjellbirkeland, L., Baron, J.L., Munger, J.S., Kawakatsu, H., Sheppard, D., Courtney Broaddus, V., and Nishimura, S.L. (2002). The integrin  $\alpha\beta 8$  mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF- $\beta 1$ . *J. Cell Biol.* 157, 493–507.
- 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.

## N

- Newman, A.M., Liu, C.L., Green, M.R., Gentles, A.J., Feng, W., Xu, Y., Hoang, C.D., Diehn, M., and Alizadeh, A.A. (2015). Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat. Methods* 12, 453–457.
- Ni, J., Cozzi, P.J., Hao, J.L., Beretov, J., Chang, L., Duan, W., Shigdar, S., Delprado, W.J., Graham, P.H., Bucci, J., et al. (2014). CD44 variant 6 is associated with prostate cancer metastasis and chemo-/radioresistance. *Prostate* 74, 602–617.
- O'Connor, B.P., Danhorn, T., De Arras, L., Flatley, B.R., Marcus, R.A., Farias-Hesson, E.,

Leach, S.M., and Alper, S. (2015). Regulation of toll-like receptor signaling by the SF3a mRNA splicing complex. *PLoS Genet.* *11*, e1004932.

O'Connor, R.A., Prendergast, C.T., Sabatos, C.A., Lau, C.W.Z., Leech, M.D., Wraith, D.C., and Anderton, S.M. (2008). Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *181*, 3750–3754.

O'Shea, J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4 + T cells. *Science* (80-. ). *327*, 1098–1102.

Oberdoerffer, S., Moita, L.F., Neems, D., Freitas, R.P., Hacohen, N., and Rao, A. (2008). Regulation of CD45 alternative splicing by heterogeneous ribonucleoprotein, hnRNPLL. *Science* (80-. ). *321*, 686–691.

## O

Oestreich, K.J., and Weinmann, A.S. (2012). T-bet employs diverse regulatory mechanisms to repress transcription. *Trends Immunol.*

Ogasawara, K., Hida, S., Azimi, N., Tagaya, Y., Sato, T., Yokochi-Fukuda, T., Waldmann, T.A., Taniguchi, T., and Taki, S. (1998). Requirement for IRF-1 in the microenvironment supporting development of natural killer cells. *Nature* *391*, 700–703.

Ostrand-Rosenberg, S. (2005). CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Invest.* *23*, 413–419.

## P

Pan, Q., Shai, O., Lee, L.J., Frey, B.J., and Blencowe, B.J. (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* *40*, 1413–1415.

Pandit, S., Zhou, Y., Shiue, L., Coutinho-Mansfield, G., Li, H., Qiu, J., Huang, J., Yeo, G.W., Ares, M., and Fu, X.D. (2013). Genome-wide Analysis Reveals SR Protein Cooperation and Competition in Regulated Splicing. *Mol. Cell.*

Pandya-Jones, A. (2011). Pre-mRNA splicing during transcription in the mammalian system. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.*

Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Haley, A.S., and Johnson, K.P. (1987). Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* (London, England) *1*, 893–895.

Papageorgis, P., and Stylianopoulos, T. (2015). Role of TGF $\beta$  in regulation of the tumor microenvironment and drug delivery (review). *Int. J. Oncol.* *46*, 933–943.

Penninger, J.M., Sirard, C., Mittrücker, H.W., Chidgey, A., Koziaradzki, I., Nghiem, M., Hakem, A., Kimura, T., Timms, E., Boyd, R., et al. (1997). The interferon regulatory transcription factor IRF-1 controls positive and negative selection of CD8+ thymocytes. *Immunity* *7*, 243–254.

Perucha, E., Melchiotti, R., Bibby, J.A., Wu, W., Frederiksen, K.S., Roberts, C.A., Hall, Z., LeFrieck, G., Robertson, K.A., Lavender, P., et al. (2019). The cholesterol biosynthesis pathway regulates IL-10 expression in human Th1 cells. *Nat. Commun.*

Pickup, M.W., Owens, P., and Moses, H.L. (2017). TGF- $\beta$ , bone morphogenetic protein,

and activin signaling and the tumor microenvironment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9.

Prochazka, L., Tesarik, R., and Turanek, J. (2014). Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell. Signal.* 26, 2234–2239.

Puré, E., and Cuff, C.A. (2001). A crucial role for CD44 in inflammation. *Trends Mol. Med.* 7, 213–221.

## R

Ramanathan, A., Robb, G.B., and Chan, S.H. (2016). mRNA capping: Biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.*

Ribas, A., and Wolchok, J.D. (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science (80-. )*. 359, 1350–1355.

Richard, P., and Manley, J.L. (2009). Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes Dev.*

Rizvi, N.A., Hellmann, M.D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J.J., Lee, W., Yuan, J., Wong, P., Ho, T.S., et al. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science (80-. )*. 348, 124–128.

Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., ... Chang, H. Y. (2007). Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell*, 129(7), 1311–1323.

Rocha, B., and Tanchot, C. (2004). CD8 T cell memory. *Semin. Immunol.*

Ruefli-Brasse, A.A., French, D.M., and Dixit, V.M. (2003). Regulation of NF-kappaB-dependent lymphocyte activation and development by paracaspase. *Science* 302, 1581–1584.

## S

Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*, 146(3), 353–358.

Samstein, R.M., Lee, C.-H., Shoushtari, A.N., Hellmann, M.D., Shen, R., Janjigian, Y.Y., Barron, D.A., Zehir, A., Jordan, E.J., Omuro, A., et al. (2019). Tumor mutational load predicts survival after immunotherapy across multiple cancer types. *Nat. Genet.* 51, 202–206.

Sanjabi, S., Oh, S.A., and Li, M.O. (2017). Regulation of the immune response by TGF- $\beta$ : From conception to autoimmunity and infection. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9.

Saxon, A., Diaz-Sanchez, D., and Zhang, K. (1997). Regulation of the expression of distinct human secreted IgE proteins produced by alternative RNA splicing. In *Biochemical Society Transactions*, (Portland Press Ltd), pp. 383–387.

Schaub, A., and Glasmacher, E. (2017). Splicing in immune cells-mechanistic insights and emerging topics. *Int. Immunol.* 29, 173–181.

Schmitt, M.J., Philippidou, D., Reinsbach, S.E., Margue, C., Wienecke-Baldacchino, A., Nashan, D., Behrmann, I., and Kreis, S. (2012). Interferon- $\gamma$ -induced activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) up-regulates the tumor suppressing microRNA-29 family in melanoma cells. *Cell Commun. Signal.*

Schultz, E.S., Lethé, B., Cambiaso, C.L., Van Snick, J., Chaux, P., Corthals, J., Heirman, C., Thielemans, K., Boon, T., and van der Bruggen, P. (2000). A MAGE-A3 peptide presented by HLA-DP4 is recognized on tumor cells by CD4+ cytolytic T lymphocytes. *Cancer Res.* 60, 6272–6275.

Scotti, M.M., and Swanson, M.S. (2016). RNA mis-splicing in disease. *Nat. Rev. Genet.* 17, 19–32.

Segal, N.H., Parsons, D.W., Peggs, K.S., Velculescu, V., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Allison, J.P. (2008). Epitope landscape in breast and colorectal cancer. *Cancer Res.* 68, 889–892.

Seo, J.-Y., Kim, D.-Y., Kim, S.-H., Kim, H.-J., Ryu, H.G., Lee, J., Lee, K.-H., and Kim, K.-T. (2017). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) L promotes DNA damage-induced cell apoptosis by enhancing the translation of p53. *Oncotarget.*

Shalek, A.K., Satija, R., Adiconis, X., Gertner, R.S., Gaublomme, J.T., Raychowdhury, R., Schwartz, S., Yosef, N., Malboeuf, C., Lu, D., et al. (2013). Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* 498, 236–240.

Shapiro, I.M., Cheng, A.W., Flytzanis, N.C., Balsamo, M., Condeelis, J.S., Oktay, M.H., Burge, C.B., and Gertler, F.B. (2011). An emt-driven alternative splicing program occurs in human breast cancer and modulates cellular phenotype. *PLoS Genet.* 7.

Shi, Y. (2017). Mechanistic insights into precursor messenger RNA splicing by the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 655–670.

Shirai, C.L., Ley, J.N., White, B.S., Kim, S., Tibbitts, J., Shao, J., Ndonwi, M., Wadugu, B., Duncavage, E.J., Okeyo-Owuor, T., et al. (2015). Mutant U2AF1 Expression Alters Hematopoiesis and Pre-mRNA Splicing In Vivo. *Cancer Cell* 27, 631–643.

Singh, R.K., Kolonin, A.M., Fiorotto, M.L., and Cooper, T.A. (2018). Rbfox-Splicing Factors Maintain Skeletal Muscle Mass by Regulating Calpain3 and Proteostasis. *Cell Rep.*

Slager, E.H., van der Minne, C.E., Krüse, M., Krueger, D.D., Griffioen, M., and Osanto, S. (2004). Identification of multiple HLA-DR-restricted epitopes of the tumor-associated antigen CAMEL by CD4+ Th1/Th2 lymphocytes. *J. Immunol.* 172, 5095–5102.

Smeby, J., Sveen, A., Eilertsen, I.A., Danielsen, S.A., Hoff, A.M., Eide, P.W., Johannessen, B., Hektoen, M., Skotheim, R.I., Guren, M.G., et al. (2019). Transcriptional and functional consequences of TP53 splice mutations in colorectal cancer. *Oncogenesis* 8.

Sotillo, E., Barrett, D.M., Black, K.L., Bagashev, A., Oldridge, D., Wu, G., Sussman, R., Lanauze, C., Ruella, M., Gazzara, M.R., et al. (2015). Convergence of acquired mutations and alternative splicing of CD19 enables resistance to CART-19 immunotherapy. *Cancer Discov.* 5, 1282–1295.

Spear, P., Barber, A., Rynda-Applé, A., and Sentman, C.L. (2012). Chimeric antigen receptor T cells shape myeloid cell function within the tumor microenvironment through IFN- $\gamma$  and GM-CSF. *J. Immunol.* 188, 6389–6398.

Stegle, O., Teichmann, S.A., and Marioni, J.C. (2015). Computational and analytical

challenges in single-cell transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* 16, 133–145.

Sultan, M., Schulz, M.H., Richard, H., Magen, A., Klingenhoff, A., Scherf, M., Seifert, M., Borodina, T., Soldatov, A., Parkhomchuk, D., et al. (2008). A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* 321, 956–960.

Sun, J.C., Williams, M.A., and Bevan, M.J. (2004). CD4<sup>+</sup> T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8<sup>+</sup> T cells after acute infection. *Nat. Immunol.* 5, 927–933.

Sveen, A., Kilpinen, S., Ruusulehto, A., Lothe, R.A., and Skotheim, R.I. (2016). Aberrant RNA splicing in cancer; expression changes and driver mutations of splicing factor genes. *Oncogene* 35, 2413–2427.

## T

Takeuchi, A., and Saito, T. (2017). CD4 CTL, a cytotoxic subset of CD4<sup>+</sup> T cells, their differentiation and function. *Front. Immunol.*

Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M.S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T.W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M., and Taniguchi, T. (1996). Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature* 382, 816–818.

Thieu, V.T., Yu, Q., Chang, H.C., Yeh, N., Nguyen, E.T., Sehra, S., and Kaplan, M.H. (2008). Signal Transducer and Activator of Transcription 4 Is Required for the Transcription Factor T-bet to Promote T Helper 1 Cell-Fate Determination. *Immunity*.

Tong, A., Nguyen, J., and Lynch, K.W. (2005). Differential expression of CD45 isoforms is controlled by the combined activity of basal and inducible splicing-regulatory elements in each of the variable exons. *J. Biol. Chem.* 280, 38297–38304.

Toole, B.P. (2009). Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: Paradoxes and possibilities. *Clin. Cancer Res.* 15, 7462–7468.

Topp, M.S., Gökbuget, N., Zugmaier, G., Klappers, P., Stelljes, M., Neumann, S., Viardot, A., Marks, R., Diedrich, H., Faul, C., et al. (2014). Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J. Clin. Oncol.* 32, 4134–4140.

Toung, J.M., Morley, M., Li, M., and Cheung, V.G. (2011). RNA-sequence analysis of human B-cells. *Genome Res.* 21, 991–998.

Townsend, M.J., Weinmann, A.S., Matsuda, J.L., Salomon, R., Farnham, P.J., Biron, C.A., Gapin, L., and Glimcher, L.H. (2004). T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Va14i NKT cells. *Immunity*.

Trapani, J.A. (2005). The dual adverse effects of TGF- $\beta$  secretion on tumor progression. *Cancer Cell* 8, 349–350.

Tripathi, V., Sixt, K.M., Gao, S., Xu, X., Huang, J., Weigert, R., Zhou, M., and Zhang, Y.E. (2016). Direct Regulation of Alternative Splicing by SMAD3 through PCBP1 Is Essential to the Tumor-Promoting Role of TGF- $\beta$ . *Mol. Cell* 64, 549–564.

Tripathi, V., Shin, J.H., Stuelten, C.H., and Zhang, Y.E. (2019). TGF- $\beta$ -induced alternative splicing of TAK1 promotes EMT and drug resistance. *Oncogene* 38, 3185–3200.

Tzachanis, D., Freeman, G.J., Hirano, N., Van Puijenbroek, A.A.F.L., Delfs, M.W., Berezovskaya, A., Nadler, L.M., and Boussiotis, V.A. (2001). Tob is a negative regulator of activation that is expressed in anergic and quiescent T cells. *Nat. Immunol.* 2, 1174–1182.

Tzoanopoulos, D., Speletas, M., Arvanitidis, K., Veiopoulou, C., Kyriaki, S., Thyphronitis, G., Sideras, P., Kartalis, G., and Ritis, K. (2002). Low expression of interferon regulatory factor-1 and identification of novel exons skipping in patients with chronic myeloid leukaemia. *Br. J. Haematol.* 119, 46–53.

## U

Ueno, A., Jeffery, L., Kobayashi, T., Hibi, T., Ghosh, S., and Jijon, H. (2018). Th17 plasticity and its relevance to inflammatory bowel disease. *J. Autoimmun.* 87, 38–49.

Um, S.-J., Rhyu, J.-W., Kim, E.-J., Jeon, K.-C., Hwang, E.-S., and Park, J.-S. (2002). Abrogation of IRF-1 response by high-risk HPV E7 protein in vivo. *Cancer Lett.* 179, 205–212.

Unutmaz, D., and Vilcek, J. (2008). IRF1: A deus ex machina in TH1 differentiation. *Nat. Immunol.*

## V

Végran, F., Berger, H., Boidot, R., Mignot, G., Bruchard, M., Dosset, M., Chalmin, F., Rébé, C., Dérangère, V., Ryffel, B., et al. (2014). The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat. Immunol.* 15, 758–766.

## W

Wang, F.-Q., Chen, G., Zhu, J.-Y., Zhang, W., Ren, J.-G., Liu, H., Sun, Z.-J., Jia, J., and Zhao, Y.-F. (2013). M2-polarised macrophages in infantile haemangiomas: correlation with promoted angiogenesis. *J. Clin. Pathol.* 66, 1058–1064.

Wang, L., Wang, Y., Song, Z., Chu, J., and Qu, X. (2015). Deficiency of interferon-gamma or its receptor promotes colorectal cancer development. *J. Interferon Cytokine Res.* 35, 273–280.

Wei, G., Wei, L., Zhu, J., Zang, C., Hu-Li, J., Yao, Z., Cui, K., Kanno, Y., Roh, T.Y., Watford, W.T., et al. (2009). Global Mapping of H3K4me3 and H3K27me3 Reveals Specificity and Plasticity in Lineage Fate Determination of Differentiating CD4+ T Cells. *Immunity.*

Wielenga, V.J.M., Heider, K.H., Offerhaus, G.J.A., Adolf, G.R., van den Berg, F.M., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T. (1993). Expression of CD44 Variant Proteins in Human Colorectal Cancer Is Related to Tumor Progression. *Cancer Res.* 53, 4754–4756.

Wong, S.B.J., Bos, R., and Sherman, L.A. (2008). Tumor-specific CD4+ T cells render the tumor environment permissive for infiltration by low-avidity CD8+ T cells. *J. Immunol.* 180, 3122–3131.

## X

Xu, X., Zheng, L., Yuan, Q., Zhen, G., Crane, J.L., Zhou, X., and Cao, X. (2018). Transforming growth factor- $\beta$  in stem cells and tissue homeostasis. *Bone Res.* 6.



## Y

Yagi, R., Juntila, I.S., Wei, G., Urban, J.F., Zhao, K., Paul, W.E., and Zhu, J. (2010). The Transcription Factor GATA3 Actively Represses RUNX3 Protein-Regulated Production of Interferon- $\gamma$ . *Immunity*.

Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2008a). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- $\beta$ . *Mol. Cell* 31, 918–924.

Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y.E. (2008b). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- $\beta$ . *Mol. Cell* 31, 918–924.

Yan, X., Liu, Z., and Chen, Y. (2009). Regulation of TGF- $\beta$  signaling by Smad7. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 41, 263–272.

Yanai, H., Negishi, H., and Taniguchi, T. (2012). The IRF family of transcription factors inception, impact and implications in oncogenesis. *Oncoimmunology*.

Yap, K., and Makeyev, E. V (2016). Functional impact of splice isoform diversity in individual cells. *Biochem. Soc. Trans.* 44, 1079–1085.

Yip, B.H., Steeples, V., Repapi, E., Armstrong, R.N., Llorian, M., Roy, S., Shaw, J., Dolatshad, H., Taylor, S., Verma, A., et al. (2017). The U2AF1S34F mutation induces lineage-specific splicing alterations in myelodysplastic syndromes. *J. Clin. Invest.* 127, 2206–2221.

Yugami, M., Kabe, Y., Yamaguchi, Y., Wada, T., and Handa, H. (2007). hnRNP-U enhances the expression of specific genes by stabilizing mRNA. *FEBS Lett.*

## Z

Zhang, Y., Yan, L., Zeng, J., Zhou, H., Liu, H., Yu, G., Yao, W., Chen, K., Ye, Z., and Xu, H. (2019a). Pan-cancer analysis of clinical relevance of alternative splicing events in 31 human cancers. *Oncogene* 1–18.

Zhang, Z., Pan, Z., Ying, Y., Xie, Z., Adhikari, S., Phillips, J., Carstens, R.P., Black, D.L., Wu, Y., and Xing, Y. (2019b). Deep-learning augmented RNA-seq analysis of transcript splicing. *Nat. Methods* 16, 307–310.

Zhao, P., Damerow, M.S., Stern, P., Liu, A.H., Sweet-Cordero, A., Siziopikou, K., Neilson, J.R., Sharp, P.A., and Cheng, C. (2013). CD44 promotes Kras-dependent lung adenocarcinoma. *Oncogene* 32, 5186–5190.

Zhou, L., Chong, M.M.W., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4<sup>+</sup> T Cell Lineage Differentiation. *Immunity*.

Zhou, Z.-J., Dai, Z., Zhou, S.-L., Fu, X.-T., Zhao, Y.-M., Shi, Y.-H., Zhou, J., and Fan, J. (2013). Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 132, 1080–1089.

Zimmerli, S.C., Harari, A., Cellerai, C., Vallelian, F., Bart, P.-A., and Pantaleo, G. (2005). HIV-1-specific IFN- $\gamma$ /IL-2-secreting CD8 T cells support CD4-independent proliferation of HIV-1-specific CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7239–7244.

Zong, X., Tripathi, V., & Prasanth, K. V. (n.d.). RNA splicing control: yet another gene regulatory role for long nuclear noncoding RNAs. *RNA Biology*, 8(6), 968–977.

Zou, W., Wolchok, J.D., and Chen, L. (2016). PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations. *Sci. Transl. Med.*

---

# ANNEXES

---

**ANNEXE 1 : “Tumor microenvironment impairs Th1 cell differentiation through alternative splicing modifications”**

Entête du papier autour de l'épissage alternatif d'*Irf1* actuellement en révision dans le journal Cancer Immunology Research et dont la teneur est commentée dans les parties résultats et discussion.

---

**Title: Tumor microenvironment impairs Th1 cell differentiation through alternative splicing modifications**

**Authors**

Antoine Bernard<sup>1,2,3</sup>, Christophe Hibos<sup>1,2</sup>, Corentin Richard<sup>2,3</sup>, Etienne Viltard<sup>1,2</sup>, Sandy Chevrier<sup>3</sup>, Joséphine Melin<sup>2,4</sup>, Etienne Humblin<sup>1,2</sup>, Romain Mary<sup>1,2</sup>, Théo Accogli<sup>1,2</sup>, Fanny Chalmin<sup>1</sup>, Mélanie Bruchard<sup>1,2,3</sup>, Paul Peixoto<sup>5</sup>, Eric Hervouet<sup>5</sup>, Lionel Apetoh<sup>1,2</sup>, François Ghiringhelli<sup>1,2,3</sup>, Frédérique Végran<sup>1,2,3</sup>, Romain Boidot<sup>1,2,3\*</sup>

**Affiliations**

<sup>1</sup>CRI INSERM UMR1231 “Lipids, Nutrition and Cancer”, Team “CAAdIR”, Dijon, France.

<sup>2</sup> Faculté des sciences de santé, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France

<sup>3</sup> Centre Georges François Leclerc, Dijon, France.

<sup>4</sup> LipSTIC LabEx, F-21000, Dijon, France.

<sup>5</sup> INSERM UMR1231 “Interactions Hôte-Greffon-Tumeur & Ingénierie Cellulaire et Génique”, Besançon, France.

\* Corresponding authors:

Romain Boidot: [RBoidot@cgfl.fr](mailto:RBoidot@cgfl.fr)

**ANNEXE 2** : "Cleaved Caspase-3 acts as a transcription factor promoting tumorigenesis and resistance to treatment"

Au cours de mes années de thèse, j'ai également contribué à la finalisation d'une étude entamée par le docteur Romain BOIDOT, autour du rôle de facteur de transcription de la caspase 3. Nous montrons pour la première fois que lors du traitement de cellules tumorales mammaires humaines par chimiothérapie, la caspase 3 se fixe sur le promoteur du VEGFA pour en induire l'expression. Nous soulignons ainsi l'action antagoniste de la caspase 3, qui peut à la fois induire l'apoptose, et induire l'expression du gène codant pour la protéine pro-angiogénique qu'est le VEGFA.

Cet article est accepté dans le journal Cancer Research.

**Title: Cleaved Caspase-3 acts as a transcription factor promoting tumorigenesis and resistance to treatment**

**Authors:** Antoine Bernard<sup>1</sup>, Sandy Chevrier<sup>2</sup>, Françoise Beltjens<sup>2</sup>, Magalie Dosset<sup>1</sup>, Etienne Viltard<sup>1</sup>, Anaïs Lagrange<sup>1</sup>, Valentin Dérangère<sup>1,3</sup>, Alexandra Oudot<sup>4</sup>, François Ghiringhelli<sup>1,3</sup>, Bertrand Collin<sup>4</sup>, Lionel Apetoh<sup>1</sup>, Olivier Feron<sup>5</sup>, Suzie Chen<sup>6,7</sup>, Laurent Arnould<sup>2</sup>, Frédérique Végran<sup>1,3</sup>, Romain Boidot<sup>1,2\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Inserm U1231, Dijon, France

<sup>2</sup>Department of Biology and Pathology of Tumors, Georges-Francois Leclerc cancer center - UNICANCER, Dijon, France

<sup>3</sup>Platform of Transfer in Cancer Biology, Georges-Francois Leclerc cancer center - UNICANCER, Dijon, France

<sup>4</sup>Preclinical Imaging Platform – Nuclear Medicine Department, Georges-Francois Leclerc cancer center - UNICANCER, Dijon, France

<sup>5</sup>Pole of Pharmacology and Therapeutics, Institut de Recherche Expérimentale et Clinique, UCLouvain, Brussels, Belgium

<sup>6</sup>Susan Lehman Cullman Laboratory for Cancer Research, Department of Chemical Biology, Ernest Mario School of Pharmacy, Rutgers, The State University of New Jersey, Piscataway, New Jersey 08854, USA

<sup>7</sup>The Cancer Institute of New Jersey, 195 Little Albany Street, New Brunswick, New Jersey 08903, USA

**Running title:** Caspase-3 is a transcription factor

**Keywords:** Caspase-3, transcription factor, DNA binding domain, tumorigenesis, resistance to treatment

### **Additional information**

\*corresponding author: Romain Boidot - Georges-Francois Leclerc cancer center - 1, rue du Professeur Marion, 21000 Dijon, France; Phone: +33 3 80 73 77 67; E.mail: [rboidot@cgfl.fr](mailto:rboidot@cgfl.fr)

### **Availability of data and material**

NGS data are available on the GEO website with the SuperSeries reference: GSE87227.

### **Competing interests**

The authors declare no conflict of interest.

### **Funding**

We thank "Ligue contre le Cancer de Côte d'Or" and "Ligue contre le Cancer de Saône-et-Loire" for the financial support of this work. We thank "Ligue contre le Cancer" for the financial support of Antoine Bernard. Imaging experiments were supported by a French Government Grant managed by the French National Research Agency (ANR) under the program "Investissements d'Avenir" (reference ANR-10-EQPX-05-01/IMAPPI Equipex).

### **Authors' Contributions**

R.B. conceived the study; Li.A., O.F., F.G., F.V., and R.B. designed the methodology; A.B., Sa.C., M.D., A.L., E.L., V.D., A.O., B.C., La.A. and R.B. performed the experiments; A.B., A.O., F.V., and R.B. analyzed the data, R.B. wrote the original draft; O.F., F.V. and R.B. reviewed, and edited the manuscript; R.B. acquired funding; B.C., O.F., Su.C., F.G., and R.B. obtained resources; and R.B. supervised the study.

**Words count: 4958 - # Figures: 5**

## **Abstract**

Apoptosis is a well-known physiological process, in which Caspases are key executors. In recent years, investigations have identified novel non-apoptotic roles of Caspases. However, these new roles are not well documented and the mechanisms involved are not fully understood. We investigated cleaved Caspase-3 functions in human and mouse proficient Caspase-3 cancer cells (MDA-MB-231, 4T1, CT26, and MCF-7 expressing Caspase-3) and in human deficient Caspase-3 cell line (MCF-7). We analyzed impact of inhibition of Caspase-3 on tumor behavior and at the genomic level by RNA sequencing and ChIP sequencing. Moreover, we evaluated the effect of Caspase-3 targeting in vivo. We demonstrate that cleaved Caspase-3 acts as a transcription factor by directly interacting with DNA. Caspase-3 DNA binding enhances different pathways such as angiogenesis via the expression of pro-angiogenic genes and activation of different pathways leading to endothelial cell activation. Moreover, we have identified a DNA binding domain in the small subunit of Caspase-3 and showed that Caspase-3 active conformation is essential for its transcriptional activity. Furthermore, we have shown that some genes acting in pro-apoptotic pathways were down-regulated in caspase-3 proficient cells and identified cleaved Caspase-3 as a new therapeutic target in cancer since its inhibition increases the efficacy of chemotherapy and decreases spontaneous tumor development. These data highlight a new role of Caspase-3 and its underlying molecular mechanism, suggesting that cleaved Caspase-3 could be a new therapeutic target in cancer.



### **Statement of significance**

We report an unexpected ability of active Caspase-3 to directly interact with DNA, triggering the transcription of pro-angiogenic genes responsible for tumor development and resistance to treatment.

## Introduction

Apoptosis is a well-known physiological process that enables the maintenance of homeostasis in multicellular organisms. Apoptosis can be induced by different stimuli such as cytotoxic drugs, irradiation and hypoxic stress. One of the best-known markers of apoptosis is the proteolytic cleavage of Pro-caspase-3 into its active form, Caspase-3. Once cleaved, Caspase-3 translocates into the nucleus, where it cleaves specific substrates (1). Depending on the context, activation of Caspase-3 is considered a deleterious event in different pathophysiological processes, like neurodegenerative disorders or ischemia, or as a positive marker of effective therapeutic strategy like in cancer. However, in recent years, new investigations have identified new non-apoptotic roles of Caspases. Indeed, in cancer, activation of Caspase-3 was described as a stimulator of tumor cell repopulation during radiotherapy treatment (2), or a driver of tumor cell proliferation in pancreatic cancer (3) and melanoma (4). Recently, Caspase-3 was described as a mediator of neoangiogenesis in dying cells after X-ray therapy (5). Nevertheless, all non-apoptotic roles of Caspase-3 rely on its proteolytic activity (6-9). In the present work, we showed that Caspase-3 activation induced transcriptional changes leading to the upregulation of genes involved in angiogenesis and down-regulation of genes involved in pro-apoptotic pathways. We have shown that Caspase-3 was able to directly interact with the promoter of various pro-angiogenic genes, such as VEGFA gene, and induce transcription thanks to a specific DNA binding domain. In vivo, the pharmacological targeting of Caspase-3 increased chemotherapy cytotoxicity in cancer cells.

## **Materials and Methods**

**Cell lines.** All cell lines were cultured at 37°C under 5% CO<sub>2</sub>. MCF-7, MCF-7-Caspase 3 (stably transfected) and MDA-MB-231 cells were cultured in DMEM (high glucose). 4T1, CT26, COLO-205, HT-29 sensitive and resistant to oxaliplatin were cultured in for the MCF-7, MCF-7-Caspase 3 (stably transfected), MDA-MB-231 in RPMI-1640 for the 4T1, CT26, COLO-205, HT-29 sensitive and resistant to oxaliplatin. Mediums were supplemented with 10% (vol/vol) fetal calf serum, 1% penicillin, streptomycin, amphotericin B, 4 mM HEPES. Colo-205 and HT-29 resistant to oxaliplatin were cultured with oxaliplatin at 3µg/ml. Experiments with Concerning culture conditions of our MCF-7 cells , experiments were performed simultaneously with MCF-7 Casp-3-/- and +/+ within 5 cell subclonings. After 5 passages, new vials of both cells were thawed and new experiments were carried out. All cell lines were sequenced at the exome level and the transcriptomic level for authentication.

**Next Generation Sequencing.** Total RNA was extracted with TRIzol reagent, from MCF-7 and Caspase-3 transfected MCF-7 cells treated or not with docetaxel. Libraries and analysis were performed as described previously (10). ChIP sequencing was performed as described previously (11) for MCF-7 or MCF-7 caspase-3 +/+ cells treated or not with docetaxel.

## **Ethics approval and consent to participate**

The study on patient samples was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the ethics committee of the Centre Georges-François Leclerc (Dijon, France), the Comité Consultatif de Protection des Personnes en Recherche Biomédicale de Bourgogne. Written informed consent was obtained from all patients before enrollment.

All the mice were maintained in specific pathogen-free conditions and all experiments followed the guidelines of the Federation of European Animal Science Associations. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of Université de Bourgogne (Dijon, France).

**In vivo experiments.** MDA-MB-231 cells were cultured for 24h with control inhibitor as control or with the Caspase-3 inhibitor, Z-DEVD-FMK. Then,  $5 \times 10^6$  MDA-MB-231 cells in serum-free culture medium were inoculated subcutaneously into the right side of 8-week-old nude (nu/nu) BALB/c mice. As soon as tumors reached 400 mm<sup>2</sup>, the mice were sacrificed and tumors were collected, included with OCT and conserved at -80°C. Frozen sections were marked with CD-31 antibody and DAPI.

BALB/c mice were subcutaneously injected with CT-26 or 4T1 cells and treated with 5-fluorouracil

(50 mg/kg) + irinotecan (40mg/kg) or docetaxel (10mg/kg) respectively, 8 days after the tumor graft. Z-FA-FMK control inhibitor, Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor or anti-mouse VEGFA were injected intraperitoneally. siRNA transfections were performed twice a week as described previously (12) with anti-mouse Pro-Caspase-3 (GGATAGTGTTCTAAGGAA), anti-mouse Pro-Caspase-6 (CCTGGTACATTCAGGATTT), and anti-mouse Pro-Caspase-7 (CCTGTTAGAGAAACCCAAA) siRNA.

Twelve-week-old TG3 transgenic mice (13) had been intraperitoneally treated with Z-DEVD-FMK or Z-FA-FMK as a negative control for 4 months. Mice were sacrificed and tail tumor nodes were counted.

**Statistical analysis.** Graph Pad Prism software was used for the statistical analysis. Statistical significance is shown as \* for  $p < 0.05$ , \*\* for  $p < 0.01$ , \*\*\* for  $p < 0.001$  and \*\*\*\* for  $p < 0.0001$ .

## Results

### Caspase-3 dependent apoptosis is associated with tumor angiogenesis

It is known that an increase of SUVmax (Standardized Uptake Value maximum corresponding to the ratio between tracer binding in the tumor on total injected radioactive activity normalized by the patient body weight) after one course of neoadjuvant docetaxel is a marker of non-response to treatment (14,15). To understand the mechanism involved in the increase of SUVmax after docetaxel treatment, and consequently resistance to treatment, tumors generated with the aggressive MDA-MB-231 cells were treated or not with docetaxel. Two weeks later, FDG uptake was measured by PET scanner. First, we observed that docetaxel treatment induced FDG uptake compared to non-treated cells (Figure 1A). As an increase of FDG uptake is correlated with tumor progression, we hypothesized that an inhibition of apoptosis by the pharmacological Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK would increase FDG uptake by tumors. Tumors treated by Caspase-3 inhibitor alone presented a reduced size and, surprisingly, the inhibition of apoptosis completely abolished FDG uptake induced by docetaxel treatment (Figure 1B and 1C). In agreement with literature, the decrease of FDG uptake, induced by Caspase-3 inhibition, after 1 cycle of docetaxel was correlated with a decrease of tumor growth (Figure 1D). As FDG uptake was described as being correlated with tumor angiogenesis (16), we wondered whether the results observed with FDG uptake was linked to tumor blood vessel. For that, we stained mouse blood vessels in the MDA-MB-231 tumors used for PET scanner experiments. We observed that docetaxel increased blood vessel density and that Caspase-3 inhibitor treatment lead to an inhibition of this phenomenon (Figure 1E and 1F). Additionally, quantification of tumor mouse vessels by CD31 mRNA expression analysis showed that docetaxel induced the expression of

this blood vessel marker and that Caspase-3 pharmacological inhibition reduced its expression (Figure 1G). To confirm that angiogenesis was impacted by docetaxel and Caspase-3 pharmacological inhibition, we performed RNA sequencing of human MDA-MB-231 injected into nude mice and treated or not with docetaxel +/- the Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK. The sequences obtained were first aligned with the mouse genome. This enabled us to identify mechanisms induced by tumor cells in the host. Unsupervised clustering revealed that untreated tumors profile was closer to those of tumors treated with the Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK, or docetaxel and Z-DEVD-FMK than to that of tumors treated with docetaxel alone (Figure 1H). ClueGO software analysis of a cluster of genes specifically induced in tumors treated with docetaxel alone, revealed enrichment in genes involved in mechanisms known to promote angiogenesis (blood vessel development, morphogenesis of branching structures and response to wounding) (Figure 1H).

We secondly aligned sequences with the human genome. By comparing treated and non-treated tumors, we observed that the treatment of MDA-MB-231 tumors with docetaxel induced pathways involved in angiogenesis according to ClueGO analysis (Figure S1A). By performing additional analysis using Enrichr software (17,18), we observed that numerous pathways inducing angiogenesis were significantly enriched in docetaxel treated cells such as alpha adrenergic (19), oxytocin (20-22), thyrotropin (23), muscarinic receptor (24), p38 MAPK (25), 5-hydroxytryptamine (26), and PDGF (27) pathways (Figure S1B).

To address the role of Caspase-3 dependent cell death in angiogenesis, the naturally Caspase-3 deficient cells (MCF-7) were stably transfected with an empty vector (Casp3<sup>-/-</sup>) or with a plasmid encoding Caspase-3 cDNA (Casp3<sup>+/+</sup>). Both cell lines were treated with docetaxel at 10 nM. This dose of docetaxel induced Caspase-

3 (Figure S1C) and Caspase-9 (Figure S1D) cleavage in Casp3 +/+ cells with no differences observed neither in Caspase-7 (Figure S1E), nor in Caspase-8 (Figure S1F) cleavage, nor in apoptosis (Figure S1G), nor in cell growth (Figure S1H) between both cell lines. After 24 hours of treatment, the medium containing docetaxel was removed; cells were washed and incubated for additional 24h with fresh docetaxel-free medium. Afterwards, endothelial tube formation experiments were performed with the 24 hour conditioned drug-free cell medium. We observed that only docetaxel treated Caspase-3-proficient cells were able to induce tube formation and stabilize formed tubes (Figure 11). Altogether these data suggest that Caspase-3 dependent apoptosis could induce neo-vessel formation and their stabilization.

### **Activation of Caspase-3 induces pro-angiogenic gene expression**

We previously observed that apoptosis and particularly Caspase-3 dependent apoptosis correlated with increased neo-vessel formation and vasculature stabilization. To decipher the mechanism involved in this phenomenon, we performed massive mRNA sequencing on Caspase-3-deficient and Caspase-3-proficient MCF-7 cells treated with 10 nM docetaxel as above. This analysis allowed the identification of a set of 522 transcripts specifically upregulated in Caspase-3-deficient cells, a set of 283 transcripts overexpressed in both cell lines, and a set of 1197 transcripts specifically upregulated in Caspase-3-proficient cells (Figure 2A, Table S1). Each subset had an enrichment of particular pathways as detected by Enrichr software. In the subset of 522 transcripts, 4 pathways were significantly enriched (Figure S2A), whereas in the subset of 283 transcripts, 8 pathways were enriched (Figure S2B) as for the subset of 1197 transcripts (Figure S2C). Interestingly, in the third subset, appeared a pathway named "Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2". Using ClueGO software,

we confirmed that angiogenesis-related pathways were enriched in these 1197 transcripts (Figure 2B). As an example, the increased expression of the pro-angiogenic ANXA2, C1GALT1 and VEGFA genes was validated by qPCR exclusively in treated Caspase-3 proficient cells (Figure 2C). As VEGFA is a major pro-angiogenic gene involved in formation of neo-vessels and stabilization of vasculature, and as VEGFR1 and 2 signaling seemed activated only in Caspase-3 proficient cells (Figure S2C), therefore we decided to study its regulation by cleaved Caspase-3 as an illustration of our observations. While docetaxel cytotoxicity was identical in Caspase-3-proficient and deficient cells (Figures S1G and S1G), VEGFA mRNA expression increased continuously over time only in Caspase-3-proficient cells (Figure 2D), resulting in a higher VEGFA secretion in treated Caspase-3-proficient cells (Figure 2E) 72 hours after docetaxel treatment initiation (48 hours after docetaxel removal). Literature previously reported that VEGFA expression can be induced by NF- $\kappa$ B (28) or Caspase-3 activated PKC $\delta$  (29). Using specific siRNAs, we showed that neither NF- $\kappa$ B (Figure 2F) nor PKC $\delta$  (Figure 2G) were involved in the VEGFA upregulation observed in our conditions. In contrast, extinction of Caspase-3 by siRNA (Figure 2H) or inhibition of Caspase-3 activity by the pharmacological inhibitor Z-DEVD-FMK (Figure S2D) prevented VEGFA mRNA increase. In 2015, it was hypothesized that AKT phosphorylation was responsible for the induction of VEGFA expression in response to Caspase-3 cleavage (5). In our experimental conditions, the pharmacological inhibition of AKT activity had no effect on VEGFA expression (Figure 2I). Once cleaved, Caspase-3 cleaves and activates the 2 downstream Caspases-6 and 7. Still with siRNA strategy, it appeared that neither Caspase-6 (Figure 2J) nor Caspase-7 extinction (Figure 2K) had an impact on the induction of VEGFA mRNA expression following docetaxel treatment of Caspase-3-proficient cells. Caspase-3 can share substrates with its downstream Caspases, especially with Caspase-7. To confirm that our observation was only linked to cleaved



Caspase-3, we pharmacological inhibited Caspase-3 in combination with siRNA strategy against either Caspase-3, or Caspase-6, or Caspase-7. These experiments indicated that the Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor lost its activity only in presence of the siRNA targeting Caspase-3 (Figure S2E). To be active, Caspase-3 needs to be cleaved by upstream Caspases, such as Caspases-8 and -9. SiRNA strategy targeting both upstream Caspases, we surprisingly observed that both Caspase-8 (Figure S2F) and Caspase-9 (Figure S2G) extinction induced a slight decrease of VEGFA mRNA expression compared with treated control. Nevertheless, when both upstream Caspases were downregulated, we observed a similar impact to that obtained with Caspase-3 inhibition (Figure 2L). Indeed, upon docetaxel treatment, Caspase-3 activation is triggered by both Caspase-8 and Caspase-9 (30). Consequently, silencing of both Caspases-8 and -9 was required to prevent Caspase-3 activation. Finally, we also tested whether VEGFA mRNA expression could be influenced by chemotherapy induced Caspase-3 activation, without external targeting of Caspase-3. For that, we have used the 2 colon cancer cell lines HT-29 and Colo-205. For each cell line, we disposed of a sensitive versus a resistant oxaliplatin clone. Treatment by oxaliplatin induced Caspase-3 activation and cell death only in sensitive clones and not in resistant ones. Thus, VEGFA induction in both cell lines was exclusively observed in the sensitive clone (Figure 2M). Taken together, these results demonstrated that only cleaved Caspase-3 was involved in the induction of VEGFA, and by extension in pro-angiogenic gene expression in response to chemotherapy.

### **Cleaved Caspase-3 binds DNA and induces transcription**

We previously observed that activation of Caspase-3 induced the expression of pro-angiogenic genes. As this induction seemed to be exclusively due to cleaved

Caspase-3 and as cleaved Caspase-3 translocated into the nucleus under docetaxel treatment (Figure 3A and B), we wondered whether cleaved Caspase-3 could be able to interact with DNA. To elucidate this point, we performed ChIPseq experiments by immunoprecipitating cleaved Caspase-3 after docetaxel treatment in Caspase-3-deficient MCF-7 and Caspase-3-proficient MCF-7 cells. We first observed interactions between cleaved Caspase-3 and DNA. These interactions were at 2% with gene promoters, 40% in intergenic regions, 30% in introns and 1% in exons (Figure 3C). From aligned data, we obtained 3 putative consensus DNA sequences of interaction between DNA and cleaved Caspase-3 (Figure 3D). Next, bioinformatics analyses revealed that cleaved Caspase-3 interacted with 1406 genes whose 117 had an expression induced only in presence of Caspase-3 (Figure 3E, Table S2). Among these 117 genes, the most enriched pathway was the “Signaling events mediated by VEGFR1 and VEGFR2” (Figure S3A), suggesting that cleaved Caspase-3 was able to bind and activate genes involved in this pathway. Notably, ChIPseq revealed an interaction between cleaved Caspase-3 and the promoter of VEGFA (Figure 3F), confirmed by ChIP PCR experiments (Figure S3B). We also observed that cleaved Caspase-3 interacted with promoters of ANXA2 (Figure 3G) and C1GALT1 (Figure 3H), both induced in treated Caspase-3-proficient cells (Figure 2C). On the contrary, no interaction was observed with VEGFB and VEGFC promoters (Figure S3C) that were not induced by Caspase-3 activation. As cleaved Caspase-3 seemed to interact with DNA, we wondered whether this interaction was functional. Consequently, we performed luciferase assays. The transfection of the VEGFA promoter upstream from the luciferase gene was associated with luciferase signal detection only in presence of Caspase-3 (Figure 3I), whereas absence of Procaspases-6 and 7 did not impact luciferase signal detection (Figure S3D). Procaspase-3 is structured in 3 main domains: a prodomain, a large subunit and a small subunit (Figure S3E). To decipher

the involvement of each Procaspase-3 domain in the interaction between cleaved Caspase-3 and DNA, we generated a Caspase-3 protein without prodomain. This truncation induces a specific nuclear location of non-cleaved Caspase-3 (31) (no cleavage by cytoplasmic Caspases). This prodomain-truncated Caspase-3 did not induce any VEGFA mRNA expression after treatment into Caspase-3-deficient cells, whereas the full length Caspase-3 did (Figure 3J). This observation suggests that activation of Caspase-3 by cleavage is necessary for its transcriptional activity. Similarly, we generated a Caspase-3 protein lacking the small subunit. The expression of this second truncated form of Caspase-3 in Caspase-3-deficient cells was not associated with an increase of VEGFA mRNA (Figure 3K). This result suggested that the interaction between cleaved Caspase-3 and DNA needed the small subunit of Caspase-3. Furthermore, we analyzed the catalytically inactive C163A isoform of Caspase-3 that can adopt a conformation equivalent to wild type Caspase-3, but with no protease activity (32). Overexpression of this proteolytic inactive mutant of Caspase-3 induced VEGFA promoter activity as the wild-type Caspase-3 (Figure S3F), suggesting that the catalytic activity of Caspase-3 is not necessary for its transcriptional activity, contrarily to its conformation. Next, we wondered whether we could detect an amino-acid sequence enabling an interaction with DNA. By using BindN tool (33), we observed the presence of a 15-amino acid sequence "AYSTAPGYYSWRNSK" with putative DNA interaction properties located in the small subunit of Caspase-3 (Figure S3E). To test the DNA binding ability of this 15-amino acid sequence, we generated a Caspase-3 protein lacking the 15 amino acids and performed luciferase assays with the VEGFA promoter. The overexpression of the mutated Caspase-3 was not able to induce luciferase activity in Caspase-3 deficient cells (Figure 3L), and completely abolished the luciferase activity induced by docetaxel (Figure S3G), even in the absence of Caspases-3, -6, or -7 (Figure S3H). This

observation suggested that this 15-amino acid sequence might be involved in DNA binding and consequently gene transcription induction by Caspase-3 as the putative DNA binding domain truncated Caspase-3 was not able to interact with VEGFA promoter as demonstrated by ChIP experiment (Figure 3H). Finally, as this putative DNA binding domain is located in the small subunit of Caspase-3 and as this small subunit was necessary for transcription induction, we wondered whether the small subunit alone was sufficient for transcription induction. We therefore generated a plasmid encoding only the small subunit of Caspase-3 and performed a luciferase assay with the VEGFA promoter. As obtained with the DNA binding domain truncated Caspase-3, overexpression of the small subunit alone did not induce luciferase activity in Caspase-3 deficient cells (Figure 3L), and no interaction between the small subunit of Caspase-3 and the VEGFA promoter was observed (Figure 3M). In Caspase-3 proficient cells, the overexpression induced the same activation of the VEGFA promoter as the control (Figure S3I). Nevertheless, when we associated this overexpression with the extinction of Caspases-3, -6, or -7, the activation of VEGFA promoter was completely abolished in absence of Caspase-3 (Figure S3J), suggesting that the induction observed in Figure S3G was due to endogenous Caspase-3. These results suggested that both subunits of cleaved Caspase-3, and consequently a specific 3D structure of Caspase-3, were required for the transcriptional activity of cleaved Caspase-3.

### **Caspase-3 inhibition increases response to cytotoxic treatment**

As previously described, we surprisingly observed that Caspase-3 inhibition completely abolished the FDG uptake in tumors treated with docetaxel through angiogenesis inhibition. Moreover it also dramatically decreased tumor growth. These observations

suggested that Caspase-3 activation promoted aggressiveness of cancer cells by promoting neo-vessel formation and stabilization. To validate this observation in humans, we first studied the extent of the tumor vascular network, through the analysis of CD31 mRNA expression, before and after neoadjuvant chemotherapy in 61 locally advanced breast tumors, and correlated data with relapse-free survival (RFS). We observed a significantly worse RFS in patients with increased CD31 mRNA expression after cytotoxic treatment than in patients with a decreased CD31 mRNA expression (Figure 4A). On the same patients, we studied Caspase-3 activation by IHC at the same time point. It appeared that the number of tumors with increased nuclear staining (Caspase-3 cleavage) was about twice more than in tumors with decreased nuclear staining, indicating that neoadjuvant treatment induced Caspase-3 activation. Moreover, 73% of tumors presenting increased CD31 expression also showed an increase of Caspase-3 cleavage, and 67% of tumors with decreased CD31 expression showed a decrease of Caspase-3 activation (Figure 4B). This difference between both groups was statistically significant ( $p=0.041$ ). These findings indicated that neoadjuvant chemotherapy induced Caspase-3 activation and that angiogenesis was increased in the majority of human breast tumors harboring Caspase-3 activation. As the observations done in mouse were validated in humans, we wondered whether cleaved Caspase-3 could be a therapeutic target. For that, we have used the mouse colon CT26 and mammary 4T1 cancer cell lines for in vivo experiments. Both mouse cell lines harbor the same behavior as human cell lines in response to Caspase-3 activation by chemotherapy. Both increased VEGFA expression in response to cytotoxic treatment in the presence of cleaved Caspase-3 (Figure S4A). *In vivo*, treatment of CT26 tumors with 5-fluorouracil + irinotecan did not affect tumor growth whereas intratumor injection of anti-mouse Caspase-3 siRNA alone slightly decreased tumor growth. Interestingly, the combination of siRNA with

cytotoxic treatment dramatically increased the antitumor effects of 5-fluorouracil + irinotecan (Figure 4C). In parallel, we also tested the impact of anti-mouse Caspase-6 and anti-mouse Caspase-7 siRNAs on tumor growth in absence and presence of cytotoxic treatment. Contrary to Caspase-3 targeting, the targeting of Caspase-6 and Caspase-7 did not affect tumor growth (Figure S4B). The same observation was obtained with systemic inhibition of Caspase-3 with the pharmacological inhibitor Z-DEVD-FMK, administered intraperitoneally (Figure 4D). Moreover, treatment of tumors with an anti-mouse VEGFA therapeutic antibody in association with chemotherapy showed the same benefit (Figure 4E) as that observed with inhibition of Caspase-3 by siRNA or the Z-DEVD-FMK inhibitor (Figure 4C, Figure 4D). Similar observations were obtained with the mammary 4T1 cancer cell model, where both inhibition of Caspase-3 (Figure 4F) and VEGFA targeting (Figure 4G) further increased docetaxel growth inhibition. In Figure 1C, we observed that the pharmacological inhibition of Caspase-3 with Z-DEVD-FMK inhibitor strongly decreased tumorigenicity of highly tumorigenic MDA-MB-231 cancer cells. Based on the data previously described, we could hypothesize that cleaved Caspase-3 promoted tumor development by inducing tumor angiogenesis through the induction of transcription of pro-angiogenic genes as VEGFA. To test this hypothesis, we wondered whether the pharmacological inhibition of Caspase-3, in a spontaneous melanoma mouse model, could decrease the development of tumors. The Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK, or the control inhibitor Z-FA-FMK, was intraperitoneally injected once a week in 12-week old TG3 mice. Four months later, mice were sacrificed and tail tumor nodes were counted. It appeared that mice treated with control Z-FA-FMK harbored a mean of 10 (7-12) nodes, whereas mice treated with the Caspase-3 inhibitor Z-DEVD-FMK, had a mean of only 3.4 (0-7) nodes (Figure 4H), confirming that activation of Caspase-3 could be tumorigenic. Finally, we wondered whether Caspase-3 activation, detected by IHC in

31 locally advanced breast tumors, could be correlated with an increased VEGFA mRNA expression. We observed that tumors with a low Caspase-3 activation (less than 20% of stained nuclei) harbored a significantly lower expression of VEGFA mRNA than did tumors with high Caspase-3 activation (more than 20% of stained nuclei) (Figure 4H).

### **Cleaved Caspase-3 possibly down-regulates anti-apoptotic genes**

Using data obtained from massive RNA sequencing comparing Caspase-3 deficient and Caspase-3 proficient cells treated or not with docetaxel, we observed that treated Caspase-3 proficient cells specifically down-regulated 486 genes. The analysis of these down-regulated genes indicated a significant enrichment of 8 pathways (Figure 5A). Surprisingly, among these 8 pathways specifically down-regulated in treated Caspase-3 proficient cells, 7 were involved in apoptosis induction: FAS, TRAIL, IFN-gamma, ceramide, TNF receptor, RAC1, and Tap63 pathways. This observation suggested that the activation of Caspase-3 decreases the expression of genes inducing apoptosis, especially extrinsic apoptosis. As we previously showed that cleaved Caspase-3 was able to bind DNA and promote gene transcription, we wondered whether it was also able to inhibit transcription of pro-apoptotic genes by direct interaction with DNA. For that, we compared the list of the 486 down-regulated genes with the list of the 1407 Caspase-3 interacted genes. Among the 36 genes common between both lists (Figure 5B), no pathways were significantly enriched (Figure 5C), suggesting that the mechanism underlying down-regulation was not due to a direct interaction of Caspase-3 with DNA. We then focused on genes present in enriched pathways of Figure 5A. Sixteen genes were represented in these down-regulated pathways: ARRB1, BIRC2, DHRS3, GPX2, IQGAP1, IRF1, MAP3K1, MAP3K11,

NQO1, PIK3CB, PKN1, PRKCD, RACGAP1, RIPK1, SMPD1, and ZYX (Figure 5D). Among these 16 genes, except RACGAP1 for which Caspase-3 interacted with an enhancer region of this gene, none was a target of Caspase-3 DNA binding activity (Figure 5E), suggesting that these down-regulations were probably due to an indirect mechanism. However, the analysis of these 15 genes without interaction with Caspase-3 showed that their expression was mainly under the control of 2 transcription factors: NFE2L2 and FOXA2, suggesting that a putative indirect mechanism explaining down-regulation of anti-apoptotic genes in Caspase-3 proficient cells might be an inhibition of NFE2L2 and FOXA2 (Figure 5F).

## **Discussion**

One of the hallmarks of cancer is resistance to apoptosis (34), suggesting that apoptosis induction in cancer cells is an important anti-cancer mechanism. Since a few years, some works tend to demonstrate that Caspases activation (6-8,35), and especially Caspase-3 (2,4,5,9,36-38), could have impact independently of apoptosis, that could even have inverse effects on cell death. In the present work, we showed that apoptosis-triggering Caspase-3 activation is responsible for transcriptional changes such as up-regulation and down-regulation of some genes compared to apoptosis in absence of Caspase-3. Among upregulated genes, we observed that some genes involved in angiogenesis, another hallmark of cancer, were significantly represented. This overexpression was correlated with an increased angiogenesis *in vivo*, such as VEGFA, the main driver of angiogenesis. This observation is in agreement with two previous studies, which showed that Caspase-3 activation was linked to angiogenesis induction in a hepatocyte model (39) and in a cancer model after treatment with ionizing radiations (5). Consequently, we decided to focus



on VEGFA expression as an illustration of Caspase-3 transcriptional activity. We showed that the induction of VEGFA exclusively due to cleaved Caspase-3 and not NF- $\kappa$ B (28) in our experimental conditions. Our observation could be explained by the proteolytic cleavage and therefore inhibition of NF- $\kappa$ B by cleaved Caspase-3 (40), contrary to the angiogenesis stimulated by Caspase-8 in glioblastoma that is due to NF- $\kappa$ B activation (41).

Our results also contradict the hypotheses that the induction of angiogenesis by Caspase-3 requires the activating proteolytic cleavage of PKC $\delta$  by Caspase-3 (29), or AKT activation (5,29). Our results could be in accordance with different studies. Indeed, PKC $\delta$  was shown to induce stabilization of VEGFA translation without impacting its transcription (42). Moreover, AKT was described as a target of cleaved Caspase-3, inducing an abolishment of its activity (43,44). As once cleaved, Caspase-3 translocates into the nucleus, we wondered whether the induction of pro-angiogenic genes could be due to an unexpected transcriptional function of cleaved Caspase-3. After its proteolytic activation, Caspase-3 migrates to the nucleus and directly interacts with DNA, especially in regions containing pro-angiogenic genes, to induce transcription. This interaction needs the 15-amino acid motif "AYSTAPGYYSWRNSK" and the formation of the tertiary structure between small and large subunits of Caspase-3. Nevertheless, the proteolytic activity of Caspase-3 is not necessary for its transcriptional activity, as the overexpression of the inactive C163A Caspase-3 isoform was able to induce VEGFA expression to the same extent as wild type Caspase-3. We demonstrate that cleaved Caspase-3 translocates into the nucleus for a function other than its canonical proteolytic activity. Moreover, we confirmed a link between Caspase-3 activation and angiogenesis in breast tumors. Almost 75% of breast tumors presenting an increase in CD31 after chemotherapy also

showed an increase in Caspase-3 activation. Besides, increased angiogenesis could be related to a worse relapse-free survival in breast tumors. In addition to its role in the induction of angiogenesis, VEGFA is also described as an inducer of resistance in cancer cells (45). Recently, VEGFA (46) and Caspase-3 (47) were associated with the development of fibrosis in pancreatic cancer, a marker of resistance to chemotherapeutic treatment (48). VEGFA has also been associated with an increased infiltration of immunosuppressive cells, MDSC, in ovarian cancer, resulting in local immunity inhibition and a poor prognosis (49). In parallel with the direct upregulation of genes, Caspase-3 was also able to induce down-regulation of other genes, some involved in pro-apoptotic pathways. This down-regulation was not due to a direct interaction with promoters but possibly through the inhibition of NFE2L2 and FOXA2. At the transcriptional level, FOXA2 was not detected in our RNAseq analysis whereas NFE2L2 was. The inhibition of NFE2L2 could be due to its cleavage by cleaved Caspase-3 as described in HeLa cells during TNF $\alpha$ -mediated apoptosis (50). This double effect of Caspase-3 activation (up-regulation of pro-angiogenic genes and down-regulation of pro-apoptotic genes) could explain the observation showing that Caspase-3 inhibition improved chemotherapy efficacy. Consequently Caspase-3 can be a new therapeutic target. Moreover, this double effect could explain with Caspase-3 targeting could prevent tumor growth in mice but also tumor development in genetically predisposed mice, suggesting that Caspase-3 inhibition could be a prophylactic treatment for patients with a familial risk of cancer. The therapeutic use of Caspase-3 inhibitors could be rapidly tested in clinics as a feasibility study was performed for the use of Caspase-3 inhibitors in Pemphigus vulgaris (51), and a randomized clinical trial of emricasan, a pan-Caspase inhibitor, was performed in subjects with non-alcoholic fatty liver disease (52).

Our data indicate that Caspase-3 could be a therapeutic target to enhance the efficacy of chemotherapy. In contrast, in other medical domains such as neurodegenerative diseases or ischemic disorders of heart or brain, our data could encourage the development of Caspase-3-protective treatments. Indeed, in cases of myocardial infarction, Caspase-3 is rapidly cleaved (53), resulting in a putative induction of pro-angiogenic genes and decrease of pro-apoptotic genes, which could protect cardiac muscle (54,55). In a previous study, we showed that the inhibition of Caspase-6 blocked apoptosis without blocking Caspase-3 activation (12). In these conditions, we could speculate that the inhibition of Caspase-6 could block the deleterious impact of apoptosis on heart cells without affecting the benefit of Caspase-3 activation on the production of other pro-angiogenic factors. A similar rationale could be applied to ischemic stroke, in which cleaved Caspase-3 is essential for neuroprotection (56) and an increase in VEGFA is neuroprotective (57). Finally, VEGF stimulates neural stem cells proliferation after cerebral ischemia and could enable neurodegenerative disorders treatment (58-60).

Our study highlights unexpected functions of Caspase-3 in cells. Indeed, we showed that cleaved Caspase-3 is able to interact with DNA and more specifically with promoters of pro-angiogenic genes. This interaction induces transcription of these genes and leads to neoangiogenesis (Figure 5G). In parallel, activation of Caspase-3 induced, by an indirect mechanism, down-regulation of genes involved in pro-apoptotic pathways. These observations could explain why the activation of Caspase-3 is required for tumorigenesis and is a factor of resistance to cytotoxic drugs. (Figure 5G). Finally, we identified cleaved Caspase-3 as a new therapeutic target in cancer as its inhibition sensitizes cells to chemotherapy drugs and decreases the development of tumors in genetically predisposed mice.

## **Declarations**

## **Acknowledgments**

We thank Pr. Christophe Borg and Pr. Olivier Adotevi for supplying oxaliplatin sensitive and resistant clones of Colo-205 and HT-29 cell lines. We thank Dr Alexia Cotte for her critical read of the manuscript. We thank Isabel Gregoire for manuscript editing.

## ReferencesUncategorized References

1. Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *The Journal of biological chemistry* **2005**;280(2):857-60 doi 10.1074/jbc.C400538200.
2. Huang Q, Li F, Liu X, Li W, Shi W, Liu FF, *et al.* Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. *Nature medicine* **2011**;17(7):860-6 doi 10.1038/nm.2385.
3. Cheng J, Tian L, Ma J, Gong Y, Zhang Z, Chen Z, *et al.* Dying tumor cells stimulate proliferation of living tumor cells via caspase-dependent protein kinase Cdelta activation in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Molecular oncology* **2015**;9(1):105-14 doi 10.1016/j.molonc.2014.07.024.
4. Donato AL, Huang Q, Liu X, Li F, Zimmerman MA, Li CY. Caspase 3 promotes surviving melanoma tumor cell growth after cytotoxic therapy. *The Journal of investigative dermatology* **2014**;134(6):1686-92 doi 10.1038/jid.2014.18.
5. Feng X, Tian L, Zhang Z, Yu Y, Cheng J, Gong Y, *et al.* Caspase 3 in dying tumor cells mediates post-irradiation angiogenesis. *Oncotarget* **2015**;6(32):32353-67 doi 10.18632/oncotarget.5898.
6. Boege Y, Malehmir M, Healy ME, Bettermann K, Lorentzen A, Vucur M, *et al.* A Dual Role of Caspase-8 in Triggering and Sensing Proliferation-Associated DNA Damage, a Key Determinant of Liver Cancer Development. *Cancer Cell* **2017**;32(3):342-59 e10 doi 10.1016/j.ccell.2017.08.010.
7. Mukherjee A, Williams DW. More alive than dead: non-apoptotic roles for caspases in neuronal development, plasticity and disease. *Cell death and differentiation* **2017**;24(8):1411-21 doi 10.1038/cdd.2017.64.
8. Gorelick-Ashkenazi A, Weiss R, Sapozhnikov L, Florentin A, Tarayrah-Ibraheim L, Dweik D, *et al.* Caspases maintain tissue integrity by an apoptosis-independent inhibition of cell migration and invasion. *Nat Commun* **2018**;9(1):2806 doi 10.1038/s41467-018-05204-6.
9. Yosefzon Y, Soteriou D, Feldman A, Kostic L, Koren E, Brown S, *et al.* Caspase-3 Regulates YAP-Dependent Cell Proliferation and Organ Size. *Mol Cell* **2018**;70(4):573-87 e4 doi 10.1016/j.molcel.2018.04.019.
10. Vegran F, Berger H, Boidot R, Mignot G, Bruchard M, Dosset M, *et al.* The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nature immunology* **2014**;15(8):758-66 doi 10.1038/ni.2925.
11. Bruchard M, Rebe C, Derangere V, Togbe D, Ryffel B, Boidot R, *et al.* The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nature immunology* **2015**;16(8):859-70 doi 10.1038/ni.3202.
12. Vegran F, Mary R, Gibeaud A, Mirjolet C, Collin B, Oudot A, *et al.* Survivin-3B potentiates immune escape in cancer but also inhibits the toxicity of cancer chemotherapy. *Cancer research* **2013**;73(17):5391-401 doi 10.1158/0008-5472.CAN-13-0036.
13. Pollock PM, Cohen-Solal K, Sood R, Namkoong J, Martino JJ, Koganti A, *et al.* Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nature genetics* **2003**;34(1):108-12 doi 10.1038/ng1148.
14. Hirakata T, Yanagita Y, Fujisawa T, Fujii T, Kinoshita T, Horikoshi H, *et al.* Early predictive value of non-response to docetaxel in neoadjuvant chemotherapy in breast cancer using 18F-FDG-PET. *Anticancer Res* **2014**;34(1):221-6.
15. Coudert B, Pierga JY, Mouret-Reynier MA, Kerrou K, Ferrero JM, Petit T, *et al.* Use of [(18)F]-FDG PET to predict response to neoadjuvant trastuzumab and

- docetaxel in patients with HER2-positive breast cancer, and addition of bevacizumab to neoadjuvant trastuzumab and docetaxel in [(18)F]-FDG PET-predicted non-responders (AVATAXHER): an open-label, randomised phase 2 trial. *Lancet Oncol* **2014**;15(13):1493-502 doi 10.1016/S1470-2045(14)70475-9.
16. Kaira K, Oriuchi N, Shimizu K, Ishikita T, Higuchi T, Imai H, *et al.* Correlation of angiogenesis with 18F-FMT and 18F-FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Cancer science* **2009**;100(4):753-8 doi 10.1111/j.1349-7006.2008.01077.x.
  17. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, *et al.* Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* **2013**;14:128 doi 10.1186/1471-2105-14-128.
  18. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, *et al.* Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic acids research* **2016**;44(W1):W90-7 doi 10.1093/nar/gkw377.
  19. Chen H, Liu D, Yang Z, Sun L, Deng Q, Yang S, *et al.* Adrenergic signaling promotes angiogenesis through endothelial cell-tumor cell crosstalk. *Endocr Relat Cancer* **2014**;21(5):783-95 doi 10.1530/ERC-14-0236.
  20. Cattaneo MG, Chini B, Vicentini LM. Oxytocin stimulates migration and invasion in human endothelial cells. *Br J Pharmacol* **2008**;153(4):728-36 doi 10.1038/sj.bjp.0707609.
  21. Cattaneo MG, Lucci G, Vicentini LM. Oxytocin stimulates in vitro angiogenesis via a Pyk-2/Src-dependent mechanism. *Experimental cell research* **2009**;315(18):3210-9 doi 10.1016/j.yexcr.2009.06.022.
  22. Zhu J, Wang H, Zhang X, Xie Y. Regulation of angiogenic behaviors by oxytocin receptor through Gli1-induced transcription of HIF-1alpha in human umbilical vein endothelial cells. *Biomed Pharmacother* **2017**;90:928-34 doi 10.1016/j.biopha.2017.04.021.
  23. Hoffmann S, Hofbauer LC, Scharrenbach V, Wunderlich A, Hassan I, Lingelbach S, *et al.* Thyrotropin (TSH)-induced production of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cells in vitro: evaluation of TSH signal transduction and of angiogenesis-stimulating growth factors. *J Clin Endocrinol Metab* **2004**;89(12):6139-45 doi 10.1210/jc.2004-1260.
  24. de la Torre E, Davel L, Jasnis MA, Gotoh T, de Lustig ES, Sales ME. Muscarinic receptors participation in angiogenic response induced by macrophages from mammary adenocarcinoma-bearing mice. *Breast Cancer Res* **2005**;7(3):R345-52 doi 10.1186/bcr1005.
  25. Rajashekhar G, Kamocka M, Marin A, Suckow MA, Wolter WR, Badve S, *et al.* Pro-inflammatory angiogenesis is mediated by p38 MAP kinase. *J Cell Physiol* **2011**;226(3):800-8 doi 10.1002/jcp.22404.
  26. Machida T, Iizuka K, Hirafuji M. 5-hydroxytryptamine and its receptors in systemic vascular walls. *Biol Pharm Bull* **2013**;36(9):1416-9.
  27. Raica M, Cimpian AM. Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)/PDGF Receptors (PDGFR) Axis as Target for Antitumor and Antiangiogenic Therapy. *Pharmaceuticals (Basel)* **2010**;3(3):572-99 doi 10.3390/ph3030572.
  28. Shibata A, Nagaya T, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H. Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **2002**;73(3):237-43.
  29. Cheng J, He S, Wang M, Zhou L, Zhang Z, Feng X, *et al.* The Caspase-3/PKCdelta/Akt/VEGF-A Signaling Pathway Mediates Tumor Repopulation during Radiotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2019**;25(12):3732-43 doi 10.1158/1078-0432.CCR-18-3001.

30. Jelinek M, Balusikova K, Schmiedlova M, Nemcova-Furstova V, Sramek J, Stancikova J, *et al.* The role of individual caspases in cell death induction by taxanes in breast cancer cells. *Cancer cell international* **2015**;15(1):8 doi 10.1186/s12935-015-0155-7.
31. Luo M, Lu Z, Sun H, Yuan K, Zhang Q, Meng S, *et al.* Nuclear entry of active caspase-3 is facilitated by its p3-recognition-based specific cleavage activity. *Cell research* **2010**;20(2):211-22 doi 10.1038/cr.2010.9.
32. Tawa P, Hell K, Giroux A, Grimm E, Han Y, Nicholson DW, *et al.* Catalytic activity of caspase-3 is required for its degradation: stabilization of the active complex by synthetic inhibitors. *Cell death and differentiation* **2004**;11(4):439-47 doi 10.1038/sj.cdd.4401360.
33. Wang L, Brown SJ. BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. *Nucleic acids research* **2006**;34(Web Server issue):W243-8 doi 10.1093/nar/gkl298.
34. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**;144(5):646-74 doi 10.1016/j.cell.2011.02.013.
35. Nakajima YI, Kuranaga E. Caspase-dependent non-apoptotic processes in development. *Cell death and differentiation* **2017**;24(8):1422-30 doi 10.1038/cdd.2017.36.
36. Kim JS, Ha JY, Yang SJ, Son JH. A Novel Non-Apoptotic Role of Procaspase-3 in the Regulation of Mitochondrial Biogenesis Activators. *J Cell Biochem* **2018**;119(1):347-57 doi 10.1002/jcb.26186.
37. Yosefzon Y, Fuchs Y. Exiting the dark side: A vital role for Caspase-3 in Yap signaling. *Mol Cell Oncol* **2018**;5(4):e1494947 doi 10.1080/23723556.2018.1494947.
38. Feng X, Yu Y, He S, Cheng J, Gong Y, Zhang Z, *et al.* Dying glioma cells establish a proangiogenic microenvironment through a caspase 3 dependent mechanism. *Cancer letters* **2017**;385:12-20 doi 10.1016/j.canlet.2016.10.042.
39. Povero D, Eguchi A, Niesman IR, Andronikou N, de Mollerat du Jeu X, Mulya A, *et al.* Lipid-induced toxicity stimulates hepatocytes to release angiogenic microparticles that require Vanin-1 for uptake by endothelial cells. *Science signaling* **2013**;6(296):ra88 doi 10.1126/scisignal.2004512.
40. Kang KH, Lee KH, Kim MY, Choi KH. Caspase-3-mediated cleavage of the NF-kappa B subunit p65 at the NH2 terminus potentiates naphthoquinone analog-induced apoptosis. *The Journal of biological chemistry* **2001**;276(27):24638-44 doi 10.1074/jbc.M101291200.
41. Fianco G, Mongiardi MP, Levi A, De Luca T, Desideri M, Triscioglio D, *et al.* Caspase-8 contributes to angiogenesis and chemotherapy resistance in glioblastoma. *Elife* **2017**;6 doi 10.7554/eLife.22593.
42. Sataranatarajan K, Lee MJ, Mariappan MM, Feliers D. PKCdelta regulates the stimulation of vascular endothelial factor mRNA translation by angiotensin II through hnRNP K. *Cell Signal* **2008**;20(5):969-77 doi 10.1016/j.cellsig.2008.01.016.
43. Jahani-Asl A, Basak A, Tsang BK. Caspase-3-mediated cleavage of Akt: involvement of non-consensus sites and influence of phosphorylation. *FEBS Lett* **2007**;581(16):2883-8 doi 10.1016/j.febslet.2007.05.033.
44. Chu J, Lauretti E, Pratico D. Caspase-3-dependent cleavage of Akt modulates tau phosphorylation via GSK3beta kinase: implications for Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* **2017**;22(7):1002-8 doi 10.1038/mp.2016.214.
45. Ge YL, Zhang X, Zhang JY, Hou L, Tian RH. The mechanisms on apoptosis by inhibiting VEGF expression in human breast cancer cells. *International immunopharmacology* **2009**;9(4):389-95 doi 10.1016/j.intimp.2008.11.020.

46. Yang L, Kwon J, Popov Y, Gajdos GB, Ordog T, Brekken RA, *et al.* Vascular endothelial growth factor promotes fibrosis resolution and repair in mice. *Gastroenterology* **2014**;146(5):1339-50 e1 doi 10.1053/j.gastro.2014.01.061.
47. Laplante P, Sirois I, Raymond MA, Kokta V, Beliveau A, Prat A, *et al.* Caspase-3-mediated secretion of connective tissue growth factor by apoptotic endothelial cells promotes fibrosis. *Cell death and differentiation* **2010**;17(2):291-303 doi 10.1038/cdd.2009.124.
48. Erkan M, Reiser-Erkan C, Michalski CW, Kleeff J. Tumor microenvironment and progression of pancreatic cancer. *Experimental oncology* **2010**;32(3):128-31.
49. Horikawa N, Abiko K, Matsumura N, Hamanishi J, Baba T, Yamaguchi K, *et al.* Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Ovarian Cancer Inhibits Tumor Immunity through the Accumulation of Myeloid-Derived Suppressor Cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **2016** doi 10.1158/1078-0432.CCR-16-0387.
50. Ohtsubo T, Kamada S, Mikami T, Murakami H, Tsujimoto Y. Identification of NRF2, a member of the NF-E2 family of transcription factors, as a substrate for caspase-3(-like) proteases. *Cell death and differentiation* **1999**;6(9):865-72 doi 10.1038/sj.cdd.4400566.
51. Hariton WVJ, Galichet A, Vanden Berghe T, Overmiller AM, Mahoney MG, Declercq W, *et al.* Feasibility study for clinical application of caspase-3 inhibitors in Pemphigus vulgaris. *Exp Dermatol* **2017**;26(12):1274-7 doi 10.1111/exd.13458.
52. Shiffman M, Freilich B, Vuppalanchi R, Watt K, Chan JL, Spada A, *et al.* Randomised clinical trial: emricasan versus placebo significantly decreases ALT and caspase 3/7 activation in subjects with non-alcoholic fatty liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* **2019**;49(1):64-73 doi 10.1111/apt.15030.
53. Schwarz K, Simonis G, Yu X, Wiedemann S, Strasser RH. Apoptosis at a distance: remote activation of caspase-3 occurs early after myocardial infarction. *Molecular and cellular biochemistry* **2006**;281(1-2):45-54 doi 10.1007/s11010-006-0233-1.
54. Ai F, Chen M, Li W, Yang Y, Xu G, Gui F, *et al.* Danshen improves damaged cardiac angiogenesis and cardiac function induced by myocardial infarction by modulating HIF1alpha/VEGFA signaling pathway. *International journal of clinical and experimental medicine* **2015**;8(10):18311-8.
55. Ai F, Chen M, Yu B, Yang Y, Xu G, Gui F, *et al.* Puerarin accelerate scardiac angiogenesis and improves cardiac function of myocardial infarction by upregulating VEGFA, Ang-1 and Ang-2 in rats. *International journal of clinical and experimental medicine* **2015**;8(11):20821-8.
56. McLaughlin B, Hartnett KA, Erhardt JA, Legos JJ, White RF, Barone FC, *et al.* Caspase 3 activation is essential for neuroprotection in preconditioning. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2003**;100(2):715-20 doi 10.1073/pnas.0232966100.
57. Yang ZJ, Bao WL, Qiu MH, Zhang LM, Lu SD, Huang YL, *et al.* Role of vascular endothelial growth factor in neuronal DNA damage and repair in rat brain following a transient cerebral ischemia. *Journal of neuroscience research* **2002**;70(2):140-9 doi 10.1002/jnr.10380.
58. Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF at the neurovascular interface: therapeutic implications for motor neuron disease. *Biochimica et biophysica acta* **2006**;1762(11-12):1109-21 doi 10.1016/j.bbadis.2006.04.005.
59. Cariboni A, Davidson K, Dozio E, Memi F, Schwarz Q, Stossi F, *et al.* VEGF signalling controls GnRH neuron survival via NRP1 independently of KDR and blood vessels. *Development* **2011**;138(17):3723-33 doi 10.1242/dev.063362.



60. Vijayalakshmi K, Ostwal P, Sumitha R, Shruthi S, Varghese AM, Mishra P, *et al.* Role of VEGF and VEGFR2 Receptor in Reversal of ALS-CSF Induced Degeneration of NSC-34 Motor Neuron Cell Line. *Molecular neurobiology* **2015**;51(3):995-1007 doi 10.1007/s12035-014-8757-y.

## Figure Legends

**Figure 1: Activation of Caspase-3 stimulates angiogenesis.** **A.** Images of FDG uptake experiment in mice previously injected with MDA-MB-231 cells cultured with Z-FA-FMK control inhibitor and treated or not with docetaxel (10nM). **B.** Images of FDG uptake experiment in mice previously injected with MDA-MB-231 cells cultured with Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor and treated or not with docetaxel (10nM). **C.** Quantification of SUVmax calculated from analysis of FDG uptake. **D.** Tumor growth in nude BALB/c mice after subcutaneous injection of MDA-MB-231 cells pre-incubated with Z-FA-FMK control inhibitor or with Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor, followed by IP injection of docetaxel (10mg/kg) (n = 8 per group). **E.** Immunofluorescence staining analysis of OCT embedded tumors from mice previously injected with MDA-MB-231 cells cultured with Z-FA-FMK control inhibitor or with Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor and treated or not with docetaxel (10nM). CD31 vessels appear in red and nuclei in blue. **F.** Vessels quantification of **E** immunofluorescence staining. **G.** RT-PCR analysis of CD31 expression in **E** tumors. Data are presented as mean  $\pm$  SD. **H.** Cluster and ClueGO software analysis showing RNA sequencing data of human MDA-MB-231 injected into nude mice and treated or not with docetaxel (10nM) +/- the Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor. **I.** Number of nodes of HUVEC cells cultured or not with supernatant from MCF-7 Caspase-3 -/- or Caspase-3 +/+ cells.

**Figure 2: Activation of Caspase-3 induces VEGFA expression.** **A.** Venn diagram of an RNA sequencing analysis in Caspase-3 -/- and Caspase-3 +/+ MCF-7 cells 48 hours after docetaxel (10nM) treatment. **B.** Pathway activation analysis performed with the ClueGEO software from the 1200 genes upregulated only in treated Caspase-3-proficient MCF-7 cells. **C.** RT-PCR analysis of ANXA2, C1GALT1 and VEGFA expression

in Caspase-3  $-/-$  and  $+/+$  MCF-7 cells treated or not with docetaxel (10nM). **D.** RT-PCR analysis of VEGFA expression at 0h, 24h, 48h and 72h after the start of docetaxel treatment (10nM) in Caspase-3  $-/-$  and  $+/+$  MCF-7 cells. **E.** ELISA of VEGFA secretion after docetaxel treatment (10nM) in Caspase-3  $-/-$  and  $+/+$  MCF-7 cells. **F-L.** RT-PCR analysis of VEGFA mRNA expression from Caspase-3  $-/-$  and  $+/+$  MCF-7 cells treated or not with docetaxel (10nM) and transfected with control siRNA or siRNAs targeting NF $\kappa$ B (**F**), PKC $\delta$  (**G**), pro-caspase-3 (**H**), pro-caspase-6 (**J**), pro-caspase-7 (**K**), pro-caspase-8 and pro-caspase-9 (**L**), or treated with the AKT inhibitor Ipatasertinib (**I**) and corresponding immunoblot analysis testing the corresponding siRNA efficacy. **M.** RT-PCR analysis of VEGFA expression in HT-29 and Colo-205 cells sensitive or reinstated to Oxa and treated or not with Oxa. Data are presented as mean  $\pm$  SD.

**Figure 3: Cleaved Caspase-3 binds DNA on a specific binding site thanks to a DNA binding domain.** **A.** Immunoblot analysis of Caspase-3  $-/-$  and  $+/+$  MCF-7 cells at 0 and 72h after docetaxel (10 nM) treatment start, showing the sub-cellular distribution of cleaved Caspase-3, with  $\beta$ -Actin and PARP used as cytoplasmic and nuclear markers, respectively to assess the purity of the fractionation. **B.** Fluorescence microscopy in Caspase-3  $-/-$  MCF-7 cells transiently transfected with Pro-Caspase-3-GFP plasmid treated or not with docetaxel (10 nM). **C.** Distribution of Caspase-3 ChIP-seq peaks among various genome regions. **D.** Determination of Caspase-3-binding motifs by analysis of Caspase-3 ChIP-Seq peaks from MCF-7 Caspase-3  $+/+$  cells. Left, letter size indicates frequency of nucleotide. Right, significance of motif occurrence. **E.** Venn diagram showing the interaction between genes upregulated in Caspase-3-proficient MCF-7 cells and Caspase-3 interacting genes. **F-H.** Caspase-3-binding peaks identified by ChIP-seq on VEGFA (**F**), ANXA2 (**DG**), and C1GALT1 (**H**) promoters in Caspase-3  $-/-$

and +/+ MCF-7 cells treated or not with docetaxel (10nM). Asterisks represent interaction peaks between Caspase-3 and the promoter, and arrows represent gene orientation. Blue and green colors correspond to read 1 and read 2 during sequencing run. **I.** Firefly luciferase activity in 293T cells after transfection of luciferase reporter constructs for the VEGFA promoter with various combinations of Caspase-3-specific siRNA and docetaxel treatment (10nM), and immunoblot analysis testing transfection efficiency. **J.** RT-PCR analysis of VEGFA expression in Caspase-3 -/- MCF-7 cells treated or not with docetaxel (10nM) after transfection of plasmids encoding Caspase-3 or prodomain-truncated Caspase-3. **K.** RT-PCR analysis of VEGFA expression in Caspase-3 -/- or +/+ MCF-7 cells treated or not with docetaxel (10nM) after transfection of plasmids encoding Caspase-3 or Caspase-3 without the small subunit. **L.** Firefly luciferase activity in Caspase-3 -/- MCF-7 cells transfected with plasmid encoding either Pro-Caspase-3, or the small subunit truncated Caspase-3, or a DNA binding domain truncated Caspase-3, and then treated or not during 24 hours with docetaxel (10 nM). **M.** ChIP PCR analysis performed in Caspase-3 -/- MCF-7 cells transfected with plasmid encoding either Pro-Caspase-3, or the small subunit truncated Caspase-3, or a DNA binding domain truncated Caspase-3, and then treated or not during 24 hours with docetaxel (10 nM). Data are presented as mean  $\pm$  SD.

**Figure 4: Caspase-3 inhibition increases response to cytotoxic treatment. A.** Analysis of CD31 mRNA expression before and after neoadjuvant chemotherapy in 61 locally advanced breast tumors, and correlated data with relapse-free survival (RFS). **B.** Graph representing the number of tumors presenting Caspase-3 staining increase or decrease depending on CD31 expression variation (increase or decrease) after chemotherapeutic treatment. **C.** Tumor growth in BALB/c mice after subcutaneous injection of CT-26 cells followed by intraperitoneal (IP) injections of 5-fluorouracil

(50mg/kg) (FU) and irinotecan (40mg/kg) with or without injections of Caspase-3-specific siRNA into the tumor twice a week (n = 8 per group). **D.** Tumor growth in BALB/c mice after subcutaneous injection of CT-26 cells followed by IP injection of FU (50mg/kg) and irinotecan (40mg/kg) with weekly IP injection of Z-FA-FMK control inhibitor or of Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor (n = 8 per group). **E.** Tumor growth in BALB/c mice after subcutaneous injection of CT-26 cells followed by IP injection of FU (50mg/kg) and irinotecan (40mg/kg) with or without IP injection of anti-mouse VEGFA blocking antibody (one day after chemotherapy injection) (n = 8 per group). **F.** Tumor growth in BALB/c mice after subcutaneous injection of 4T1 cells followed by IP injection of docetaxel (10mg/kg) with weekly IP injection of Z-FA-FMK control inhibitor or with weekly IP injection of Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor (n = 8 per group). **G.** Tumor growth in BALB/c mice after subcutaneous injection of 4T1 cells followed by IP injection of docetaxel (10mg/kg) with or without IP injection of anti-mouse VEGFA blocking antibody (one day after chemotherapy injection) (n = 8 per group). **H.** Number of tail tumors on TG3 mice treated or not with weekly IP injection of Z-FA-FMK control inhibitor or Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor for 4 months. **I.** Correlation between immunohistochemistry analyses of Caspase-3 activation in 31 locally advanced breast tumors and RT-PCR analysis of VEGFA expression. Data are presented as mean  $\pm$  SD.

**Figure 5: Cleaved Caspase-3 could down-regulate anti-apoptotic genes.** **A.** RNA sequencing analysis of MCF-7 Caspase-3 +/+ downregulated genes with Enrichr NCI-Nature pathway database. **B.** Venn diagram of genes downregulated in Caspase-3 +/+ MCF-7 cells and Caspase-3 interacted genes. **C.** RNA sequencing analysis of the 36 genes in common in **B** with Enrichr NCI-Nature pathway database. **D.** Fold change of enriched genes in **A** showing RNA sequencing data of Caspase-3 +/+ and -/- MCF-7 cells. **E.** Venn diagram of **A** enriched genes in Caspase-3 +/+ MCF-7 cells and Caspase-3 interacted genes. **F.** RNA sequencing analysis Caspase-3 non-interacted

genes in MCF-7 Caspase-3 +/+ cells with Enrichr ENCODE and ChEA Consensus TFs from ChIP-X. **G.** Suggested model for Caspase-3 direct effects on pro-angiogenic genes and indirect effects on pro-apoptotic genes.

### **Supplementary methods**

**In vitro tube formation assay.** Cells were treated with 10 nM docetaxel for 24h. The medium was then replaced with fresh medium without docetaxel. Twenty-four hours later, the supernatant without docetaxel was used for in vitro tube formation assay with HUVEC cells. The formation of capillary-like endothelial tubes was determined by plating endothelial cells on growth factor-reduced Matrigel, as previously reported [1]. A picture of each well was taken at 0, 4, 6, 8, and 24h and the number of capillary nodes was counted.

**Pharmacological inhibition.** Pharmacological inhibition of Caspase-3 was achieved with Z-DEVD-FMK (BD Biosciences). Controls were performed with the Z-FA-FMK negative control for Caspase inhibitors (BD Biosciences) at same concentrations. For in vitro experiments, the inhibitors were used at 5  $\mu$ M. For in vivo experiments, the inhibitors were used at 2 mg/kg diluted in PBS and injected intraperitoneally twice a week. Pharmacological inhibition of AKT was performed with Ipatasertinib at 2  $\mu$ M.

**Reverse transcription, and quantitative real-time PCR.** Reverse transcription and q-PCR were performed as previously described previously[2]. The oligonucleotide sequences used were: mouse CD-31 (Fwd: CCTTCTGCTCTGTTCAAGCC, Rev: GGGTCAGGTTCTCCCATTT), human CD31 (Fwd: CCTTCTGCTCTGTTCAAGCC, Rev: GGGTCAGGTTCTCCCATTT), human ANXA2 (Fwd: TGAAACAGCCATCAAGACCA, Rev: TAGGCGAAGGCAATATCCTG), human C1GALT1 (Fwd: CTTTGTGCCAGAACACCATT, Rev: CAAGATCAGAGCAGCAACCA), mouse VEGFA (Fwd: GCTTCCTACAGCACAGCAGA , Rev: AATGCTTCTCCGCTCTGAA), human VEGFA (Fwd: CTACCTCCACCATGCCAAGT, Rev: AGCTGCGCTGATAGACATCC), human VEGFB (Fwd: GAGCTCAACCCAGACACCTG , Rev: GTGAAGCAGGGCCATAAAAG), human VEGFC (Fwd: CGGACTCGACCTCTCGG, Rev: TGGACACAGACCGTAACTGC), mouse  $\beta$ -actin (Fwd:

ATGGAGGGGAATACAGCCC, Rev: TTCTTGCAGCTCCTTCGTT), human  $\beta$ -actin (Hs99999903\_m1). 2

**PET imaging.** Overnight fasted mice were placed in an anesthesia induction chamber (4% isoflurane) and then on a heating plate and maintained under anesthesia (2% isoflurane). The lateral tail vein was then catheterized under microscope to allow subsequent FDG injection. A PE10 catheter was fitted with a microinjection port with a low dead volume (8  $\mu$ L). The mice were then maintained under anesthesia and placed on the heated imaging bed inside the BioPET/CT. The end of the Catheter was then linked to a syringe containing 15-20 MBq of  $^{18}$ F-FDG.  $^{18}$ F-FDG was infused and immediately followed by a saline injection to clear any trace of FDG from the catheter. The mice were maintained under anesthesia for 30min after the end of  $^{18}$ F-FDG injection before an emission scan to evaluate tumor metabolism after  $^{18}$ F-FDG uptake (30min static acquisition, tumor-centered, 250-700 keV).

**ELISA.** Cell culture supernatants were assayed by ELISA for human VEGFA (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol.

**Western blot analysis.** Western blot analyses were conducted as described previously [2] with the following primary antibodies: Cleaved Caspase-3, Cleaved Caspase-7, Cleaved Caspase-8, Cleaved Caspase-9, Pro-caspase-3, Pro-caspase-6, Pro-caspase-7, NF $\kappa$ B, PKC $\alpha$ , PARP,  $\beta$ -Actin, HSC70.

**Fluorescence microscopy.** Caspase-3  $-/-$  MCF-7 cells were transiently transfected with procaspase-3-GFP plasmid for 48 h. Then, cells were treated or not with docetaxel (10nM) for 24h. Medium containing docetaxel was replaced by fresh docetaxel free medium during 24 hours then cells were scanned in phase contrast with a GFP filter under UV light.

**siRNA transfection.** For transfection experiments, cells were transfected with 2 different siRNA specific for human NF- $\kappa$ B (GGATCCTTCTTTGACTCAT and CCACCTTCATTCTCAACTT), PKC $\alpha$  (GCAAGAAGAACAATGGCAA and GCATGAATGTGCACCATAA), Pro-caspase-3 (GGGAAACATTCAGAACTT and GCACCTGGTTATTATTCTT), Pro-caspase-6 (GCAGATAGAGACAATCTTA and GCGAAGGCAATCACATTA), Pro-caspase-7 (GCCCATCAATGACACAGAT and GGA ACTCTACTTCAGTCAA), Pro-caspase-8 (GGAGATGGAAAGGGAACTT and 3 GGAGAAAGTGCCCAA ACTT), Pro-caspase-9 (GCTTCGTTTCTGCGAACTA and

GCCACTGCCTCATTATCAA), with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's protocol. Graphs represent the mean of the 2 siRNA experiments.

**Clustering.** Unsupervised hierarchical clustering of samples was performed with Gene Cluster 3.0 software and was viewed with the Treeview viewer. Values were normalized and mean centered. Hierarchical clustering was performed by measuring Euclidean distances and complete linkage analysis.

**Luciferase transactivation assay.** The VEGFA-luc construct was obtained by inserting fragments of the promoter of human VEGFA into the multicloning site of the pGL3 basic vector. Fragments were amplified by high-fidelity PCR with specific primers and genomic DNA from MCF-7 as a template. Human 293T cells (cultured at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> in DMEM containing 4.5 g/l glutamine and FBS) were transiently transfected for 48h with reporter plasmids and anti-Procapase-3 siRNA with Lipofectamine 2000. Twenty-four hours later, cells were treated or not with docetaxel (10nM) for 24h. Then, medium containing docetaxel was replaced by fresh docetaxel free medium and, 24h later, luciferase was measured with the Dual Glo Luciferase Assay System according to the manufacturer's instructions. Dual Glo Luciferase Reagent was added to the cells. After 10min of incubation, firefly luciferase activity was measured with a Wallac 1440 Victor2 luminometer. Reactions were stopped by adding Dual-Glo Stop and Glo Reagent and renilla luciferase activity was then measured.

**Transfections.** The full-length of Caspase-3-coding plasmid was previously generated [3]. Caspase-3 mutants without a pro-domain or without a DNA binding domain were generated with GeneTailor Site-Directed Mutagenesis System by following the manufacturer's instructions. The induced mutations were checked by Sanger sequencing. The plasmid coding the loss-of-function mutated Caspase-3 pcDNA3-Casp3 C163A-myc was a gift from Guy Salvesen (Addgene plasmid # 11814) [4]. 4

**Immunohistochemistry.** MDA-MB-231 tumors were cryosliced and sections were probed with a rat monoclonal antibody against CD31 followed by a secondary antibody coupled to an Alexa Fluor-568 as previously described [5]. Number of vessels per picture was determined by 2 different persons. Three pictures were analyzed for each tumor. For patients, Caspase-3 staining was performed on FFPE tumors at diagnosis and at surgery after neoadjuvant chemotherapy. The percentage of



nuclear staining was quantified by 2 pathologists. Differences in staining between tumors before and after chemotherapy were qualified as increase or decrease.

**Bioinformatics analysis.** BindN web-based tool was used for prediction of the putative DNA binding domain [6].

**Patients.** We studied the expression of human VEGFA and CD31 transcripts by quantitative real-time PCR in 61 tumors from patients treated with neoadjuvant chemotherapy. All samples were treated as described previously [7].

**Cytotoxic assay.** For cytotoxic tests, 2,500 cells were cultured for 0, 24, 48, and 72h with 10 nM docetaxel. The medium was then replaced with fresh docetaxel-free medium and cells were cultured for 48h. At the end of these experiments, cells still attached were stained with 0.5% crystal violet solution. After washing the cells, the crystal violet was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) and read with a spectrophotometer at 590 nm. Cell viability was determined by cytometry using the Annexin V PE and 7-aminoactinomycin D (7AAD) staining from BD Biosciences according to the manufacturer's instructions.

## **Declarations**

### **Ethics approval and consent to participate**

The study on patient samples was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the ethics committee of the Centre Georges-François Leclerc (Dijon, France), the Comité Consultatif de Protection des Personnes en Recherche Biomédicale de Bourgogne. Written informed consent was obtained from all patients before enrollment.

All the mice were maintained in specific pathogen-free conditions and all experiments followed the guidelines of the Federation of European Animal Science Associations. All animal experiments were approved by the Ethics Committee of Université de Bourgogne (Dijon, France).

## References

1. Daneau G, Boidot R, Martinive P, *et al.* Identification of cyclooxygenase-2 as a major actor of the transcriptomic adaptation of endothelial and tumor cells to cyclic hypoxia: effect on angiogenesis and metastases. *Clin Cancer Res* **2010**;16(2):410-9.
2. Vegran F, Boidot R, Oudin C, *et al.* Association of p53 gene alterations with the expression of antiapoptotic survivin splice variants in breast cancer. *Oncogene* **2007**;26(2):290-7.
3. Vegran F, Boidot R, Oudin C, *et al.* Overexpression of caspase-3s splice variant in locally advanced breast carcinoma is associated with poor response to neoadjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* **2006**;12(19):5794-800.
4. Stennicke HR, Salvesen GS. Biochemical characteristics of caspases-3, -6, -7, and -8. *J Biol Chem* **1997**;272(41):25719-23.
5. Vegran F, Boidot R, Michiels C, *et al.* Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res* **2011**;71(7):2550-60.
6. Wang L, Brown SJ. BindN: a web-based tool for efficient prediction of DNA and RNA binding sites in amino acid sequences. *Nucleic Acids Res* **2006**;34(Web Server issue):W243-8.
7. Vegran F, Boidot R, Oudin C, *et al.* Distinct expression of Survivin splice variants in breast carcinomas. *Int J Oncol* **2005**;27(4):1151-7.

**Figure 1**

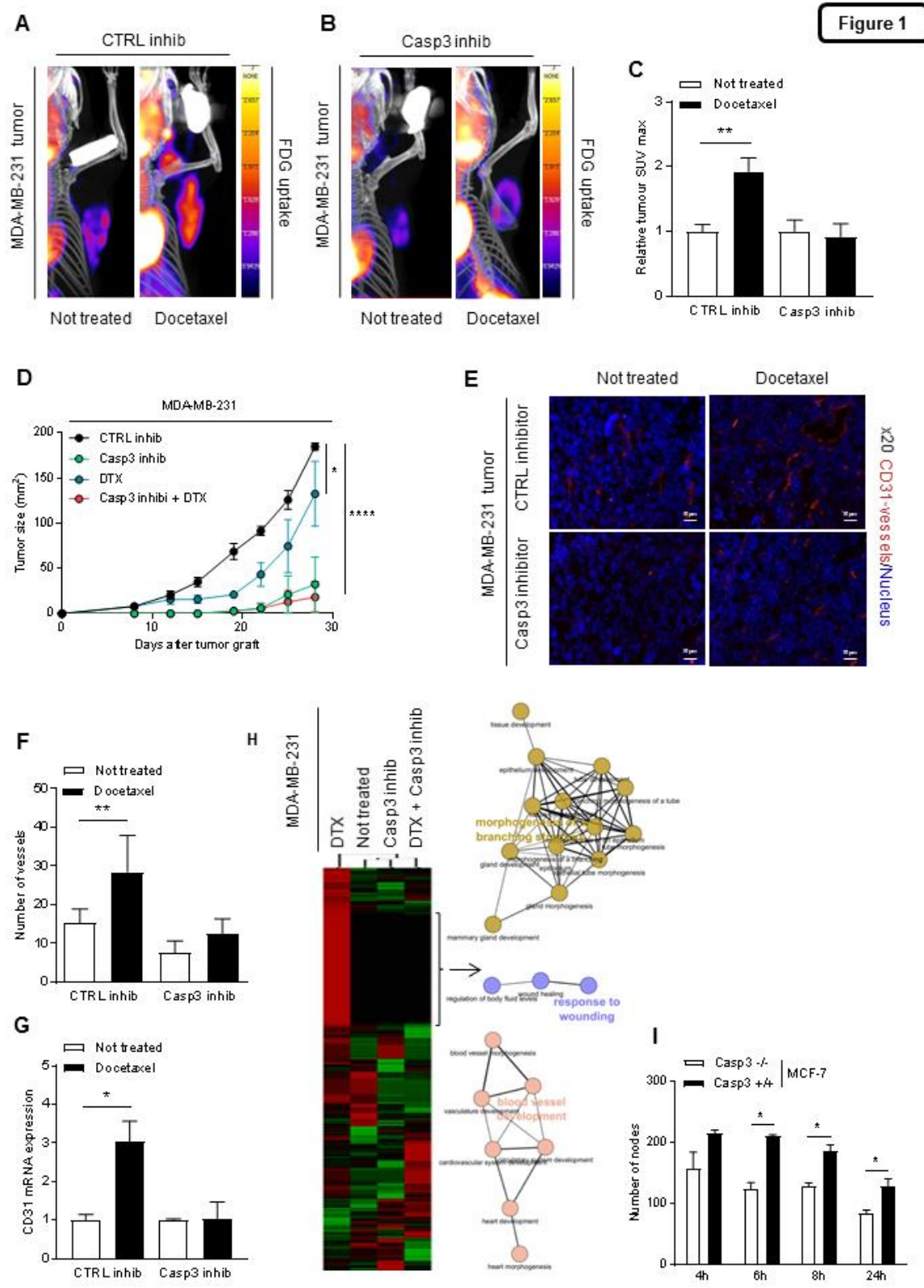
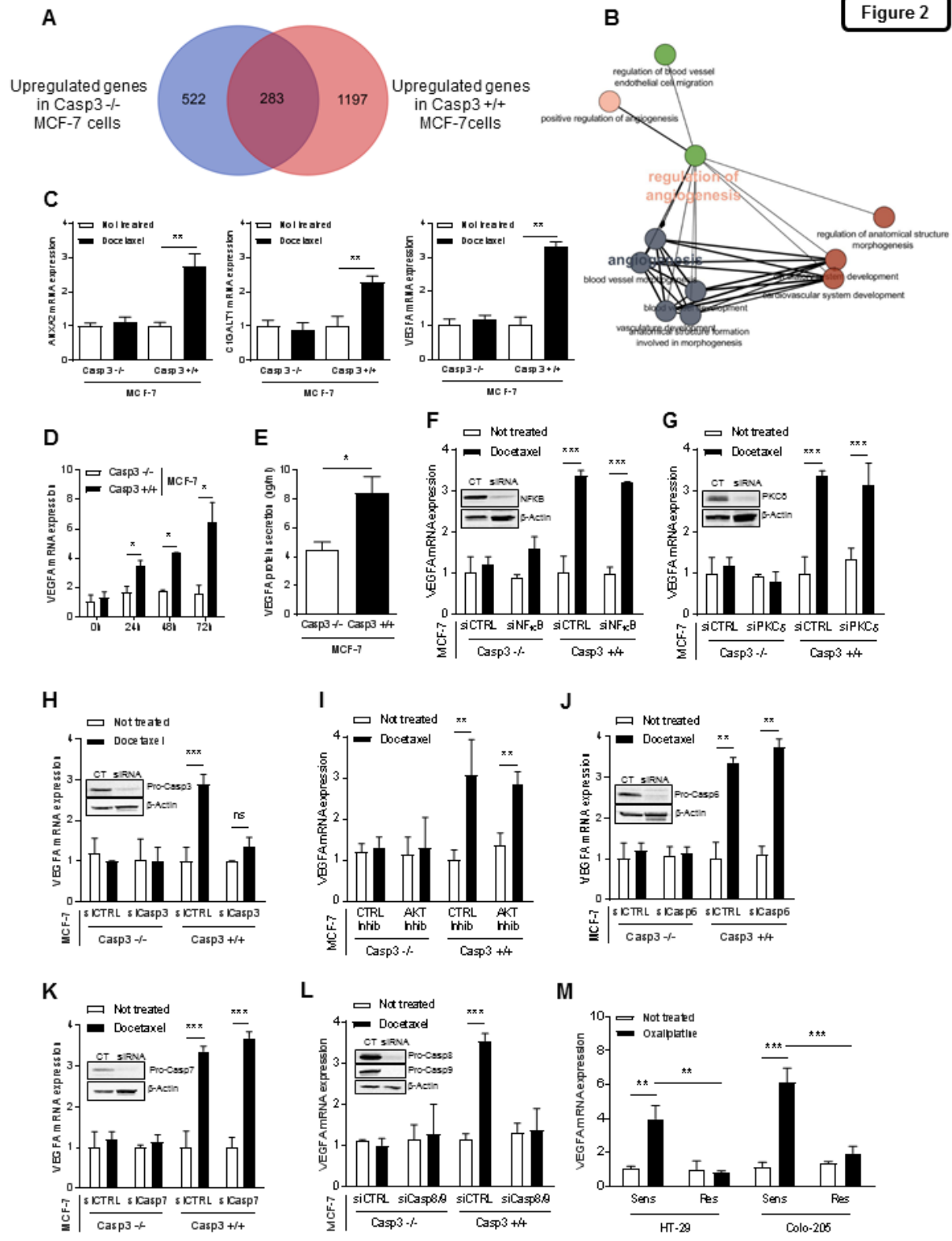


Figure 2



**Figure 3**

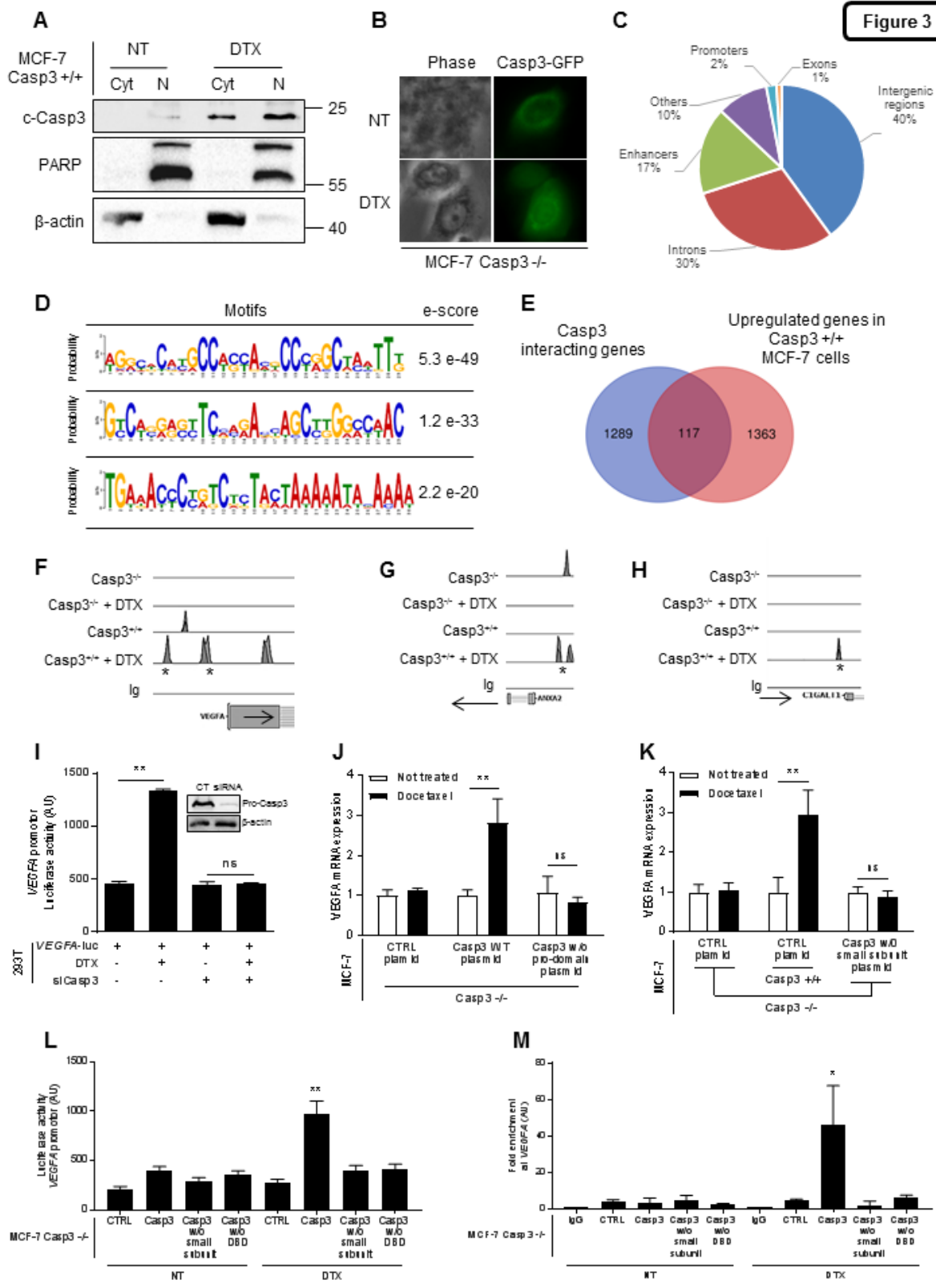


Figure 4

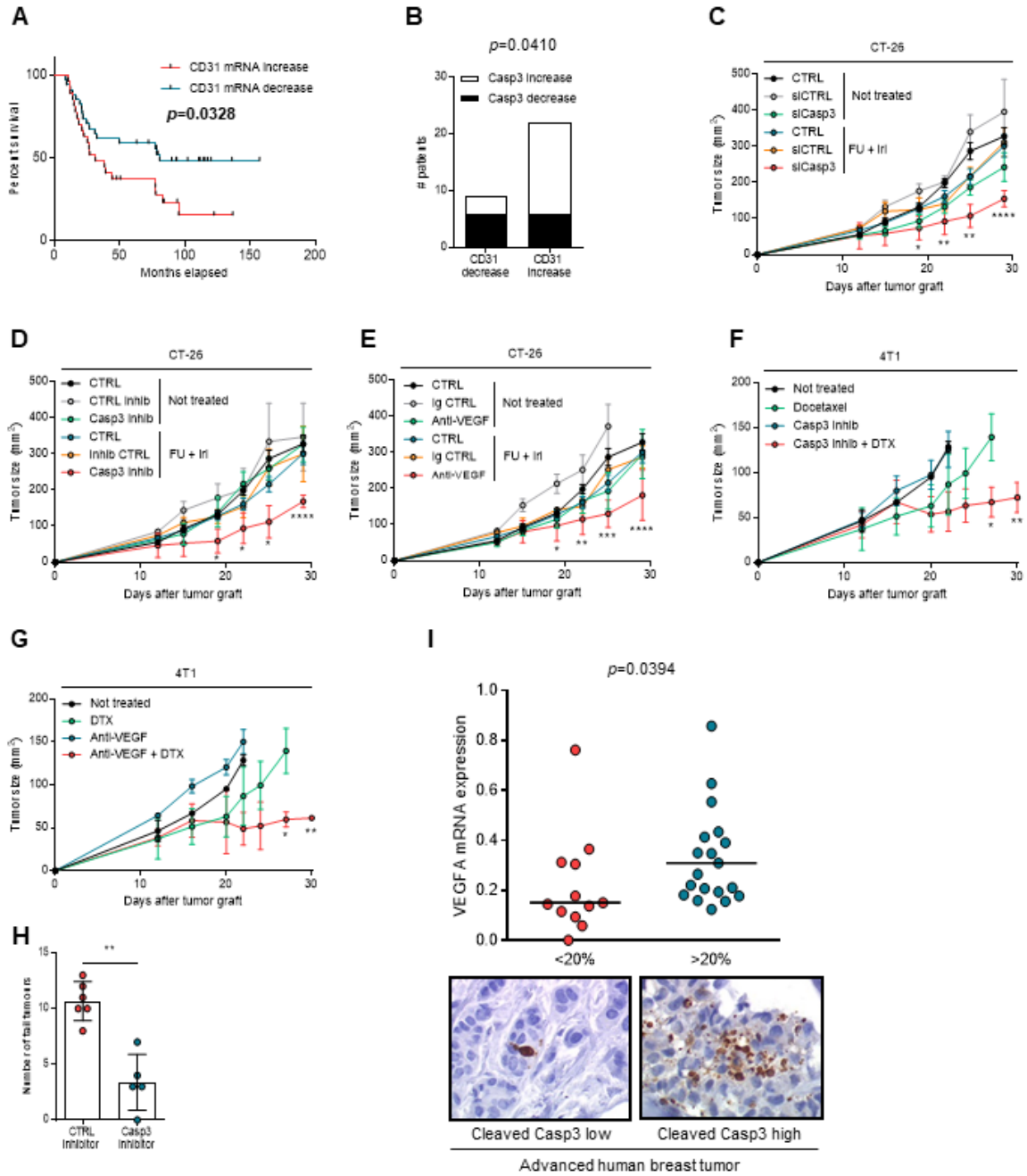
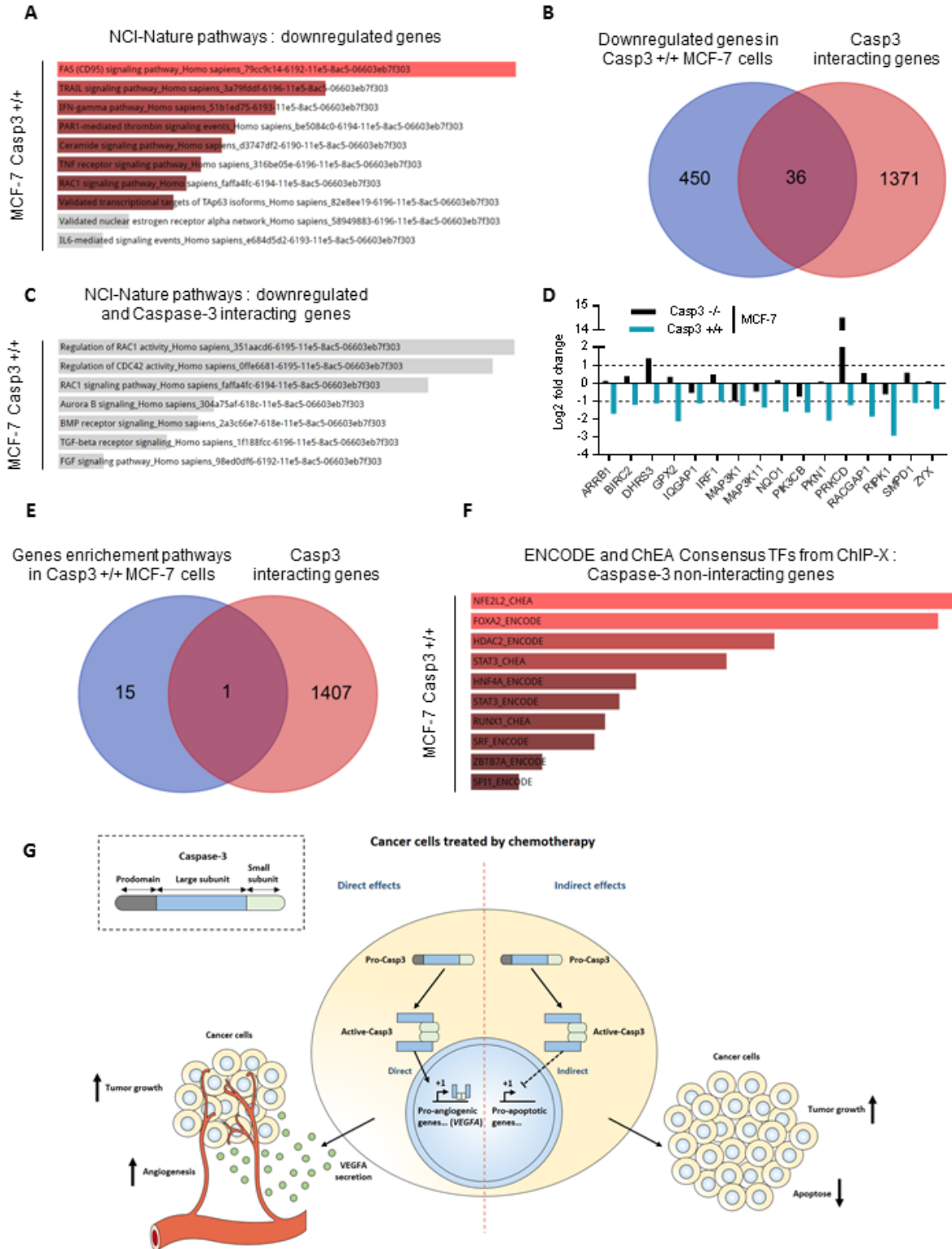
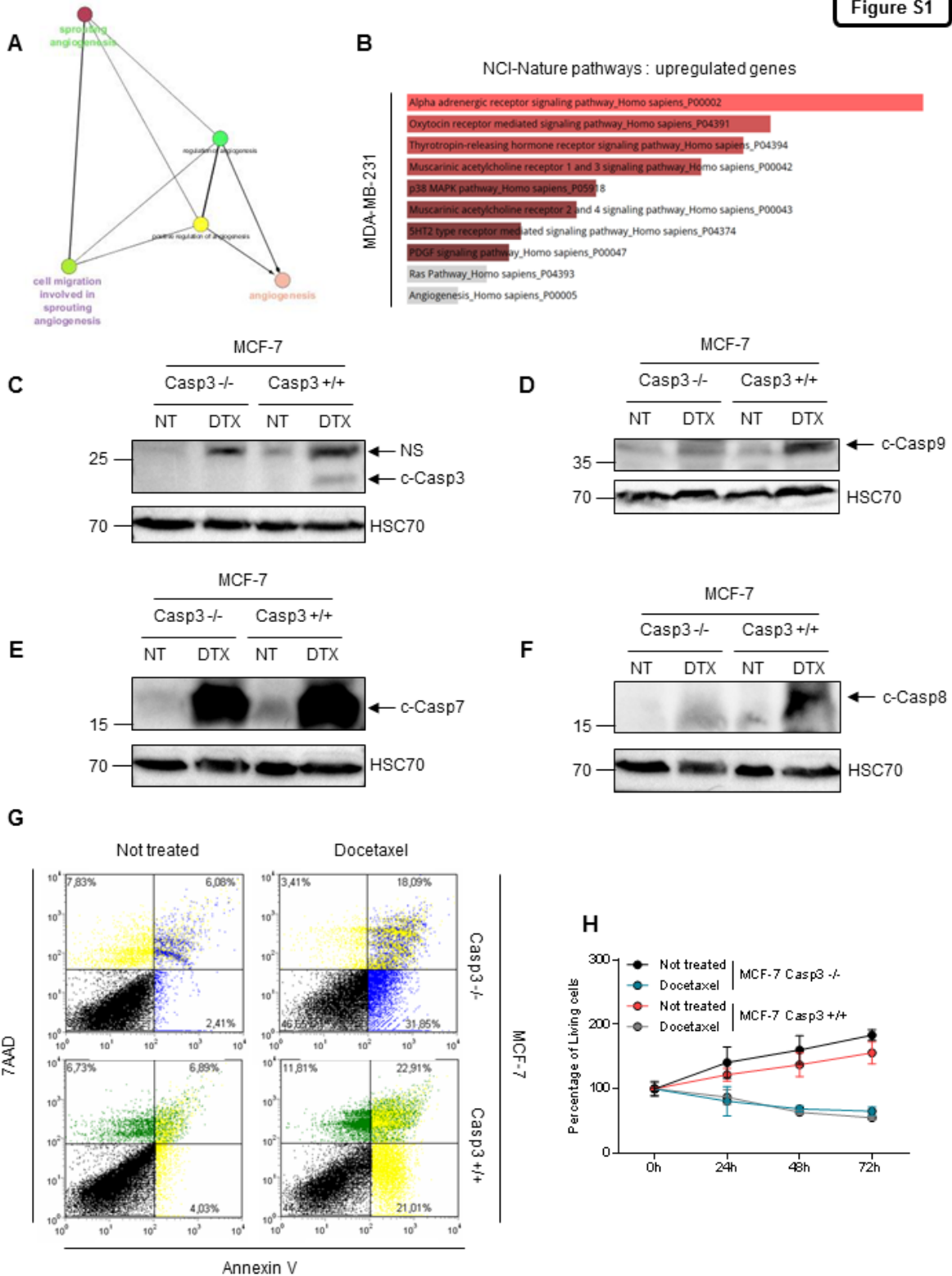


Figure 5



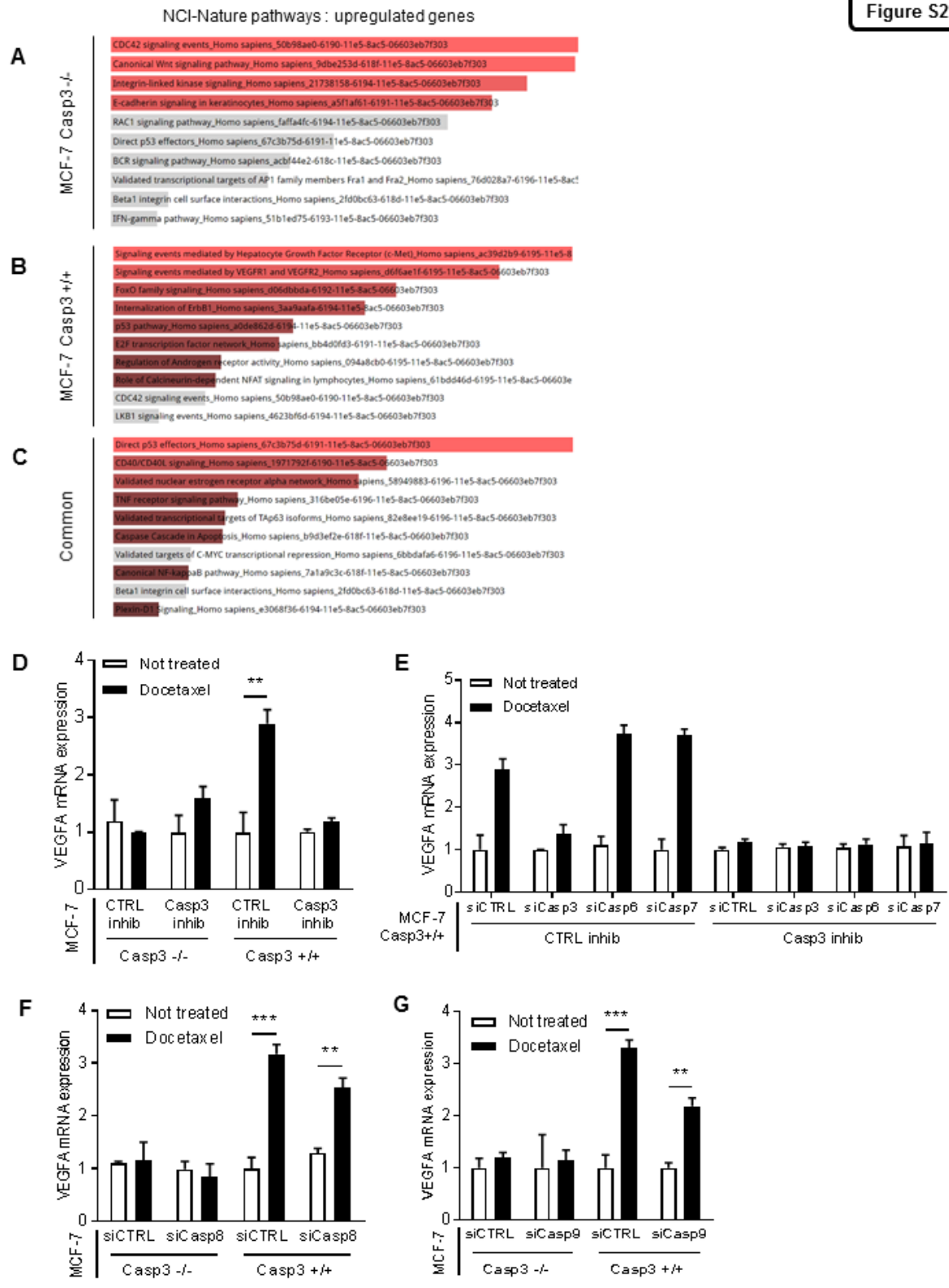
**Figure S1**





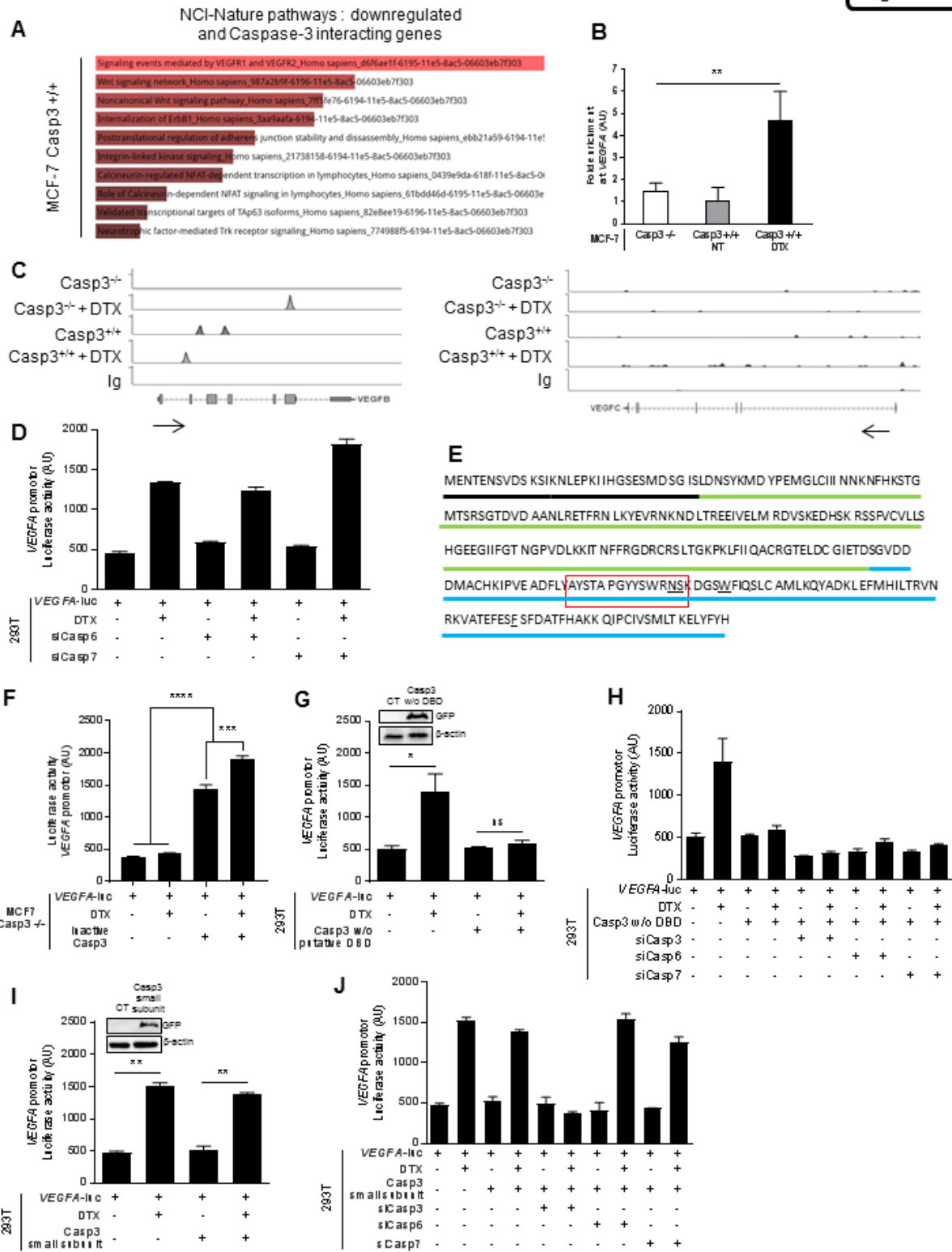
**Figure S1: A. *In vivo* treatment of MDA-MB-231 tumors with docetaxel induces angiogenic pathways.** ClueGEO software was used to analyze angiogenic pathways activation in MDA-MB-231 tumors treated with docetaxel. **B. *In vivo* treatment of MDA-MB-231 tumors with docetaxel induces angiogenic pathways.** RNA sequencing analysis of MDA-MB-231 tumors treated with docetaxel upregulated genes with Enrichr NCI-Nature pathway database. **C-F. *In vitro* treatment of Caspase-3 +/+ MCF-7 cells with docetaxel induces Caspase-3, Caspase-9 and Caspase-8 cleavage, and no differences on Caspase-7 cleavage.** Immunoblot analysis of cleaved Caspase-3 (C), cleaved Caspase-9 (D), Caspase-7 (E) and Caspase-8 in Caspase-3 -/- and +/+ MCF-7 cells at 0 and 72h after docetaxel (10 nM) treatment start. **G. No differences in apoptosis between Caspase-3 -/- or +/+ MCF-7 cells treated with docetaxel.** Annexin V/7AAD staining of Caspase-3 -/- or +/+ MCF-7 cells after 72 h of treatment with docetaxel (10 nM). **H. No cell growth differences between Caspase-3 -/- or +/+ MCF-7 cells treated with docetaxel.** Crystal violet staining of Caspase-3 -/- or +/+ MCF-7 cells after 0, 24, 48 and 72 h of treatment with docetaxel (10 nM). Data are presented as mean  $\pm$  SD.

Figure S2



**Figure S2: A-C. Caspase-3 +/+ MCF-7 cells treated with docetaxel have an enrichment in angiogenesis-related pathways.** RNA sequencing analysis with Enrichr NCI-Nature pathway database of upregulated genes of Caspase-3 -/- (**A**) or +/+ (**B**) MCF-7 cells treated during 24h with docetaxel (10 nM) and common upregulated genes (**C**). **D. Pharmacological inhibition of Caspase-3 blocks VEGFA expression.** RT-PCR analysis of VEGFA expression in Caspase-3 -/- or +/+ MCF-7 cells treated during 24h or not with docetaxel (10 nM) and with Z-FA-FMK control inhibitor or with Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor. **E. Testing Caspase-3 inhibitor specificity.** RT-PCR analysis of VEGFA expression in Caspase-3 +/+ MCF-7 cells treated during 24h or not with docetaxel (10 nM) and transfected with siRNAs targeting of Procaspase-3, Procaspase-6, or Procaspase-7 and treated with Z-FA-FMK control inhibitor or with Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor. **F-G. Extinction of Pro-caspase-8 or Pro-caspase-9 induces a slight decrease of VEGFA mRNA expression.** RT-PCR analysis of VEGFA expression in Caspase-3 -/- or +/+ MCF-7 cells treated during 24h or not with docetaxel (10 nM) and transfected with siRNAs targeting Procaspases-8 (**F**) and Procaspase-9 (**G**). Data are presented as mean  $\pm$  SD.

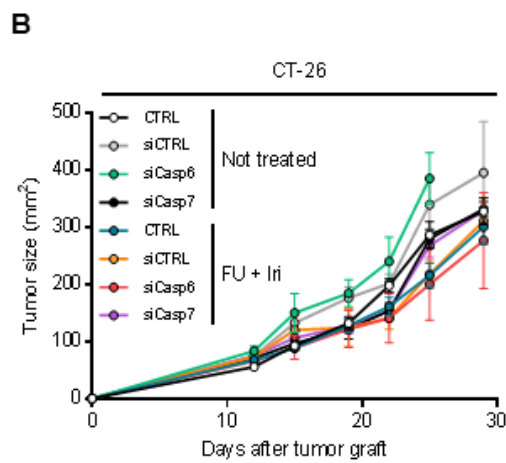
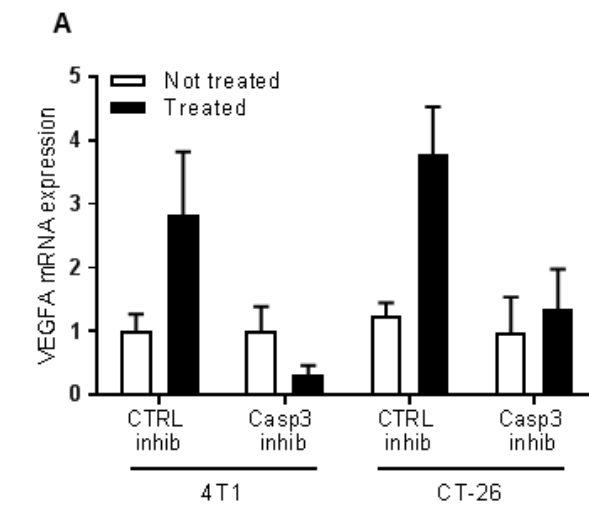
**Figure S3**



**Figure S3: A. Caspase-3 +/+ MCF-7 cells treated with docetaxel have an enrichment in angiogenesis-related pathways.** RNA sequencing analysis of Caspase-3 -/- (A) or +/+ (B) MCF-7 cells treated during 24h with docetaxel (10 nM) upregulated genes and common upregulated genes in the two cell lines (C) with Enrichr NCI-Nature pathway database. **B. Docetaxel induces Caspase-3 binding on VEGFA promoter.** CHIP PCR analysis performed in Caspase-3 -/- or +/+ MCF-7 cells treated during 24h or not with docetaxel (10 nM). **C. Docetaxel does not induce Caspase-3 binding on VEGFB and VEGFC promoters.** Caspase-3-binding peaks identified by ChIP-seq analysis of VEGFB and VEGFC in Caspase-3 -/- and +/+ MCF-7 cells treated during 24h or not with docetaxel. **D. Absence of Procaspases-6 and -7 do not impact VEGFA promotor transcriptional activity.** Firefly luciferase activity in 293T cells after transfection of luciferase reporter constructs for the VEGFA promoter with various combinations of Caspase-6 or Caspase-7 specific siRNA and docetaxel (10 nM) treatment during 24h. **E. Caspase-3 primary structure.** The pro-domain is underlined in black, the large subunit is underlined in green and the small subunit in blue. The DNA binding domain is indicated in red. **F. Overexpression of a proteolytic inactive mutant of Caspase-3 induced the same profile as the wild-type Caspase-3.** Firefly luciferase activity in MCF-7 cells after transfection of luciferase reporter constructs for VEGFA promoter with various combinations of inactive mutant C163A isoform of Caspase-3 and docetaxel treatment (10nM). **G. Overexpression of the DNA binding domain truncated Caspase-3 completely abolished the luciferase activity induced by docetaxel.** Firefly luciferase assay with various combinations of putative DNA binding domain truncated Caspase-3 transfection and docetaxel treatment (10nM), and immunoblot analysis testing transfection efficiency. **H. Overexpression of the Caspase-3 truncated for the putative DNA binding domain completely abolished the luciferase activity induced by docetaxel even in absence of Caspases-3, -6, or -7.** Firefly luciferase assay with various combinations of putative DNA binding domain truncated Caspase-3, siRNA against Caspase-3, Caspase-6 or Caspase-7 transfection and docetaxel (10 nM) treatment during 24h. **I. Overexpression of the small Caspase-3 subunit alone induced the same activation of the VEGFA promoter as the control.** Firefly luciferase assay with various combinations of Caspase-3 small subunit plasmid transfection and docetaxel treatment (10nM), and immunoblot analysis testing transfection efficiency. **J. Both subunits of active Caspase-3 are necessary for the transcription activity of active**

**Caspase-3.** Firefly luciferase assay with various combinations of Caspase-3 small subunit plasmid, siRNA against Caspase-3, -6 or -7 transfection and docetaxel (10 nM) treatment during 24h. Data are presented as mean  $\pm$  SD.

Figure S4



**Figure S4: A. Pharmacological inhibition of Caspase-3 blocks VEGFA induction in mouse cells.** RT-PCR analysis of *VEGFA* expression in 4T1 and CT-26 cells treated or not with docetaxel (10 nM) and with Z-FA-FMK control inhibitor or with Z-DEVD-FMK Caspase-3 inhibitor. **B. Targeting Caspase-6 and Caspase-7 does not affect tumor growth.** Tumor growth in BALB/c mice after subcutaneous injection of CT-26 cells followed by intraperitoneal (IP) injections of 5-fluorouracile (FU) (50 mg/kg) and irinotecan (40mg/kg) with or without weekly injections of Caspase-6 or -7-specific siRNA into the tumor ( $n = 8$  per group). Data are presented as mean  $\pm$  SD.



### **ANNEXE 3 : Listes des communications orales et affichées**

#### **Orales**

**28 novembre 2018** : Participation aux journées jeunes chercheurs de la fondation ARC. Courte présentation orale de vulgarisation scientifique autour du travail de thèse.

**16 juillet 2018** : Participation à la deuxième conférence internationale "SPLICING. Lisbonne, Portugal. Présentation orale courte du travail de thèse avec comme titre « Study of IRF-1 transcription factor new isoform in Th1 lymphocyte differentiation ».

#### **Affichées**

**28 novembre 2018** : Participation aux journées jeunes chercheurs de la fondation ARC. Présentation du travail de thèse sous forme d'un poster intitulé « Etude d'une isoforme alternative du facteur de transcription IRF-1 dans la différenciation lymphocytaire Th1 » et poster de vulgarisation scientifique intitulé « IRF-1, un gène aux deux visages ».

**30 novembre 2017** : Participation à la 18ème journée scientifique de la Ligue contre le cancer. Présentation du travail de thèse sous forme d'un poster intitulé « Study of IRF-1 transcription factor new isoform in Th1 lymphocyte differentiation », Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg (ESBS), Illkirch.

**6-7 novembre 2017** : Participation congrès joint de la Société Française d'Immunologie et de l'Association Française de Cytométrie. Présentation du travail de thèse sous forme d'un poster intitulé « Etude d'une isoforme alternative du facteur de transcription IRF-1 dans la différenciation lymphocytaire Th1 », Centre des Congrès, Reims.

**15-16 juin 2017** : Participation au Forum des Jeunes Chercheurs. Présentation du travail de thèse sous forme de communication orale intitulée « Etude d'une isoforme alternative du facteur de transcription IRF-1 dans la différenciation lymphocytaire Th1 », Faculté de Sciences de la Vie de Dijon.

**16-17 juin 2016** : Participation au Forum des Jeunes Chercheurs. Présentation du travail de thèse sous forme d'un poster intitulé « Etude d'une isoforme alternative du facteur de transcription IRF-1 dans la différenciation lymphocytaire Th1 », Faculté de Sciences Médicales et Pharmaceutiques de Besançon.

# RÉSUMÉ

---

Il est maintenant clairement établi que le système immunitaire peut influencer la réponse du cancer au traitement. Cependant, l'influence du microenvironnement tumoral sur les cellules immunitaires n'est pas complètement comprise. Dans ce contexte, l'épissage alternatif est de plus en plus décrit comme affectant la biologie du système immunitaire.

Dans ce travail, nous avons montré que le microenvironnement tumoral, en augmentant les événements d'épissage alternatif, induisait l'expression d'une isoforme alternative du facteur de transcription IRF1 dans les cellules Th1. En outre, nous avons également montré, chez la souris comme chez l'homme, que l'isoforme alternative d'IRF1 altère l'activité transcriptionnelle d'IRF1 sur le promoteur de *Il12rb1*, entraînant une diminution de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des cellules Th1.

Ainsi, l'expression de l'isoforme courte d'IRF1 augmente au sein du microenvironnement tumoral, et bloquer son apparition pourrait potentialiser l'effet anti-tumoral des cellules Th1.