



**HAL**  
open science

# Etude du rôle de STING dans la biologie des lymphocytes T CD4 : application en immunothérapie anticancéreuse

Isis Benoit-Lizon

► **To cite this version:**

Isis Benoit-Lizon. Etude du rôle de STING dans la biologie des lymphocytes T CD4 : application en immunothérapie anticancéreuse. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCI002 . tel-03227431

**HAL Id: tel-03227431**

**<https://theses.hal.science/tel-03227431v1>**

Submitted on 17 May 2021

**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.

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE  
FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A L'UFR DES SCIENCES DE SANTE – INSERM U1231**

Ecole doctorale n° 554

Environnements-Santé-E2S

Doctorat de Biochimie et Biologie Moléculaire

Par

Mme Benoit-Lizon Isis

**ETUDE DU ROLE DE STING DANS LA BIOLOGIE DES  
LYMPHOCYTES T CD4 : APPLICATIONS EN IMMUNOTHERAPIE  
ANTI-CANCEREUSE**

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 22 janvier 2021

Composition du Jury :

Mr Godet Yann	PU, INSERM U1098- UFC, Besançon	Président
Mme Lafont Virginie	CR, INSERM – IRCM U1194, Montpellier	Rapporteur
Mr Fazilleau Nicolas	DR, INSERM – CPTP U1043, Toulouse	Rapporteur
Mme Togbe Dieudonnée	PU, CNRS – INEM U7355, Orléans	Examinateur
Mr Gros Laurent	CR, CNRS – IRCM U1194, Montpellier	Examinateur
Mr Apetoh Lionel	DR, INSERM U2131 – UBFC, Dijon	Directeur de thèse



# REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le Dr Nicolas Fazilleau et le Dr Virginie Lafont pour le temps consacré à examiner et évaluer ce manuscrit en la qualité de rapporteur. Je remercie également le Dr Dieudonnée Togbé, le Dr Yann Godet et le Dr Laurent Gros d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Je tiens également à remercier mon directeur de thèse le Dr Lionel Apetoh qui m'a donnée l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de son équipe. Ta pédagogie et tes précieux conseils tout au long de ma thèse m'ont permis d'évoluer, de gagner en confiance et de me dépasser pour donner le meilleur de moi-même.

Un grand merci également à Elise pour m'avoir accompagnée dans ce projet, toujours en musique et avec beaucoup de bonne humeur. Merci à toi pour ton soutien sans faille, et tes conseils, essentiels pour la réalisation de ce projet. Je te souhaite le meilleur pour la suite et un maximum de succès dans ta carrière.

Ludivine, merci encore de m'avoir aidé pour réaliser ces travaux. Depuis ton stage de M2 jusqu'à ton départ tu auras été mon binôme et ton organisation, ta précision et ton efficacité m'auront été indispensables tout au long de ces travaux de thèse. Je te souhaite que du bonheur à toi et ta nouvelle famille.

Je tiens également à remercier l'ensemble de l'équipe pour leur soutien technique et moral dans un esprit d'équipe soudé, et pour tous ces supers moments passés ensemble, les restaurants, et les soirées jeux, etc. Merci à Andréa, Tiffany et Dasha pour tout ce qu'on a pu partager. Merci également à Alvaro et à Carole pour m'avoir apporté leurs conseils et leur savoir-faire et pour toutes les discussions scientifiques qui m'ont toujours beaucoup apportés. Merci à Aurélie, Thaiz et Magalie qui ont été les premières à m'accueillir et à me former dès mes stages de Master et au début de ma thèse.

Merci également à l'ensemble de l'unité U1231 et aux personnes avec qui j'ai pu échanger pendant ces nombreuses années que j'ai passées dans le laboratoire.

Je remercie enfin mes amis et ma famille, en particulier mon Papa et ma Mamie, qui ont toujours été là pour moi, pour me soutenir et me motiver dans les moments les plus difficiles. Merci d'avoir cru en moi jusqu'au bout.



# RESUMÉ

La reconnaissance des signaux de danger par les récepteurs PRR exprimés par les cellules immunitaires innées est cruciale pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace. STING (STimulator of INterferon Genes) est une protéine localisée dans le réticulum endoplasmique caractérisée en 2008 comme étant indispensable pour la détection des ADNs cytosoliques et l'établissement d'une réponse immunitaire antivirale médiée par les Interférons (IFN) de type I. La protéine STING joue également un rôle clé dans la mise en place des réponses immunitaires antitumorales spontanées et l'administration de ligands de STING chez des souris porteuses de tumeurs permet le contrôle de la croissance tumorale. Ces observations sont vérifiées dans le cadre d'essais cliniques chez des patients atteints de mélanome, illustrant le potentiel thérapeutique de l'activation de STING en immunothérapie anticancéreuse.

Toutefois, les mécanismes expliquant l'efficacité antitumorale des ligands de STING restent peu clairs. *In vivo*, les ligands de STING conduisent à l'activation des cellules dendritiques qui sont ensuite responsables de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Si les lymphocytes T CD8 cytotoxiques présentent de fortes propriétés antitumorales, les lymphocytes T CD4, dits auxiliaires, sont également essentiels pour la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale efficace. La voie de signalisation STING a surtout été décrite dans les cellules myéloïdes, néanmoins, plusieurs études ont montré que celle-ci était fonctionnelle au sein des lymphocytes T. Le rôle intrinsèque de STING sur les propriétés effectrices et antitumorales des lymphocytes T CD4 reste cependant mal caractérisé.

Mes travaux ont permis de montrer que les ligands de STING augmentent respectivement la sécrétion d'IL-9 et d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T<sub>H</sub>9 et T<sub>H</sub>1, deux sous-types de cellules T CD4 dotés d'une forte activité antitumorale, et ce de manière dépendante de STING. Au niveau moléculaire, j'ai pu établir que STING module les fonctions effectrices de ces deux sous types à travers différents mécanismes : un axe IRF3-IFN- $\beta$  pour les cellules Th1 et un axe indépendant des IFN type I pour les cellules Th9, mais dépendant de la voie mTOR. Les effets antitumoraux *in vivo* du ligand de STING 2'3'-cGAMP semblent impliquer les lymphocytes T CD4 ainsi que les cytokines effectrices spécifiques des Th1 et Th9, l'IFN- $\gamma$  et l'IL-9 respectivement. Enfin, dans un contexte de transfert adoptif passif chez des animaux porteurs de mélanome, l'activation de STING permet d'augmenter les effets antitumoraux des cellules Th9. Ces données indiquent un nouveau rôle intrinsèque pour STING dans la

modulation de la différenciation des lymphocytes T CD4 et de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative antitumorale.

Mots clés : STING, différenciation lymphocytaire T CD4, Cancer

# ABSTRACT

Recognition of danger signals by intracellular or extracellular receptors expressed by innate immune cells is crucial for the establishment of an effective adaptive immune response. STING (STimulator of INterferon Genes) is a protein located in the endoplasmic reticulum discovered in 2008 as being essential for the detection of cytosolic DNAs and the establishment of antiviral immune response mediated by type I interferons (IFNs). The STING protein also plays a key role in spontaneous anti-tumor immune responses and the administration of STING ligands in tumor-bearing mice favors tumor growth control. These observations have been verified in clinical trials in patients with melanoma, illustrating the therapeutic potential of activating STING in cancer immunotherapy.

However, the mechanisms explaining the antitumor efficacy of STING ligands remain unclear. *In vivo*, STING ligands lead to dendritic cell activation. Dendritic cells are then responsible for setting up the adaptive immune response. While cytotoxic CD8 T lymphocytes have strong anti-tumor properties, helper CD4 T lymphocytes are also essential for the establishment of an effective anti-tumor immune response. The STING signaling pathway has mainly been described in myeloid cells, however several studies have shown that STING signaling pathway is functional in T lymphocytes. However, the intrinsic role of STING on the effector and antitumor properties of CD4 T lymphocytes remains unclear.

My work reveals that STING ligands respectively increase the secretion of IL-9 and IFN- $\gamma$  by TH9 and TH1 lymphocytes, two CD4 T cell subsets ascribed with potent anti-tumor activity, in a STING-dependent manner. Mechanistically, I was able to establish that STING modulates the effector functions of these two subtypes through different mechanisms: an IRF3-IFN- $\beta$  axis for TH1 cells and an IFN- $\beta$ -independent but mTOR-dependent axis for TH9 cells. *In vivo* antitumor effects of the STING ligand 2'3'-cGAMP involves CD4 T cells as well as the specific effector cytokines of TH1 and TH9, IFN- $\gamma$  and IL-9 respectively. Finally, in the context of passive adoptive transfer in melanoma-bearing animals, activation of STING increases the antitumor effects of TH9 cells. These data indicate a new intrinsic role for STING in the modulation of the differentiation of CD4 T lymphocytes and the development of the adaptive anti-tumor immune response.

Keywords: STING, CD4 T cell differentiation, Cancer

# I. TABLE DES MATIERES

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>3</b>
<b>RESUMÉ</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	<b>10</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>14</b>
<b>I. Préambule</b>	<b>15</b>
<b>II. Principe de l'immunosurveillance et détection du danger de l'environnement tumoral par les cellules immunitaires innées</b>	<b>16</b>
A. Théorie de l'immunosurveillance anti-cancéreuse.	16
1. Découverte et mise en évidence	16
a. Histoire de l'immunosurveillance	16
b. Preuves expérimentales et modèles murins	16
2. Échappement tumoral et théorie de l'immunoediting	17
B. Les stratégies d'immunothérapies antitumorales	19
1. Les lymphocytes T, au centre des stratégies d'immunothérapie	19
2. Le cycle de l'immunité anti-cancéreuse	20
C. Mise en place de la réponse immunitaire innée par les récepteurs PRRs	21
1. Découverte et mise en évidence des Toll-Like Récepteurs (TLRs)	21
2. Détection des acides nucléiques par les récepteurs PRRs	22
D. Activation de la réponse immunitaire par les cellules tumorales	24
1. Théorie du danger	24
2. Alarmines et signaux de danger de l'environnement tumoral	24
a. Découverte et exemple d'alarmine	24
b. Les acides nucléiques comme signaux de danger	25
3. Intérêts thérapeutiques des récepteurs PRRs dans le traitement du cancer	26
a. Utilisation d'agonistes de PRRs pour le traitement du cancer	27
b. Thérapies favorisant l'activation des récepteurs PRRs	27
<b>III. STING, protéine clé de la réponse aux ADNs cytosoliques</b>	<b>30</b>
A. Découverte et fonction de STING	30
1. Mise en évidence	30
a. A la recherche des mécanismes de détection de l'ADN	30
b. STING, protéine essentielle pour la réponse immunitaire antivirale	30
2. STING : une protéine qui cumule les fonctions de protéine adaptatrice et de récepteur	31
a. STING comme protéine adaptatrice	31
b. STING comme récepteur	32
B. Voies de signalisation cGAS-STING	33
1. Activation de la voie cGAS-STING	33
2. Régulation de la voie cGAS/STING	34
a. Régulation de la détection des ADNs	34
b. Des agonistes de STING aux affinités variables	35

c.	Modifications post-traductionnelles de STING	35
C.	Rôle de la protéine STING dans les pathologies	36
1.	STING et maladies inflammatoires	36
a.	Dérégulation des enzymes de dégradation de l'ADN	37
b.	Mutations activatrices de STING	37
2.	Rôle de STING dans le cancer	38
a.	Effet antitumoral spontané de la protéine STING	38
b.	Effets antitumoraux de la radiothérapie et de la chimiothérapie dépendants de STING	39
3.	STING une nouvelle cible thérapeutique ?	41
a.	Agonistes de STING utilisés en monothérapie	41
b.	Agonistes de STING en association avec d'autres stratégies d'immunothérapie	42
<b>IV.</b>	<b>Mise en place de la réponse immunitaire adaptative antitumorale</b>	<b>44</b>
A.	Les lymphocytes T CD4 et leurs sous populations dans l'immunité antitumorale	44
1.	Différenciation des lymphocytes T CD4	44
a.	Activation par les cellules immunitaires innées	44
b.	Les lymphocytes Th1 et Th2, premiers sous types découverts	45
c.	Les lymphocytes Th17 et T régulateurs	46
2.	Les lymphocytes T CD4 dans le cancer	48
a.	Mise en évidence du rôle clé des lymphocytes T CD4 dans l'immunité antitumorale	48
b.	Les multiples rôles des CD4 dans l'immunosurveillance	48
3.	Rôles des différents sous-types lymphocytaires dans le cancer	50
a.	Les lymphocytes Th1 dans l'immunité antitumorale	51
b.	Un rôle controversé des autres sous-types lymphocytaires	52
B.	Un nouveau sous-type pro inflammatoire : les lymphocytes Th9	53
1.	Découverte et caractéristiques physiologiques	53
a.	Mise en évidence et différenciation des cellules sécrétrices d'IL-9	53
b.	Pathologies associées	54
2.	Quel rôle des cellules Th9 dans le cancer ?	55
a.	Mise en évidence des propriétés pro et anti tumorales de l'IL-9	55
b.	Contextes favorisant une réponse Th9 antitumorale	57
c.	Impact clinique des lymphocytes Th9 chez l'homme	59
<b>V.</b>	<b>Objectifs des travaux de thèse</b>	<b>60</b>
A.	Contexte de l'étude	60
1.	Une stimulation de la réponse adaptative directe par les récepteurs PRR	60
2.	Un rôle intrinsèque de STING dans la biologie des lymphocytes T ?	61
B.	But du projet	62
	<b>MATERIELS ET MÉTHODES</b>	<b>64</b>
<b>I.</b>	<b>Souris</b>	<b>65</b>
<b>II.</b>	<b>Expériences in vivo</b>	<b>65</b>
A.	Lignées cellulaires et croissance tumorales	65
B.	Déplétions des CD8 et neutralisation des cytokines	67
C.	Transfert adoptif de cellules Th9	67
<b>III.</b>	<b>Procédures Ex-vivo</b>	<b>68</b>
A.	Analyses de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)	68
B.	Purification des cellules T murines	69
C.	Purification des cellules T humaines	69
D.	Traitement et transfection des cellules T	70
E.	Polarisation in vitro des lymphocytes T CD4	70
<b>IV.</b>	<b>Analyse des cellules</b>	<b>71</b>

A. Cytométrie en flux	71
B. PCR quantitative en temps-réel (RT-qPCR)	72
C. ELISA	74
D. Western Blot	74
E. RNAseq	75
F. Analyses statistiques	75
<b>RÉSULTATS</b>	<b>76</b>
I. L'activation de STING augmente les propriétés effectrices des lymphocytes T CD4 <i>in vivo</i>	77
II. Différents ligands de STING augmentent la sécrétion d'IFN- $\gamma$ et d'IL-9 des lymphocytes Th1 et Th9 respectivement	82
III. Profil transcriptionnel des lymphocytes Th1 et Th9 stimulés avec le cGAMP	86
IV. L'activation de STING augmente la sécrétion d'IFN- $\gamma$ des Th1 de manière dépendante de l'axe IRF3/IFN- $\beta$ /IFNAR	88
V. L'activation de STING augmente la sécrétion d'IL-9 des Th9 de manière dépendante de la voie mTOR	90
<b>DISCUSSION</b>	<b>94</b>
I. Un rôle complexe de la signalisation de STING dans les CD4.	95
II. Quel est le rôle intrinsèque de STING dans les lymphocytes T CD8 ?	98
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>102</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	<b>106</b>
<b>ANNEXES</b>	<b>126</b>
Annexe 1 : Stratégies de « gating »	
Annexe 2 : Analyse RNAseq – Suite de la Figure 22	
Annexe 3 : “Rationale for STING-targeted cancer immunotherapy”	
Annexe 4 : “Harnessing Th9 cells in cancer immunotherapy”	
Annexe 5 : “Selective autophagy restricts IL-9 secretion from TH9 cells: relevance in cancer growth”	
Annexe 6 : Liste des communications orales et posters	

# LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1 : Ligands et agonistes thérapeutiques des récepteurs PRRs .....</i>	<i>29</i>
<i>Tableau 2 : Différenciation des lymphocytes T CD4 in vitro .....</i>	<i>71</i>
<i>Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour les analyses RT-qPCR .....</i>	<i>72</i>

# LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : La théorie de l'Immunoediting.....</i>	19
<i>Figure 2 : Cycle de l'immunité anticancéreuse .....</i>	21
<i>Figure 3 : Les récepteurs PRRs et la détection du danger.....</i>	26
<i>Figure 4 : Activation des récepteurs aux acides nucléiques par les chimio et radiothérapies.....</i>	29
<i>Figure 5 : Les mécanismes de détection de l'ADN .....</i>	32
<i>Figure 6 : La voie de signalisation cGAS-STING :.....</i>	36
<i>Figure 7 : Rôles de STING dans le cancer.....</i>	41
<i>Figure 8 : Les agonistes de STING augmentent l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses .....</i>	44
<i>Figure 9 : Activation et polarisation des lymphocytes T CD4 :.....</i>	47
<i>Figure 10 : Les multiples rôles antitumoraux des lymphocytes T CD4 .....</i>	50
<i>Figure 11 : Les propriétés antitumorales des cellules Th9.....</i>	57
<i>Figure 12 : Stratégies favorisant une réponse Th9 antitumorale .....</i>	59
<i>Figure 13 : Les CD4 contribuent à l'effet antitumoral du cGAMP .....</i>	78
<i>Figure 14 : L'activation de STING par le cGAMP in vivo augmente les propriétés effectrices des CD4 infiltrant la tumeur.....</i>	79
<i>Figure 15 : L'activation de STING induite par une mutation augmente les propriétés effectrices des CD4 in vivo. ....</i>	80
<i>Figure 16 : Les effets antitumoraux du cGAMP sont médiés par l'IFN-<math>\gamma</math> et l'IL-9, et non par l'IL-4 ou l'IL-17.....</i>	81
<i>Figure 17 : Le cGAMP augmente l'IFN-<math>\gamma</math> et l'IL-9 des cellules Th1 et Th9 de manière dépendante de STING.....</i>	82
<i>Figure 18 : Effet du 2'3'-cGAMP et son analogue 2'3'-cGAM(PS)<sub>2</sub>(Rp/Sp), sur les propriétés effectrices et la viabilité des cellules Th1 et Th9.....</i>	83
<i>Figure 19 : Effet du ligand synthétique DMXAA sur les propriétés effectrices et la viabilité des cellules Th1 et Th9.....</i>	84
<i>Figure 20 : Effet des di-nucléotides cycliques bactériens (cdi-AMP et cdi-GMP) sur les propriétés effectrices des cellules Th1 et Th9.....</i>	85
<i>Figure 21: Le voie de signalisation STING est induite dans les CD4 stimulés avec le cGAMP.....</i>	86



<i>Figure 22 : Analyse RNAseq des cellules CD4 naïves stimulées avec le cGAMP et polarisées 16 et 48h en Th1 et Th9.....</i>	87
<i>Figure 23 : Rôle des Interférons de Type I dans l'augmentation des propriétés effectrices médié par le cGAMP. ....</i>	89
<i>Figure 24 : Rôle d'IRF3 dans l'augmentation des propriétés effectrices médiée par le cGAMP. ....</i>	89
<i>Figure 25 : Rôle de P65 et mTOR dans l'augmentation des propriétés effectrices des Th9 médié par le cGAMP. ....</i>	91
<i>Figure 26 : Le cGAMP augmente les propriétés antitumorales des cellules Th9.....</i>	92
<i>Figure 27 : Le cGAMP augmente la sécrétion d'IL-9 des lymphocytes Th9 humains</i>	93
<i>Figure 28 : Proposition de modèle pour les effets intrinsèques de l'activation de STING dans les CD4.....</i>	95
<i>Figure 29 : Expression de STING dans les différents sous types lymphocytaires T CD4, .....</i>	97
<i>Figure 30 : Effet du cGAMP sur les propriétés effectrices des différents sous types lymphocytaires T CD4, .....</i>	97
<i>Figure 31 : Effet du cGAMP sur la sécrétion d'IFN-<math>\gamma</math> des CD4 en comparaison aux CD8 .....</i>	100

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN: *Acide Désoxy-Ribonucléique*

APC: *Antigen-Presenting Cell*

ARN: *Acide RiboNucléique*

BMDC: *Bone Marrow-Derived Dendritic cells*

BMDM: *Bone Marrow-Derived Macrophages*

CCL: *Chemokine (C-C motif) ligand*

CD: *Cluster de Différenciation*

CDN: *Cyclic Di-Nucleotide*

cGAS: *cyclic GMP-AMP Synthase*

CMH: *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*

DC: *Dendritic Cells*

Foxp3: *Forkhead box P3*

Gata3: *GATA-binding protein 3*

GFP: *Green Fluorescent Protein*

GITR: *Glucocorticoid-Induced TNFR-Related*

GM-CSF: *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*

HIF1 $\alpha$ : *Hypoxia Inducible Factor 1 $\alpha$*

IDO: *Indoléamine 2,3 dioxygénase*

IFN: *InterFeroN*

IL: *InterLeukine*

IRF: *Interferon Regulatory Factor*

ISD: *Interferon Stimulatory DNA*

ISG: *Interferon-Stimulated Gene*

LPS: *LipoPolySaccharide*

MDA5: *Melanoma Differentiation-Associated 5*

mTOR: *Mammalian Target Of Rapamycin*

NF- $\kappa$ B: *Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B*

NK: *Natural Killer*

NO: *Nitric Oxyde*

OVA: *OVALbumine*

PBMC: *Peripheral Blood Mononuclear Cell*

PD-1: *Programmed cell Death protein 1*

PRR: *Pattern Recognition Receptor*

RAG: *Recombination Activating Gene*

RLR: *RIG-I-Like Receptor*

RIG-I: *Retinoic acid-Inducible Gene I*

ROR $\gamma$ t: *Retinoic acid receptor-related Orphan Receptor  $\gamma$ t*

STAT: *Signal Transducer and Activator of Transcription*

STING: *Stimulator of Interferon genes*

T-bet: *T-box transcription factor*

TBK1: *TANK-Binding Kinase 1*

TCGFIII: *T Cell Growth Factor III*

TCR: *T Cell Receptor*

TGF- $\beta$ : *Transforming Growth Factor  $\beta$*

Th: *T helper*

TIL: *Tumor Infiltrating Lymphocyte*

TLR: *Toll-Like Receptor*

TNF: *Tumor Necrosis Factor*

TRAF6: *Tumor necrosis factor Receptor Associated Factor 6*

TRAIL: *Tumor-necrosis-factor Related Apoptosis Inducing Ligand*

Treg: *T régulateur*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

YFP: *Yellow Fluorescent Protein*

# INTRODUCTION

## I. Préambule

La réponse immunitaire s'organise par le biais de nombreuses cellules immunitaires, aux propriétés et fonctions variées. Les cellules du système immunitaire inné, constituent notre première ligne de défense. Activées par des signaux de danger, les cellules dites « présentatrices d'antigènes » permettent la mise en place de la réponse immunitaire adaptative qui, contrairement à la réponse immunitaire innée, est spécifique et capable de développer une mémoire. De nombreux récepteurs permettent la détection des signaux de danger par les cellules innées, qui détectent des protéines, des acides nucléiques, ou d'autres types de molécules souvent associées aux pathogènes, mais également à des cellules du soi considérées comme dangereuses telles que les cellules cancéreuses.

Parmi les cellules immunitaires adaptatives, les lymphocytes B permettent une réponse immunitaire humorale qui se traduit par la production d'anticorps spécifiques, alors que les cellules T induisent une réponse immunitaire à médiation cellulaire grâce à un contact cellule/cellule dépendant de récepteurs spécifiques. Les lymphocytes T sont eux-mêmes divisés en sous catégories : les lymphocytes CD8 sont des cellules cytotoxiques, alors que les lymphocytes T CD4 sont caractérisés « d'auxiliaires » ou de T « helper ». C'est par la reconnaissance d'un antigène via leurs récepteurs, que les cellules adaptatives se différencient et acquièrent leur spécificité.

## II. Principe de l'immunosurveillance et détection du danger de l'environnement tumoral par les cellules immunitaires innées

### A. Théorie de l'immunosurveillance anti-cancéreuse.

#### 1. Découverte et mise en évidence

##### *a. Histoire de l'immunosurveillance*

Le système immunitaire a longtemps été défini par les immunologistes comme un ensemble de cellules permettant de nous défendre contre les composants étrangers, en discriminant le « soi » du « non soi » (Bretscher and Cohn 1970). Pourtant, l'immunosurveillance est un concept qui propose que le système immunitaire permette également de s'attaquer aux cellules tumorales pour empêcher l'apparition de cancers. En effet, les cellules tumorales sont des cellules de l'organisme ayant subi des modifications génétiques et ayant acquis diverses caractéristiques pendant le processus d'oncogenèse : l'autosuffisance (indépendance aux facteurs de croissance), une insensibilité aux facteurs inhibant la croissance et à l'apoptose, ainsi que des capacités de prolifération illimitée, d'induction de l'angiogenèse, et d'invasion grâce à leur capacité à générer des métastases (Hanahan and Weinberg 2000).

Ce lien entre le système immunitaire et la tumorigenèse a été suggéré pour la première fois dans les années 1900, par William B. Coley qui évoquait que la survenue d'infection pouvait conduire à la régression de cancer chez certains patients, puis confirmé par Paul Erlich qui postulait que les défenses immunitaires de l'hôte empêchaient le développement de tumeurs. Néanmoins, pour cause d'absence de preuves expérimentales et de connaissances suffisantes à l'époque, il a fallu attendre une cinquantaine d'années avant que l'hypothèse de l'immunosurveillance ne soit vraiment évoquée.

##### *b. Preuves expérimentales et modèles murins*

Des modèles de transplantation de tumeurs chez la souris ainsi que l'observation de régressions tumorales spontanées chez l'homme, ont permis à Burnet et Thomas de développer cette hypothèse de l'immunosurveillance et de proposer que le système Immunitaire adaptatif pourrait reconnaître spécifiquement des « néo-

antigènes » tumoraux et ainsi contrôler la croissance tumorale (Burnet 1957, Burnet 1967, Burnet 1971, Thomas 1982).

Le développement et l'utilisation de modèles murins immunodéficients a ensuite permis une accumulation de données expérimentales permettant de renforcer cette théorie de l'immunosurveillance. Le premier modèle utilisé pour étudier cette hypothèse fut le modèle de souris nude, athymiques, ne possédant pas de lymphocytes T. Alors que les résultats de Stutman, qui ne démontra aucune différence en ce qui concerne l'apparition de tumeurs spontanées ou induites par methylcholanthrène (MCA, un carcinogène) entre les souris nude ou immunocompétentes (Stutman 1974), semblait à première vue remettre en cause la théorie de l'immunosurveillance, ces résultats ont été plus tard expliqués par la présence, dans ces souris nudes, d'un système immunitaire inné compétent, incluant les cellules « Natural Killeuse » (NK) cytotoxiques.

D'autres modèles de souris immuno-incompétentes ont par la suite été développés tels que les souris RAG2<sup>-/-</sup> (déficientes en lymphocytes T et B). En effet, des expériences ont montré que ces souris développaient davantage d'adénocarcinomes de l'intestin et du colon (Shankaran, Ikeda et al. 2001), soulignant le rôle clé du système immunitaire dans le contrôle de la croissance tumorale.

## 2. Échappement tumoral et théorie de l'immunoediting

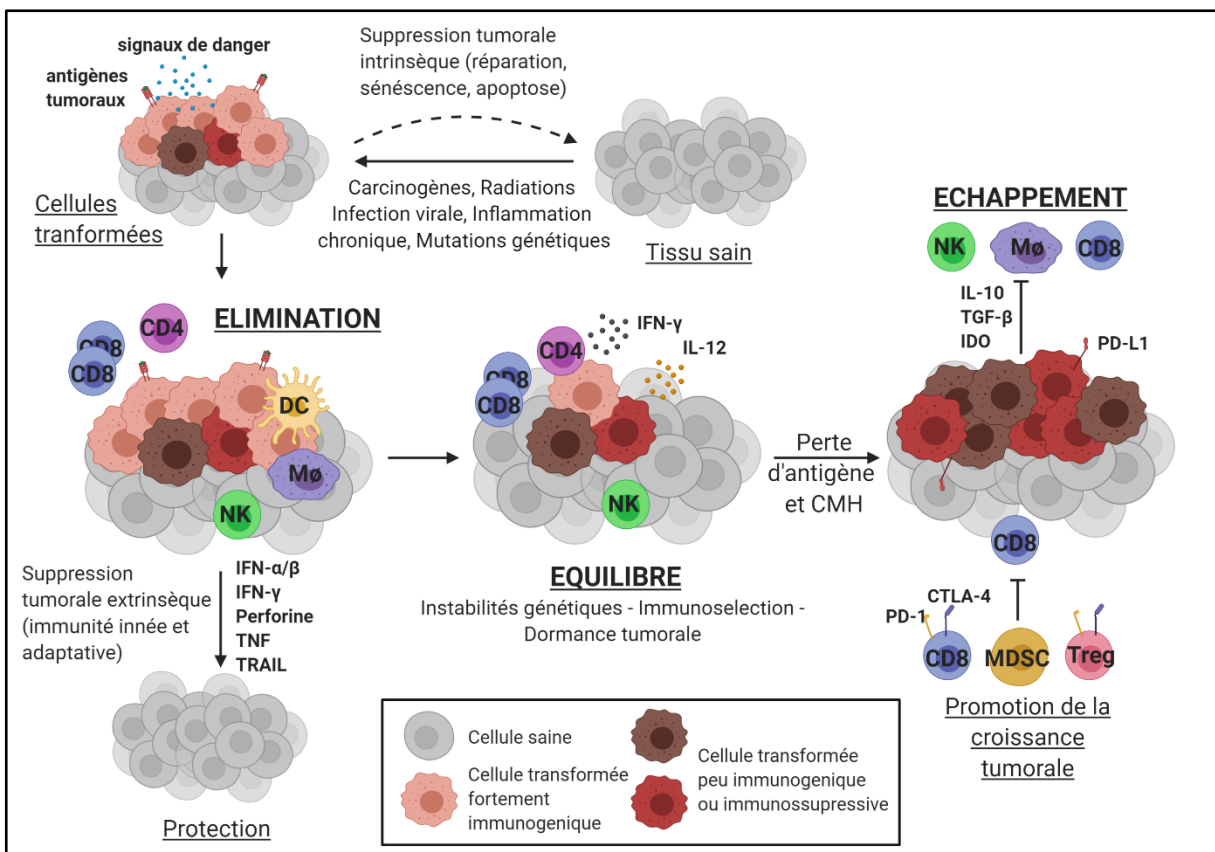
Pourquoi alors, malgré ce phénomène d'immunosurveillance, certains patients développent tout de même des cancers ? Les cellules tumorales ont en effet, en plus des autres caractéristiques décrites précédemment, la capacité d'échapper à ce phénomène d'immunosurveillance (Zitvogel, Tesniere et al. 2006, Hanahan and Weinberg 2011), expliquant ainsi pourquoi le système immunitaire ne permet pas toujours de contrôler efficacement la croissance tumorale de manière spontanée. Le concept d'immunosurveillance a ainsi été reconsidéré par Dunn et Schreiber qui ont proposé une théorie intégrant cette dernière caractéristique. « L'immunoediting » ou « théorie des 3 E », se caractérise ainsi par 3 phases (Dunn, Bruce et al. 2002, Dunn, Old et al. 2004) : une phase d'Élimination, une phase d'Équilibre et une phase d'Échappement. (**Figure 1**)

La première phase se caractérise ainsi par l'immunosurveillance et l'élimination des cellules cancéreuses par le système immunitaire, que ce soit le système

immunitaire inné (cellules dendritiques et Natural Killer) ou le système immunitaire adaptatif (lymphocytes T et B).

Pendant la phase d'équilibre l'action des cellules immunitaires - notamment via la sécrétion de molécules effectrices telles que les interférons de type I (IFN- $\beta/\alpha$ ), l'IFN- $\gamma$ , le TNF- $\alpha$  ou encore le granzyme et la perforine - va conduire à la sélection de clones tumoraux résistants.

Enfin, ces cellules tumorales ainsi sélectionnées vont échapper au contrôle du système immunitaire par l'intermédiaire de divers mécanismes. En effet les cellules tumorales vont diminuer ou perdre l'expression d'antigènes et/ou de leurs Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) pour ne pas être reconnues par les cellules T. De plus, elles peuvent également sécréter des molécules immunosuppressives telles que l'IL-10 ou le TGF- $\beta$  ou également exprimer des molécules inhibitrices telles que PD-L1, conduisant à l'inhibition des cellules T effectrices au profit des cellules T régulatrices, permettant ainsi aux cellules tumorales de progresser et de se développer (Figure 1).



### **Figure 1 : La théorie de l'Immunoediting**

*Après la transformation des cellules saines en cellules tumorales, l'expression d'antigènes tumoraux et la libération de signaux de danger conduit au recrutement des cellules immunitaires qui vont chercher à éliminer les cellules tumorales. Pendant la phase d'équilibre, les cellules tumorales vont résister à cette pression immunitaire jusqu'à ce que des clones tumoraux résistants échappent à l'immunosurveillance des cellules immunitaires. Ces cellules tumorales résistantes prolifèrent ensuite et persistent grâce à la mise en place de mécanismes inhibant la réponse immunitaire antitumorale. Adapté de (Dunn et al., 2004), réalisé avec Biorender.*

## **B. Les stratégies d'immunothérapies antitumorales**

Cette meilleure compréhension du fonctionnement du système immunitaire vis-à-vis des cellules cancéreuses, a permis une avancée majeure dans le traitement du cancer chez l'homme avec le développement d'immunothérapies anticancéreuses, visant à stimuler et accompagner le système immunitaire pour un contrôle plus efficace de la croissance des tumeurs.

### **1. Les lymphocytes T, au centre des stratégies d'immunothérapie**

En effet l'analyse de l'infiltrat immunitaire au sein des tumeurs colorectales a permis de mettre en évidence que la présence de lymphocytes T, en particulier les lymphocytes CD8 cytotoxiques, était associée à un bon pronostic, et des chercheurs français ont ainsi développé un test « immunoscore » associé à la qualité de l'infiltrat tumoral, permettant aujourd'hui d'évaluer et de prédire la survie des patients atteints de cancer colorectaux (Pagès, Berger et al. 2005, Galon, Costes et al. 2006, Pagès, Mlecnik et al. 2018).

Par ailleurs de nombreuses stratégies d'immunothérapies ont été développées au cours des années. Notamment la thérapie cellulaire ou transfert adoptif de cellules est devenu une stratégie très prometteuse dont le procédé consiste à récupérer les lymphocytes T infiltrant la tumeur (TILs) du patient, spécifiques de la tumeur, afin de les amplifier *in vitro* avant de les réinjecter au patient (Rosenberg, Lotze et al. 1985, Rosenberg, Spiess et al. 1986, Rosenberg, Packard et al. 1988). Cette stratégie, permettant de renforcer le système immunitaire adaptatif, a permis la régression, partielle ou totale, de mélanomes métastatiques chez 50% des patients réfractaires à tout autre traitement (Dudley, Wunderlich et al. 2002, Dudley, Wunderlich et al. 2005, Rosenberg and Restifo 2015).



Une autre alternative, appelée thérapie CAR-T cell (pour Chimeric Antigen Receptor) consiste à « éduquer » les lymphocytes en les modifiant génétiquement afin qu'ils expriment un récepteur TCR (choisi) spécifique de la tumeur (June, Maus et al. 2014). Ainsi l'utilisation de cellules CAR-T spécifiques de l'antigène CD19, exprimé par les cellules B, semble une stratégie encourageante pour le traitement de leucémies ou de lymphomes B (Porter, Levine et al. 2011), et des études cliniques de phase I sont aujourd'hui en cours (Lee, Kochenderfer et al. 2015).

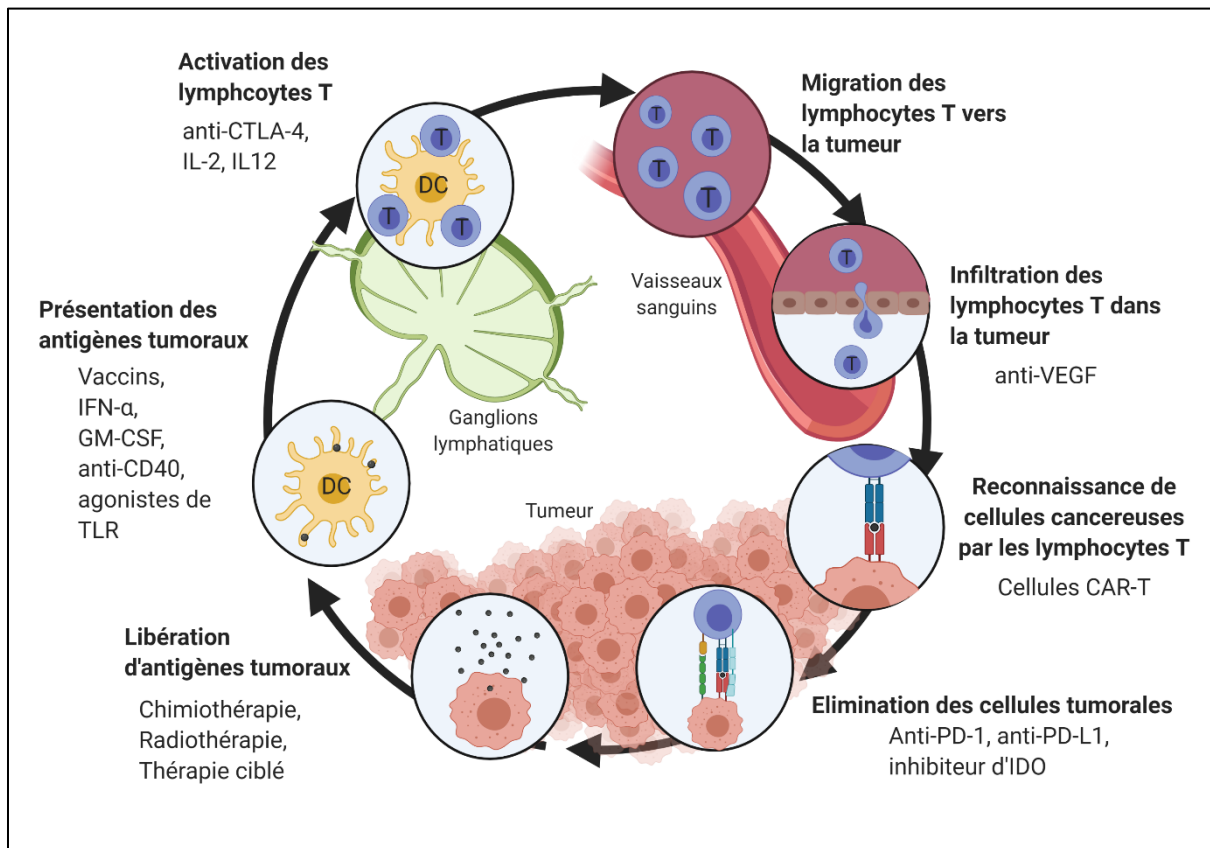
Des molécules exprimées à la surface des cellules tumorales ou des cellules présentatrices d'antigènes (APC) (PD-L1 ou CD80/86) sont cependant responsables de l'inhibition des cellules T et constituent un des mécanismes majeurs d'échappement des cellules tumorales. Ainsi, l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces « points de contrôle » du système immunitaire, tels que l'anti-PD-1 ou l'anti-CTLA-4, permet de rétablir la fonction des cellules T. Ces découvertes ont non seulement valu à James P Allison et Tasuku Honjo le prix Nobel de médecine en 2018 mais ont donné lieu à la mise en place de stratégies thérapeutiques maintenant utilisées dans la pratique clinique quotidienne pour le traitement du mélanome et du cancer du poumon métastatique (Leach, Krummel et al. 1996, Iwai, Ishida et al. 2002, Tumeh, Harview et al. 2014).

## 2. Le cycle de l'immunité anti-cancéreuse

En 2013, Chen et Mellman illustrent sous la forme d'un cycle les différentes étapes conduisant le système immunitaire à éliminer les cellules cancéreuses (Chen and Mellman 2013). Ce cycle comprend 7 étapes : la libération d'antigènes tumoraux par la tumeur, la présentation antigéniques de ces antigènes aux cellules présentatrices d'antigène (APC), l'activation par les APC matures des cellules T au niveau des organes lymphoïdes secondaires, la circulation des lymphocytes T activés dans les vaisseaux sanguins suivi de leur infiltration au sein de la tumeur, la reconnaissance des cellules tumorales par les lymphocytes T, et pour finir l'élimination des cellules cancéreuses. Les diverses stratégies d'immunothérapies agissent ainsi pour favoriser et amplifier ces étapes clés conduisant à l'élimination de la tumeur, et peuvent ainsi être associées pour obtenir des effets synergiques (**Figure 2**).

Les théories de l'immunosurveillance et de l'immunoediting ont ainsi permis le développement de stratégies d'immunothérapies efficaces pour le traitement du

cancer et ouvrent la voie pour une prise en charge personnalisée des patients ainsi qu'au développement d'associations thérapeutiques prometteuses.



**Figure 2 : Cycle de l'immunité anticancéreuse**

L'étape 1 de libération des antigènes tumoraux peut être favorisée par les thérapies induisant la mort des cellules tumorales. L'étape 2 de présentation antigénique, est favorisée par les thérapies stimulant les cellules dendritiques. L'étape 3 d'activation des lymphocytes T est favorisée par les thérapies visant à augmenter la prolifération et la fonctionnalité des cellules T. Les étapes 4 et 5 correspondent à la migration et l'infiltration des lymphocytes T au site de la tumeur. La thérapie cellulaire, et les cellules CAR-T favorise la reconnaissance spécifique des cellules tumorales (étape 6). Les thérapies permettant de lever les mécanismes inhibant la fonctionnalité des cellules T, telles que l'anti-PD-1, facilitent l'étape 7 d'élimination des cellules cancéreuses. D'après (Chen et Mellman, 2013), réalisé avec Biorender.

## C. Mise en place de la réponse immunitaire innée par les récepteurs PRRs

### 1. Découverte et mise en évidence des Toll-Like Récepteurs (TLRs)

Les cellules immunitaires innées telles que les cellules dendritiques, les monocytes, ou les macrophages sont les premières cellules du système immunitaire

à être activées. Elles sont indispensables pour l'activation du système immunitaire adaptatif et la mise en place d'une réponse immunitaire efficace.

Charles Janeway qui a adapté la théorie du « soi, non soi » vers une vision davantage centrée sur la caractéristique infectieuse ou non des cellules, est à l'origine d'une découverte majeure dans le domaine de l'immunologie : l'existence de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors). Exprimés par les cellules immunitaires innées, ces récepteurs permettent la détection de molécules associées aux pathogènes appelées PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) (Janeway 1989, Janeway 1992) et sont indispensables pour l'induction d'une réponse immunitaire efficace. En effet, c'est la stimulation de ces récepteurs PRRs qui permet non seulement d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I par les cellules immunitaires innées, mais également la maturation des ces dernières.

Ainsi, le premier PRR découvert par Medzhitov et Janeway en 1997 chez l'homme correspond au TLR4 (famille des Toll-Like Receptors) - protéine homologue de la protéine Toll de la drosophile impliquée dans l'embryogenèse et l'immunité antifongique (Lemaitre, Nicolas et al. 1996) - et permet la détection du LPS, un motif moléculaire présent à la surface des bactéries à gram négatives (Medzhitov, Preston-Hurlburt et al. 1997). D'autres TLRs situés à la membrane plasmique ont ensuite été caractérisés. Ainsi le TLR2 permet la reconnaissance de nombreux composants microbiens tels que les peptidoglycanes, les lipopeptides et les lipoprotéines. Il s'associe également aux TLR1 et TLR6 pour discriminer les diacyles et triacyles lipopeptides, respectivement. Quant au TLR5, il permet de détecter la flagelline issue de bactéries (**Figure 3 et Tableau 1**).

## [2. Détection des acides nucléiques par les récepteurs PRRs](#)

Bien qu'il ait été montré dès 1963 que les acides nucléiques étrangers pouvaient également représenter un signal de danger conduisant à l'activation des réponses immunitaires (Isaacs, Cox et al. 1963, Rotem, Cox et al. 1963), les mécanismes de détection et de reconnaissance des acides nucléiques sont longtemps restés peu clairs.

D'autres TLRs ont en effet été découverts, et sont localisés au niveau de vésicules intracellulaires appelés endosomes. Cette localisation endosomale/intracellulaire facilite la détection d'acides nucléiques à la suite de

l'endocytose de micro-organismes. Le TLR9 est le premier à avoir été identifié, et permet la détection d'ADN CpG (Cytosine-phosphate-Guanine) non méthylés qui sont des motifs présents chez les bactéries et les virus, ainsi qu'un ligand synthétique, l'oligodéoxynucléotide CpG (ODN CpG) (Hemmi, Takeuchi et al. 2000). Le récepteur TLR3, quant à lui, est le premier récepteur aux ARNs découvert, et reconnaît l'ARN double brin (dsRNA) caractéristique des virus mais peut également reconnaître un analogue (utilisé pour mimer l'infection virale), le Poly(I:C) (Alexopoulou, Holt et al. 2001). Les récepteurs TLR7 et TLR8 reconnaissent l'ARN simple brin (ssRNA) riche en G/U (Heil, Hemmi et al. 2004) et notamment l'ARN de virus tel que le virus de la grippe A ou le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), mais peut également détecter les petits ARNs interférents ainsi qu'un ligand synthétique antiviral, l'imidazoquinoléine (**Figure 3 et Tableau 1**).

En 2003, Diebold et al. montrent que l'introduction de Poly(I:C) dans le cytosol permet d'induire la sécrétion d'interférons de type I de manière indépendante du TLR3 (Diebold, Montoya et al. 2003). En effet, c'est plus tardivement, que d'autres familles de récepteurs intracellulaires, situés au niveau du cytosol, ont été mis en évidence. C'est notamment le cas des RLRs (RIG-I-Like Receptors) qui reconnaissent des acides nucléiques viraux. RIG-I est le premier récepteur de la famille des RLRs mis en évidence en 2004 (Yoneyama, Kikuchi et al. 2004) suivi de MDA5 (Melanoma Differentiation-Associated protein 5) et du régulateur négatif LGP2 (Probable ATP-dependent RNA helicase DHX58) (Yoneyama, Kikuchi et al. 2005).

L'activation de ces récepteurs PRRs induit de manière générale le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques du récepteur telles que MyD88 (Myeloid Differentiation primary response protein MyD88) pour les TLR1,2,5,6,7,8 et 9, TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$ ) pour les TLR3 et 4, ou encore MAVS (également appelé IPS-1/VISA/CARDIF) pour les RLRs. Ces protéines adaptatrices permettent le recrutement et la translocation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B, IRF3 ou encore IRF7, responsables de la transcription de cytokines pro-inflammatoires et d'interférons de type I, indispensables pour la mise en place d'une réponse immunitaire efficace contre les pathogènes (Kawai and Akira 2010, O'Neill, Golenbock et al. 2013, Wu and Chen 2014) (**Figure 3**).

## D. Activation de la réponse immunitaire par les cellules tumorales

### 1. Théorie du danger

L'ensemble des récepteurs PRRs semblent principalement reconnaître des molécules associées aux pathogènes. Néanmoins, malgré la mise en évidence d'une immunosurveillance antitumorale, les mécanismes permettant la reconnaissance des cellules tumorales par le système immunitaire ne restent que partiellement expliqués. Si pendant longtemps il a été considéré que le système immunitaire discriminait le « soi » du « non soi », certaines observations ne peuvent être expliquées avec cette théorie. En effet, certains composants du soi peuvent déclencher une réponse immunitaire, comme c'est le cas pour les cellules tumorales, mais également des réactions auto-immunes envers nos propres cellules. A l'inverse, le « non soi » peut également être toléré par l'organisme comme c'est le cas pour les bactéries commensales de l'intestin ou encore le fœtus.

C'est en 1994 que Polly Matzinger énonce une théorie, selon laquelle le système immunitaire aurait comme fonction de répondre plus largement à des signaux de danger (Matzinger 1994). Cette théorie soutient davantage l'hypothèse de l'immunosurveillance anticancéreuse étant donné que les cellules tumorales sont des cellules endommagées (de par leur instabilité génomique et la dérégulation de leur métabolisme), et capables d'émettre des signaux pro-inflammatoires (Hanahan and Weinberg 2011), notamment suite à une mort cellulaire dite « immunogène » (Immunogenic Cell Death, ICD) (Garg and Agostinis 2017), qui se caractérise par la libération de signaux de danger permettant l'activation des cellules immunitaires.

### 2. Alarmines et signaux de danger de l'environnement tumoral

#### *a. Découverte et exemple d'alarmine*

Ainsi, si les récepteurs PRRs reconnaissent des molécules appelées PAMPs par Charles Janeway, la théorie du danger de Matzinger a conduit à la découverte d'autres molécules associées à l'inflammation et aux lésions cellulaires. Ces molécules appelées « DAMPs » (pour Damage-Associated Molecular Pattern) ou encore « alarmines » proposé par Oppenheim, peuvent notamment être libérées par des cellules stressées endommagées, ou mourantes telles qu'il en existe au niveau des lésions tumorales (Oppenheim and Yang 2005, Garg and Agostinis 2017). Ces

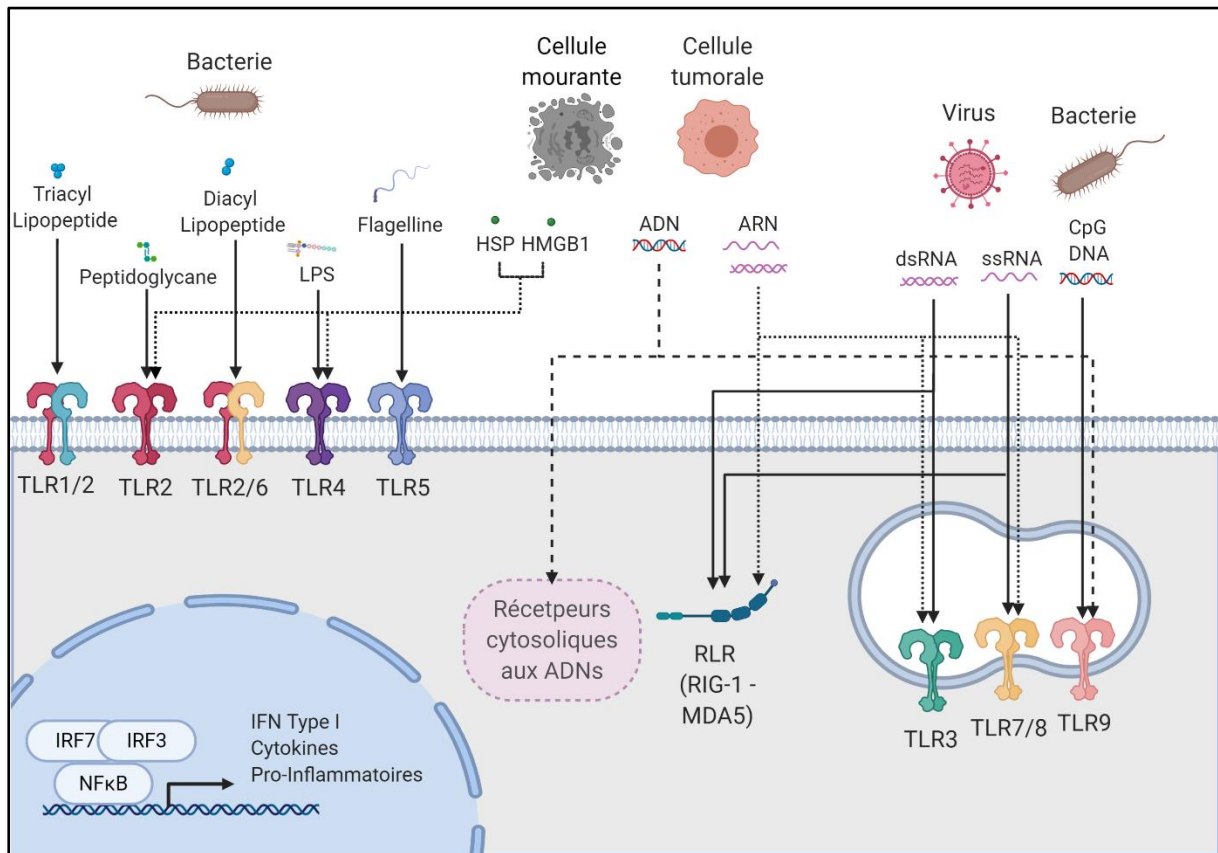
molécules sont généralement caractérisées par une libération rapide, et parfois accrue, après une infection ou une blessure, une mobilité importante et une reconnaissance spécifique par un récepteur. Par ailleurs, elles ont généralement un rôle physiologique intracellulaire avant de devenir des signaux de danger une fois libérées dans l'espace extracellulaire. C'est par exemple le cas d'HMGB1 qui possède initialement une fonction de protéine chaperonne de l'ADN, mais qui, une fois libérée par les cellules nécrotiques, permet d'activer le système immunitaire et d'induire l'inflammation (Scaffidi, Misteli et al. 2002). De nombreux signaux de danger peuvent ainsi circuler dans l'environnement tumoral ou au niveau de tissus endommagés, tels que l'IL-1, le TNF- $\alpha$ , l'ATP, ou certaines protéines de choc thermique (Heat Shock Protein-HSP) qui sont libérées à la suite de la mort immunogène des cellules et déclenchant alors l'inflammation.

#### *b. Les acides nucléiques comme signaux de danger*

Par ailleurs les cellules tumorales sont caractérisées par une instabilité génétique, possèdent de nombreuses mutations, et sont sujettes au stress et aux altérations métaboliques (Hanahan and Weinberg 2011), pouvant ainsi conduire à la libération d'acides nucléiques endommagés. Ainsi les acides nucléiques, qu'ils proviennent de pathogènes ou de cellules endommagées et/ou mourantes, y compris les cellules tumorales, peuvent induire une réponse immunitaire via les récepteurs PRRs (Barbalat, Ewald et al. 2011). Notamment, il a été montré que l'ARN messager (mRNA) libéré par des cellules endommagées ou nécrotiques pouvait être reconnu par le TLR3 et ainsi activer les cellules dendritiques (Karikó, Ni et al. 2004). De la même manière l'ADN mitochondrial (mitDNA) peut être détecté par le TLR9 (Zhang, Raouf et al. 2010) (**Figure 3 et Tableau 1**). Certaines molécules ont d'ailleurs été décrites comme médiatrices pour la prise en charge de ces acides nucléiques libérés par les cellules mourantes. C'est d'ailleurs le cas d'HMGB1 qui une fois complexée à de l'ADN ou de l'ARN peut induire l'activation des récepteurs TLR9 ou encore des TLR3 et TLR7 (Ivanov, Dragoi et al. 2007, Tian, Avalos et al. 2007, Yanai, Ban et al. 2009). Il en est de même pour le peptide anti-microbien LL37 qui associé respectivement à de l'ADN ou de l'ARN du soi est reconnu par le TLR9 ou les TLR7/8 (Lande, Gregorio et al. 2007, Ganguly, Chamilos et al. 2009). D'autres protéines ont également été décrites



pour faciliter la reconnaissance des cellules nécrotiques tels que CLEC9A (Sancho, Joffre et al. 2009) ou CD205 (Shrimpton, Butler et al. 2009).



**Figure 3 : Les récepteurs PRRs et la détection du danger**

Les récepteurs TLRs extracellulaires permettent la détection de multiples composants bactériens mais également des protéines libérées par les cellules mourantes comme l'HMGB1. D'autres récepteurs tels que les TLRs endosomaux ou les récepteurs cytosoliques permettent la détection d'acides nucléiques issus de virus, de bactéries ou de cellules mourantes. L'activation de ces récepteurs stimule la réponse immunitaire innée et induit la production de cytokines pro-inflammatoires et d'Interférons de type I par l'intermédiaire des facteurs de transcription IRF3 et NF-κB. Schéma réalisé avec Biorender.

### 3. Intérêts thérapeutiques des récepteurs PRRs dans le traitement du cancer

Les études pionnières d'immunothérapies de Coley avaient déjà mis en lumière que certaines infections pouvaient conduire à la régression des tumeurs. En effet si l'injection de toxines bactériennes (issus de *Streptococcus erysipelas* et *Bacillus prodigiosus*) avait permis la régression de sarcomes, les premiers patients sont morts des suites de l'infection. Mais l'utilisation d'une mixture composée de bactéries tuées et inactivées par la chaleur, appelée toxine de Coley, a permis le traitement de nombreux sarcomes inopérables aux cours de sa carrière. Bien que ces travaux aient été fortement controversés et mis de côté par la communauté scientifique, il est

maintenant clair que ces observations étaient liées à la stimulation du système immunitaire à la suite de la reconnaissance de motifs bactériens par les récepteurs PRRs.

#### *a. Utilisation d'agonistes de PRRs pour le traitement du cancer*

Aujourd'hui, bien que la toxine de Coley ne soit plus utilisée, des thérapies fondées sur l'utilisation d'agonistes des récepteurs PRRs sont aujourd'hui développées (**Tableau 1**) (Adams 2009, Li, Qu et al. 2017, Braunstein, Kucharczyk et al. 2018). Un des exemples les plus connus, et approuvé en clinique, est la « thérapie BCG » pour traiter le cancer de la vessie, qui repose sur l'injection locale (intra vésicale) de Bacille de Calmette Guérin (BCG). En effet, initialement découvert par deux français de l'institut Pasteur et utilisé comme vaccin pour le traitement de la tuberculose, le BCG (souche vivante atténuée de *Mycobacterium bovis*) permet d'activer les TLR2, TLR4 et TLR9 et de stimuler la réponse immunitaire au site de la tumeur (Herr and Morales 2008).

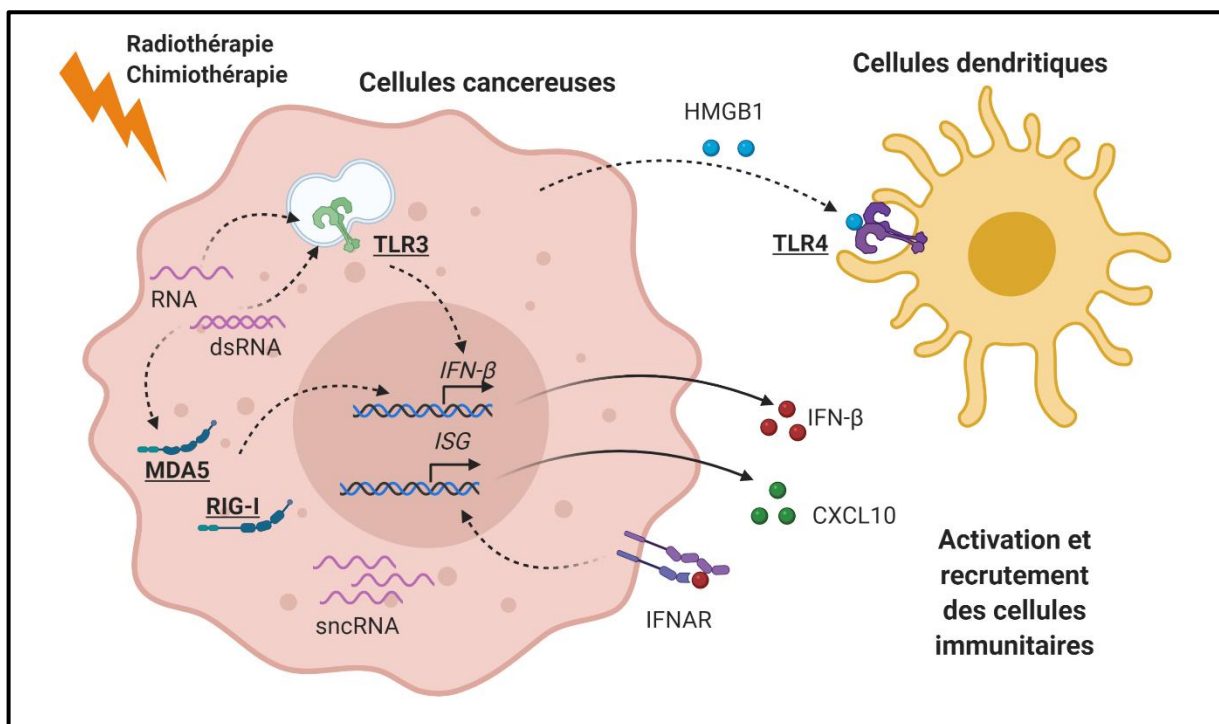
Néanmoins très peu d'agonistes de PRR ont été approuvés pour une utilisation clinique en monothérapie par manque d'efficacité. Seul deux autres agonistes de TLR sont aujourd'hui approuvés en clinique, l'Imiquimod et le Monophosphoryl lipid A (MPLA) (**Tableau 1**). Par ailleurs, si la stimulation des récepteurs PRRs peut conduire à des effets antitumoraux via l'activation du système immunitaire, elle peut également dans certains cas avoir des effets délétères en promouvant l'inflammation et la tumorigenèse (Fabbri, Paone et al. 2012, Liu, Gu et al. 2016). Ce double effet dépend du contexte, en particulier du type de PRR activé et du type de cancer.

#### *b. Thérapies favorisant l'activation des récepteurs PRRs*

L'utilisation de certaines thérapies traditionnelles induisant une mort immunogène des cellules tumorales permet notamment d'accentuer ce phénomène de détection du danger par les récepteurs PRRs. Il a notamment été montré que l'HMGB1 libéré par les cellules tumorales mourantes, à la suite de traitements par chimiothérapie ou radiothérapie, pouvait être reconnu par le TLR2 ou le TLR4 des cellules dendritiques et induire une réponse immunitaire antitumorale favorisant la régression des tumeurs (Apetoh, Ghiringhelli et al. 2007, Curtin, Liu et al. 2009). La radiothérapie pourrait également conduire à l'accumulation intracellulaire de petits



ARNs non codants (sncRNA), responsables de l'activation du récepteur cytosolique RIG-1 et conduisant à la sécrétion d'interférons de type I, à l'origine d'une meilleure efficacité du traitement par radiations ionisantes dans plusieurs types de cancers (Ranoa, Parekh et al. 2016). Par ailleurs, une étude a montré que les anthracyclines, agents intercalants de l'ADN utilisés comme chimiothérapies, auraient des effets dépendants du système immunitaire. En effet les anthracyclines conduiraient à la libération d'ARNs par les cellules tumorales mourantes et à l'expression d'Interférons de type I et de gènes induits par les Interférons (Interferons Stimulated Genes, ISG), tels que *Cxcl10* ou *Mx1*, et ce par l'intermédiaire des récepteurs TLR3 et IFNAR. L'expression du métagène des Interférons ou plus précisément l'expression de *Mx1* constituerait ainsi un biomarqueur permettant de prédire l'efficacité des traitements par anthracyclines chez les patients atteints de cancer du sein (Sistigu, Yamazaki et al. 2014). D'autres chimiothérapies comme des agents de déméthylation de l'ADN/Inhibiteurs d'ADN méthyltransférase semblent induire une détection d'ARNs double brin (dsRNA) par les récepteurs TLR3 ou encore MDA5, permettant la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale dépendante des Interférons de Type I (Chiappinelli, Strissel et al. 2015, Roulois, Loo Yau et al. 2015) (**Figure 4**).



**Figure 4 : Activation des récepteurs aux acides nucléiques par les chimio et radiothérapies**

Les thérapies anticancéreuses telles que les chimiothérapies ou la radiothérapie, induisent la mort immunogène des cellules tumorales et peuvent également induire l'accumulation et/ou l'endommagement d'acides nucléiques. Ces phénomènes favorisent l'activation des récepteurs PRR et l'activation du système immunitaire. Schéma réalisé avec Biorender.

Aujourd'hui de plus en plus d'essais cliniques ont pour but de trouver des combinaisons thérapeutiques efficaces en associant des agonistes de récepteurs PRRs avec d'autres thérapies telles que la chimiothérapie, la radiothérapie mais également l'immunothérapie (Bai, Li et al. 2020).

**Tableau 1 : Ligands et agonistes thérapeutiques des récepteurs PRRs**

Récepteurs	Protéines adaptatrices	Ligands		
		Pathogènes	Cellules mourantes	Agonistes thérapeutiques
<b>TLR1-2</b>	Myd88	Triacyl Lipopeptide	-	Amplivant
<b>TLR2</b>	Myd88	Peptidoglycane	HSP70, HMGB1	<b>BCG</b>
<b>TLR4</b>	Myd88/TRIF	LPS	HSP70, HMGB1	<b>BCG, AS04-MPLA</b>
<b>TLR5</b>	Myd88	Flagelline	-	Entolimod (CBLB502-Dérivé de Flagelline)
<b>TLR6-2</b>	Myd88	Diacyl Lipopeptide	-	-
<b>TLR3</b>	TRIF	dsRNA(virus)	mRNA, exosomal RNA	Poly-ICLC, Poly I:C, Hiltonol
<b>TLR7/8</b>	Myd88	ssRNA(RNA virus)	nucleic acid, microRNA	PolyICLC, Resiquimod, <b>Imiquimod</b> , 852A
<b>TLR9</b>	Myd88	CpGDNA (bactérie) DNA (virus)	Histones, mitDNA	<b>BCG</b> , CpG-ODN
<b>RIG-I</b>	IPS-1 (CARD, MAVS)	dsRNA (virus)	dsRNA, snRNA	5' ppp-siRNA for Bcl-2 or TGF- $\beta$ , HVJ-E, BO-112 (Poly(I:C))
<b>MDA5</b>	IPS-1 (CARD, MAVS)	dsRNA (virus)	dsRNA	BO-112 (Poly(I:C))

### III. STING, protéine clé de la réponse aux ADN cytosoliques

#### A. Découverte et fonction de STING

##### 1. Mise en évidence

###### a. *A la recherche des mécanismes de détection de l'ADN*

Les mécanismes de détection de l'ADN sont longtemps restés peu connus, et seul le récepteur TLR9 était décrit comme capable de détecter l'ADN bactérien riche en CpG. En 2006 deux études provenant des groupes de Medzhitov et d'Akira ont mis en évidence l'existence de voies de signalisation alternatives impliquées dans la détection de l'ADN (poly(dA:dT) et ISD), dépendant de TBK1 et d'IRF3, sans pour autant identifier de récepteur cytosolique (Ishii, Coban et al. 2006, Stetson and Medzhitov 2006). C'est en 2007 que le premier récepteur cytosolique aux ADN a été mis en évidence dans des fibroblastes, connu sous le nom de DAI (DNA-dependent Activator of Interferon-regulatory factors, aussi appelé ZBP-1) et permettant la détection de l'ADN double brin (dsDNA) poly(dA-dT) (Takaoka, Wang et al. 2007). Néanmoins il semblerait que le rôle de ce récepteur soit spécifique à certains types cellulaires étant donné qu'aucun rôle de DAI n'ait été décrit dans les macrophages (Unterholzner, Keating et al. 2010) ni *in vivo* (Ishii, Kawagoe et al. 2008) suggérant l'existence d'autres mécanismes de détection de l'ADN. Un autre mécanisme, découvert en 2009, implique la RNA polymérase III qui est capable de transcrire l'ADN double brin riche en A/T en ARN contenant des extrémités 5'-triphosphates qui sont ensuite reconnues par le récepteur cytosolique aux ARNs RIG-I (Ablasser, Bauernfeind et al. 2009, Chiu, Macmillan et al. 2009)(**Figure 5**).

###### b. *STING, protéine essentielle pour la réponse immunitaire antivirale*

Afin de mieux comprendre les mécanismes de la réponse immunitaire innée, Glenn Barber et son équipe réalise en 2008 un criblage en transfectant des milliers d'ADNc humains et murins dans des cellules 293T exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle du promoteur de l'IFN- $\beta$ . Ils mettent ainsi en évidence 5 gènes dont la surexpression permet une forte induction d'IFN- $\beta$ -Luc. Parmi ces 5 gènes figurent les protéines adaptatrices MAVS (également connu sous le noms de IPS-1, VISA ou CARDIF) et TRIF, les facteurs de transcription IRF1 et RelA/P65 mais également une

nouvelle protéine qu'ils ont alors appelé STING pour STimulator of INterferon Genes (Ishikawa and Barber 2008). Au même moment 3 autres études ont également mis en évidence cette protéine, que les auteurs ont respectivement appelée MITA, MPYS ou encore ERIS (Jin, Waterman et al. 2008, Zhong, Yang et al. 2008, Sun, Li et al. 2009). Sun et al. confirment ainsi les données de Barber, et montrent que la dimérisation de la protéine ERIS (pour Endoplasmic Reticulum Interferon Stimulator) est nécessaire pour l'induction d'IFN- $\beta$  en réponse aux ARNs et ADNs cytosoliques (Sun, Li et al. 2009). Pour Zhong et al., la protéine MITA (pour Mediator of IRF3 Activation), permet d'induire l'expression d'IFN- $\beta$  par l'intermédiaire d'IRF3 en réponse aux virus (Zhong, Yang et al. 2008).

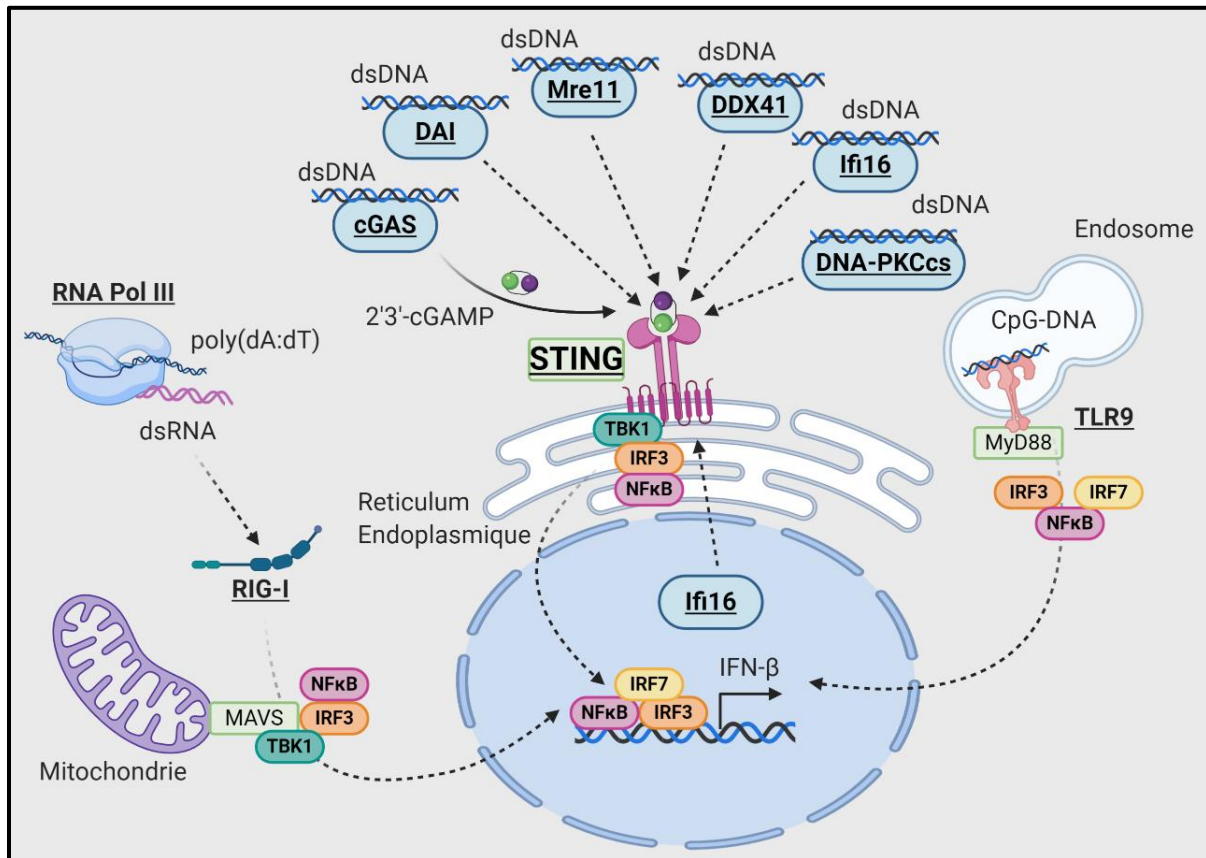
Localisée au niveau du réticulum endoplasmique, STING est une protéine transmembranaire de 42 KDa impliquée dans l'expression d'interférons de type I essentiels dans la réponse contre les pathogènes. En effet, l'utilisation du modèle murin (STING<sup>-/-</sup>) a permis de montrer qu'une déficience pour cette protéine entraîne la perte d'expression d'IFN- $\beta$  en réponse à de nombreux ADNs (ISD ou ADNs issus d'HSV-1, d'Adenovirus ou d'E.Coli) mais conduit surtout à une forte létalité des souris à la suite d'une infection par le virus HSV (Ishikawa, Ma et al. 2009).

## 2. STING : une protéine qui cumule les fonctions de protéine adaptatrice et de récepteur

### a. *STING comme protéine adaptatrice*

Cette protéine codée par le gène *Tmem173* ou *Sting1* a été décrite comme protéine adaptatrice au même titre que MAVS (associée aux récepteurs RLRs) ou MyD88 et TRIF (associées aux récepteurs TLRs). De nombreux autres récepteurs cytosoliques ont par la suite été découverts tels que DDX41 (Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41) (Zhang, Yuan et al. 2011), cGAS (cyclic GMP-AMP Synthase) (Sun, Wu et al. 2013), DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit) (Ferguson, Mansur et al. 2012) ou encore Mre11 (Double-strand break repair protein MRE11A) (Kondo, Kobayashi et al. 2013), avec chacun une spécificité différente, et l'induction d'interférons par ces récepteurs est, dans la plupart des cas, dépendante de STING (Unterholzner 2013) (**Figure 5**). Par ailleurs, bien que MAVS soit la protéine adaptatrice principale associée aux récepteurs MDA5 et RIG-I, la protéine STING

serait requise pour un meilleur fonctionnement de la voie RIG-I (Ishikawa and Barber 2008).



### Figure 5 : Les mécanismes de détection de l'ADN

La détection de l'ADN par les cellules immunitaires peut se faire grâce au TLR9 situé dans les endosomes, ou par l'intermédiaire de la RNA Polymérase III. La protéine STING, qui cumule les fonctions de récepteur et de protéine adaptatrice, peut directement être activée par des ligands tels que le 2'3'-cGAMP synthétisé par la protéine cGAS, ou par l'intermédiaire des multiples récepteurs aux ADNs (DAI, Mre11, DDX41, Ifi16, DNA-PKCs). Adapté de (Unterholzner, 2013), réalisé avec Biorender.

#### b. STING comme récepteur

En plus de sa fonction de protéine adaptatrice, STING cumule également la fonction de récepteur. En effet c'est un peu plus tardivement, en 2011, que les premiers ligands de STING ont été identifiés : les di-nucléotides cycliques, seconds messagers bactériens, c-di-GMP et c-di-AMP (Burdette, Monroe et al. 2011, Jin, Hill et al. 2011), suivi du di-nucléotide cyclique, second messenger également, cGAMP (cyclic GMP-AMP) (Diner, Burdette et al. 2013, Gao, Ascano et al. 2013, Wu, Sun et al. 2013). C'est la protéine cGAS (Cyclic GMP-AMP Synthase) qui permet la synthèse du 2'3'-cGAMP, en réponse à des ADNs double brin cytosoliques (Sun, Wu et al. 2013). Par ailleurs,

Barber montre dans une étude que STING aurait la capacité d'interagir et de s'associer directement avec des ADNs double brin et simple brin (dsDNA-ssDNA) (Abe, Harashima et al. 2013), néanmoins aucune autre étude n'a décrit ce phénomène de détection directe des ADNs par la protéine STING. STING joue ainsi un rôle prédominant dans la réponse aux acides nucléiques cytosoliques.

## B. Voies de signalisation cGAS-STING

### 1. Activation de la voie cGAS-STING

Lors de la fixation d'un ligand (cGAMP ou autres di-nucléotides cycliques, CDN), la protéine STING change de conformation. Ce changement de conformation semble être différent en fonction du ligand et de l'espèce, et lui permet de se polymériser (Ergun, Fernandez et al. 2019, Shang, Zhang et al. 2019). A la suite de son activation, la protéine STING va être relocalisée du réticulum endoplasmique au trans Golgi grâce à des mécanismes impliquant des protéines de l'autophagie et conduisant à la formation de vésicules COP-II, ou ERGIC (ER-Golgi intermediate compartments). Ces vésicules peuvent ensuite former des autophagosomes permettant ainsi la dégradation des ADNs intracellulaires (Saitoh, Fujita et al. 2009, Dobbs, Burnaevskiy et al. 2015, Gui, Yang et al. 2019). Dans le Golgi, STING qui joue le rôle de protéine adaptatrice, permet le recrutement et la phosphorylation de TBK1 qui phosphoryle STING en retour, ce qui permet le recrutement d'IRF3 au niveau du complexe et sa phosphorylation par TBK1 (Tanaka and Chen 2012, Barber 2015, Liu, Cai et al. 2015, Zhang, Shang et al. 2019). Comme lors de son recrutement par les autres protéines adaptatrices associées aux récepteurs PRRs, IRF3 se dimérise pour entrer dans le noyau et activer la transcription des interférons de type I (tels que l'IFN- $\beta$ ) (Ishikawa, Ma et al. 2009, Burdette and Vance 2013)(**Figure 6**). Les Interférons permettent par la suite d'induire l'expression de gènes appelés ISG (Interférons Stimulated Genes) par l'intermédiaire du récepteur aux interférons de type I IFNAR.

En plus d'IRF3, STING permet également l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B. En effet, TBK1 conduit également à la phosphorylation et au recrutement de la sous-unité P65/RelA de NF- $\kappa$ B, nécessaire à l'induction de gènes pro-inflammatoires (**Figure 6**), mais également à l'activation de la voie non canonique de NF- $\kappa$ B impliquant les protéines TRAF3 et NIK (Abe and Barber 2014). Par ailleurs, une étude a décrit une activation non-canonique de la voie STING. Cette voie alternative



n'implique pas la détection d'ADN par cGAS mais serait une réponse beaucoup plus précoce en réponse à des lésions à l'ADN (induit par l'agent étoposide) dans le noyau et conduit à une activation de STING dépendante du récepteur IFI16 et du facteur de réponse aux cassures de l'ADN double brin (ATM). Cette voie conduit à une activation préférentielle de NF- $\kappa$ B, plutôt qu'IRF3, et implique l'ubiquitination de STING par TRAF6 (Dunphy, Flannery et al. 2018). Dans certains cas, L'activation de STING permet également le recrutement du facteur de transcription IRF7 (Suschak, Wang et al. 2016, Ruangkiattikul, Nerlich et al. 2017).

## 2. Régulation de la voie cGAS/STING

### a. *Régulation de la détection des ADNs*

Si la voie de signalisation cGAS-STING est indispensable pour la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale efficace, il est surprenant que cGAS ne fasse pas de distinction entre les ADNs endogènes normaux ou endommagés et les ADNs exogènes. Ainsi, afin d'éviter une activation aberrante de STING et des réactions auto-immunes, un point clé de la régulation de la voie cGAS-STING se trouve dans la compartimentation cellulaire. En effet l'ADN est localisé en condition normale dans le compartiment nucléaire (ou dans les mitochondries), et la présence d'ADN dans un autre compartiment (extracellulaire, cytoplasme etc..) est associée à un danger après avoir été reconnu par les différents récepteurs à l'ADN dont STING. Si la séquence de l'ADN ne semble pas affecter l'activité de la protéine cGAS, il a été montré que l'activation de cGAS était dépendante de la longueur des ADNs détectés, de leur concentration, et de leur structure (Luecke, Holleufer et al. 2017, Ablasser and Hur 2020). Par ailleurs, des enzymes ont pour rôle de dégrader les acides nucléiques localisés dans des compartiments non appropriés. Il s'agit d'enzymes telles que la DNase I dans l'espace extracellulaire, la DNase II dans les lysosomes, Trex1 dans le cytoplasme (**Figure 6**) ou encore la RNase H2 qui permet la dégradation des hybrides ADNs-ARNs. De ce fait, une déficience de l'une de ses enzymes peut conduire à des réactions et maladies auto-immunes inflammatoires dépendantes de STING (Stetson, Ko et al. 2008, Ahn, Gutman et al. 2012, Mackenzie, Carroll et al. 2016, Rodero, Tesser et al. 2017)

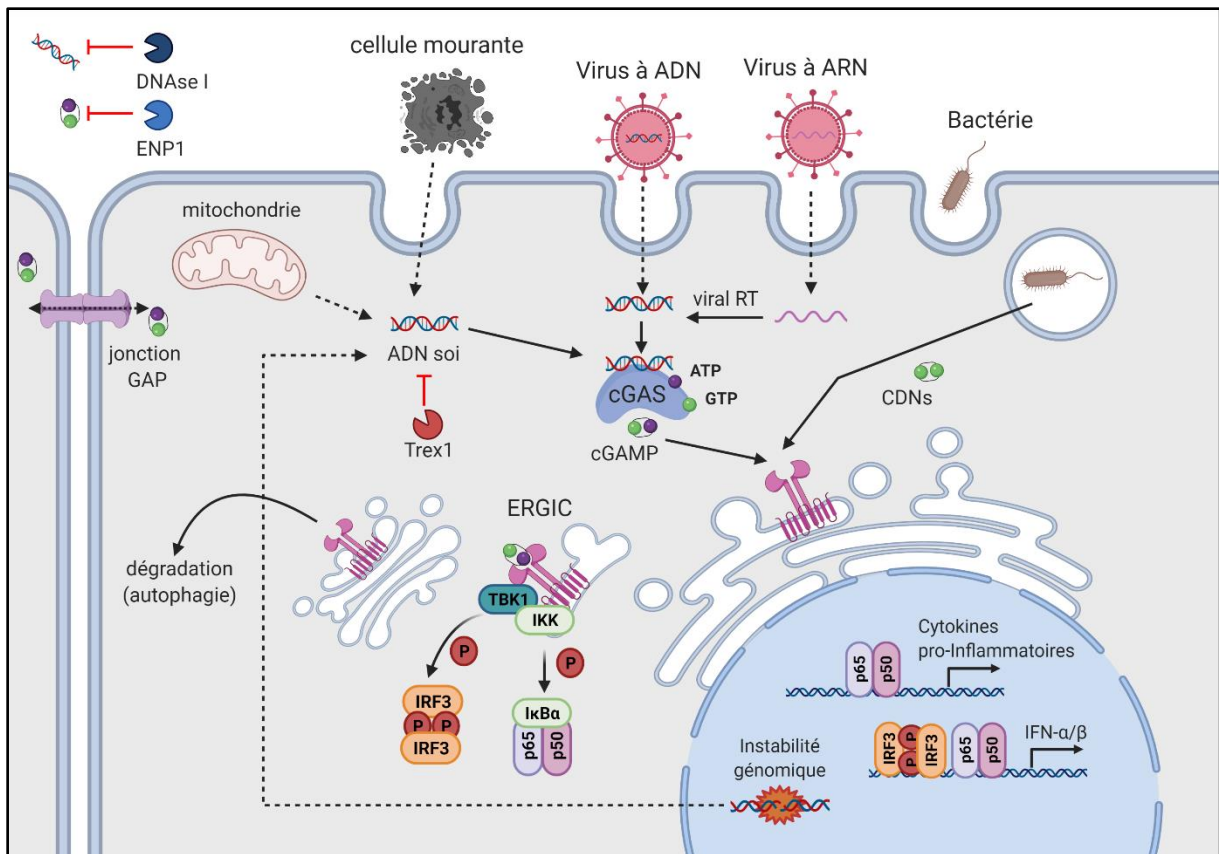
### *b. Des agonistes de STING aux affinités variables*

La protéine STING a la capacité de se lier et d'être activée par différents ligands, que ce soit des di-nucléotides cycliques (CDNs) naturels (cGAMP, c-di-AMP...) ou des ligands synthétiques (DMXAA, CMA), ayant chacun des affinités différentes et conduisant à des réponses variables (Chen, Sun et al. 2016). C'est en réponse aux ADNs cytosoliques que la protéine cGAS permet la synthèse endogène du second messenger 2'3'-cGAMP, qui est le ligand naturel de STING avec l'affinité la plus élevée. Par ailleurs, le second messenger 2'3'-cGAMP a la particularité de permettre la communication intercellulaire par transfert intracellulaire (Ablasser, Schmid-Burgk et al. 2013) (cellules infectées ou tumorales (Marcus, Mao et al. 2018)) ou par l'intermédiaire de virus (Bridgeman, Maelfait et al. 2015, Gentili, Kowal et al. 2015), permettant la mise en place d'une réponse immunitaire plus rapide. Ce phénomène est cependant régulé par la présence extracellulaire de l'enzyme ENPP1 permettant la dégradation du 2'3'-cGAMP (Li, Yin et al. 2014) (**Figure 6**).

### *c. Modifications post-traductionnelles de STING*

D'autres mécanismes de régulation de la voie cGAS-STING ont été décrits. En effet, des modifications post traductionnelles de STING incluant la phosphorylation (Konno, Konno et al. 2013), la palmylation (Mukai, Konno et al. 2016) ou la polyubiquitination semblent nécessaires pour la fonctionnalité de la voie STING mais également impliquées dans la mise en place d'un rétrocontrôle négatif de cette dernière via la dégradation de STING (ou d'autres protéines impliquées dans la voie de signalisation telles que TBK1) par le processus d'autophagie (Konno, Konno et al. 2013, Chen, Sun et al. 2016, Prabakaran, Bodda et al. 2018) (**Figure 6**).





**Figure 6 : La voie de signalisation cGAS-STING :**

Dans les cellules myéloïdes, la protéine STING située au niveau du réticulum endoplasmique, reconnaît directement les dinucléotides cycliques (CDNs) ou le 2'3'-cGAMP synthétisé par la protéine cGAS en réponse aux ADNs issus de bactéries, de virus, ou de cellules mourantes. Son activation induit sa translocation dans l'appareil de golgi, ainsi que la phosphorylation des facteurs de transcription IRF3 et P65 par TBK1. Ces facteurs de transcription sont relocalisés dans le noyau pour induire la production d'Interférons de Type I et de cytokines pro-inflammatoires. Des protéines de dégradation de l'ADN (DNase I, Trex1) ou du 2'3'-cGAMP extracellulaire (ENP1) régulent cette voie de signalisation pour limiter les réactions auto-immunes inflammatoires. Adapté de (Kwon et Bakhoum, 2020) et (Zhu et al., 2019), réalisé avec Biorender.

## C. Rôle de la protéine STING dans les pathologies

### 1. STING et maladies inflammatoires

Bien que la voie de signalisation STING ait été initialement décrite comme nécessaire pour la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale efficace, STING possède des fonctions prédominantes dans d'autres pathologies. En effet, si une réponse inflammatoire transitoire est nécessaire pour lutter contre les pathogènes, une suractivation de la voie de signalisation cGAS-STING peut conduire à des maladies

inflammatoires auto-immunes, telles que le lupus érythémateux systémique (SLE), le syndrome d'Aicardi-Goutière (AGS) ou l'arthrite rhumatoïde (Ahn and Barber 2014).

#### *a. Dérégulation des enzymes de dégradation de l'ADN*

Une dérégulation des mécanismes de détection des acides nucléiques peut conduire à des maladies inflammatoires de la famille des Interféronopathies, associées à une surexpression d'Interférons de Type I, et causées par des mutations héréditaires. Ces maladies peuvent survenir lors d'une accumulation d'ADNs endogènes lorsque le système de dégradation des ADNs est défectueux. Par exemple, une déficience en DNase I conduit à une inflammation chronique dépendante de STING à l'origine de la mort prématurée des souris concernées (Kawane, Ohtani et al. 2006, Ahn, Gutman et al. 2012). De la même manière une déficience en DNase III (trex1) conduit au développement de myocardite inflammatoire et à la mort prématurée des souris (Yang, Lindahl et al. 2007, Stetson, Ko et al. 2008, Ahn, Ruiz et al. 2014), et une mutation de cette protéine chez l'homme peut être à l'origine de plusieurs maladies inflammatoires (Rice, Rodero et al. 2015).

#### *b. Mutations activatrices de STING*

Il existe des polymorphismes de STING chez l'homme, et les patients présentant des syndromes vasculaires et pulmonaires se trouvent avoir des mutations hyperactivatrices de STING (Liu, Jesus et al. 2014). Ce type de maladie est appelé SAVI pour « STING-Associated Vasculopathy with onset in Infancy », et se caractérise par une inflammation systémique survenant à des âges précoces (chez l'enfant) conduisant à une vasculopathie sévère au niveau des extrémités et pouvant aller jusqu'à la nécrose et l'amputation.

Cette pathologie est causée par des mutations « Gain de fonction » (Gain of Function- GOF) du gène *Tmem173*, en particulier des substitutions de certains acides aminés V147L, N154S, V155M conduisant à une stabilisation du domaine de dimérisation de la protéine STING et entraînant son activation constitutive (Jeremiah, Neven et al. 2014, Liu, Jesus et al. 2014). D'autres substitutions C206, R281, R284 au niveau du domaine de liaison avec le cGAMP ont également été décrites (Melki, Rose et al. 2017). Afin de mieux comprendre ces maladies rares, des modèles murins présentant les mutations N153S et V154M ont très récemment été générés (Warner,

Irizarry-Caro et al. 2017, Bouis, Kirstetter et al. 2019, Luksch, Stinson et al. 2019, Motwani, Pawaria et al. 2019).

## 2. Rôle de STING dans le cancer

En plus de son rôle clé dans la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale efficace, et de son implication dans les maladies inflammatoires, STING possède des fonctions prédominantes dans le cancer.

Bien que l'inflammation induite par une activation chronique de STING puisse participer à l'augmentation de la croissance tumorale (Ahn, Xia et al. 2014), et que certaines propriétés pro-tumorales aient été associées à la protéine STING, notamment via l'induction d'indoléamine 2,3 dioxygénase (IDO), inhibiteur des lymphocytes T effecteurs, et activateur des Treg (Lemos, Mohamed et al. 2016), de nombreuses études se sont intéressées à la protéine STING pour son potentiel rôle antitumoral (**Figure 7**).

### *a. Effet antitumoral spontané de la protéine STING*

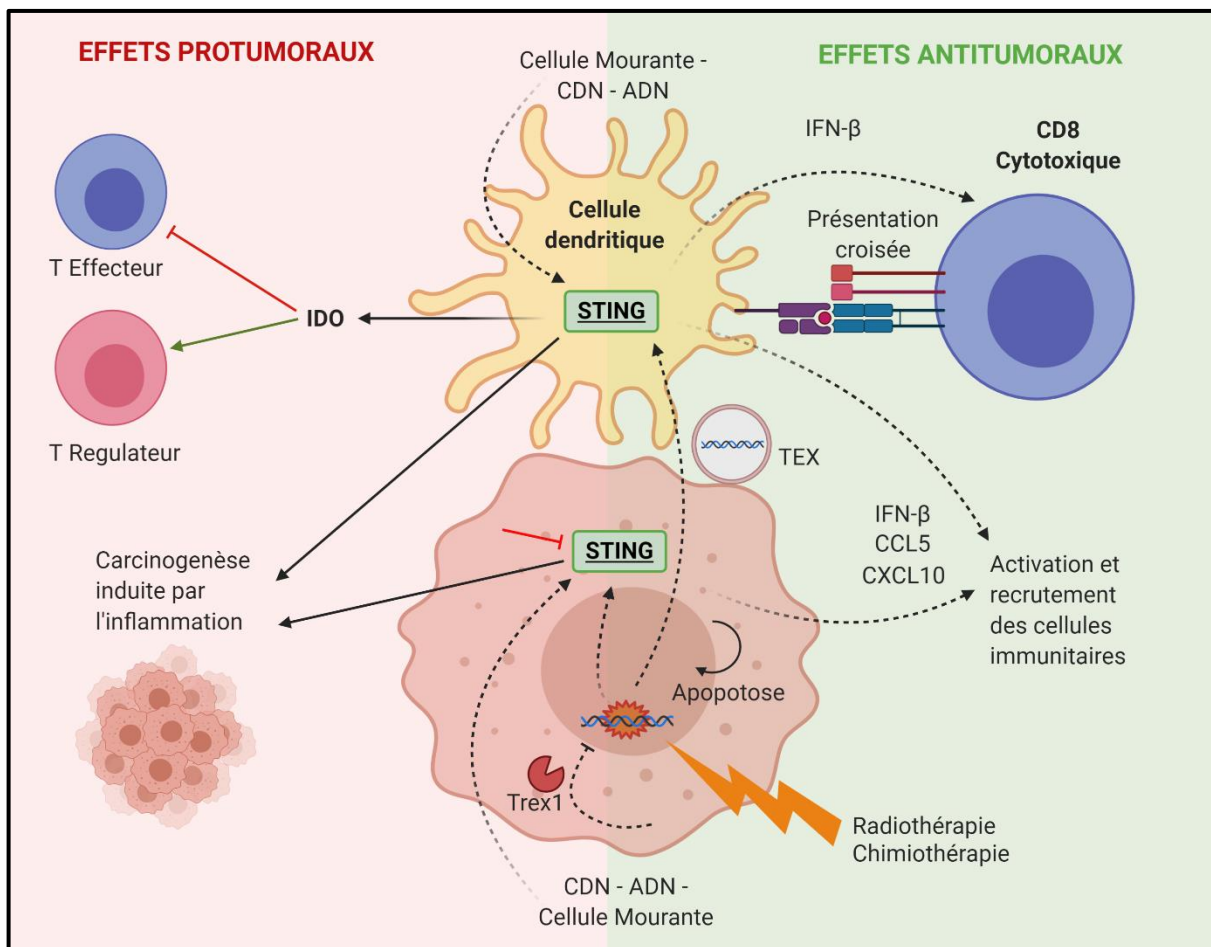
L'activation de STING permet l'induction d'Interférons de type I (Ishikawa, Ma et al. 2009) qui sont particulièrement importants pour l'immunosurveillance antitumorale et le recrutement des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Dunn, Bruce et al. 2005, Diamond, Kinder et al. 2011, Fuertes, Kacha et al. 2011), suggérant un potentiel rôle antitumoral de STING. Par ailleurs, il a été montré que la voie de signalisation cGAS/STING pouvait être activée à la suite de la prise en charge et la détection d'ADNs issus de cellules mourantes par les cellules dendritiques afin d'induire l'expression d'IFN- $\beta$  (Klarquist, Hennies et al. 2014). L'équipe de Gajewski fut la première à mettre en évidence que les souris déficientes pour STING ou IRF3 (Tmem173<sup>-/-</sup> et irf3<sup>-/-</sup>), étaient incapables de rejeter spontanément les tumeurs murines fortement immunogènes 1696 (sarcomes induits par MCA générés dans des souris immunodéficientes) ou B16.SIY (contexte allogénique), contrairement aux souris sauvages. En effet, la détection d'ADNs issus de cellules tumorales mourantes conduit à des effets antitumoraux, dépendants de STING, impliquant la sécrétion d'Interférons de type I par les cellules dendritiques CD8 $\alpha$ , ainsi que le cross-priming et l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Woo, Fuertes et al. 2014)(**Figure 7**).

Néanmoins, la protéine STING n'est pas seulement exprimée au niveau des cellules dendritiques/APC, et l'expression de STING au sein des cellules tumorales permet de moduler leur immunogénicité. En effet, l'activation de la voie STING à la suite de l'endommagement de l'ADN des cellules cancéreuses peut également conduire à la sécrétion d'Interférons de type I et à l'activation des cellules du système immunitaire (Ho, Zhang et al. 2016). Par ailleurs, il a été montré que l'activation de STING au niveau des cellules B malignes pouvait directement induire leur apoptose (Tang, Zundell et al. 2016). C'est pourquoi certains cancers comme les cancers colorectaux ou les mélanomes ont la particularité d'inhiber l'expression de STING (Xia, Konno et al. 2016, Xia, Konno et al. 2016)(**Figure 7**), et que certains oncogènes viraux (tels que les oncogènes E7 ou EA1 issus du papillomavirus ou de l'adénovirus) agissent comme antagonistes pour la voie cGAS-STING (Lau, Gray et al. 2015).

*b. Effets antitumoraux de la radiothérapie et de la chimiothérapie dépendants de STING*

En plus de son implication dans la réponse immunitaire antitumorale spontanée, il a été montré que STING était impliqué dans les effets antitumoraux induits par la radiothérapie ou la chimiothérapie. En effet, en dehors de son action cytotoxique directe sur les cellules tumorales, l'activation des lymphocytes T et les Interférons de type I sont essentiels pour l'efficacité du traitement par radiothérapie (Burnette, Liang et al. 2011). Deng et al. furent les premiers à mettre en évidence le rôle clé de STING dans ce contexte, en démontrant, à l'aide de souris *Tmem173<sup>-/-</sup>*, qu'une déficience en STING (et non Myd88 ou TRIF) diminuait drastiquement l'efficacité de la radiothérapie dans un modèle murin de cancer du côlon MC38 (Deng, Liang et al. 2014). En effet l'ADN issu des cellules tumorales irradiées permet l'activation de la voie cGAS-STING au sein des cellules dendritiques, par l'intermédiaire d'exosomes dérivés de la tumeur (Tumor-derived Exosome TEX) (Diamond, Vanpouille-Box et al. 2018). Par ailleurs, ce phénomène est régulé selon l'intensité et la fréquence des radiations, et plus particulièrement par l'endonucléase *Trex1* qui se trouve être induite par de fortes doses de radiations, réduisant ainsi l'efficacité du traitement (Vanpouille-Box, Alard et al. 2017, Diamond, Vanpouille-Box et al. 2018)(**Figure 7**).

Il en est de même pour les traitements par chimiothérapie. Notamment, l'efficacité des inhibiteurs de la PARP (une enzyme de réparation des lésions à l'ADN) est largement dépendante du recrutement des lymphocytes T CD8 induit par les IFN- $\beta$  et les chimiokines CCL5 et CXCL10 à la suite de l'activation de la voie de signalisation cGAS/STING au sein des cellules cancéreuses, que ce soit en monothérapie dans un modèle murin de cancer du sein triple négatif (TNBC) (Pantelidou, Sonzogni et al. 2019) ou en association avec l'anti-PD-L1 dans un modèle murin de cancer du poumon à petites cellules (SCLC) (Sen, Rodriguez et al. 2019). Des résultats similaires ont été obtenus avec le Teniposide (inhibiteur de l'ADN topoisomérase II) dans des modèles murins de mélanome et de cancer du côlon (Wang, Chen et al. 2019). Pour Kitai et al., le topotecan (l'inhibiteur de l'ADN topoisomérase I) semble également induire la libération d'exosomes dérivés de la tumeur contenant de l'ADN permettant l'activation de STING dans cellules dendritiques et le recrutement des CD8 (Kitai, Kawasaki et al. 2017) (**Figure 7**).





### **Figure 7 : Rôles de STING dans le cancer**

*L'activation de STING peut dans certains cas conduire à des effets protumoraux dépendants de la sécrétion d'IDO par les cellules dendritiques mais également en promouvant la carcinogenèse induite par l'inflammation. A l'inverse la production d'IFN- $\beta$  et des chimiokines CCL5 et CXCL10 induisent respectivement l'activation des cellules T CD8 et le recrutement des cellules immunitaires. Si les chimiothérapies et la radiothérapie favorisent la détection d'ADN tumoraux par les cellules dendritiques, l'expression de Trex1 peut limiter ce phénomène. L'activation de STING peut directement induire la mort des cellules tumorales, néanmoins certains cancers ont la capacité d'inhiber son expression. Schéma réalisé avec Biorender.*

### **3. STING une nouvelle cible thérapeutique ?**

#### *a. Agonistes de STING utilisés en monothérapie*

Depuis plusieurs années, STING est devenu une véritable cible thérapeutique (Rivera Vargas, Benoit-Lizon et al. 2017). Le DMXAA fut un des premiers agonistes de STING utilisé pour le traitement du cancer. Néanmoins, ce composé n'a pas montré d'effet antitumoral satisfaisant en phase III chez l'homme, étant davantage spécifique à la souris (Conlon, Burdette et al. 2013). L'étude du polymorphisme de la protéine STING chez l'homme a par la suite mis en évidence que certains variants de STING ne répondaient pas bien aux agonistes canoniques d'origine bactérienne tels que le c-di-GMP, c-di-AMP et 3'3'-cGAMP (Yi, Brendel et al. 2013). En revanche le 2'3'-cGAMP produit par la protéine cGAS des mammifères peut (contrairement au 3'3'-cGAMP d'origine bactérienne) activer la voie STING chez l'homme en raison de sa nature non canonique et sa liaison phosphodiester 2'-5' (Diner, Burdette et al. 2013, Zhang, Shi et al. 2013), et permettre le contrôle de la croissance tumorale (Demaria, De Gassart et al. 2015). La découverte de ENPP1, enzyme impliquée dans la dégradation du 2'3'-cGAMP par hydrolyse des liaisons de type phosphodiester, a conduit à l'élaboration de ligands (2'3'-cG<sup>S</sup>A<sup>S</sup>MP et ML RR-S2 CDA) résistants à cette hydrolyse par l'ajout de ponts disulfures (Li, Yin et al. 2014, Corrales, Glickman et al. 2015).

Ainsi, l'activation de STING dans l'environnement tumoral, qu'elle soit spontanée, induite par des traitements favorisant la mort immunogène des cellules tumorales, ou par des agonistes de STING, permet de moduler la réponse immunitaire anticancéreuse à différentes étapes du cycle de l'immunité cancéreuse. En effet, l'activation de STING peut induire la mort des cellules cancéreuses, en particulier des cellules B malignes, par des mécanismes impliquants le CMH-II (Jin, Waterman et al. 2008) ou la voie de signalisation IRE-1/XBP-1 (Tang, Zundell et al. 2016), conduisant ainsi à la libération d'antigènes associés à la tumeur. De plus, l'activation de STING

est également nécessaire pour faciliter la maturation des cellules dendritiques, mais également la présentation d'antigènes tumoraux et le cross-priming médié par les interférons de type I (Deng, Liang et al. 2014, Škrnjug, Guzmán et al. 2014, Wang, Hu et al. 2017), conduisant ainsi à l'activation des T CD8 (Woo, Fuertes et al. 2014, Demaria, De Gassart et al. 2015, Fu, Kanne et al. 2015). Par ailleurs, des études ont montré une infiltration des cellules T CD8 au sein de la tumeur par l'intermédiaire des chimiokines Cxcl10 et Ccl5 (Ohkuri, Ghosh et al. 2014, Ohkuri, Kosaka et al. 2017).

#### *b. Agonistes de STING en association avec d'autres stratégies d'immunothérapie*

Ces multiples rôles de STING sur le microenvironnement tumoral, permettant notamment le « réchauffement » de la tumeur en activant et favorisant le recrutement des cellules immunitaires innées et adaptatives, font de cette protéine une cible prometteuse pour une association avec d'autres thérapies. Bien que l'utilisation de chimiothérapies et radiothérapies semble déjà, dans une certaine mesure, activer indirectement la voie de signalisation STING, l'efficacité de ces stratégies peut augmenter lorsqu'elles sont associées à des agonistes de STING. En effet, il a été montré dans un modèle murin de cancer du pancréas que le di-thio c-di-GMP (RR-CDG, c-di-GMP modifié par l'ajout de pont disulfure) associé à la radiothérapie permettait la régression des tumeurs (Baird, Friedman et al. 2016). Deng et al., ont obtenu des résultats similaires avec le cGAMP dans le modèle de cancer du côlon MC38 (Deng, Liang et al. 2014). Le cGAMP permet également une meilleure activité et une toxicité réduite du 5-Fu dans un modèle murin de cancer du côlon (Li, Cheng et al. 2016)(**Figure 8**).

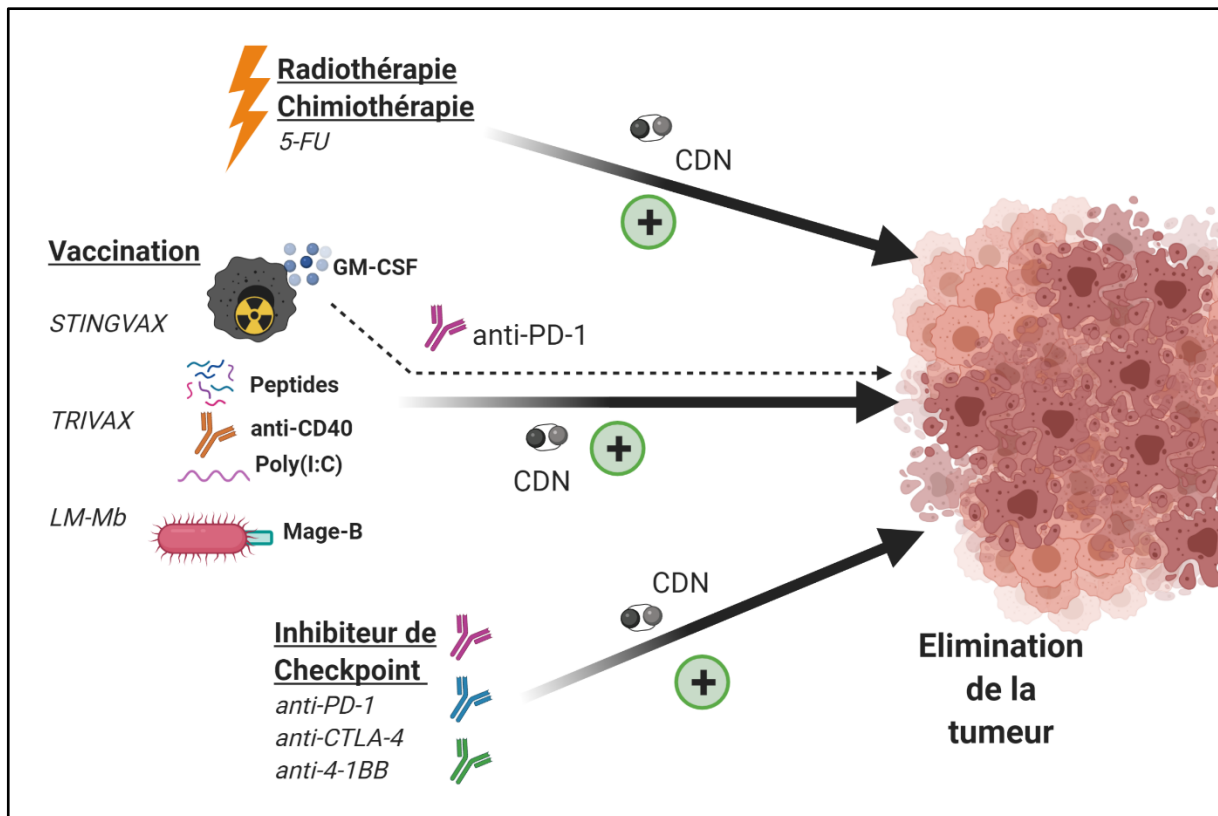
Les agonistes de STING ont également été utilisés comme adjuvants en association avec des stratégies de vaccination, pour favoriser des réponses immunitaires T spécifiques. Fu et al. ont notamment développé une stratégie appelée STINGVAX, une combinaison de l'agoniste de STING ML RR-S2 CDA et de cellules tumorales irradiées sécrétrices de GM-CSF, efficace pour le traitement de divers cancers (Fu, Kanne et al. 2015). Le c-di-GMP permet également d'augmenter l'efficacité du TriVax (association d'anti-CD40, de Poly(I :C), et d'un mix de peptides) et du vaccin LM-Mb (Vaccination par injection de souche atténuée de *Lysteria Monocytogenes* exprimant l'antigène tumoral Mage-b) dans un modèle de mélanome

B16 et de cancer du sein métastatique 4T1 respectivement (Chandra, Quispe-Tintaya et al. 2014, Wang and Celis 2015) (**Figure 8**).

Les thérapies fondées sur les inhibiteurs de point de contrôle (Immune Checkpoint Therapy, ICT), permettent également une synergie avec les thérapies ciblant STING. Harding et al. ont montré, dans un contexte de radiothérapie, que STING était essentiel pour une réponse abscopale efficace induite par la thérapie anti-CTLA-4 (Harding, Benci et al. 2017). Ager et al. ont quant à eux mis en évidence, dans un modèle murin de cancer de la prostate TRAMP-C2, que l'association du c-di-GMP avec la triple thérapie (anti-CTLA-4, anti-PD-1 et anti-4-1BB) permettait d'augmenter les régressions jusqu'à 75%, contre 40% pour les souris traitées uniquement par la trithérapie (Ager, Reilley et al. 2017). Fu et al. ont également montré une meilleure efficacité du STINGVAX évoqué précédemment lorsqu'il est associé à l'anti-PD-1 avec notamment une guérison totale des souris porteuses de tumeur colorectale CT26 (Fu, Kanne et al. 2015) (**Figure 8**). Aujourd'hui, plusieurs essais cliniques utilisant ce type d'agonistes de STING (MIW815 /ADU-S100 ou MK-1454), seuls ou en combinaison avec l'inhibiteur de checkpoint anti-PD-1, sont en cours (Essais cliniques de Phase I) (Zhu, An et al. 2019).

Néanmoins, d'autres problèmes se posent quant à l'utilisation d'agonistes de STING en immunothérapie anticancéreuse. En effet, la plupart des molécules actuelles nécessitent d'être administrées directement dans la tumeur, ce qui est une pratique particulièrement invasive. Ainsi, des composés alternatifs avec une efficacité systémique, tel que le composé appelé diABZIs (Ramanjulu, Pesiridis et al. 2018) sont en cours de développement. Par ailleurs, afin d'éviter la dégradation des composés, mais également une toxicité due à une dissémination non contrôlée, de nombreuses études cherchent à développer de nouveaux systèmes d'administration tels que des nano ou micro particules (Su, Zhang et al. 2019).





**Figure 8 : Les agonistes de STING augmentent l'efficacité des thérapies anti-cancéreuses**

Les agonistes de STING induisent des effets antitumoraux seuls ou en association avec d'autres thérapies telles que la radiothérapie, la chimiothérapie, la vaccination ou les inhibiteurs de checkpoint. Schéma réalisé avec Biorender.

#### IV. Mise en place de la réponse immunitaire adaptative antitumorale

##### A. Les lymphocytes T CD4 et leurs sous populations dans l'immunité antitumorale

###### 1. Différenciation des lymphocytes T CD4

###### a. *Activation par les cellules immunitaires innées*

Lors de l'activation du système immunitaire inné par des signaux de danger, les cellules dendritiques ou APCs ainsi activées vont non seulement répondre à ce danger en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires et des Interférons de type I, mais elles vont également maturer et migrer dans les organes lymphoïdes secondaires afin

d'activer les cellules du système immunitaire adaptatif : les lymphocytes B et les lymphocytes T CD8 et CD4 (Banchereau and Steinman 1998).

Les lymphocytes T CD4, au niveau des organes lymphoïdes secondaires, ont besoin de 3 signaux pour s'activer et se différencier. Tout d'abord les cellules présentatrices d'antigènes vont présenter, grâce à leur Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH-II), le peptide antigénique aux récepteurs TCR des cellules T CD4. C'est cette présentation antigénique qui donne leur spécificité aux cellules T. L'association entre le récepteur CD28 de la cellule T CD4 avec le ligand B7 (CD80/CD86) de l'APC correspond au deuxième signal dit de « co-stimulation ». Enfin, les conditions d'activation des APCs (virus, bactéries, cellules mourantes, etc...) leur permettent de sécréter des cytokines variées qui vont, en se fixant sur des récepteurs spécifiques, orienter la polarisation des lymphocytes T CD4 vers un sous type spécifique (**Figure 9**).

#### *b. Les lymphocytes Th1 et Th2, premiers sous types découverts*

En 1986 Mosmann et Coffman mettent en évidence les deux premiers sous types lymphocytaires, les Th1 et les Th2. Impliqués dans l'immunité antivirale et antibactérienne, les Th1 sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , tandis que les Th2 permettent de lutter contre les infections parasitaires en sécrétant des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 (Mosmann, Cherwinski et al. 1986).

Les lymphocytes Th1 sont différenciés à partir de lymphocytes T naïfs à la suite de la présentation d'antigènes issus de pathogènes intracellulaires et grâce à l'IL-12 sécrétée par les APC (tels que les macrophages lors d'infection par *Listeria Monocytogenes*) (Hsieh, Macatonia et al. 1993). Dans un premier temps, la signalisation TCR permet une faible induction d'IFN- $\gamma$  et du facteur de transcription T-bet. Puis, l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$  permettent respectivement l'activation des facteurs de transcription STAT4 et STAT1, nécessaires pour augmenter l'expression de T-bet. T-bet est le facteur majeur des lymphocytes Th1 et permet d'augmenter l'expression de la sous unité  $\beta 2$  du récepteur à l'IL-12 ainsi que l'IFN- $\gamma$ , nécessaires au maintien de la différenciation (Szabo, Kim et al. 2000, Mullen, High et al. 2001, Afkarian, Sedy et al. 2002, Thieu, Yu et al. 2008) (**Figure 9**). D'autres facteurs de transcription ont été décrits comme importants pour la différenciation Th1 tels qu'IRF1 (Lohoff, Ferrick et al. 1997), Runx3 (Djuretic, Levanon et al. 2007) ou encore Hlx (Mullen, Hutchins et al.

2002). Bien que l'IFN- $\gamma$  soit la cytokine effectrice principale des lymphocytes Th1, ces derniers peuvent également sécréter d'autres cytokines telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-2 ou encore l'IL-10 et exprimer le récepteur CXCR3 et les chimiokines CCL3 et CCL4 (Jenner, Townsend et al. 2009)

Les lymphocytes Th1 et Th2 étant mutuellement exclusifs, l'expression de T-bet, en association avec Runx3 ou GATA3, permet d'inhiber la différenciation Th2 (Hwang, Szabo et al. 2005, Djuretic, Levanon et al. 2007).

Les lymphocytes Th2 sont quant à eux différenciés en présence d'IL-4 et leur différenciation dépend des facteurs de transcription GATA3 (Zheng and Flavell 1997) (**Figure 9**) et STAT6 (Kaplan, Schindler et al. 1996). Par ailleurs, GATA3 permet d'inhiber la différenciation Th1 (Usui, Nishikomori et al. 2003), et une déficience en GATA3 *in vitro* comme *in vivo* conduit au développement de Th1, même en l'absence d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  (Zhu, Min et al. 2004). D'autres facteurs de transcription de la famille des STATs, en particulier STAT5 et STAT3 sont également importants pour le développement des lymphocytes Th2 (Zhu, Cote-Sierra et al. 2003, Stritesky, Muthukrishnan et al. 2011)

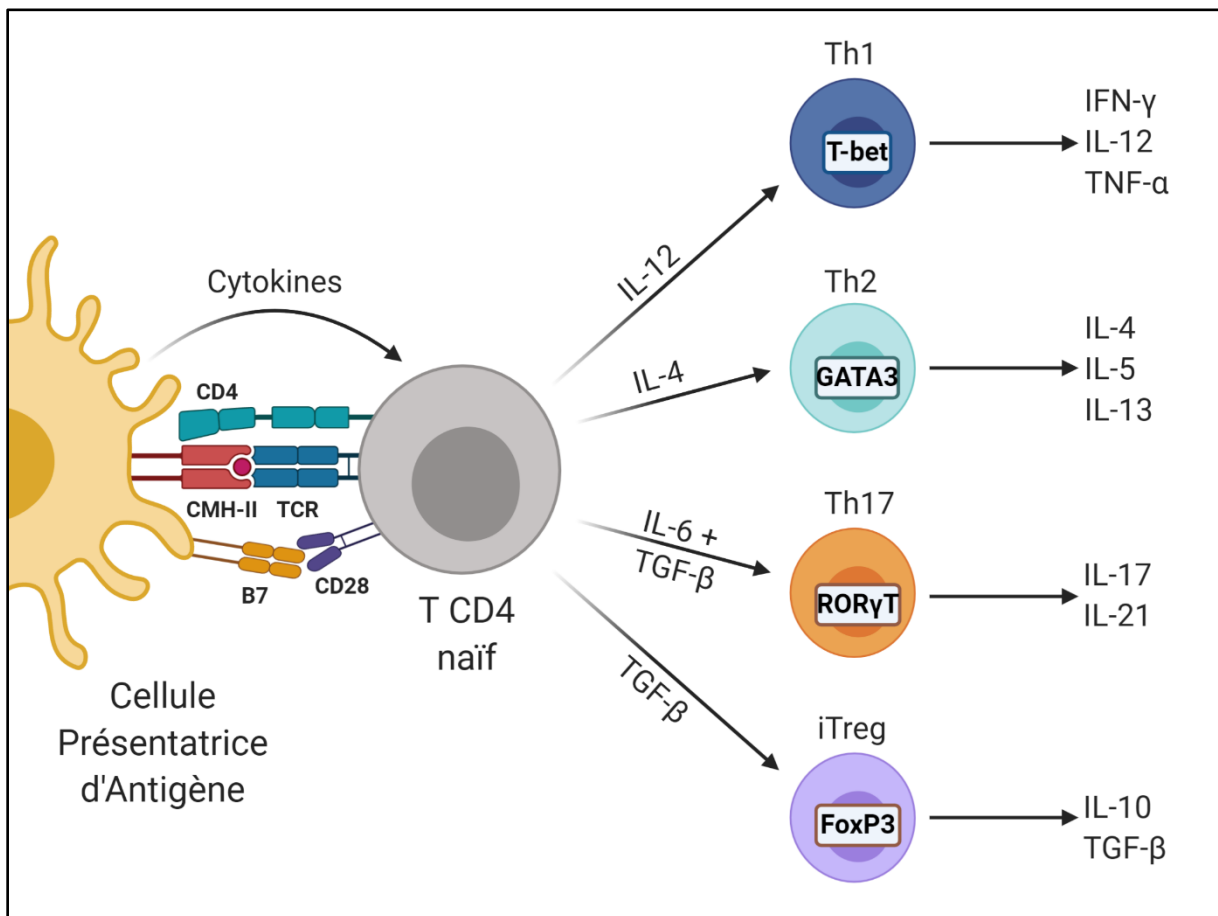
### c. Les lymphocytes Th17 et T régulateurs

2003 marque la découverte de deux sous-types lymphocytaires. Les lymphocytes Th17, cellules pro-inflammatoires et sécrétrices d'IL-17, ont été mis en évidence pour la première fois dans un modèle d'encéphalomyélite expérimentale murins (EAE) induit par l'IL-23 (Cua, Sherlock et al. 2003, Murphy, Langrish et al. 2003). Bien que des études aient montré que l'IL-23 était nécessaire pour le développement et l'expansion des lymphocytes Th17 pathogéniques associés aux réactions auto-immunes (Harrington, Hatton et al. 2005, Langrish, Chen et al. 2005), ces cellules sont différenciées à partir de cellules T CD4 naïves en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-6 (Mangan, Harrington et al. 2006, Veldhoen, Hocking et al. 2006). C'est ROR $\gamma$ T qui est le facteur majeur de la différenciation Th17 (Ivanov, McKenzie et al. 2006, Manel, Unutmaz et al. 2008) (**Figure 9**).

Les lymphocytes T régulateurs induits (iTreg), que l'on distingue des lymphocytes T régulateurs qui se développent naturellement dans le thymus, sont des cellules immunorégulatrices capables de limiter les fonctions effectrices des autres sous-populations lymphocytaires via la sécrétion de cytokines suppressives telles que

l'IL-10 ou le TGF- $\beta$ . Ils ont également été caractérisés en 2003, comme étant des cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> induites en présence de TGF- $\beta$  et exprimant le facteur de transcription FoxP3 (Chen, Jin et al. 2003, Fontenot, Gavin et al. 2003)(**Figure 9**).

Bien que ces deux sous types lymphocytaires aux fonctions opposées soient induits en présence de TGF- $\beta$ , il a été montré qu'une faible concentration de TGF- $\beta$  associée à l'IL-6 conduisait à l'expression de ROR $\gamma$ t et l'inhibition de Foxp3 pour favoriser la différenciation Th17 alors qu'à l'inverse, une forte concentration de TGF- $\beta$  favorisait la différenciation des iTreg (Bettelli, Carrier et al. 2006, Zhou, Lopes et al. 2008)



**Figure 9 : Activation et polarisation des lymphocytes T CD4 :**

Les lymphocytes T CD4 naïfs sont activés par les cellules présentatrices d'antigènes (APCs) grâce à trois signaux : la signalisation induite par l'association TCR-peptide-CMH-II, la costimulation induite par l'association CD28-B7(CD80/CD86) et la signalisation induite par les cytokines. Les cytokines sont responsables de la polarisation des lymphocytes T CD4 vers un sous type lymphocytaire spécifique. Adapté de (O'Shea and Paul, 2010), réalisé avec Biorender.

## 2. Les lymphocytes T CD4 dans le cancer

### *a. Mise en évidence du rôle clé des lymphocytes T CD4 dans l'immunité antitumorale*

Les lymphocytes T sont indispensables pour la mise en place d'une mémoire immunitaire efficace à la suite d'une infection par un pathogène (Swain, McKinstry et al. 2012), mais jouent également un rôle clé dans le contrôle de la croissance tumorale (Shankaran, Ikeda et al. 2001). Les CD4 permettent notamment une meilleure activation des CD8, grâce à leur sécrétion d'IL-2 (Williams, Tyznik et al. 2006, Feau, Arens et al. 2011) mais également par l'intermédiaire des APCs via le récepteur CD40 (Bennett, Carbone et al. 1998, Schoenberger, Toes et al. 1998). En 1998 Hung et al. montrent que des souris déficientes en CD4 (CD4<sup>-/-</sup>), survivent moins longtemps à la suite de l'inoculation de tumeurs B16, après vaccination préalable avec des cellules B16-GM-CSF irradiées, mettant en évidence l'importance des cellules T CD4 dans la réponse immunitaire antitumorale (Hung, Hayashi et al. 1998). Néanmoins les études se sont longtemps focalisées sur les lymphocytes T CD8 pour leur cytotoxicité directe, et leur capacité à reconnaître des antigènes endogènes présentés par le CMH de classe I (CMH-I), fortement exprimé par les cellules tumorales. A l'inverse, les lymphocytes T CD4, connus pour leur fonction « auxiliaire » ou « helper », et reconnaissant des antigènes exogènes présentés par le CMH-II, souvent peu exprimés au niveau des tumeurs, ont suscité beaucoup moins d'attention.

La découverte d'antigènes tumoraux reconnus par les CD4 tel que la tyrosinase ou NY-ESO-1 dans le mélanome (Topalian 1994, Topalian, Rivoltini et al. 1994, Jäger, Jäger et al. 2000), a permis de relancer un certain intérêt pour ces cellules. C'est en 2008 que pour la première fois une étude à montrer que le transfert adoptif de CD4 sécréteurs d'IFN- $\gamma$  et spécifiques de l'antigène associé au mélanome NY-ESO-1, permettait le traitement de mélanome métastatique et une rémission durable chez une patiente, soulignant l'intérêt majeur des CD4 dans le contrôle des tumeurs (Hunder, Wallen et al. 2008).

### *b. Les multiples rôles des CD4 dans l'immunosurveillance*

Bien que de nombreuses tumeurs expriment peu le CMH-II, les CD4 sont nécessaires pour le phénomène de présentation croisée (Cross-priming) des CD8

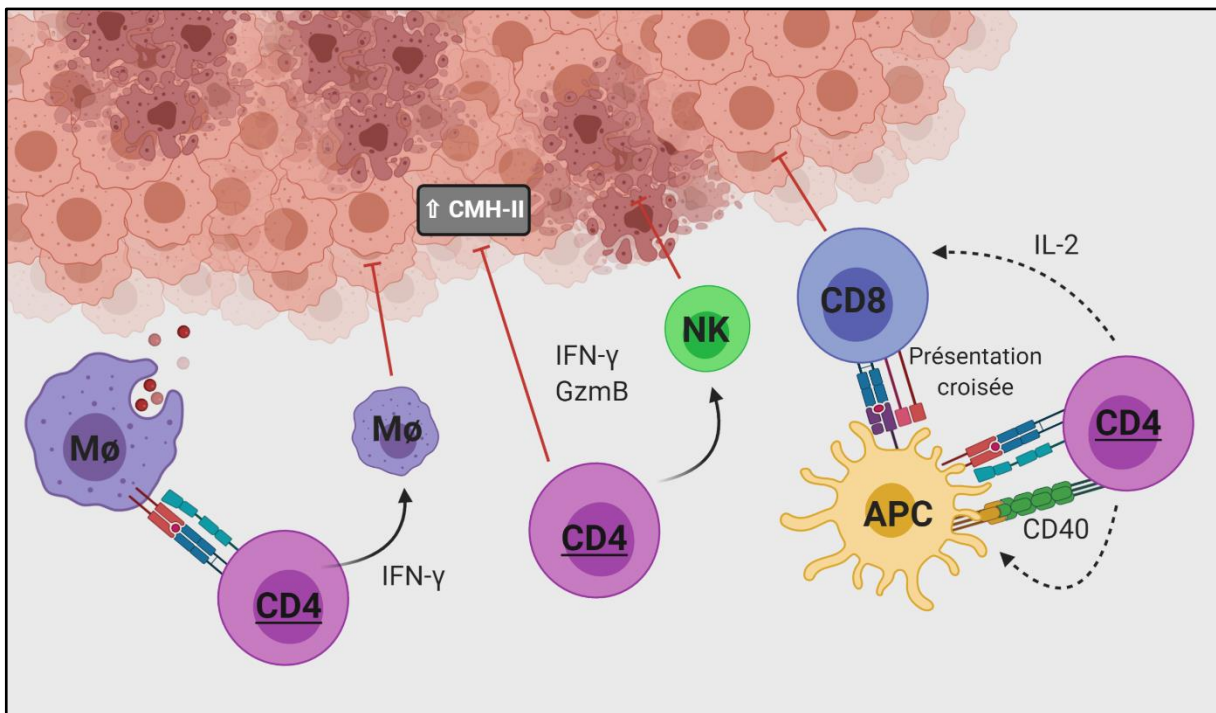
(Bennett, Carbone et al. 1997) et la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale, dépendante des CD8, efficace dans des tumeurs n'exprimant pas le CMH-II (Ossendorp, Mengedé et al. 1998). En effet, Ferris et al. ont montré que les cellules dendritiques conventionnelles de type I (cDC1) étaient requises pour une réponse antitumorale efficace. L'expression du CMH-II et du CD40 par les cellules cDC1 permet l'activation simultanée des CD4 et des CD8, favorisant ainsi leurs interactions et une fonctionnalité optimale des CD8 (Ferris, Durai et al. 2020)(**Figure 10**). Les CD4 semblent également indispensables pour induire une cytotoxicité optimale des lymphocytes T CD8 (Gao, Khammanivong et al. 2002, Zander, Schauder et al. 2019). En 2005, Anthony et al. montrent dans un modèle murin de mélanome que le transfert adoptif de CD8 et de CD4+CD25- (T « helper » ou effecteurs), en l'absence de T régulateurs CD4+CD25+, conduit à un contrôle plus efficace de la croissance tumorale, et ce de manière dépendante de l'IL-2, cytokine nécessaire à la prolifération et au maintien des CD8. Ceci souligne l'importance des lymphocytes T CD4 effecteurs, sécréteurs d'IL-2, et le rôle délétère des T régulateurs dans l'immunité antitumorale (Anthony, Piccirillo et al. 2005).

Les lymphocytes T CD4 permettent également la mise en place de réponses immunitaires antitumorales indépendantes des CD8. Perez-Diez et al. ont montré une meilleure efficacité du transfert adoptif de CD4 spécifiques de la tumeur, en comparaison aux CD8, y compris pour des tumeurs n'exprimant pas le CMH-II, et ce de manière dépendante des cellules NK, dans plusieurs types de cancers (Perez-Diez, Joncker et al. 2007). Le groupe de Bogen s'est particulièrement intéressé aux mécanismes d'immunosurveillance par les CD4 dans un modèle de myélome MOPC315 n'exprimant pas le CMH-II. Ils ont successivement démontré que les macrophages étaient capables de capturer des antigènes tumoraux libérés par les cellules tumorales, conduisant à leur activation, et de présenter l'antigène via leurs CMH-II aux cellules T CD4. Les cellules CD4 ainsi activées permettent la régression des tumeurs par l'intermédiaire de l'IFN- $\gamma$  et du recrutement de macrophages antitumoraux (Corthay, Skovseth et al. 2005, Corthay, Lundin et al. 2009)(**Figure 10**).

En plus de leur rôle chaperon, des études ont suggéré des effets cytotoxiques directs des lymphocytes T CD4, par l'intermédiaire des récepteurs FAS (Schattner, Mascarenhas et al. 1996), TRAIL (Thomas and Hersey 1998), ou via la sécrétion de granzyme et de perforine (Echchakir, Bagot et al. 2000), *in vitro*. Mais en 2010, deux études conjointement menées par Anthony, Restifo et Muranski montrent, dans des



souris présentant une lymphopénie, qu'après transfert adoptif, les CD4 spécifiques de l'antigène tumoral TRP1 se développent spontanément en CD4 cytotoxiques dont la sécrétion d'IFN- $\gamma$ , et de granzyme/perforine, permet successivement d'augmenter l'expression du CMH-II par les cellules tumorales et de permettre une cytotoxicité directe des CD4, conduisant à l'éradication de mélanomes murins (Quezada, Simpson et al. 2010, Xie, Akpinarli et al. 2010) (**Figure 10**).



**Figure 10 : Les multiples rôles antitumoraux des lymphocytes T CD4**

Les lymphocytes T CD4 ont un rôle clé dans l'immunosurveillance antitumorale, que ce soit par l'intermédiaire des macrophages et des cellules NK, ou en promouvant la survie, la prolifération et la fonctionnalité des lymphocytes T CD8. Par ailleurs les CD4 peuvent directement cibler les cellules tumorales grâce à l'IFN- $\gamma$  qui augmente leur expression de CMH-II et à la sécrétion de granzyme B cytotoxique. M $\phi$  : Macrophages. Schéma réalisé avec Biorender.

### 3. Rôles des différents sous-types lymphocytaires dans le cancer

Bien que les études montrent l'importance des lymphocytes T CD4 dans la réponse immunitaire antitumorale, en augmentant la production d'anticorps par les lymphocytes B et en stimulant la réponse CD8 (Pardoll and Topalian 1998), les lymphocytes T CD4 n'ont pas des rôles antitumoraux équivalents en fonction de leur polarisation.

### *a. Les lymphocytes Th1 dans l'immunité antitumorale*

En plus de leur rôle dans la réponse immunitaire antivirale et antibactérienne, les lymphocytes Th1 ont un rôle prédominant dans le contrôle de la croissance tumorale. Bien que l'IFN- $\gamma$  soit également sécrété par les CD8, l'utilisation du modèle murin déficient pour l'IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^{-/-}$ ) a permis de mettre en évidence le rôle critique de l'IFN- $\gamma$  dans le contrôle de la croissance tumorale (Kaplan, Shankaran et al. 1998, Shankaran, Ikeda et al. 2001). Néanmoins, Mumberg et al. ont également montré dans un contexte de transfert adoptif que les effets antitumoraux des CD4 étaient dépendants de l'IFN- $\gamma$  (Mumberg, Monach et al. 1999).

L'IFN- $\gamma$  sécrété par les CD4 possède de nombreux rôles au sein de l'environnement tumoral (Castro, Cardoso et al. 2018). Il permet notamment l'activation et le recrutement de CD8 cytotoxiques, de macrophages M1 antitumoraux ou de cellules NK (Corthay, Skovseth et al. 2005, Quezada, Simpson et al. 2010), et permet à l'inverse d'inhiber la fonction des Treg (Nishikawa, Kato et al. 2005, Cao, Leonard et al. 2009). Par ailleurs l'IFN- $\gamma$  semble pouvoir directement inhiber de la prolifération des cellules tumorales ou encore induire leur apoptose par des mécanismes dépendants de FAS et TRAIL, mais également inhiber l'angiogenèse.

En revanche, l'IFN- $\gamma$  peut également participer à la mise en place des mécanismes d'échappement tumoral (Dunn, Koebel et al. 2006), notamment en induisant l'expression de PD-L1(B7-H1) (Dong, Strome et al. 2002), en induisant l'expression d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) par les cellules tumorales ou les APCs associées, favorisant le développement de T régulateurs aux dépens des lymphocytes T effecteurs (Jürgens, Hainz et al. 2009).

Malgré ce double rôle de l'IFN- $\gamma$ , des études ont montré que le transfert adoptif de lymphocytes Th1 spécifiques de la tumeur permettait la régression tumorale dans des modèles murins de lymphomes B (A20-OVA) (Nishimura, Iwakabe et al. 1999, Nishimura, Nakui et al. 2000). Haabeth et al. ont par ailleurs montré que l'inflammation induite par les lymphocytes Th1 permettait le contrôle de la croissance tumorale, de manière dépendante des macrophages, dans des modèles murins de lymphomes B et myélomes (Haabeth, Lorvik et al. 2011).

Le rôle des différents sous types lymphocytaires a par ailleurs été cliniquement évalué dans différents types de cancers. Friedman et al. ont ainsi résumé les résultats de plusieurs études et ont montré un rôle antitumoral pour les cellules Th1 dans 14



études sur 15 (Fridman, Pagès et al. 2012), soulignant le rôle prédominant des cellules Th1 dans l'immunité antitumorale.

*b. Un rôle controversé des autres sous-types lymphocytaires*

Les lymphocytes Th2, grâce à leur sécrétion d'IL-4 peuvent également dans certains cas présenter des propriétés antitumorales. En effet, des études ont montré que l'IL-4 présentait des propriétés antitumorales lorsqu'elle est localement présente dans l'environnement tumoral, par l'intermédiaire des éosinophiles (Tepper, Coffman et al. 1992), mais également que des souris déficientes en IL-4 présentaient une réponse immunitaire antitumorale réduite, associée à une réduction des lymphocytes Th1 et des lymphocytes T CD8 dans des modèles murins de cancer du côlon et du sein (Schüler, Qin et al. 1999). Par ailleurs, Nishimura et al., puis Mattes et al. ont montré dans un contexte de transfert adoptif spécifique de l'antigène OVA, que les Th2 permettaient le contrôle de la croissance tumorale de lymphomes B (A20-OVA) et mélanomes (B16-OVA) murins de manière dépendante des éosinophiles (Nishimura, Iwakabe et al. 1999, Mattes, Hulett et al. 2003). Ils ont cependant montré plus tard que le transfert adoptif de lymphocytes Th1 était plus efficace dans ce contexte. De plus des études récentes ont mis en évidence un rôle pro-tumoral des lymphocytes Th2, qui peuvent promouvoir l'inflammation et la carcinogenèse (ou transformation néoplasique) des cellules, favorisant le développement du cancer du côlon et du pancréas chez la souris (Osawa, Nakajima et al. 2006, Ochi, Nguyen et al. 2012).

L'IL-17 sécrété par les cellules Th17 possède également plusieurs rôles au sein de l'environnement tumoral. Wang et al. ont mis en évidence que l'IL-17 favorisait la croissance tumorale par l'intermédiaire de la signalisation IL-6/STAT3, dans des modèles murins de mélanome et de cancer de la vessie (Wang, Yi et al. 2009). Numasaki et al. ont confirmé ces résultats, et démontré que l'IL-17 favorisait l'angiogenèse (Numasaki, Fukushi et al. 2003). Néanmoins, en 2008 l'équipe de Restifo, qui a généré un modèle murin transgénique permettant l'expression d'un TCR associé au CMH-II et spécifique de l'antigène tumoral TRP-1, montre que le transfert adoptif de lymphocytes Th17 spécifiques de la tumeur permettait la régression de mélanomes murins. Bien que dans leur modèle les Th17 présentent des propriétés antitumorales supérieures aux cellules Th1, leurs effets antitumoraux sont dépendants de l'IFN- $\gamma$  (Muranski, Boni et al. 2008).

Les cellules T régulatrices, qui sont responsables du phénomène de tolérance immunitaire envers les antigènes du soi, sont associées à des effets pro-tumoraux du fait de leur capacité à inhiber les fonctions effectrices et antitumorales du système immunitaire par divers mécanismes. Néanmoins, les Treg permettraient de limiter le développement, dans certains cas, des cancers où l'inflammation chronique au sein de la tumeur est délétère (Frydrychowicz, Boruckowski et al. 2017).

Alors que les propriétés antitumorales des lymphocytes Th1 sont clairement définies, et que la présence de Th1 dans la majorité des cancers est associée à un bon pronostic, l'impact des autres sous types lymphocytaires chez l'homme semble beaucoup moins clair et dépend du type de cancer. Néanmoins, la majorité des études décrivent un rôle pro-tumoral pour les cellules Th2, Th17 et Treg (Fridman, Pagès et al. 2012).

## B. Un nouveau sous-type pro inflammatoire : les lymphocytes Th9

### 1. Découverte et caractéristiques physiologiques

#### *a. Mise en évidence et différenciation des cellules sécrétrices d'IL-9*

En 1994, Schmitt et al. avaient déjà mis en évidence la capacité des cellules T CD4 naïves à sécréter de l'IL-9, de manière dépendante de l'IL-2, et que l'ajout de TGF- $\beta$  et d'IL-4 permettait d'augmenter de manière synergique cette sécrétion d'IL-9, alors que l'IFN- $\gamma$  l'inhibait (Schmitt, Germann et al. 1994). Mais ce n'est qu'en 2008, que les équipes de Kuchroo et Stockinger décrivent pour la première fois l'existence d'un sous type spécifiquement caractérisé par sa sécrétion d'IL-9 : les lymphocytes Th9. Ils sont obtenus en présence de TGF- $\beta$  et d'IL-4 à partir de lymphocytes T CD4 naïfs mais peuvent également être obtenus à partir d'une reprogrammation des cellules Th2 en présence de TGF- $\beta$  (Dardalhon, Awasthi et al. 2008, Veldhoen, Uyttenhove et al. 2008). La différenciation des lymphocytes Th9 est dépendante de différents facteurs de transcription : L'IL-4 permet d'induire l'expression du facteur de transcription IRF4 (Staudt, Bothur et al. 2010), par l'intermédiaire de STAT6 - qui permet également la répression des facteurs de transcriptions T-bet et FoxP3 par l'intermédiaire de GATA3 (Dardalhon, Awasthi et al. 2008, Goswami, Jabeen et al. 2012) - alors que le TGF- $\beta$  permet l'induction de PU.1 (Chang, Sehra et al. 2010). Bien que l'IL-2 soit également importante pour l'induction d'IL-9 et qu'à l'inverse l'IFN- $\gamma$  soit

délétère (Schmitt, Germann et al. 1994, Murugaiyan, Beynon et al. 2012), d'autres cytokines, souvent pro-inflammatoires, sembleraient pouvoir augmenter l'expression d'IL-9 dans les CD4. Notamment Wong et al. ont montré que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6, l'IFN- $\alpha$ , l'IFN- $\beta$ , IL-10 ou encore IL-21, associé à l'IL-4 et au TGF- $\beta$ , augmentait significativement la différenciation Th9 *in vitro* (Wong, Ye et al. 2010). Par ailleurs, plusieurs voies de signalisations telles que les voies Smad3/Notch (Elyaman, Bassil et al. 2012, Tamiya, Ichiyama et al. 2013), NF- $\kappa$ B (Jash, Sahoo et al. 2012) ou encore mTOR/HIF1 $\alpha$  (Wang, Bi et al. 2016, Roy and Awasthi 2019) semblent critiques pour la différenciation de ces cellules sécrétrices d'IL-9.

### *b. Pathologies associées*

L'IL-9 secrété par les cellules Th9 leur confère de fortes propriétés pro-inflammatoires *in vivo*. A titre d'exemple, il a été montré dès 1998, dans un modèle surexprimant spécifiquement l'IL-9 au niveau des poumons, que cette cytokine conduisait à une inflammation pulmonaire (Temann, Geba et al. 1998, Temann, Ray et al. 2002). Plus tard, l'utilisation de souris exprimant la protéine fluorescente YFP sous le contrôle du promoteur de l'IL-9, a permis de mettre en évidence ces cellules sécrétrices d'IL-9 *in vivo* dans un modèle d'asthme induit par sensibilisation à l'ovalbumine (Wilhelm, Hirota et al. 2011). Depuis, de nombreuses autres études ont caractérisé les fonctions des cellules Th9 dans cette pathologie, mettant notamment en évidence que le transfert adoptif de cellules Th9 permettait d'induire une inflammation pulmonaire (Staudt, Bothur et al. 2010, Jones, Gregory et al. 2012), alors qu'une déficience pour les facteurs de transcription majeurs des cellules Th9 (PU.1, IRF4 et BATF) permettait de l'atténuer (Chang, Sehra et al. 2010, Staudt, Bothur et al. 2010, Jabeen, Goswami et al. 2013, Sehra, Yao et al. 2015). Angkasekwinaï et al. ont par ailleurs montré que l'IL-25 favorisait l'expression d'IL-9 et le développement d'allergies inflammatoires pulmonaires (Angkasekwinaï, Chang et al. 2010). Xiao et al. ont obtenu des résultats similaires dans un contexte où le récepteur de costimulation OX40, activé par son ligand OX40-L exprimé à la surface des APCs, favorise la différenciation Th9, de manière dépendante de NF- $\kappa$ B (Xiao, Balasubramanian et al. 2012).

Dardalhon et al. qui pensaient avoir découvert des cellules sécrétrices d'IL-9 et d'IL-10 aux fonctions régulatrices, ont finalement mis en évidence que le transfert

adoptif des cellules Th9, dans des souris RAG1<sup>-/-</sup>, conduisait à l'inflammation de l'intestin et au développement de colite chez l'animal (Dardalhon, Awasthi et al. 2008). Par ailleurs au même moment, Veldhoen et al., montraient quant à eux dans un modèle murin d'infection parasitaire par *Trichuris muris*, qu'une déficience dans la signalisation TGF- $\beta$ , conduisait à une réduction de la sécrétion d'IL-9 par les CD4 et à une augmentation de la charge parasitaire (Veldhoen, Uyttenhove et al. 2008). Ces données sur un rôle anti-parasitaire des cellules Th9 ont ensuite été confirmées. En effet, l'utilisation de souris INFER (Interleukine Nine Fluorescent Reporter) exprimant la GFP comme gène reporteur de l'IL-9, a permis de mettre en évidence le développement de cellules Th9 au cours d'une infection par *Nippostrongylus brasiliensis* (Un nématode, parasite intestinal) et que seul le transfert adoptif de Th9, et non de Th2, conduisait à une protection efficace et à l'expulsion du parasite (Licona-Limón, Henao-Mejia et al. 2013). L'ensemble de ces données confirme ainsi l'existence d'un sous type lymphocytaire T CD4 sécréteur d'IL-9 (Th9), et que ces cellules peuvent contribuer au développement de pathologies inflammatoires mais également protéger contre les infections parasitaires.

## 2. Quel rôle des cellules Th9 dans le cancer ?

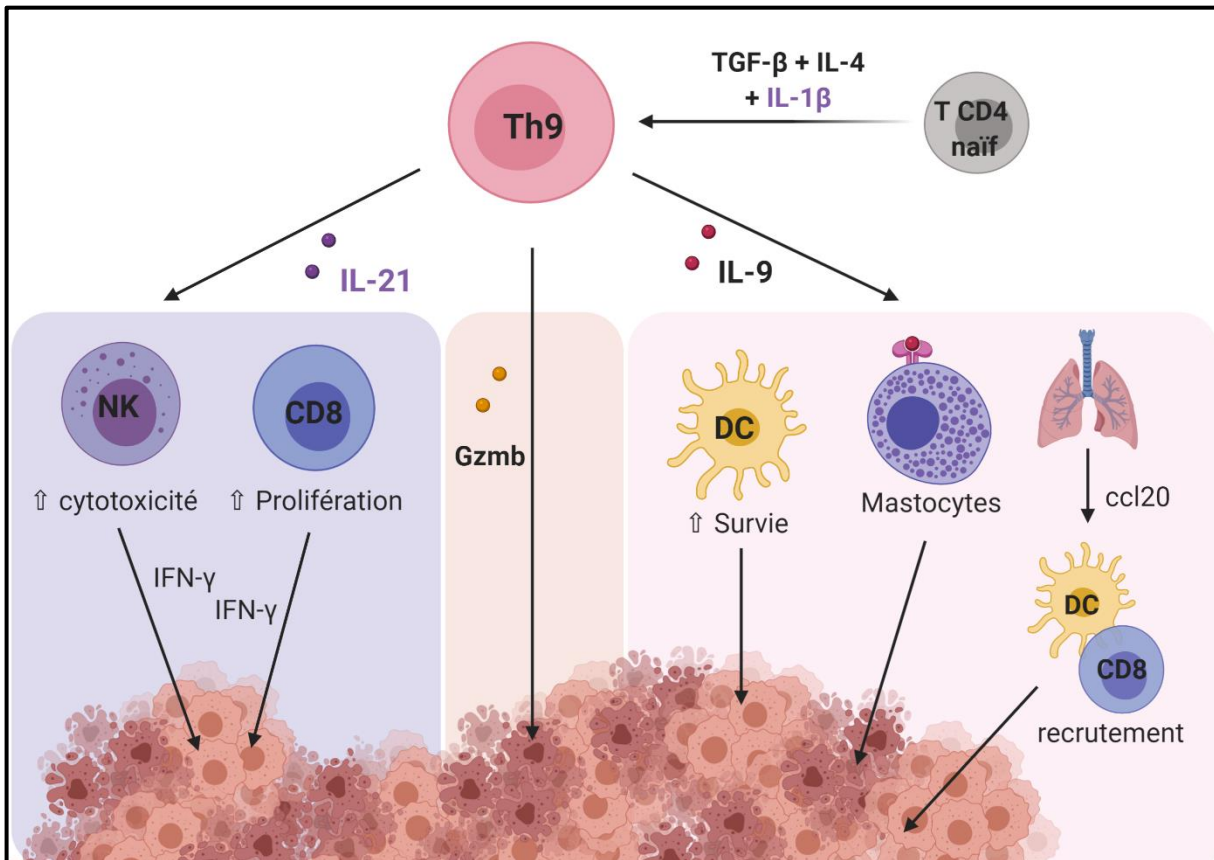
### a. *Mise en évidence des propriétés pro et anti tumorales de l'IL-9*

En 1994 Renauld et al. mettent en évidence qu'une petite proportion de souris transgéniques surexprimant l'IL-9 peuvent spontanément développer un lymphome thymique, suggérant un rôle de l'IL-9 dans le développement de cellules T malignes (Renauld, van der Lugt et al. 1994). Ces données semblent en effet en accord avec le fait que l'IL-9, également appelée P40 ou TCGFIII, ait été initialement décrite comme un facteur de croissance pour les lymphocytes T (Uyttenhove, Simpson et al. 1988). Plusieurs études ont confirmé que l'expression d'IL-9 était associée au développement de cancers hématologiques tels que les lymphomes ou les leucémies (Lemoli, Fortuna et al. 1997, Fischer, Bijman et al. 2003), probablement en favorisant la prolifération des cellules T cancéreuses. Il a par ailleurs été montré que l'accumulation de Th9 favorisait le développement d'épanchements pleuraux métastatiques et de métastases pulmonaires diminuant ainsi la survie des patients (Ye, Zhou et al. 2012, Salazar, Zheng et al. 2020).

Néanmoins, en dehors des cancers hématologiques et du poumon, il semblerait que ces cellules aient un rôle bénéfique dans un certain nombre de cancers « solides ». Purwar et al. furent les premiers à décrire un rôle antitumoral de l'IL-9 dans le mélanome. En effet, en voulant étudier le rôle des Th17 dans le mélanome par l'intermédiaire de souris déficientes pour ROR $\gamma$ t, ils ont pu mettre en évidence une augmentation de la sécrétion d'IL-9 par les cellules T au sein de souris *Rorc*<sup>-/-</sup>, corrélée avec une croissance tumorale réduite, dépendante de l'IL-9, de mélanome murin B16-F10. Ce sont également les premiers à montrer dans un contexte de transfert adoptif un effet antitumoral des cellules Th9 qui semblent notamment plus efficaces que les autres sous types T CD4 (Th1, Th2 et Th17) (Purwar, Schlapbach et al. 2012). Ces données ont été confirmées par Lu et al. dans deux études indépendantes dont une étude effectuée dans un contexte de transfert adoptif mimant ce qui peut se produire chez l'homme (Lu, Hong et al. 2012, Lu, Wang et al. 2018). En effet seul le transfert de cellules Th9, et non Th1 ou Th17, différenciées *in vitro* à partir de cellules OT-II ou TRP-1 (dont les TCR sont respectivement spécifiques de l'OVA ou de la Tyrp) en combinaison avec des cellules dendritiques (DCs) présentant ces antigènes, et ce dans un contexte de lymphodéplétion transitoire induit par le cyclophosphamide (CTX), conduit à des régressions tumorales totales et durables chez des souris présentant des tumeurs B16-OVA ou B16-F10 établies. Ils ont d'ailleurs expliqué que les fortes propriétés antitumorales des cellules Th9 seraient dues à leur persistance similaire aux cellules Th17, à leur cytotoxicité similaire à celle des cellules Th1 et médiée par la sécrétion de granzyme, et enfin grâce à leurs propriétés hyperprolifératives (Lu, Wang et al. 2018).

Les cellules Th9 permettent en effet le contrôle de la croissance tumorale par divers mécanismes. Si leurs propriétés antitumorales ont majoritairement été associées à l'IL-9, Vegran et al. ont montré que des cellules Th9 différenciées en présence d'IL-1 $\beta$  (une cytokine pro-inflammatoire augmentant leur sécrétion d'IL-9 et d'IL-21), présentaient des propriétés antitumorales supérieures dépendantes de l'IL-21 (Vegran, Berger et al. 2014). Selon les études, les Th9 permettraient d'induire une réponse antitumorale par l'intermédiaire des mastocytes (Purwar, Schlapbach et al. 2012, Abdul-Wahid, Cydzik et al. 2016), mais surtout grâce à l'activation des cellules dendritiques et au recrutement des lymphocytes T CD8 cytotoxiques (Lu, Hong et al. 2012, Végran, Berger et al. 2014). Par ailleurs les Th9 pourraient également agir via des effets cytotoxiques directs sur les cellules tumorales, par exemple par

l'intermédiaire de la molécule pro-apoptotique TRAIL (Fang, Chen et al. 2015, Miao, Zhang et al. 2017), ou du granzyme B (Lu, Wang et al. 2018)(Figure 11).



**Figure 11 : Les propriétés antitumorales des cellules Th9**

Les cellules T CD4 naïves se différencient en cellules Th9 en présence d'IL-4 et de TGF-β. Leur sécrétion d'IL-9 leur confère des propriétés antitumorales dépendantes des mastocytes, mais également des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD8. L'IL-1β favorise la sécrétion d'IL-9 et induit la production d'IL-21 qui permet de stimuler les cellules NK et CD8 cytotoxiques et d'augmenter leur sécrétion d'IFN-γ. Dans certains cas les cellules Th9 peuvent présenter des propriétés antitumorales directement grâce à la sécrétion de granzyme B. Adapté de (Végran et al. 2015), réalisé avec Biorender.

### *b. Contextes favorisant une réponse Th9 antitumorale*

Plusieurs facteurs de transcription peuvent moduler les propriétés antitumorales des cellules Th9. Il a par exemple été montré que le facteur de transcription Id3 régulait négativement la différenciation Th9, et que le transfert adoptif de T CD4 déficients pour Id3 permettait un meilleur contrôle de la croissance de mélanome murin dépendant de l'IL-9 (Nakatsukasa, Zhang et al. 2015). Les facteurs de transcription Foxo1 et Foxp1 ont également des rôles antagonistes dans la différenciation Th9. Ainsi lors d'un transfert adoptif de Th9, une déficience pour Foxo1 ou Foxp1, permet respectivement de réduire ou d'augmenter la sécrétion d'IL-9 et les propriétés antitumorales des

cellules Th9 (Bi, Ma et al. 2017). Au sein de notre laboratoire, Humblin et al. ont montré que le facteur de transcription IRF8 était requis pour un effet antitumoral optimal des cellules Th9 (Humblin, Thibaudin et al. 2017). Par ailleurs nous avons également montré qu'une dégradation de PU.1 par le processus d'autophagie, réduisait les propriétés antitumorales des cellules Th9 (Rivera Vargas, Cai et al. 2017). Enfin le groupe de Kaplan a montré que les lymphocytes Th17 surexprimant STAT5 et BATF étaient reprogrammés en cellules sécrétrices d'IL-9 *in vivo*, à la suite de leur transfert adoptif dans des souris porteuses de mélanome, augmentant ainsi leurs propriétés antitumorales (Fu, Wang et al. 2020). Plusieurs cytokines, souvent pro-inflammatoires, permettent également d'augmenter les propriétés effectrices des cellules Th9. C'est par exemple le cas de l'IL-7 (Bi, Ma et al. 2017) ou du TNF- $\alpha$  (Jiang, Chen et al. 2019). Au sein du laboratoire, Végran et al. ont montré que l'IL-1 $\beta$  permettait d'augmenter les effets antitumoraux des cellules Th9, par l'intermédiaire du facteur de transcription IRF1, et de manière dépendante de l'IL-9 et de l'IL-21 (Végran, Berger et al. 2014). Le rôle de l'IL-1 $\beta$  a par ailleurs été confirmé par Xue et al., qui ont montré que l'association de l'IL-4 avec l'IL-1 $\beta$ , en absence de TGF- $\beta$ , conduisait à la génération de Th9 avec des propriétés antitumorales supérieures aux cellules Th9 classiques (Xue, Jin et al. 2019).

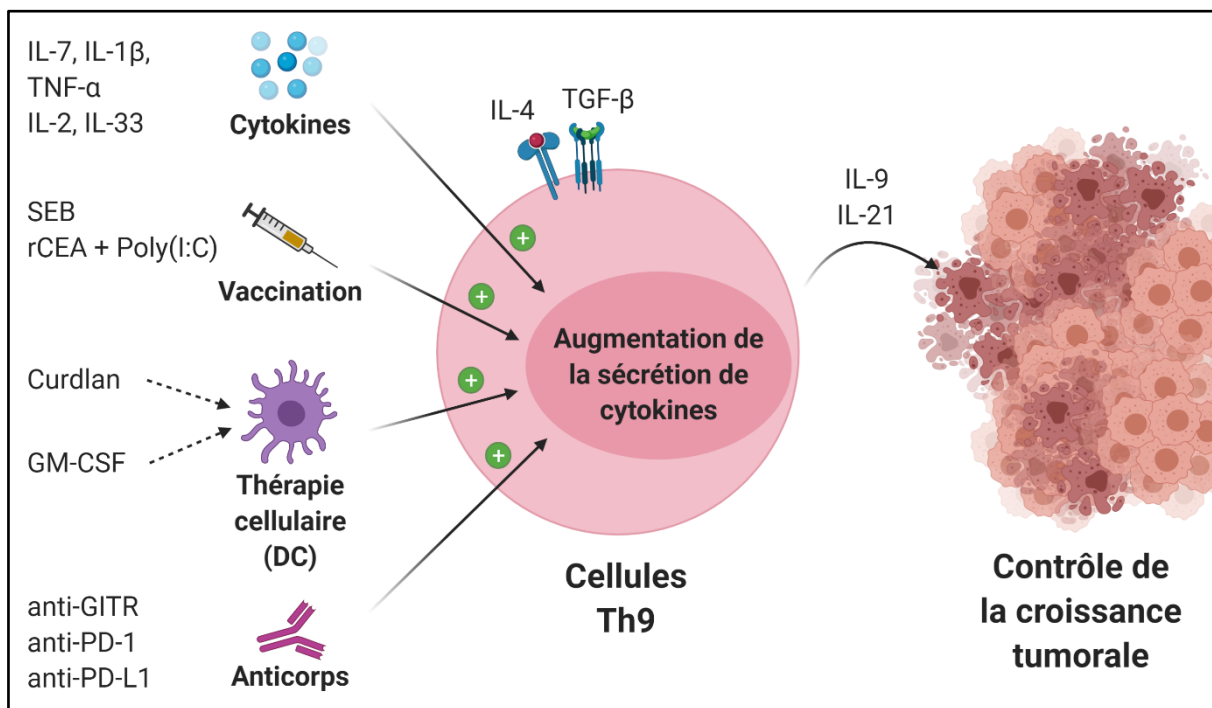
Plusieurs études ont également cherché comment il était possible de favoriser une réponse immunitaire Th9 antitumorale *in vivo*. Ainsi, la vaccination de souris en association avec l'entérotoxine B de staphylocoques (SEB) permet notamment d'induire le développement de CD4 sécréteurs d'IL-9 spécifiques de l'antigène *in vivo*, et une inhibition de la croissance tumorale dépendante de l'IL-9 (Miao, Zhang et al. 2017, Zheng, Yang et al. 2017). Abdul-Wahid et al. ont également montré qu'une immunisation des souris avec un antigène carcino-embryonnaire recombinant (rCEA) associé au Poly(I:C) (ligand du TLR3) comme adjuvant, conduisant à la génération de Th9 spécifiques de l'antigène CEA et au contrôle de la croissance des tumeurs colorectales MC38-CEA, de manière dépendante de l'IL-9 (Abdul-Wahid, Cydzik et al. 2016).

Dans un contexte de thérapie cellulaire utilisant des cellules dendritiques, la stimulation préalable de ces dernières avec le curdlan, activant la signalisation Dectin-1, favorise la différenciation Th9, par l'intermédiaire de l'IL-33, et une réponse immunitaire antitumorale dépendante de l'IL-9 (Zhao, Chu et al. 2016, Chen, Zhao et al. 2018). De la même manière le transfert adoptif de cellules dendritiques traitées



avec du GM-CSF conduit à un meilleur contrôle de la croissance tumorale, encore une fois, de manière dépendante de l'IL-9 (Kim, Koh et al. 2019).

Enfin il a été montré que l'utilisation d'un anticorps (DTA-1) agoniste du GITR, une molécule de costimulation exprimée par les cellules T, induit une forte augmentation de l'IL-9 tout en inhibant les Treg (Xiao, Shi et al. 2015), associé à une augmentation de la fonction des cellules dendritiques, une induction de CD8 spécifiques de la tumeur et une réduction de la tumeur dans un modèle de d'adénocarcinome colique murin CT26 (Kim, Kim et al. 2015) (**Figure 12**).



**Figure 12 : Stratégies favorisant une réponse Th9 antitumorale**

De nombreuses stratégies sont capables de stimuler une réponse immunitaire Th9 in vivo et d'augmenter leurs propriétés antitumorales. D'après (Benoit-Lizon et Apetoh, 2020), réalisé avec Biorender.

### c. Impact clinique des lymphocytes Th9 chez l'homme

Chez l'homme, les cellules Th9 ont été mises en évidence et caractérisées au niveau de la peau (Purwar, Schlapbach et al. 2012, Schlapbach, Gehad et al. 2014), néanmoins il semblerait que leur fréquence soit réduite au niveau des lésions tumorales. Ce phénomène peut en partie être expliqué par le fait que l'autophagie, fortement induite dans l'environnement tumoral, réprime la différenciation des cellules Th9 (Rivera Vargas, Cai et al. 2017, Benoit-Lizon, Jacquin et al. 2018).



Parrot et al. ont mis en évidence une accumulation de cellules CD4+ CD8+ double positives (DP) exprimant le récepteur à l'IL-9 dans les tumeurs de patients atteints de mélanome. Et l'IL-9 permettrait d'augmenter leur prolifération et leur cytotoxicité (Parrot, Allard et al. 2016).

Par ailleurs, il a été montré que les TILs sécréteurs d'IL-9, issus de patients atteints de cancers colorectaux, présentaient une forte expression de PD-1 à l'origine d'une inhibition de la sécrétion d'IL-9. De plus les auteurs montrent une corrélation entre la fréquence de TILs sécréteurs d'IL-9 et la fréquence de CD8, suggérant que chez l'homme les effets antitumoraux des cellules Th9 seraient dépendants de l'IL-9 et des CD8 (Wang, Lu et al. 2020). Ces résultats sont en accord avec une autre étude effectuée chez des patients atteints cette fois-ci de mélanome. Les auteurs proposent que la présence de Th9 permettrait de prédire l'efficacité du traitement par anti-PD-1. En effet, les patients répondants le mieux au traitement présentent une forte proportion de cellules Th9 dans le sang, associée à une augmentation de l'infiltrat CD8 (Nonomura, Otsuka et al. 2016). Pour finir You et al., montrent que l'IL-9 est également fortement exprimée chez les patients atteints de cancer du sein et ont mis en évidence que les propriétés antitumorales des cellules Th9 étaient médiées par l'IL-9 mais également par l'IL-21 qui permettent d'augmenter la cytotoxicité des lymphocytes T CD8, suggérant encore une fois que les Th9 seraient un marqueur de bon pronostic pour la survie des patients (You, Zhang et al. 2017).

## V. Objectifs des travaux de thèse

### A. Contexte de l'étude

#### 1. Une stimulation de la réponse adaptative directe par les récepteurs PRR

La détection du danger via les récepteurs PRRs exprimés par les cellules immunitaires innées permet de moduler la réponse immunitaire adaptative (Iwasaki and Medzhitov 2004, Iwasaki and Medzhitov 2010). Bien que la fonctionnalité de ces récepteurs ait été principalement étudiée dans les cellules myéloïdes du système immunitaire inné (monocytes, DCs et macrophages), de nombreuses études ont récemment mis en évidence un rôle intrinsèque de ces récepteurs au sein des lymphocytes T du système immunitaire adaptatif (Reynolds and Dong 2013, Imanishi and Saito 2020).

En effet en plus d'être exprimés par les cellules T, l'activation des récepteurs TLRs peut jouer le rôle d'un signal de co-stimulation nécessaire à l'activation des lymphocytes T, mais également moduler leur survie, leur prolifération et leurs fonctions effectrices, que ce soit chez la souris (Gelman, Zhang et al. 2004, Reynolds, Martinez et al. 2012), ou chez l'homme (Komai-Koma, Jones et al. 2004, Caron, Duluc et al. 2005, Funderburg, Luciano et al. 2008). De plus, si l'on s'intéresse plus spécifiquement à la différenciation lymphocytaire T CD4, la stimulation du TLR2 permet d'augmenter les fonctions effectrices des lymphocytes Th1 (Imanishi, Hara et al. 2007), Th17 (Reynolds, Pappu et al. 2010) et Th9 (Karim, Reba et al. 2017), et à l'inverse, d'inhiber la sécrétion d'IL-4 des Th2 (Watanabe, Inoue et al. 1999, Matsuguchi, Takagi et al. 2000). En outre, l'ajout du domaine TIR du TLR2 sur des cellules CAR-T ciblant le CD19 permet d'augmenter leur expansion, leur persistance et leurs propriétés effectrices, démontrant tout l'intérêt de l'étude des récepteurs au danger dans la biologie des lymphocytes T (Weng, Lai et al. 2018). Par ailleurs, le LPS, ligand de TLR4, peut directement activer les lymphocytes T régulateurs (Caramalho, Lopes-Carvalho et al. 2003). Ces données mettent ainsi en évidence un contrôle direct de la fonctionnalité des lymphocytes T CD4 par les récepteurs « innés » de détection du danger.

D'autres études ont également confirmé la présence et l'implication de certains récepteurs d'acides nucléiques dans la biologie des cellules T CD4. Il a notamment été montré que des agonistes du TLR3 et du TLR9 (Poly(I:C) et CpG ODN respectivement) pouvaient directement favoriser la survie des lymphocytes T CD4, sans l'intermédiaire des cellules du système immunitaire inné (Gelman, Zhang et al. 2004). A l'inverse, Dominguez-Villar et al. ont montré que la stimulation du TLR7 par des ARNs de virus, tel que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), dans les lymphocytes T CD4, conduisait à leur anergie (Dominguez-Villar, Gautron et al. 2015). Enfin l'implication du TLR8 dans la réversion de la fonction des lymphocytes T régulateurs a également été mise en évidence (Peng, Guo et al. 2005).

## 2. Un rôle intrinsèque de STING dans la biologie des lymphocytes T ?

À la suite de la découverte de la protéine STING en 2008, et de son rôle prédominant dans l'immunité antivirale, antitumorale mais également dans les maladies inflammatoires, de nombreuses études ont cherché à évaluer son implication intrinsèque dans les cellules adaptatives. En effet la protéine STING est exprimée par

de nombreux types cellulaires incluant les lymphocytes B et T. C'est en 2017 que trois études se sont attardées pour la première fois à l'effet de l'activation de STING sur la biologie des lymphocytes T (Cerboni, Jeremiah et al. 2017, Gulen, Koch et al. 2017, Larkin, Ilyukha et al. 2017). Ainsi la suractivation de STING, causée par une mutation V155M présente chez des patients touchés par des maladies inflammatoires sévères à début précoce (SAVI), conduit à un effet antiprolifératif dans les lymphocytes T CD4, à l'origine d'une lymphopénie chez les patients (Cerboni, Jeremiah et al. 2017). Par ailleurs, l'utilisation de ligands synthétiques de STING tels que le CMA ou le DMXAA induisent la mort des lymphocytes T, mais également l'expression d'interférons de type I (IFN- $\beta$ ) et d'ISG (Interférons Sensitive Genes) (Gulen, Koch et al. 2017, Larkin, Ilyukha et al. 2017). Dans un modèle murin présentant une mutation activatrice N153S de STING associée à une interféronopathie et une inflammation des poumons, deux études ont montré que malgré une lymphopénie, les lymphocytes T présentaient une activation de mTORC1, un phénotype activateur (Warner, Irizarry-Caro et al. 2017) mais également une production de cytokines plus accrue pouvant être à l'origine de la maladie (Luksch, Stinson et al. 2019). D'après Imanishi et son équipe, les effets de l'activation de STING dans les T dépendraient en réalité de la nature du ligand utilisé (synthétique comme le CMA ou le DMXAA ou naturel comme le cGAMP) mais également du contexte d'activation de STING, avec un rôle prédominant de la signalisation TCR pour une induction d'Interférons de Type I (Imanishi, Unno et al. 2019, Imanishi and Saito 2020).

## B. But du projet

Bien que la protéine STING apparaisse de plus en plus comme une cible thérapeutique prometteuse, en particulier pour le traitement de certains cancers, cette voie de signalisation et son effet sur les différents types cellulaires reste de nos jours encore mal compris. En effet bien que très largement étudié dans les cellules du système immunitaire innée (cellules dendritiques, macrophage etc..), le rôle de la protéine STING dans la biologie et la fonctionnalité des cellules immunitaires adaptatives tels que les lymphocytes T n'a suscité un intérêt que très récemment.

Les lymphocytes T CD4 jouent un rôle prédominant dans le contrôle de la croissance tumorale et par ailleurs le contexte d'activation et de différenciation de ces cellules permet de moduler leurs propriétés effectrices et antitumorales. Bien qu'il ait

été montré que la voie de signalisation STING soit fonctionnelle et que son activation pouvait conduire dans certaines conditions à la mort des lymphocytes, les données actuelles restent peu claires et le rôle de STING sur la différenciation des lymphocytes T n'a pas encore été étudié.

Ainsi, mon projet de thèse a pour but de déterminer le rôle intrinsèque de STING sur la biologie des lymphocytes T CD4, que ce soit leur différenciation *in vitro*, mais également leurs fonction effectrices et antitumorales *in vivo*.

# MATERIELS ET MÉTHODES

## I. Souris

Tous les animaux ont été élevés et maintenus conformément aux directives de la Fédération des associations de laboratoires de sciences animales (FELASA) et du comité d'éthique expérimentale animale (Université de Bourgogne et TAAM, Orléans, France). Le comité d'éthique du bien-être animal de l'Université de Bourgogne et le ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche ont approuvé toutes les expérimentations animales (référence 10626).

Les femelles C57BL/6 ont été achetées auprès des laboratoires Charles River (France). Les souris *Irf3<sup>-/-</sup>* (IRF3<sup>-/-</sup>; RBRC00858 - RIKEN), *Rela<sup>fl/fl</sup>* (p65, 024342 - The Jackson Laboratory), *Cd4-Cre* (017336 - The Jackson Laboratory), *IL-9-eGFP*, *Sting1<sup>-/-</sup>* (*STING<sup>-/-</sup>*), *Rag2<sup>-/-</sup>Sting1<sup>-/-</sup>* (*Rag2<sup>-/-</sup>STING<sup>-/-</sup>*), *OT-II* (004194 - The Jackson Laboratory) et *Ifnar<sup>-/-</sup>* ont toutes été élevées au TAAM (Typage et Archivage d'Animaux Modèles, Orléans, France). Les souris *IL-9-eGFP* ainsi que les souris *Sting1<sup>-/-</sup>* et *IFNAR<sup>-/-</sup>* ont été respectivement fournies par le Pr. Richard Flavell et le Pr. Bernhard Ryffel. Les souris *STING V154M/WT* (Bouis, Kirstetter et al. 2019) et leurs contrôles correspondants ont été fournis par le Pr. Soulas-Sprauel.

Pour les expériences *in vivo*, des souris femelles âgées de 6 à 12 semaines ont été appariées par âge et assignées au hasard à des groupes de traitement spécifiques, à l'exception des expériences *Rag2<sup>-/-</sup> STING<sup>-/-</sup>* qui incluent des mâles équitablement répartis entre les différents groupes de traitement.

Pour les expériences *in vitro*, des souris âgées de 6 à 12 semaines ont été appariées selon l'âge et le sexe. Toutes les souris transgéniques utilisées étaient sur un fond génétique C57BL/6 et étaient appariées par âge avec des témoins de type sauvage pour les expériences.

## II. Expériences in vivo

### A. Lignées cellulaires et croissance tumorales

Des lignées cellulaires murines B16-F10, B16-OVA (mélanomes) et MC38 (adénocarcinome du colon) ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> dans les milieux de culture suivants. Les cellules B16-F10 ont été maintenues dans du milieu DMEM High Glucose (Dutscher) supplémenté avec 10% (vol/vol) de sérum bovin fœtal

décomplémenté (Inactivé par la chaleur, 30 min 56°C) (FBS, Dutscher) et 100 U/mL de pénicilline, 0,1 mg/mL de streptomycine, 0,25 µg/mL d'amphotéricine B (1% PSA, Pan Biotech). Les cellules B16-OVA et MC38 ont été respectivement maintenues dans du milieu RPMI 1640 w/L-Glutamine ou du milieu DMEM High Glucose contenant 10 mM d'Hepes (Gibco) supplémenté avec 10% (vol/vol) de sérum bovin foetal décomplémenté, 1% PSA, 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco), L-glutamine 2 mM (Gibco) et MEM NEAA (0,1 mM chaque AA; Gibco). Les cellules B16-F10 et MC38 ont été respectivement obtenues auprès de l'ATCC et de Kerafast. Les cellules B16-OVA ont été fournies par le Pr. Yong Lu (Département de microbiologie et d'immunologie, Wake Forest School of Medicine, Winston-Salem, Caroline du Nord, États-Unis).

Les cellules tumorales (1,5 x 10<sup>5</sup> cellules B16-F10 ou B16-OVA par souris ; 5 x 10<sup>5</sup> cellules MC38 par souris) ont été remises en suspension dans du PBS stérile et implantées par voie sous-cutanée (s.c.). Chaque souris a reçu deux injections intratumorales (i.t.) de PBS contenant 100 µg de 2'3'-cGAMP (cGAMP, Invivogen) encapsulé dans 2,5 µL de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) ou de PBS avec Lipofectamine 2000 seule (Contrôle) aux jours 5 et 10.

Pour les expériences Rag2<sup>-/-</sup> STING<sup>-/-</sup>, des souris ont reçu une injection i.v. avec 5 x 10<sup>6</sup> cellules T CD4 WT ou STING<sup>-/-</sup> et 2,5 x 10<sup>6</sup> cellules T CD8 STING<sup>-/-</sup> respectivement isolées avec des billes magnétiques anti-CD4 (L3T4) et anti-CD8 (Ly-2) (Miltenyi Biotec) selon les instructions du fabricant. L'implantation des tumeurs MC38 a été effectuée 5 semaines après le transfert des cellules T et les souris ont été traitées comme décrit ci-dessus.

La longueur et la largeur des tumeurs ont été mesurées trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse. Les souris avec des tumeurs de taille supérieure à 300 mm<sup>2</sup> ou avec des tumeurs ulcérées ont été euthanasiées en accord avec les directives éthiques.

Pour l'analyse des lymphocytes infiltrant la tumeurs (TILs), des souris porteuses de tumeurs MC38 ont été traitées (i.t.) lorsque les tumeurs atteignaient 40 à 50 mm<sup>2</sup> avec du cGAMP (50 µg par souris) ou du PBS avec Lipofectamine 2000 seule (contrôle) et les tumeurs ont été récoltées un jour après le traitement.

## B. Déplétions des CD8 et neutralisation des cytokines

Les cellules CD8 ont été éliminées par injections intrapéritonéales (i.p.) de 500 µg par souris d'anticorps anti-CD8a (clone YTS 169.4, Bioxcell) aux jours 4 et 9 après l'implantation de la tumeur. La neutralisation des cytokines a été réalisée par injections intrapéritonéale (i.p.) (200 µg par souris) d'anticorps anti-IFN- $\gamma$  (clone XMG1.2, Bioxcell) ou anti-IL-9 (clone 9C1, Bioxcell) un jour avant l'implantation des cellules tumorales puis trois fois par semaine.

La neutralisation de l'IFN- $\gamma$ , d'IL-4 et d'IL-17 chez les souris porteuses de tumeurs MC38 a été réalisée par injection (i.p.) (200 µg par souris) d'anti-IFN- $\gamma$ , d'anti-IL-4 (clone 11B11, Bioxcell) ou d'anti-IL-17 (clone 17F3, Bioxcell) aux jours 4, 5, 7, 9, 10, 12, 14 après l'implantation des cellules tumorales. En tant que contrôle pour l'anti-CD8, l'anti-IL-9, l'anti-IFN- $\gamma$ /IL-4 et l'anti-IL-17, des isotypes contrôles IgG2b de rat (clone LTF-2, Bioxcell), IgG2a de souris (clone C1.18.4, Bioxcell) IgG1 de rat (clone HRPN, Bioxcell), et IgG1 de souris (clone MOPC-21, Bioxcell) ont été respectivement utilisés.

## C. Transfert adoptif de cellules Th9

Des souris porteuses de tumeurs B16-OVA (5 jours après l'implantation des tumeurs en s.c.) ont été injectées par voie intraveineuse (i.v.) avec  $2 \times 10^6$  cellules effectrices OT-II Th9 stimulées ou non avec du cGAMP avant polarisation *in vitro*. La longueur et la largeur des tumeurs ont été mesurées trois fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse. Les souris avec des tumeurs de taille supérieure à 300 mm<sup>2</sup> ou avec des tumeurs ulcérées ont été euthanasiées en accord avec les directives éthiques.

En variante,  $2,5 \times 10^5$  cellules B16-OVA par souris ont été injectées (i.v.) dans la veine de la queue. Un jour après, les souris ont reçu l'injection (i.v.) de  $2 \times 10^6$  lymphocytes Th9, différenciés *in vitro* à partir de CD4 naïfs issus de souris OT-II, stimulés ou non avec du cGAMP avant polarisation. Les souris ont été euthanasiées 14 jours après le transfert adoptif des cellules Th9 et les foyers tumoraux pulmonaires ont été dénombrés en aveugle.



### III. Procédures Ex-vivo

#### A. Analyses de lymphocytes infiltrant la tumeur (TILs)

Les tumeurs MC38 ont été soumises à une dissociation mécanique et à une digestion enzymatique en utilisant le kit de dissociation des tumeurs et l'appareil gentleMACS Dissociator™ (Miltenyi Biotec) selon les instructions du fabricant. La suspension cellulaire a ensuite été lavée deux fois en utilisant du RPMI-1640 supplémenté avec 10% de FBS, 100 U/mL de pénicilline, 0,1 mg/mL de streptomycine, 0,25 µg/mL d'amphotéricine B (1% PSA) et 10 mM d'Hepes (ci-après dénommé en tant que milieu RPMI complet) et passé à travers des tamis cellulaires de 70 µm puis 30 µm (Miltenyi Biotec). La moitié des cellules ont été marquées avec le Fixable Viability Dye eFluor™ 780 (eBioscience), CD3 APC (clone REA641, Miltenyi Biotec) et CD4 Vioblue (clone REA604, Miltenyi Biotec) pour le tri des cellules T CD4 vivantes à l'aide du BD FACSAria-III (BD Biosciences). Les cellules T CD4 triées ont été directement lysées en Trizol pour l'analyse de l'ARN.

Les cellules restantes ont ensuite été stimulées en utilisant un cocktail de stimulation cellulaire (Stim Cocktail, eBioscience) et un inhibiteur de transport des protéines contenant de la monensine (PTI, eBioscience) dilué dans du milieu RPMI complet supplémenté avec 1 mM de pyruvate de sodium, 2 mM de L-glutamine, MEM NEAA (0,1 mM chaque AA) et 50 µM 2-mercaptoéthanol (Gibco) - ci-après dénommé milieu de culture des lymphocytes T - pendant 2 heures à 37 ° C sous 5% de CO<sub>2</sub> avant d'être marquées pour analyse par cytométrie en flux. La viabilité cellulaire a été évaluée en utilisant le kit de marquage des cellules mortes Blue Dead Fixable LIVE / DEAD, pour l'excitation UV (Invitrogen). Les marqueurs extracellulaires ont été marqués avec les anticorps suivants : CD45 APC-Vio770 (clone REA737, Miltenyi Biotec), CD4 PercP-Vio700 (clone REA604, Miltenyi Biotec) CD8 PE-Vio770 (clone REA601, Miltenyi Biotec). Après fixation et perméabilisation à l'aide du kit de fixation / perméabilisation (BD Biosciences) selon les instructions du fabricant, un marquage intracellulaire de l'IFN- $\gamma$  a été réalisé en utilisant un anticorps anti-IFN- $\gamma$  APC (clone AN.18.17.24, Miltenyi Biotec). Les suspensions cellulaires ont été analysées par cytométrie en flux en utilisant un cytomètre BD LSRFortessa (BD Biosciences) équipé du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences). Les données de cytométrie en flux ont

ensuite été analysées à l'aide du logiciel Flowlogic (Miltenyi Biotec). Stratégies d'acquisition en (**Annexe 1 A**).

## B. Purification des cellules T murines

Des cellules T CD4 naïves (CD4 + CD62Lhi) ont été isolées à partir de rate et de ganglions de souris. Les cellules T CD4 ont d'abord été enrichies avec un kit permettant la séparation magnétique des CD4 (L3T4) (Miltenyi Biotec) selon les instructions du fabricant, puis marquées avec des anticorps CD4 Vioblue (clone REA604, Miltenyi Biotec) et CD62L PE (clone MEL-14, BD Biosciences) avant d'être triées par cytométrie en flux à l'aide du BD FACSAria-III (BD Biosciences), pour une pureté de 98%. En variante, pour les Western Blots (WB) et les expériences de transfert adoptif, les cellules T CD4 naïves ont été purifiées en utilisant un kit d'isolement de cellules T CD4 Naïves (Miltenyi Biotec).

Les lymphocytes T CD4 totaux de souris STING V154M/WT ou contrôles ont été isolées avec un kit d'isolement de cellules T CD4 + de souris (Miltenyi Biotec) et directement restimulées en utilisant un cocktail de stimulation cellulaire et du PTI dilué dans du milieu de culture des lymphocytes T pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>, puis marquées avec un marqueur de viabilité, et les anticorps CD4 FITC (clone RM4-4, BD Biosciences) ou CD4 PercP-Vio700 (clone REA604, Miltenyi Biotec) et CD45 APC-Vio770 (clone REA737, Miltenyi Biotec). Le marquage intracellulaire de l'IFN- $\gamma$  a été réalisé en utilisant le kit de fixation/perméabilisation (BD Biosciences) et l'anticorps IFN- $\gamma$  PE (clone REA638, Miltenyi Biotec). Les cellules ont été analysées en utilisant un cytomètre BD LSRFORTESSA équipé du logiciel BD FACSDiva et les données ont été analysées en utilisant le logiciel FlowLogic. Stratégies d'acquisition en (**Annexe 1 B**).

## C. Purification des cellules T humaines

Des cellules T CD4 naïves humaines (CD4 + CD45RA +) ont été isolées à partir de sang de donneurs sains. Les cellules T CD4 ont été purifiées en utilisant le cocktail d'enrichissement des cellules CD4 + T humaines RosetteSep (StemCell) selon les instructions du fabricant, puis marquées avec des anticorps CD4 BV605 (clone RPA-T4, Biolegend) et CD45RA PE ou APC (clone HI100, Biolegend) avant d'être triées par cytométrie en flux avec le BD FACSAria-III.

## D. Traitement et transfection des cellules T

Les cellules T CD4 naïves ont étéensemencées dans des plaques en présence d'anti-CD3 (souris : 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ; clone 17A2; BioXCell ou humain : 5  $\mu\text{g.ml}^{-1}$ , clone OKT-3, BioXcell) et d'anti-CD28 (souris : 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , clone PV1, BioXCell ou humain : 2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , clone CD28.2, Biolegend). Les cellules T CD4 naïves ( $3 \times 10^6$  cellules/mL) ont été transfectées pendant 6h avec 80  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  de di-nucléotides cycliques (sauf indications contraires) en utilisant le milieu Opti-MEM Glutamax (Gibco) et la Lipofectamine 2000 (Invitrogen), selon les instructions du fabricant. En variante, les cellules T CD4 naïves ( $1,5 \times 10^6$  cellules/mL) ont été traitées avec les doses indiquées de DMXAA pendant 4 heures dans le milieu de culture des lymphocytes T.

Le 2'3'-cGAMP (cyclique [G(2',5')pA(3',5')p]) appelé cGAMP; le contrôle 2'3'-cGAMP (2'5'-GpAp) appelé Contrôle; le 2'3'-cGAM (PS)2(Rp/Sp) appelé analogue du cGAMP; le c-di-AMP(bis(3'-5')- adénosine monophosphate dimère cyclique), le c-di-GMP (bis(3'-5')- guanosine monophosphate dimère cyclique) et leurs contrôles respectifs ainsi que le DMXAA (ligand STING murin - analogue de xanthénone) ont été achetés auprès d'InvivoGen.

Lorsque c'est précisé, l'inhibition de mTOR a été obtenue en ajoutant 10 nM de Rapamycine (Rapa; Calbiochem, Merck) pendant l'étape de transfection de 6 h.

## E. Polarisation in vitro des lymphocytes T CD4

Après transfection ou traitement, les surnageants ont été remplacés par du milieu de culture des lymphocytes T contenant des cytokines de polarisation selon le **tableau 2** suivant :

**Tableau 2 : Différenciation des lymphocytes T CD4 in vitro**

	<b>Anti-IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Anti-IL-4</b>	<b>IL-12</b>	<b>IL-4</b>	<b>IL-6</b>	<b>TGF-<math>\beta</math></b>
<b>Th0</b>	50 $\mu$ g/mL	50 $\mu$ g/mL				
<b>Th1</b>		50 $\mu$ g/mL	10ng/mL			
<b>Th2</b>	50 $\mu$ g/mL			20ng/mL		
<b>Th9</b>	50 $\mu$ g/mL			20ng/mL		2ng/mL
<b>Th17</b>	50 $\mu$ g/mL	50 $\mu$ g/mL			20ng/mL	4ng/mL
<b>Treg</b>	50 $\mu$ g/mL	50 $\mu$ g/mL				

Les cellules Th9 humaines ont été différenciées dans du milieu AIM V (Gibco) contenant du TGF- $\beta$  (5 ng.mL<sup>-1</sup>, Miltenyi Biotec), de l'IL-4 (10 ng.mL<sup>-1</sup>, R&D System) et de l'anti-IFN- $\gamma$  humain (3,5  $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>, clone NIB42, Biolegend).

Sauf indication contraire, les cellules ont été différenciées pendant 3 jours à 37 ° C sous 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **IV. Analyse des cellules**

##### **A. Cytométrie en flux**

Les cellules ont été restimulées en utilisant un cocktail de stimulation cellulaire et du PTI dilué dans du milieu de culture de lymphocytes T de souris pendant 2 heures à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. Toutes les cellules ont été marquées avec un marqueur de viabilité cellulaire (eFluor™ 780, eBioscience) ou (fixables LIVE / DEAD, UV, Invitrogen) et CD4 Vioblue (clone REA604, Miltenyi Biotec). L'expression d'IL-9-eGFP dans les cellules Th9 a été évaluée par cytométrie en flux directement après marquage extracellulaire. Le marquage intracellulaire des cellules Th1, Th2 ou Th17 a été réalisé en utilisant le kit de fixation/perméabilisation (BD Biosciences) et les anticorps anti-IFN- $\gamma$  APC (clone AN.18.17.24, Miltenyi Biotec), anti-IL-4 APC (clone 11B11, BD Bioscience) anti-IL-17 BV605 (cloneTC11-18H10, BD Bioscience). Le marquage intracellulaire de FoxP3 dans les Treg a été réalisé en utilisant le kit fix/Perm foxP3 (eBioscience) et un anticorps anti-FoxP3 PE (REA, Miltenyi Biotec). Les cellules ont

été analysées en utilisant un cytomètre BD FACSCANTO ou un cytomètre BD LSRFORTESSA équipé du logiciel BD FACSDiva et les données ont été analysées en utilisant le logiciel FlowLogic. Stratégies d'acquisition en (**Annexe 1 C et D**)

## B. PCR quantitative en temps-réel (RT-qPCR)

L'ARN total a été extrait des cellules T avec le TriReagent (Ambion). En fonction des expériences, 10 à 500 ng d'ARN total ont été rétrotranscrits en utilisant la reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen) ou avec le kit de synthèse d'ADNc iScript (Biorad). L'ADNc a été analysé par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) avec le Power SYBR™ Green PCR Master Mix ou PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems) ou iTaq Universal SYBR Green Supermix 5000 (Biorad) selon les instructions du fabricant combiné avec 500 nM d'amorces sens et anti-sens, en utilisant le système de PCR en temps réel ViiA 7 (Applied Biosystems). Les séquences d'amorces sont indiquées dans le **tableau 3**.

**Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour les analyses RT-qPCR**

<b>Amorces souris (SybR Green technology)</b>		
<b>Target</b>	<b>Amorces sens (5'-3')</b>	<b>Amorces anti-sens (5'-3')</b>
<b><i>Actb</i></b>	atggaggggaatacagccc	ttcttgagctcctctggt
<b><i>Ifng</i></b>	gagctcattgaatgcttggc	gcgtcattgaatcacacctg
<b><i>Ii9</i></b>	aacagtcctccctgtagca	aaggatgatccacctgcaaa
<b><i>Tbx21</i></b>	atcctgtaatggcttggg	tcaaccagcaccagacagag
<b><i>Irf1</i></b>	aggcatcctgttgatgtcc	aattccaaccaaattcccagg
<b><i>Gata3</i></b>	aggatgtccctgctctcctt	gctgaggactctaccataa
<b><i>Irf4</i></b>	caagcacagagtcacctgg	tgcaagctcttgacacaca
<b><i>Irf8</i></b>	aatgatgagaagaccatgtccgt	ccagcttgcatcttctctct
<b><i>Batf</i></b>	gccccctagcagtcaagaag	tcagatgagtcctgttgccag
<b><i>Rorc</i></b>	ggtgataacccgtagtgga	ctgcaaagaagaccacacc
<b><i>Foxp3</i></b>	ctcgtctgaaggcagagtca	tggcagagaggtattgaggg
<b><i>Spi1</i></b>	tgcagctctggaagtgggt	agcgatggagaaagccatag
<b><i>Ifna</i></b>	gaatttcccctgaccagga	acttctgctctgaccacctc
<b><i>Ifnb1</i></b>	tccagcactgggtggaatga	ggtaccttgaccctccagt

<b><i>Ifit1</i></b>	tcaaggcaggtttctgagga	attctctcccatggttgctgt
<b><i>Ifit2</i></b>	gctctggaaaaggacccgaa	gcttcagtccaagaggact
<b><i>Mx2</i></b>	cctattcaccaggctccgaa	cagcataaccttttgcgaaattct
<b><i>Ccl5</i></b>	ccacttcttctctgggttg	gtgcccacgtcaaggagtat
<b><i>Cxcl10</i></b>	ctcatctgctgggtctgag	cctatggccctcattctcac
<b><i>Tnfa</i></b>	agggtctgggcatagaact	ccaccacgctcttctgtctac
<b><i>Il6</i></b>	accagaggaaatttcaataggc	tgatgcattgcagaaaaca
<b>Amorces humaines (SybR Green technology)</b>		
<b><i>ACTB</i></b>	gttgtcgacgacgagcg	gcacagagcctcgcctt
<b><i>IL9</i></b>	catggctgttcacaggaaaa	ccatgcaaacaagataccca
<b>TaqMan™ Gene Expression Assays</b>		
<b>Target</b>	<b>TaqMan Assay ID</b>	<b>Probe/Quencher</b>
<b><i>Actb</i></b>	Mm02619580_g1	FAM/MGB
<b><i>Ifng</i></b>	Mm01168134_m1	FAM/MGB

L'expression de l'*Ifng* dans les cellules T CD4 isolées de souris STING V154M/WT ou des TILs (MC38) a été analysée en utilisant le TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems) et le TaqMan™ Gene Expression Assay (Applied Biosystems) selon les instructions du fabricant (**Tableau 3**). Pour l'analyse de l'expression d'*Ifng* dans les CD4 isolées des TILs, l'équivalent de 6 ng d'ADNc ont été préalablement préamplifiés avec le TaqMan™ PreAmp Master Mix (Applied Biosystems).

L'expression des gènes cibles a été normalisée à l'expression de l'*Actb* de souris ou de l'*ACTB* humain (expression relative, RE). Lorsqu'il est indiqué, le Fold Change (FC) a été calculé en normalisant les données aux conditions témoins (cellules WT contrôles, pour chaque point dans le temps). Lorsque la rapamycine a été utilisée, les FC ont été calculés en normalisant les données pour chaque traitement (rapamycine ou véhicule).

## C. ELISA

Les surnageants de culture cellulaire ont été analysés par ELISA pour l'IFN- $\gamma$  (BD Bioscience), l'IL-9 (BioLegend) ou l'IFN- $\beta$  (PBL Assay Science) ou pour l'IL-9 humaine (BioLegend) selon les instructions du fabricant.

## D. Western Blot

Les cellules T CD4 ont d'abord été lysées dans un tampon RIPA (Pierce) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéase (Sigma) et un cocktail d'inhibiteurs de phosphatase 3 (Sigma) sur de la glace pendant 10 min. Les lysats ont ensuite été centrifugés à 13 000 g, 4°C pendant 10 min et les surnageants ont été récupérés pour les analyses par WB. Pour le fractionnement subcellulaire, les fractions cytosoliques (Cyt) et nucléaires (Nuc) ont été purifiées en utilisant le kit d'extraction de protéines subcellulaires ProteoExtract® (Merk) selon les instructions du fabricant. Les lysats de protéines ont été séparés sur des gels préfabriqués à gradient de 4 à 15% (Bio-rad) avant transfert sur des membranes en PolyVinylidène DiFluorure en utilisant un programme MIXED MW sur le Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-rad). Les membranes ont été saturées dans du TBS contenant 0,1% de Tween 20 (TBS-T) et 5% de BSA ou de lait en poudre pendant 1h à température ambiante puis incubées pendant la nuit à 4°C avec des anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage approprié. Ils ont ensuite été incubés avec un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase de raifort (Cell Signaling Technology, 7074S) dilué au 1:5000 dans du TBS-T 5% BSA et les protéines ont été détectées par chimiluminescence (Clarity Western ECL Substrate, Bio-rad ou SuperSignal West Femto Substrat de sensibilité maximale, ThermoFisher). L'analyse de densitométrie a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

Les anticorps suivants ont été achetés auprès de Cell Signaling Technology (CST) et dilués au 1:1000 dans du TBS-T 5% BSA: Phospho-STING (Ser 366, 19781), TBK1 / NAK (clone D1B4, 3504) Phospho-TBK1 (Ser 172, clone D52C2, 5483), Phospho-IRF-3 (Ser 396, clone 4D4G, 4947), IRF3 (clone D83B9, 4302), Phospho-NF kappa B P65 (Ser 536, clone 93H1, 3033), NF kappa B P65 (clone D14E12, 8242), Phospho-p70S6K (Thr389, clone 108D2, 9234), Phospho-S6 (Ser235 / 236, clone D57.2.2E, 4858). L'anticorps ciblant l'histone H3 (clone D1H2, 4499, CST) a été dilué

au 1:2000 dans du TBS-T 5% lait. Les anticorps conjugués  $\beta$ -Actin-HRP (clone 8H10D10, 12262, CST) et anti-GAPDH HRP (clone 14C10, 3683, CST) ont été dilués au 1:5000 dans du TBS-T 5% BSA. L'anticorps anti-STING (TMEM173) (19851-1-AP, Proteintech) a été dilué à 1:1000 dans du TBS-T 5% lait.

## E. RNAseq

Des cellules T CD4 naïves de souris ont été isolées et stimulées avec le cGAMP ou son contrôle puis polarisées *in vitro* en cellules Th1 ou Th9 comme décrit ci-dessus pendant 16 h et 48 h. L'ARN total a été extrait avec le TriReagent selon les instructions du fabricant. La banque de données a été préparées à partir de 500 ng d'ARN total en utilisant le kit TruSeq Stranded Total RNA Library Prep (Illumina) après élimination de l'ARNr avec le kit Ribo-zero rRNA Removal Kit (Illumina) en suivant les instructions du fabricant. Le séquençage de l'ARN a été réalisé sur le dispositif NextSeq500 (Illumina). Les banques d'RNA-seq ont été séquencées par lectures de 76 pb en sens unique. Les fichiers FASTQ bruts ont été réduites pour les séquences d'adaptateurs résiduelles et la qualité filtrée par le logiciel Trimmomatic. Les lectures ont été pseudo-alignées sur le génome mm10 via le logiciel Kallisto et une analyse d'expression différentielle a été réalisée avec le package DESeq2 R. Le regroupement hiérarchique non supervisé des gènes a été effectué à l'aide de l'outil Web Clustvis en utilisant la corrélation de Ward. L'analyse d'enrichissement de l'ensemble de gènes (GSEA) a été réalisée à l'aide du logiciel GSEA et à l'aide de l'outil Web EnrichR avec la base de données GO Biological Process 2018. Les données sont déposées dans la base de données Gene Expression Omnibus (GEO) sous le numéro d'accès GSE147300.

## F. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel Prism (logiciel Graph Pad, La Jolla, CA, USA). Pour la comparaison de deux groupes, le test Mann-Whitney (somme des rangs) a été utilisé. Pour la comparaison de plusieurs groupes, le test ANOVA unidirectionnelle ordinaire avec un test de comparaisons multiples de Dunnett ou le test ANOVA bidirectionnelle ordinaire avec un test de comparaisons multiples de Sidak ont été utilisées. Toutes les valeurs p sont bilatérales.



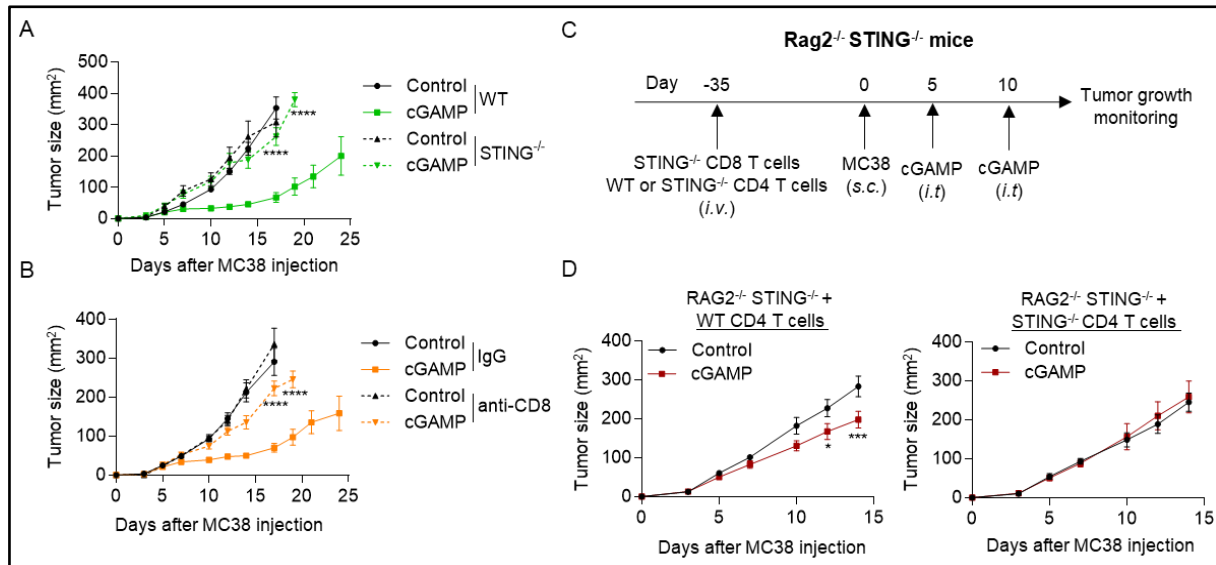
# RÉSULTATS

## I. L'activation de STING augmente les propriétés effectrices des lymphocytes T CD4 *in vivo*

Nous avons dans un premier temps évalué les mécanismes immunitaires qui contribuent aux effets antitumoraux du cGAMP *in vivo*. En effet, s'il a été montré que l'injection de cGAMP en intra-tumorale (i.t) conduisait à des effets antitumoraux dépendants de l'activation des cellules dendritiques CD8 $\alpha$ , qui via leur sécrétion d'IFN- $\beta$  induit le cross-priming et l'activation des CD8 cytotoxiques, le rôle des lymphocytes T CD4 dans les effets antitumoraux du cGAMP reste peu claire. Dans un premier temps des souris sauvages (WT) ou déficientes pour STING (STING<sup>-/-</sup>), porteuses de tumeurs MC38, ont été traitées à J5 et J10 par une injection (i.t) de cGAMP. Ces résultats montrent que les effets antitumoraux du cGAMP sont entièrement dépendants de l'expression de STING dans les cellules de l'hôte, suggérant un rôle prédominant du système immunitaire plutôt qu'un effet cytotoxique direct du cGAMP sur les cellules tumorales (**Fig 13A**). Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps anti-CD8 $\alpha$ , permettant d'éliminer les lymphocytes T CD8 mais également les cellules dendritiques CD8 $\alpha$ , diminue fortement l'effet antitumoral du cGAMP confirmant ainsi les données de la littérature. Néanmoins le cGAMP conserve des effets antitumoraux mineurs suggérant d'autres mécanismes impliqués dans les effets antitumoraux du cGAMP (**Fig 13B**).

Sachant que les CD4 sont également nécessaires pour la mise en place d'une réponse antitumorale efficace, nous avons décidé d'évaluer quel était le rôle de l'activation intrinsèque de STING dans les CD4 *in vivo*. Pour cela nous avons utilisé le modèle de souris RAG2<sup>-/-</sup> STING<sup>-/-</sup>. Ces souris, ne possédant ni lymphocytes T ni lymphocytes B et étant entièrement déficientes pour STING, ont été reconstituées avec des lymphocytes T CD4 issus de souris sauvages (WT) ou déficientes pour STING (STING<sup>-/-</sup>) et des lymphocytes T CD8 STING<sup>-/-</sup> (**Fig 13C**). Nous avons ainsi pu mettre en évidence, que le traitement avec le cGAMP réduisait la croissance tumorale uniquement chez les souris reconstituées avec des CD4 WT, et non chez les souris reconstituées avec des CD4 STING<sup>-/-</sup> (**Fig 13D**). Ces données montrent qu'une activation intrinsèque de STING dans les CD4 (en absence d'APCs exprimant STING),

permet de promouvoir leurs propriétés antitumorales *in vivo*, suggérant une contribution des lymphocytes T CD4 dans les effets antitumoraux du cGAMP.



**Figure 13 : Les CD4 contribuent à l'effet antitumoral du cGAMP**

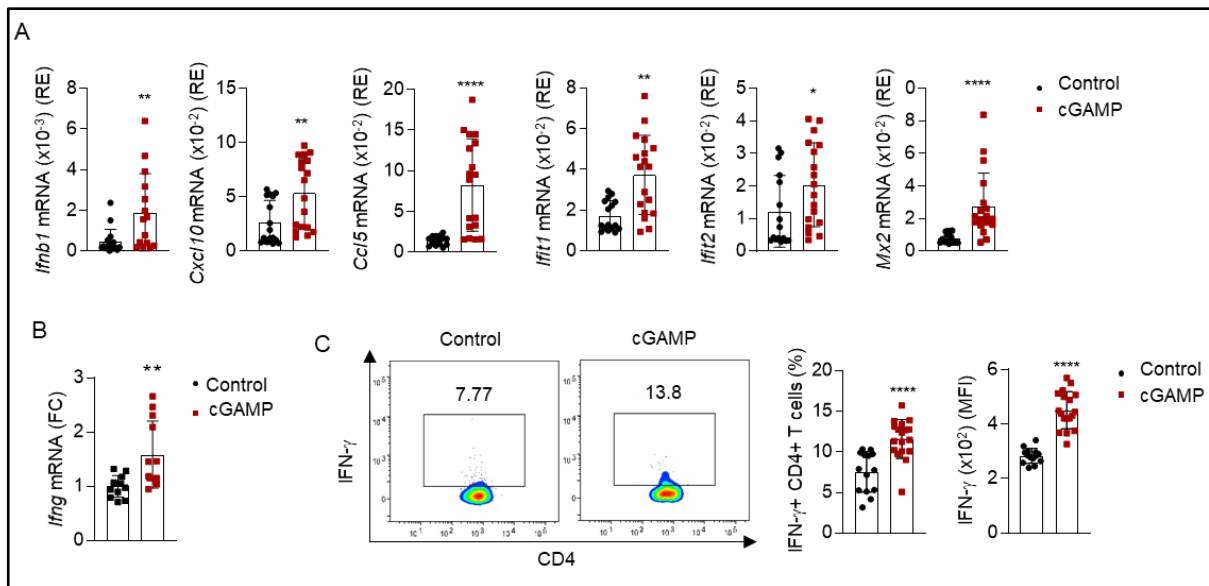
**A.** Croissances tumorales dans des souris sauvages (WT) ou déficientes pour *STING* (*STING*<sup>-/-</sup>) porteuses de tumeurs MC38 et traitées ou non en intra tumorale (*i.t*) avec le cGAMP.

**B.** Croissances tumorales dans des souris WT porteuses de tumeurs MC38, traitées ou non (*i.t*) avec le cGAMP, et injectées en intrapéritonéal (*i.p*) avec un anticorps anti-CD8 ou son contrôle isotypique (IgG).

**C.** Schéma expérimental des croissances tumorales MC38 effectuées dans le modèle *RAG2*<sup>-/-</sup>*STING*<sup>-/-</sup>.

**D.** Croissances tumorales dans des souris *RAG2*<sup>-/-</sup>*STING*<sup>-/-</sup>.

Nous avons par la suite analysé les lymphocytes T infiltrant les tumeurs 1 jour après le traitement des tumeurs MC38 (soit à J6). Les cellules T CD4 ont été isolées, et l'expression des gènes associés à l'activation de *STING* a été analysé par qPCR. Nous avons pu observer une augmentation de l'expression de l'*Irfn1*, ainsi que des gènes stimulés par les interférons (ISG) *Cxcl10*, *Ccl5*, *Ifit1*, *Ifit2* et *Mx2* dans les CD4 issus de tumeurs traitées au cGAMP, démontrant ainsi une activation de la voie *STING* dans les CD4 *in vivo* (**Fig 14A**). Nous avons également noté une augmentation de l'expression d'*Irfn3* par les CD4 (**Fig 14B**), et l'analyse des TILs par cytométrie en flux nous a permis de confirmer que le traitement avec le cGAMP favorisait la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4 (**Fig 14C**).

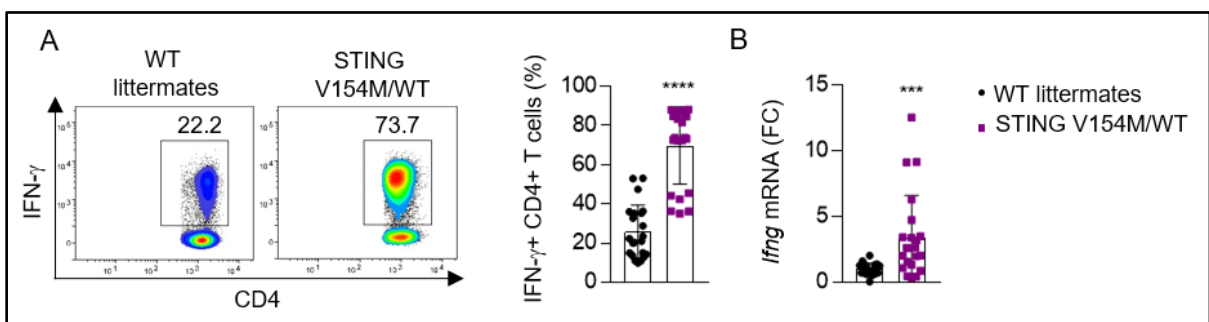


**Figure 14 : L'activation de STING par le cGAMP *in vivo* augmente les propriétés effectrices des CD4 infiltrant la tumeur**

**A-B.** Analyses qPCR (expression relative, RE) dans les CD4 isolés de tumeurs MC38 traitées ou non au cGAMP.

**C.** Analyse de l'IFN- $\gamma$  sécrété par les CD4 par cytométrie en flux dans des tumeurs MC38 traitées ou non au cGAMP.

Afin de tester si l'activation intrinsèque de STING dans les CD4 *in vivo* conduit à l'augmentation de leurs propriétés effectrices, nous avons décidé d'utiliser le modèle murin STING V154M/WT. Ces souris possèdent en effet une mutation activatrice de STING et l'analyse des CD4 totaux, issus de rate et de ganglions, par cytométrie en flux et qPCR nous a permis de mettre en évidence une augmentation accrue de l'expression d'*Ifng* et de la production d'IFN- $\gamma$  par les lymphocytes T CD4 dans ces souris, en comparaison aux souris contrôles (**Fig 15A et B**). Ces données confirment à nouveau que l'activation de STING *in vivo* conduit à une augmentation des propriétés effectrices des lymphocytes T CD4.

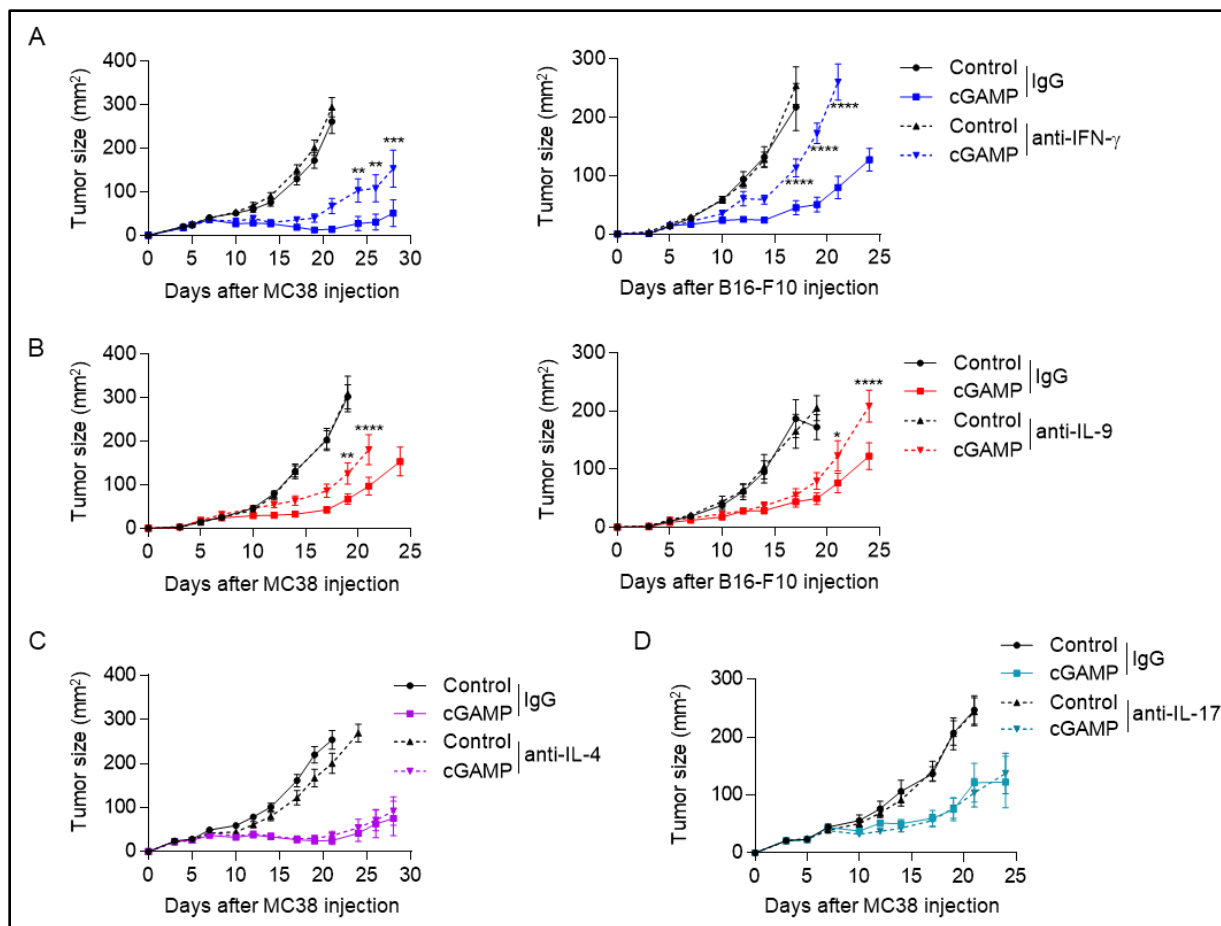


**Figure 15 : L'activation de STING induite par une mutation augmente les propriétés effectrices des CD4 in vivo.**

**A.** Analyse de l'IFN- $\gamma$  sécrété par les CD4 par cytométrie en flux dans des souris contrôles ou STINGV154M/WT

**B.** Analyse de l'expression d'*Irfng* (Fold Change, FC) dans les CD4 issus de souris contrôles ou STINGV154M/WT, par qPCR.

Comme l'activation intrinsèque de STING dans les CD4 augmente leurs propriétés effectrices et notamment leur sécrétion d'IFN- $\gamma$ , nous avons testé l'implication de l'IFN- $\gamma$  dans les effets antitumoraux du cGAMP. En effet, l'utilisation d'anticorps neutralisants l'IFN- $\gamma$  dans des souris porteuses de tumeurs MC38 réduit l'effet antitumoral du cGAMP. Par ailleurs ces résultats ont été confirmés avec le modèle murin de mélanome B16-F10 (**Fig 16A**). Si les lymphocytes Th1, sécréteurs d'IFN- $\gamma$ , sont connus pour leurs propriétés antitumorales, les CD4 peuvent également sécréter d'autres cytokines en fonction de leur environnement. Nous avons ainsi évalué la contribution de trois autres cytokines sécrétées par les CD4 effecteurs, l'IL-4, l'IL-17 et l'IL-9, respectivement sécrétées par les lymphocytes Th2, Th17 et Th9, grâce à l'utilisation d'anticorps neutralisants. Si les résultats montrent une implication modérée de l'IL-9 dans les deux modèles MC38 et B16-F10 (**Fig 16B**), l'IL-4 et l'IL-17 ne semblent pas contribuer aux effets antitumoraux du cGAMP dans le modèle MC38 (**Fig 16C et D**).



**Figure 16 : Les effets antitumoraux du cGAMP sont médiés par l'IFN- $\gamma$  et l'IL-9, et non par l'IL-4 ou l'IL-17**

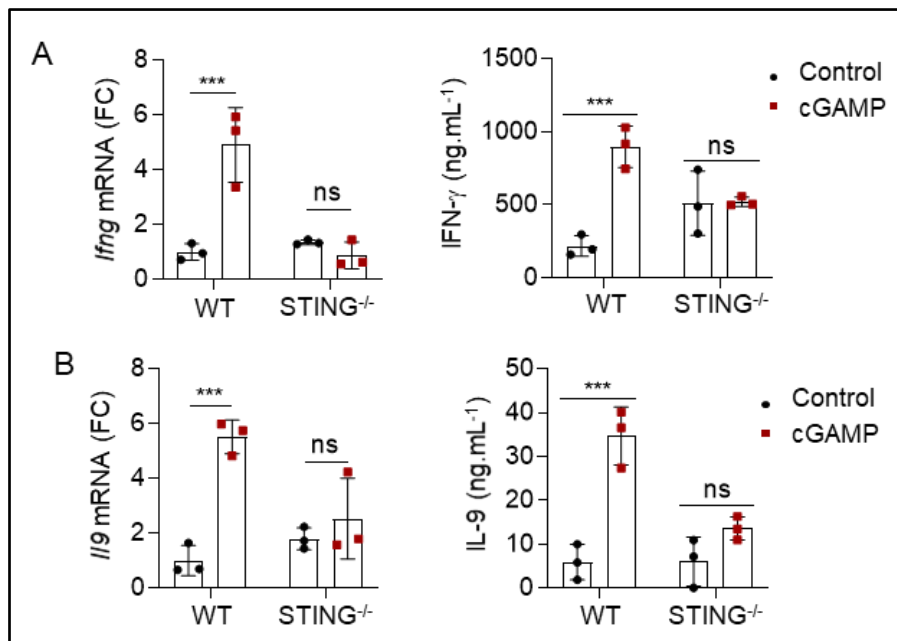
**A-B.** Croissance tumorale dans des souris WT porteuses de tumeurs MC38 (gauche) ou B16F10 (droite), traitées ou non (i.t) avec le cGAMP, et injectées (i.p) avec un anti-IFN- $\gamma$  (A) ou un anti-IL-9 (B) ou leurs contrôles (IgG).

**C-D.** Croissance tumorale dans des souris WT porteuses de tumeurs MC38, traitées ou non (i.t) avec le cGAMP, et injectées (i.p) avec un anti-IL-4 (C) ou un anti-IL-17 (D) ou leurs contrôles (IgG).

L'ensemble des résultats indiquent que, malgré une implication majeure des lymphocytes T CD8, les effets antitumoraux du cGAMP sont également médiés par l'activation de STING dans les CD4 ainsi que leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9.

## II. Différents ligands de STING augmentent la sécrétion d'IFN- $\gamma$ et d'IL-9 des lymphocytes Th1 et Th9 respectivement

Nous avons par la suite évalué si l'activation directe de STING dans les CD4 *in vitro* augmentait leur sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9. Pour cela, des lymphocytes T CD4 naïfs ont été stimulés avec le cGAMP *in vitro*, en absence d'APC mais en présence d'anti-CD3 et d'anti-CD28, puis différenciés en lymphocytes Th1 ou Th9. L'analyse de l'expression et de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9 par qPCR et ELISA nous a permis de mettre en évidence que le cGAMP augmentait significativement les propriétés effectrices des lymphocytes Th1 et Th9. L'utilisation de cellules issues de souris déficientes pour STING (STING<sup>-/-</sup>) permet par ailleurs de confirmer que le cGAMP augmente la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9 de manière dépendante de STING (**Fig 17A et B**).

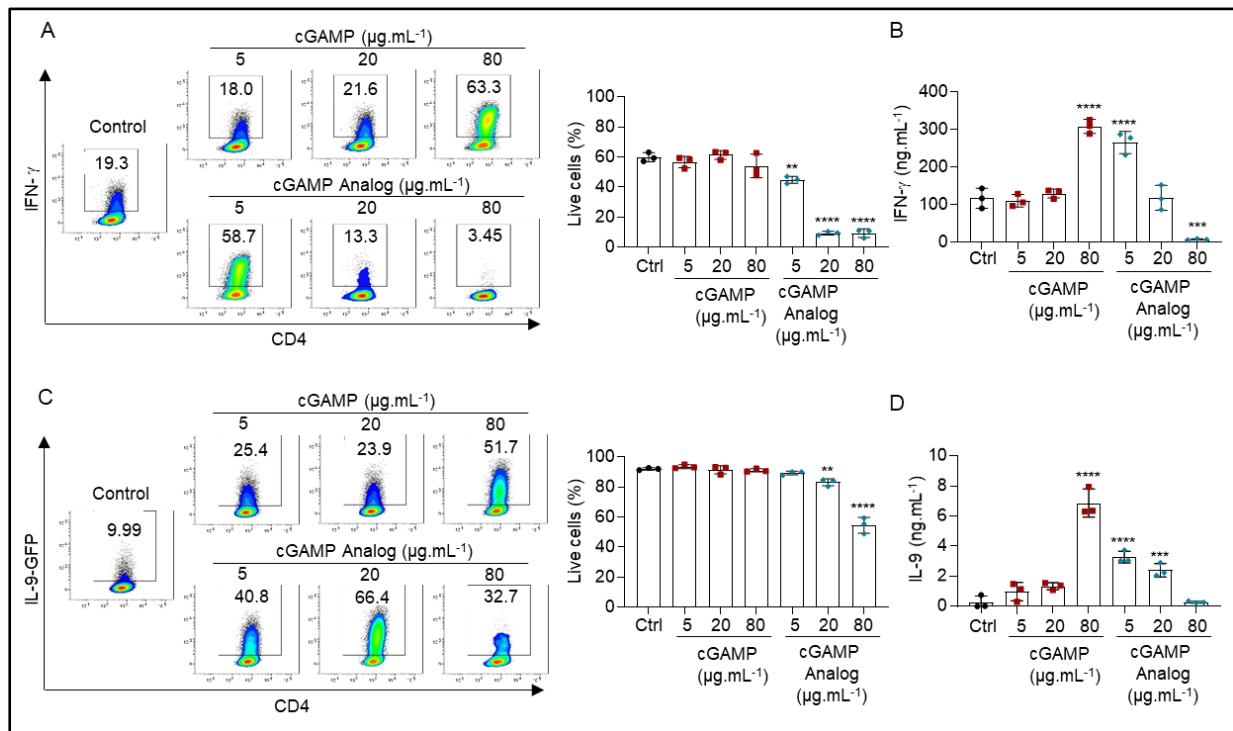


**Figure 17 : Le cGAMP augmente l'IFN- $\gamma$  et l'IL-9 des cellules Th1 et Th9 de manière dépendante de STING**

**A-B.** Des cellules CD4 naïves issues de souris WT ou STING<sup>-/-</sup> ont été stimulées avec le cGAMP ou son contrôle et polarisées en Th1 (A) ou Th9 (B). L'expression d'*Ifng* et d'*Il9* (Fold Change, FC) ainsi que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9 ont été analysées par qPCR et ELISA respectivement.

Plusieurs études ont suggéré que l'intensité de la signalisation STING était modulée en fonction du ligand. Nous avons ainsi testé différents ligands de STING afin d'évaluer leurs effets sur la différenciation Th1 et Th9. Le 2'3'-cGAM(PS)<sub>2</sub>(Rp/Sp) est

un analogue plus stable et plus puissant du 2'3'-cGAMP, modifié par l'ajout de ponts disulfures (Li, Yin et al. 2014). Nous avons pu mettre en évidence, par ELISA et cytométrie en flux, que l'analogue du cGAMP (cGAMP Analog) permettait en effet d'augmenter l'IFN- $\gamma$  et l'IL-9 des Th1 et des Th9 à des doses 10 à 15 fois plus faibles que le cGAMP (**Fig 18**). Par ailleurs de fortes doses conduisent à la mort des cellules, en particulier des Th1, comme le montre l'analyse de la viabilité cellulaire par cytométrie en flux (**Fig 18 A et C**).



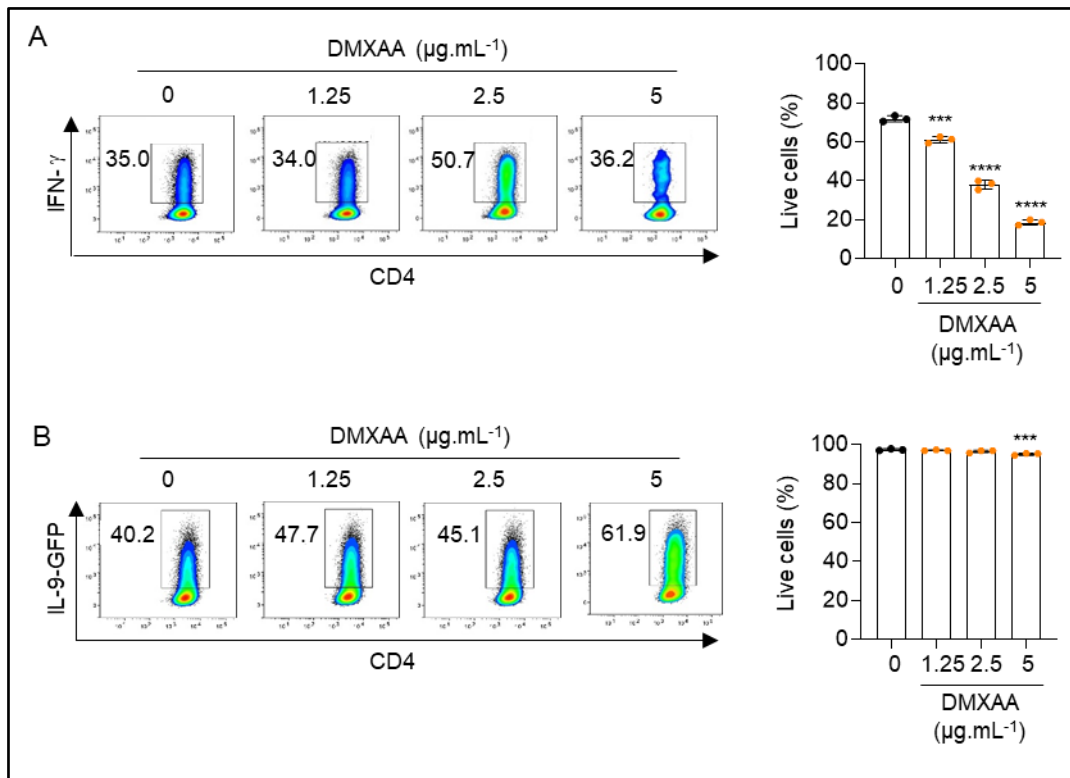
**Figure 18 : Effet du 2'3'-cGAMP et son analogue 2'3'-cGAM(PS)2(Rp/Sp), sur les propriétés effectrices et la viabilité des cellules Th1 et Th9**

**A-D.** Des cellules CD4 naïves issues de souris WT (A-B) ou IL-9-GFP (C-D) ont été stimulées avec le cGAMP, son analogue (2'3'-cGAM(PS)2(Rp/Sp)) ou son contrôle et polarisées en Th1 (A-B) ou Th9 (C-D). La production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-9-GFP ainsi que la viabilité des cellules a été analysé par cytométrie en flux (A-C) et ELISA (B-D).

Si les équipes de Poltorak et Ablasser ont respectivement montré que le DMXAA et le CMA, deux agonistes synthétiques de STING, conduisait à la mort des lymphocytes T (Gulen, Koch et al. 2017, Larkin, Ilyukha et al. 2017), nous montrons ici que de faibles doses de DMXAA ( $\leq 5\mu\text{g/mL}$ ) permettent également une augmentation mineure des propriétés effectrices des lymphocytes Th1 et Th9. Néanmoins, et en accord avec la littérature, il semblerait que l'activation de STING par des ligands



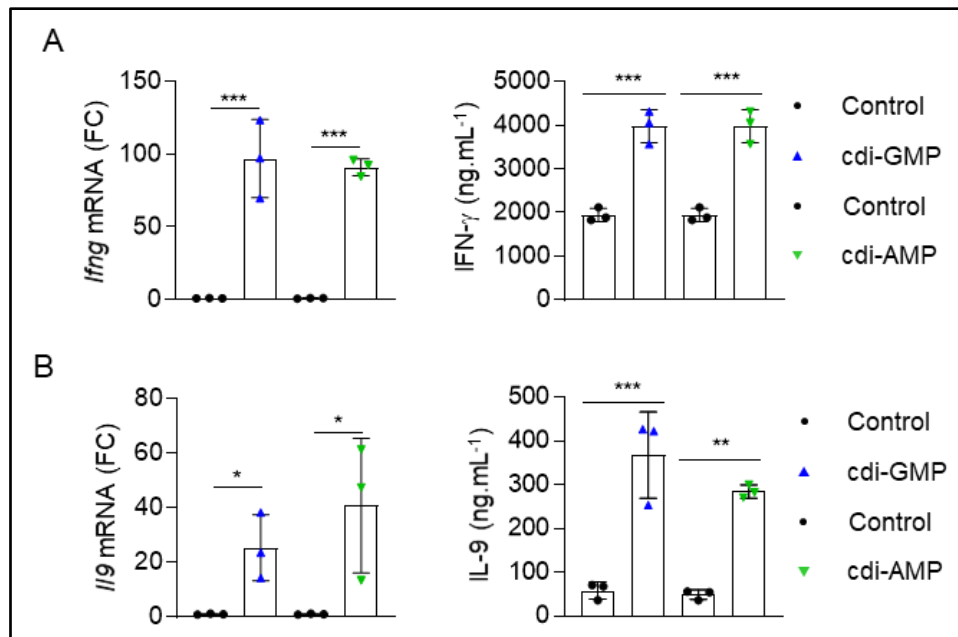
synthétiques favorise davantage la mort que l'activation des T CD4, en particulier les Th1 (**Fig 19**).



**Figure 19 : Effet du ligand synthétique DMXAA sur les propriétés effectrices et la viabilité des cellules Th1 et Th9**

**A-B.** Des cellules CD4 naïves issus de souris WT (**A-B**) ou IL-9-GFP (**C-D**) ont été stimulées avec du DMXAA et polarisées en Th1 (**A**) ou Th9 (**B**). La production d'IFN- $\gamma$ , d'IL-9-GFP ainsi que la viabilité des cellules a été analysé par cytométrie en flux.

Le c-di-AMP et c-di-GMP sont deux ligands de STING, seconds messagers bactériens. Encore une fois, ces deux ligands naturels de STING permettent d'augmenter respectivement l'expression et la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9 des cellules Th1 et Th9 (**Fig 20 A et B**).

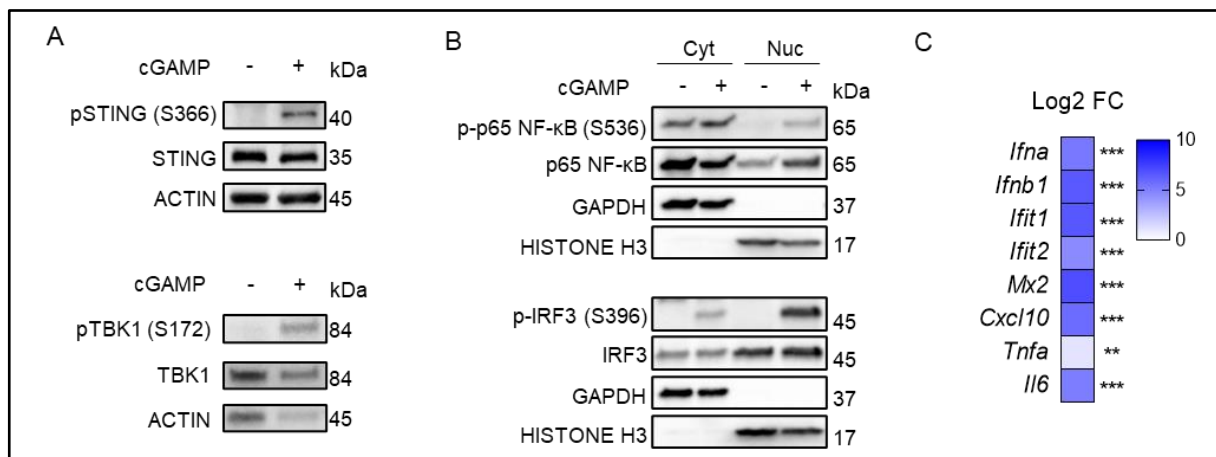


**Figure 20 : Effet des di-nucléotides cycliques bactériens (cdi-AMP et cdi-GMP) sur les propriétés effectrices des cellules Th1 et Th9**  
**A-B.** Des cellules CD4 naïves issus de souris WT ont été stimulées avec du cdi-AMP, cdi-GMP ou leurs contrôles respectifs et polarisées en Th1 (A) ou Th9 (B). L'expression d'*Ifng* et d'*Il-9* (Fold Change, FC) ainsi que la sécrétion d'*IFN-γ* et d'*IL-9* ont été analysées par qPCR et ELISA respectivement.

Si l'activation intrinsèque de STING dans les CD4 permet ainsi de promouvoir leurs fonctions effectrices, une activation trop importante (en particulier avec des ligands synthétiques comme le DMXAA), favorise davantage la mort cellulaire. Par ailleurs nos résultats démontrent que les effets de l'activation de STING varient également en fonction des conditions de polarisation des CD4. En effet il semblerait que les cellules Th1 soient plus sensibles et répondent plus fortement aux ligands de STING, en comparaison aux Th9.

### III. Profil transcriptionnel des lymphocytes Th1 et Th9 stimulés avec le cGAMP

Pour déterminer par quels mécanismes l'activation de STING favorise les différenciations Th1 et Th9, nous avons analysé les voies de signalisation induites par l'activation de STING dans les CD4 naïfs stimulés ou non avec le cGAMP pendant 6h. Nous avons ainsi pu mettre en évidence par Western Blot, que le cGAMP induisait très rapidement la phosphorylation des protéine STING et TBK1 (**Fig 21A**) ainsi que la translocation nucléaire des protéines P65 et IRF3 phosphorylées (**Fig 21B**). De plus, l'expression des interférons de Type I (*Ifna*, *Ifnb*), des ISG (*Ifit1*, *Ifit2*, *Cxcl10*, *Mx2*) et des cytokines pro-inflammatoires (*Tnfa*, *Il6*) a été analysé par qPCR, et les résultats montrent une forte augmentation de l'expression de ces gènes après 6h de stimulation avec le cGAMP (**Fig 21C**).



**Figure 21: La voie de signalisation STING est induite dans les CD4 stimulés avec le cGAMP**

Des cellules T CD4 naïves issus de souris WT ont été stimulées avec du cGAMP pendant 4h (A) ou 6h (B, C).

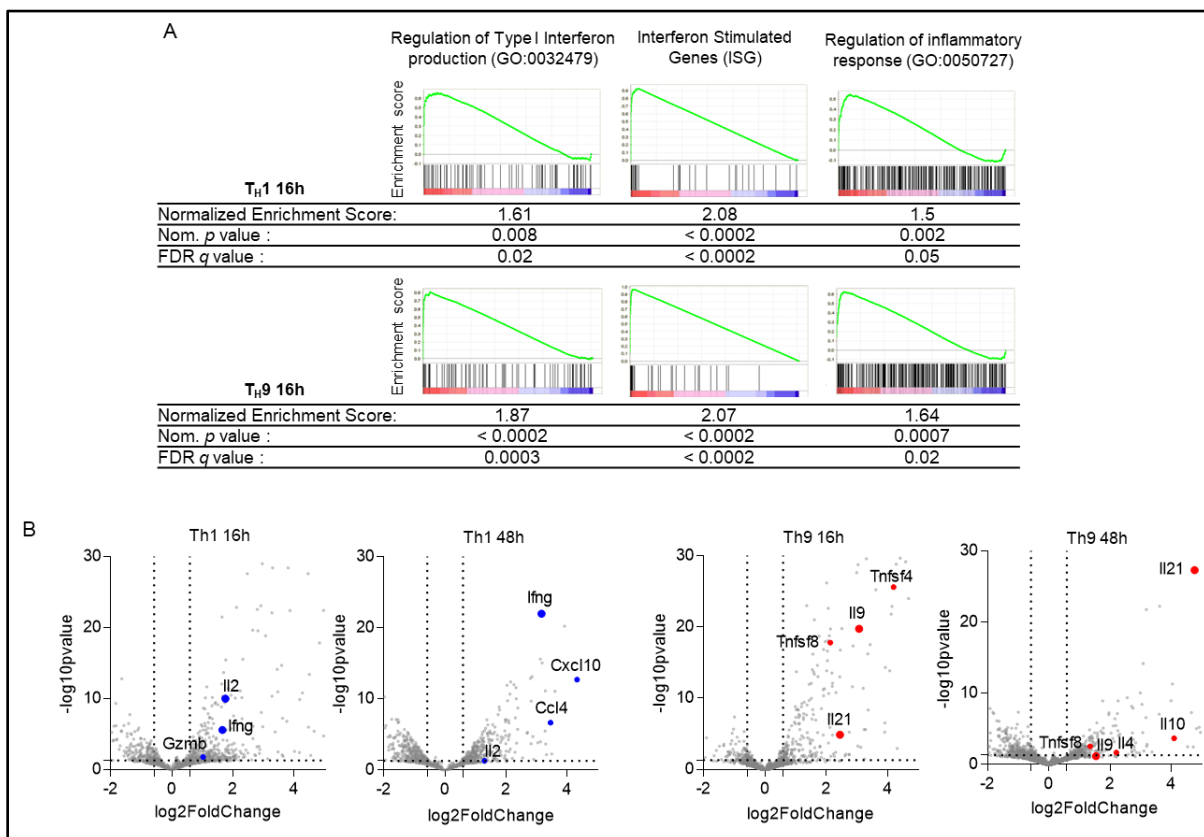
**A.** Analyse de l'expression de STING, TBK1 et de leurs formes phosphorylées par Western Blot

**B.** Analyse de la localisation cellulaire (Cytosol, Cyt ou Noyau, Nuc) d'IRF3, P65 et de leurs formes phosphorylées par Western Blot

**C.** Analyse qPCR (Heatmap, Log2FC) des gènes associés à l'activation de STING (*Ifna*, *Ifnb1*, *Ifit1*, *Ifit2*, *Mx2*, *Cxcl10*, *Tnfa* et *Il6*)

Afin de mieux comprendre le rôle de la signalisation STING au sein des lymphocytes Th1 et Th9 nous avons analysé ces cellules stimulées ou non avec le cGAMP à 16 et 48h par séquençage de l'ARN (RNAsequencing). L'analyse d'enrichissement d'ensemble de gènes (Gène Set Enrichment Analysis, GSEA) a

permis de montrer, quel que soit le sous type lymphocytaire, que l'activation de la voie de signalisation STING par le cGAMP favorisait l'expression des ensembles de gènes suivants : Régulation de la production des Interférons de type I (GO:0032479), Gènes Stimulés par les Interférons (ISG), et Régulation de la réponse inflammatoire (GO:0050727). Ces données montrent que les lymphocytes T CD4 différenciés et stimulés avec le cGAMP, présentent un profil transcriptionnel pro-inflammatoire associé à la signalisation STING qui se maintient dans le temps (au moins 48h) (**Fig 22A + Annexes 2**). De plus, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de plusieurs cytokines effectrices et chimiokines telles que l'*Ifng*, l'*Il2*, le *Gzmb* et le *Ccl4* dans les lymphocytes Th1, et l'*Il9*, l'*il21*, le *tnfsf4* (OX40L), *tnfsf8* ou encore l'*Il10* dans les lymphocytes Th9 (**Fig 22B**). Néanmoins, nous n'avons pas noté de régulation marquée des facteurs de transcription clés associés aux différenciations Th1 et Th9. En plus de l'augmentation respective de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-9, ces données montrent un profil plutôt pro-inflammatoire des cellules Th1 et Th9 stimulées avec le cGAMP.



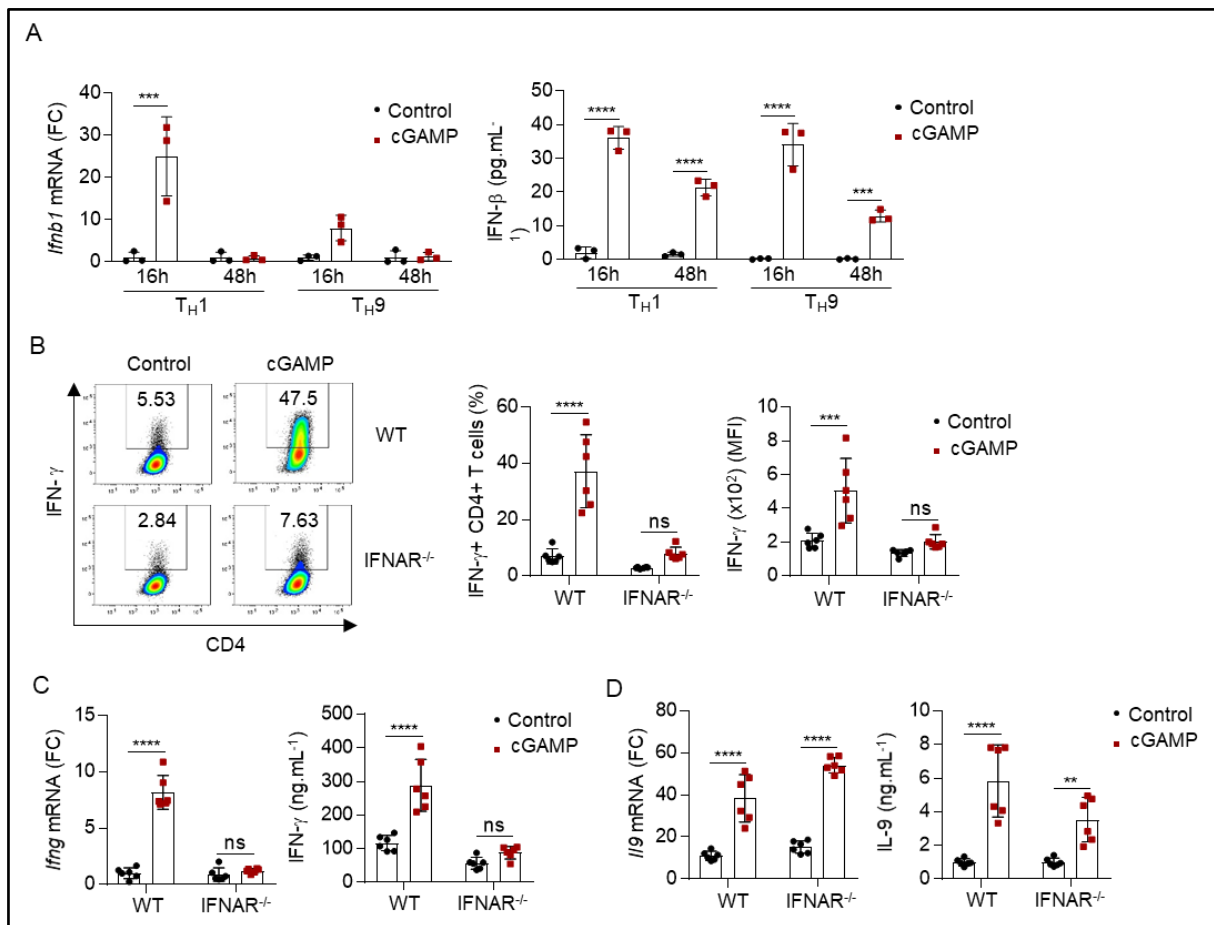
**Figure 22 : Analyse RNAseq des cellules CD4 naïves stimulées avec le cGAMP et polarisées 16 et 48h en Th1 et Th9**

**A.** Analyse GSEA à 16h. Régulation de la production des Interférons de type I (GO:0032479), Gènes Stimulés par les Interférons (ISG), et Régulation de la réponse inflammatoire (GO:0050727).

**B.** Volcano Plot représentant les gènes associés à la différenciation Th1 (bleu) ou Th9 (rouge).

#### IV. L'activation de STING augmente la sécrétion d'IFN- $\gamma$ des Th1 de manière dépendante de l'axe IRF3/IFN- $\beta$ /IFNAR

Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes conduisant à l'augmentation d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9 dans les lymphocytes Th1 et Th9 respectivement. Tout d'abord, comme nous avons noté dans l'analyse RNAseq, mais également *in vivo*, une forte induction des programmes transcriptionnels associés aux Interférons de type I et aux ISG, nous avons voulu savoir dans quelle mesure l'activation de la voie STING modulait la production d'IFN- $\beta$  dans les lymphocytes T CD4 *in vitro*. Nous avons pu montrer que le cGAMP induisait une forte augmentation de l'expression d'*Irfnb*, et que les deux sous types lymphocytaires Th1 et Th9 sont capables de sécréter l'IFN- $\beta$  (**Fig 23A**). Nous avons ainsi testé si l'augmentation d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9 pouvait résulter d'un mécanisme autocrine par l'intermédiaire du récepteur aux Interférons de Type I (IFNAR). Si une déficience pour ce récepteur (IFNAR<sup>-/-</sup>) n'empêche pas le cGAMP



**Figure 23 : Rôle des Interférons de Type I dans l'augmentation des propriétés effectrices médiée par le cGAMP.**

Des cellules CD4 naïves issues de souris WT ou *IFNAR*<sup>-/-</sup> (B-D) ont été stimulées avec le cGAMP et polarisées en Th1 ou Th9.

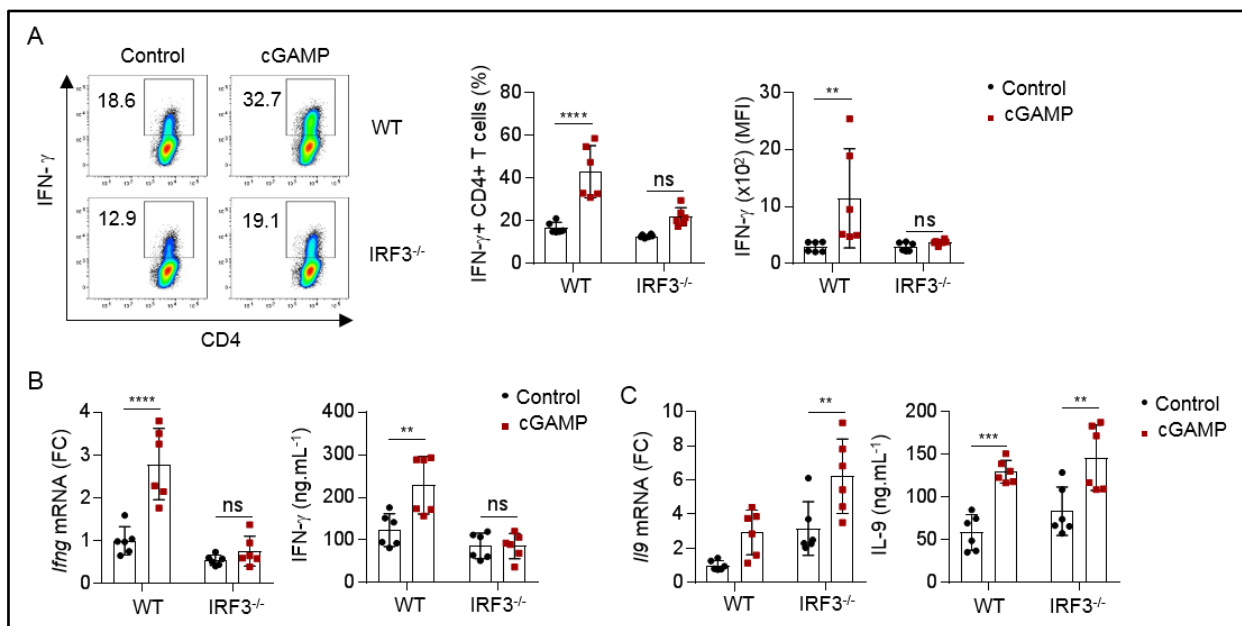
**A.** Analyse de l'expression d'*Ifnb1* (Fold Change, FC) et de la sécrétion d'IFN-β par qPCR et ELISA à 16h et 48h.

**B.** Analyse de la production d'IFN-γ des cellules Th1 par cytométrie en flux.

**C-D.** Analyse de l'expression d'*Ifng* et d'*Il-9* (FC) ainsi que de la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-9 par qPCR et ELISA respectivement.

d'induire une augmentation de l'IL-9 dans les Th9 (Fig 23D), il est cependant indispensable pour l'induction d'IFN-γ dans les Th1 (Fig 23B et C).

Sachant que l'expression d'*Ifnb* est médiée principalement par le facteur de transcription IRF3 et que la translocation de phospho-IRF3 dans le noyau est fortement induite après stimulation avec le cGAMP dans les lymphocytes T CD4 (Fig 21B), nous avons testé l'implication de ce facteur de transcription dans l'augmentation d'IFN-γ et d'IL-9. Encore une fois, si IRF3 est indispensable pour l'augmentation d'IFN-γ médiée par STING dans les Th1 (Fig 24A et B), il ne semble pas requis pour les cellules Th9 dans ce contexte (Fig 24C).



**Figure 24 : Rôle d'IRF3 dans l'augmentation des propriétés effectrices médiée par le cGAMP.**

Des cellules CD4 naïves issues de souris WT ou *IRF3*<sup>-/-</sup> ont été stimulées avec le cGAMP et polarisées en Th1 ou Th9.

**A.** Analyse de la production d'IFN-γ des cellules Th1 par cytométrie en flux.

**B-C.** Analyse de l'expression d'*Ifng* et d'*Il-9* (FC) ainsi que de la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-9 par qPCR et ELISA respectivement.

L'ensemble des résultats montrent que l'augmentation de l'IFN- $\gamma$  dans Th1 induite par l'activation de STING est dépendante de la signalisation IRF3/IFN- $\beta$ /IFNAR. En revanche cette voie ne semble pas impliquée dans l'effet du cGAMP sur la sécrétion d'IL-9 des cellules Th9. Ainsi, ces résultats suggèrent que les mécanismes de modulation des propriétés effectrices des cellules T CD4 médié par STING, varient en fonction du sous type lymphocytaire et des conditions de polarisation. Par ailleurs ces données sont en accord avec nos résultats précédents montrant une sensibilité différente des Th1 et des Th9 dans la mort induite par l'activation de STING.

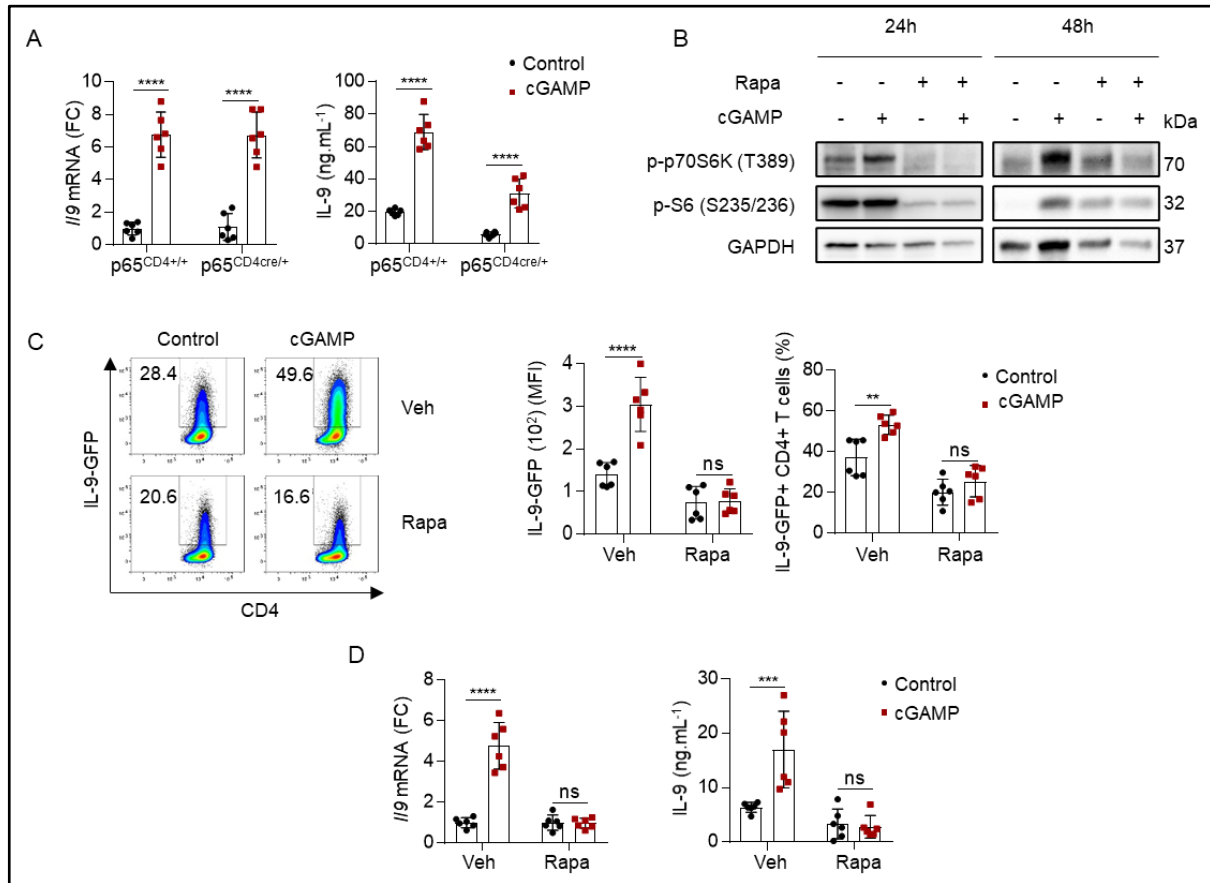
## **V. L'activation de STING augmente la sécrétion d'IL-9 des Th9 de manière dépendante de la voie mTOR**

L'augmentation de la sécrétion d'IL-9 des cellules Th9 à la suite de l'activation de STING n'étant pas médiée par l'axe IRF3/IFN- $\beta$ /IFNAR, nous avons cherché quel mécanisme alternatif pouvait être impliqué. En plus de cet axe, l'activation de STING permet d'induire la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (**fig 21B**) et il a été montré que P65 pouvait se fixer sur le promoteur de l'IL9 pour augmenter son expression (Jash, Sahoo et al. 2012). D'ailleurs l'analyse RNAseq nous a permis de voir un enrichissement significatif des gènes impliqués dans la régulation de cette voie de signalisation dans les Th9 stimulés avec le cGAMP à 16h et 48h (**Annexe 2**). Pour évaluer l'implication de P65 dans l'augmentation d'IL-9 induite par le cGAMP, nous avons généré des souris conditionnellement déficientes pour P65 dans les lymphocytes T (P65-CD4<sup>cre<sup>+/-</sup></sup>). Bien qu'une déficience en P65 réduit la sécrétion d'IL-9 des cellules Th9, le cGAMP parvient toujours à augmenter significativement leur expression et sécrétion d'IL-9 (**Fig 25A**).

Imanishi et al. ont récemment montré que la protéine mTORC1 était requise pour la production d'IFN- $\beta$  médié par l'activation de STING (Imanishi, Unno et al. 2019). Par ailleurs, il a également été montré qu'une augmentation de la signalisation mTOR favorisait la différenciation Th9 promouvant alors leurs propriétés inflammatoires et antitumorales (Wang, Bi et al. 2016). Ainsi nous avons testé l'activation de la signalisation mTOR, dans les cellules Th9 stimulées avec du cGAMP. Les résultats de Western Blot montrent bien que le cGAMP augmente la phosphorylation des protéines effectrices S6 et p70S6K en aval de la voie mTOR, et que l'utilisation d'un inhibiteur de la voie mTOR, la rapamycine, compromet cette



signalisation (**Fig 25B**). Par ailleurs nous avons pu mettre en évidence que l'utilisation de la rapamycine inhibait également l'effet du cGAMP sur la sécrétion d'IL-9, suggérant une implication de la voie mTOR dans l'augmentation de l'IL-9 induite par l'activation de STING (**Fig 25C et D**).



**Figure 25 : Rôle de P65 et mTOR dans l'augmentation des propriétés effectrices des Th9 médié par le cGAMP.**

**A.** Analyse de l'expression d'*Irfng* et d'IL-9 (FC) ainsi que de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9 par qPCR et ELISA respectivement de cellules CD4 naïves issues de souris P65<sup>CD4+/+</sup> ou P65<sup>CD4cre/+</sup> stimulées avec le cGAMP et polarisées en Th9.

**B-D.** Des cellules CD4 naïves issues de souris WT ont été stimulées avec le cGAMP en présence ou non de rapamycine et polarisées en Th9. (Rapa = rapamycine ; Veh = Vehicle)

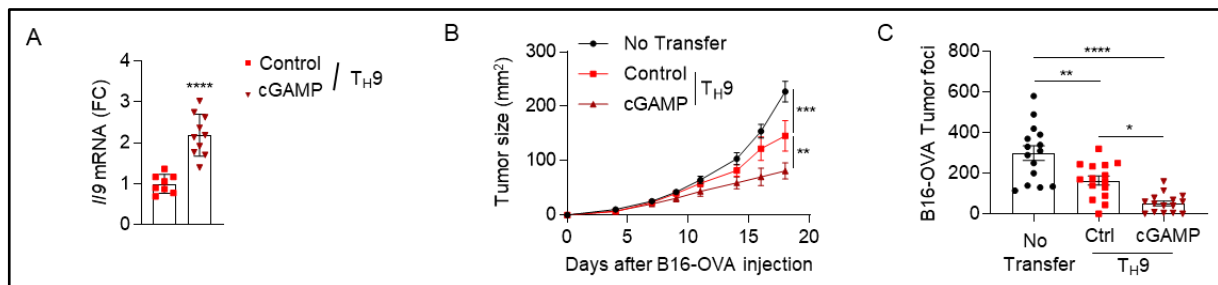
**B.** Analyse de l'expression de p-p70S6K et p-S6 par Western Blot

**C.** Analyse de la production d'IL-9-GFP par cytométrie en flux.

**D.** Analyse de l'expression d'IL-9 (FC) ainsi que de la sécrétion d'IL-9 par qPCR et ELISA respectivement.



Les cellules Th9 ont été décrites comme étant le sous type lymphocytaire T CD4 possédant les propriétés antitumorales les plus efficaces dans un contexte de transfert adoptif, en particulier dans le mélanome (Lu, Wang et al. 2018). Ainsi nous avons utilisé le modèle murin de mélanome B16-OVA, et procédé au transfert adoptif de cellules Th9 issus de souris OTII (exprimant un TCR spécifiques de l'Ovalbumine). Nous avons ainsi pu mettre en évidence que les cellules Th9-OTII stimulées avec le cGAMP présentait une augmentation de leur expression d'*Il9* (**Fig 26A**). Par ailleurs le transfert adoptif de ces Th9 stimulées permet un meilleur contrôle de la croissance des tumeurs B16-OVA injectées en sous cutané (**Fig 26B**), mais également une meilleure réduction des foyers tumoraux pulmonaires après injection des cellules B16-OVA par voie intraveineuse, en comparaison aux cellules Th9 non stimulées (**Fig 26C**).



**Figure 26 : Le cGAMP augmente les propriétés antitumorales des cellules Th9.**

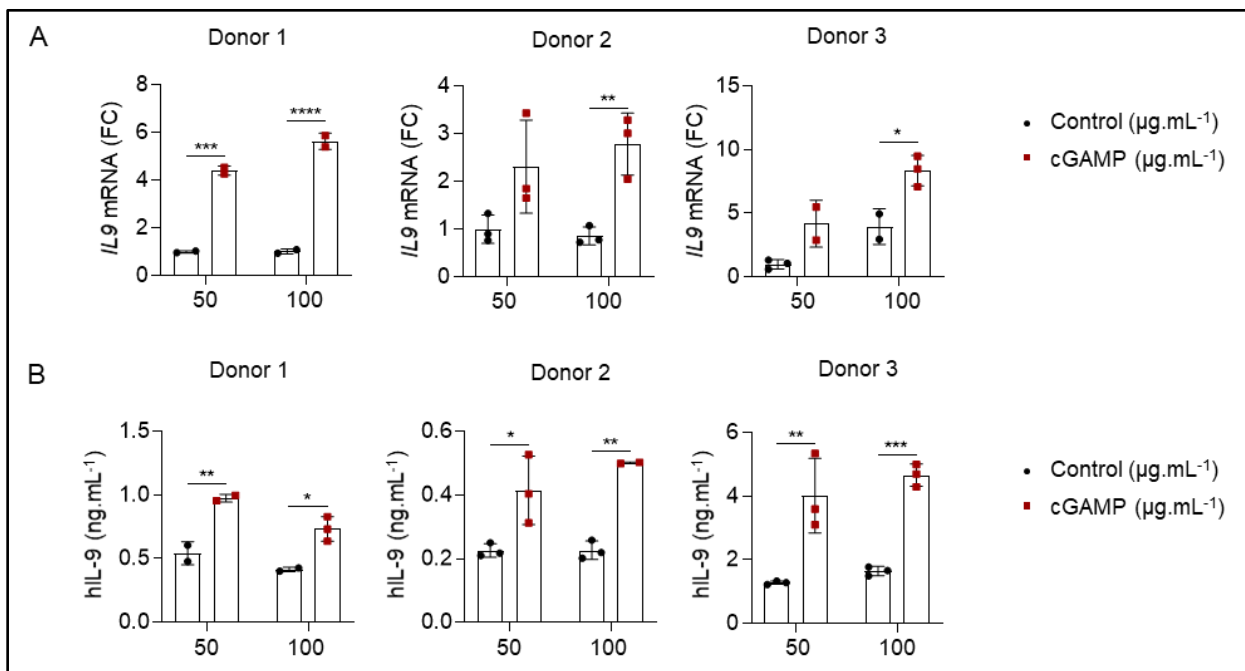
Des cellules CD4 naïves issues de souris OTII ont été stimulées avec le cGAMP ou son contrôle et polarisées en Th9, puis injectées en intraveineuse (i.v) chez des souris porteuses de tumeurs B16-OVA (s.c ou i.v)

**A.** Analyse de l'expression d'*Il9* (FC) par qPCR.

**B.** Croissance tumorale dans des souris WT porteuses de tumeurs B16-OVA (s.c) et traitées ou non (PBS) par transfert adoptif de Th9 (stimulées ou non avec le cGAMP)

**C.** Foyers tumoraux pulmonaires énumérés après sacrifice de souris WT porteuses de tumeurs B16-OVA (i.v) et traitées ou non (PBS) par transfert adoptif de Th9 (stimulées ou non avec le cGAMP)

Ainsi l'activation de STING avec le cGAMP permet d'augmenter l'IL-9 et les propriétés antitumorales des cellules Th9 dans un contexte de transfert adoptif. Afin de déterminer si ces données ont une pertinence chez l'homme, nous avons également testé si le cGAMP permettait d'augmenter l'IL-9 sécrétée par les cellules Th9 humaines. Des cellules T CD4 naïves ont été isolées à partir du sang de 3 donneurs sains, et ont été différenciées en Th9 après avoir été stimulées avec le cGAMP. Les résultats montrent que l'activation de la voie STING par le cGAMP augmente les propriétés effectrices des cellules Th9 humaines (**Fig 27A et B**).

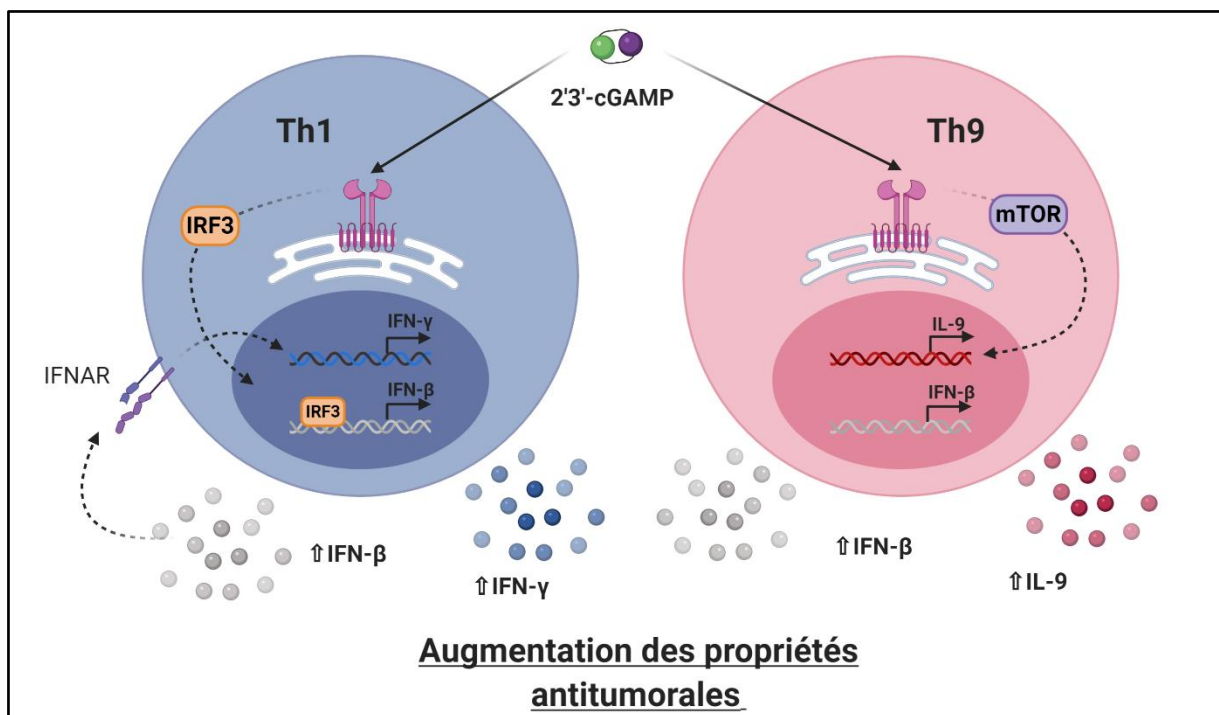


**Figure 27 : Le cGAMP augmente la sécrétion d'IL-9 des lymphocytes Th9 humains**  
 Des cellules CD4 naïves issues de sang de patients sains ont été stimulées avec le cGAMP et polarisées en Th9.  
**A.** Analyse de l'expression d'IL9 (FC) par qPCR.  
**B.** Analyse de la sécrétion d'hIL-9 par ELISA.

L'ensemble de ces données montrent que l'activation de STING peut augmenter les propriétés effectrices et antitumorales des cellules Th9 dans un contexte de transfert adoptif.

# DISCUSSION

Ces travaux ont permis de mettre en évidence le rôle clé de la protéine STING dans la biologie des lymphocytes T CD4. Le cGAMP permet notamment de moduler les propriétés effectrices des cellules T CD4 par divers mécanismes : un axe IRF3/IFN- $\beta$ /IFNAR pour l'augmentation d'IFN- $\gamma$  dans les Th1, et un axe mTOR pour l'augmentation d'IL-9 dans les Th9. Ces différences observées permettent par ailleurs d'expliquer en partie la différence de sensibilité des Th1 et des Th9 par rapport à la mort induite par STING. Par ailleurs l'activation de STING *in vivo* peut favoriser la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les CD4 au sein de la tumeur, mais également augmenter les propriétés antitumorales des Th9 dans un contexte de transfert adoptif, soulignant le potentiel thérapeutique de ces travaux (**Figure 28**).



**Figure 28 : Proposition de modèle pour les effets intrinsèques de l'activation de STING dans les CD4**

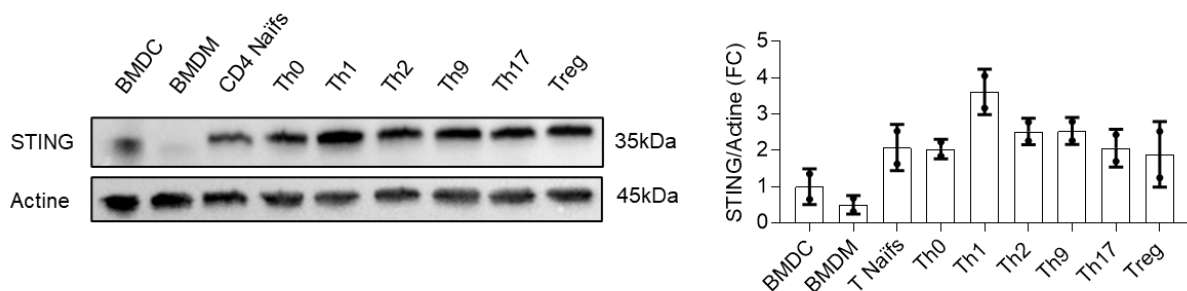
L'activation de STING avec le cGAMP augmente les propriétés effectrices et pro-inflammatoires des CD4, par des mécanismes différents en fonction des conditions de différenciation, mais également leurs propriétés antitumorales.

## I. Un rôle complexe de la signalisation de STING dans les CD4.

En 2017, 3 études s'étaient intéressées au rôle de STING dans la biologie des lymphocytes T CD4, démontrant notamment que l'activation de STING dans les CD4 pouvait favoriser leur mort cellulaire (Gulen, Koch et al. 2017, Larkin, Ilyukha et al.

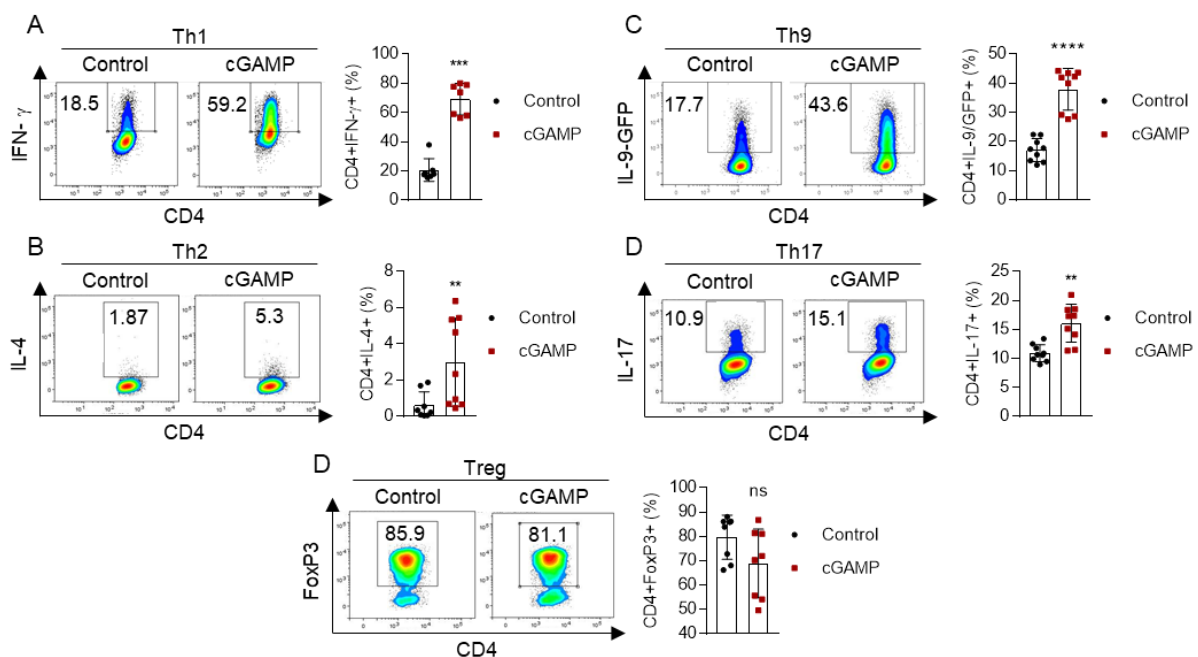
2017) et/ou inhiber leur prolifération (Cerboni, Jeremiah et al. 2017). Nous avons d'ailleurs confirmé en partie ces résultats et démontré, qu'en fonction du ligand et de la dose utilisée, la stimulation intrinsèque de STING dans les CD4 pouvait soit augmenter leurs fonctions effectrices, soit conduire à une toxicité. Imanishi et al. ont récemment validé cette hypothèse et proposé que ces effets variables dépendraient en partie de la signalisation TCR. Ils ont d'ailleurs montré une forte induction d'IFN- $\beta$  dans les cellules T et suggéré que cette sécrétion d'IFN- $\beta$  promouvait leurs propriétés antitumorale dans un modèle RAG1<sup>-/-</sup> STING<sup>-/-</sup> similaire au nôtre (Imanishi, Unno et al. 2019). Dans un modèle murin présentant une mutation activatrice N153S de STING deux études ont montré que malgré une lymphopénie, les lymphocytes T résiduels présentaient un phénotype activé (Warner, Irizarry-Caro et al. 2017) et des propriétés effectrices augmentées avec notamment une majorité de cellules sécrétrices d'IFN- $\gamma$ , d'IL-4 et dans une moindre mesure d'IL-17 (Luksch, Stinson et al. 2019). Nos résultats ainsi que l'ensemble de ces données confirment que l'activation de STING ne conduit pas uniquement à des effets délétères sur les lymphocytes T, mais peut également permettre d'augmenter leurs propriétés effectrices dans certains contextes.

Bien que nous n'ayons pas mis en évidence une implication des cytokines associées au Th2 ou aux Th17 *in vivo* (**Fig 16 C et D**) justifiant la focalisation du projet sur les lymphocytes Th1 et Th9 *in vitro*, nous avons testé le rôle de STING dans les autres sous populations lymphocytaires. En accord avec la littérature, nous avons noté que les CD4 exprimaient plus fortement la protéine STING que les cellules myéloïdes BMDCs et BMDMs. De plus, si l'ensemble des sous types lymphocytaires T CD4 expriment la protéine STING, les lymphocytes Th1 semblent l'exprimer davantage (**Fig 29**). Ceci pourrait notamment expliquer pourquoi les lymphocytes Th1 sont plus sensibles à l'activation de STING comme nous l'avons précédemment montré.



**Figure 29 : Expression de STING dans les différents sous types lymphocytaires T CD4,** Analyse de l'expression de STING dans des cellules BMDCs, BMDMs, CD4 naïves, Th0, Th1, Th2, Th9 Th17 et Treg par Western Blot. Quantification de l'expression de STING par rapport à l'actine (Fold change, FC)

Nous avons également testé le rôle de STING dans les différentes sous populations lymphocytaires, et les résultats nous ont permis de confirmer que l'activation intrinsèque de STING *in vitro* conduisait à l'augmentation des propriétés effectrices des lymphocytes T effecteurs. Néanmoins, bien que l'on observe une augmentation modérée et variable de l'IL-4 et de l'IL-17 sécrétée par les lymphocytes Th2 et Th17 (**Figure 30B et D**) respectivement, la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-9 des lymphocytes Th1 et Th9 est plus fortement impactée (**Fig 30A et C**). Par ailleurs l'expression de FoxP3 dans les T régulateurs ne semble pas être modulée par l'activation de STING (**Fig 30D**).



**Figure 30 : Effet du cGAMP sur les propriétés effectrices des différents sous types lymphocytaires T CD4,**

Analyse de la production d'IFN- $\gamma$  (A), d'IL-4 (B), d'IL-9 (C), d'IL-17 (D) et de FoxP3 (E) par cytométrie en flux dans des cellules CD4 naïves issus de souris WT, stimulées avec le cGAMP ou son contrôle et polarisées en Th1 (A), Th2 (B), Th9 (C), Th17 (D) ou Treg (E).

Dans le modèle murins STING N153S discuté précédemment, il a été montré que l'inflammation pulmonaire résultant de la sur-activation de STING, était dépendante des cellules T mais indépendante des Interférons de type I (Luksch, Stinson et al. 2019). Récemment Wu et al. se sont également intéressés aux effets

dépendants et indépendants des Interférons associés à STING, et ont mis en évidence que les effets de STING dans les T étaient en majorité indépendants des Interférons. Notamment la stimulation des cellules T (T totaux, incluant CD4 et CD8) avec le cGAMP induit, de manière indépendante des Interférons de Type I, un enrichissement des gènes associés aux différenciations Th1 et Th17, à la sécrétion d'IL-2 et aux signalisations TCR et NF- $\kappa$ B (Wu, Dobbs et al. 2020). Nous avons par ailleurs montré que l'activation de la voie STING dans les CD4 pouvait impliquer différentes voies de signalisation selon le contexte de polarisation, avec notamment l'augmentation de l'IFN- $\gamma$  par les Th1 dépendante des Interférons mais l'augmentation de l'IL-9 des Th9 indépendante des IFNs mais dépendante de la voie mTOR.

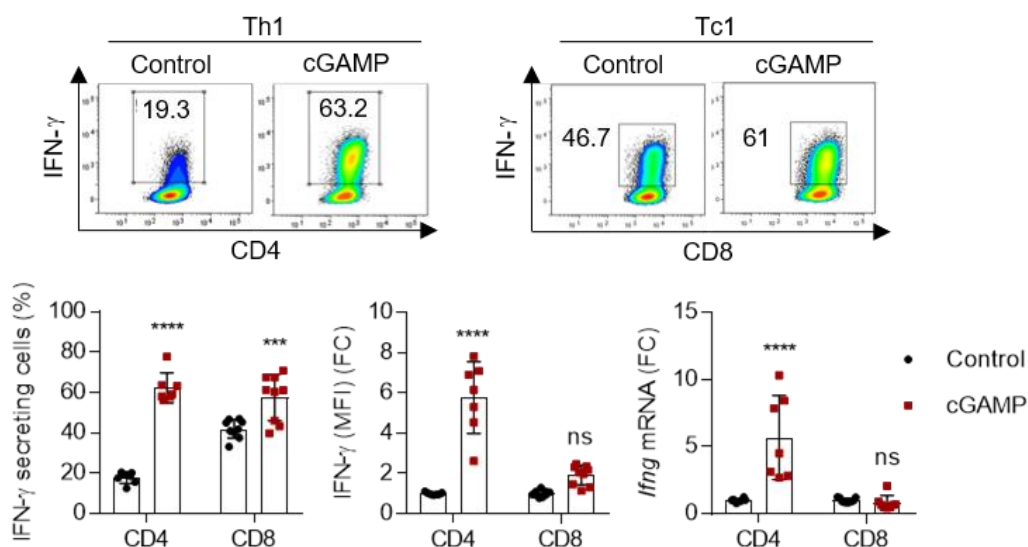
L'ensemble de nos données ainsi que celles de la littérature démontrent ainsi la complexité de la signalisation intrinsèque de STING dans les CD4. En effet le rôle de STING au sein des CD4 dépend de la force du signal mais également du contexte d'activation avec notamment un rôle important de la signalisation TCR, du phénotype naïf ou mémoire des lymphocytes T mais également de leur polarisation. Ces données suggèrent qu'il est possible d'optimiser l'utilisation des ligands de STING en clinique, en fonction du type de cancer, afin de favoriser l'activation et augmenter les propriétés antitumorales des lymphocytes T CD4.

## II. Quel est le rôle intrinsèque de STING dans les lymphocytes T CD8 ?

Les lymphocytes T CD8 ont clairement un rôle prédominant dans les effets antitumoraux des ligands de STING, en particulier par l'intermédiaire des cellules dendritiques CD8 $\alpha$ . Sivick et al. ont d'ailleurs montré que des faibles doses du ligand de STING ADU-S100 favorisait une réponse immunogène locale dépendante des CD8 et que son association avec l'anti-PD-1 permettait une régression durable des tumeurs distales, alors qu'une forte dose favorisait une réponse ablatrice indépendante des CD8 (Sivick, Desbien et al. 2018). Néanmoins des études ont également mis en évidence un rôle intrinsèque de STING dans la fonctionnalité des CD8. En effet, l'étude d'Imanishi et al. discutée précédemment s'intéresse aux lymphocytes T de manière générale et ils ont pu montrer que les lymphocytes T CD8 étaient également capables de sécréter de l'IFN- $\beta$  à la suite de l'activation intrinsèque de STING (Imanishi, Unno et al. 2019). Pour aller plus loin et en accord avec ces données, Li et al. ont montré

qu'*in vivo* la signalisation cGAS-STING était essentielle pour le maintien de la fonctionnalité des T CD8 spécifiques de la tumeur après transfert adoptif, en favorisant le développement des cellules T CD8 mémoires « stem-like » antitumorales de manière autocrine et dépendante des Interférons de type I. Par ailleurs, ils montrent une croissance tumorale augmentée pour les souris conditionnellement déficientes pour STING dans les T uniquement (STING CD4 Cre), en comparaison avec les souris sauvages (Li, Lu et al. 2020). A l'inverse, Wu et al. ont montré un rôle délétère de STING dans les CD8 qui, activé par le cGAMP de l'environnement tumoral, favoriserait leur mort, mais cette fois-ci de manière indépendante des Interférons de Type I (Wu, Dobbs et al. 2020). Ces discordances peuvent s'expliquer par les modèles choisis par les deux études. En effet, les effets bénéfiques dépendants des Interférons ont été obtenus dans un contexte de transfert adoptif de T CD8 spécifiques de la tumeur, favorisant une activation du TCR *in vivo*, alors que les effets délétères indépendants des Interférons ont été obtenus dans un contexte de transfert adoptif de T CD8 naïfs, non spécifiques. Ceci confirme d'ailleurs les données d'Imanishi et al. sur le rôle clé de la signalisation TCR dans les effets de STING sur la biologie des cellules T (Imanishi, Unno et al. 2019, Imanishi and Saito 2020).

Bien que nous n'ayons pas analysé en détails le rôle intrinsèque de STING dans les CD8, nous avons cependant testé *in vitro* l'effet du cGAMP sur les propriétés effectrices des CD8. Alors que l'activation de STING augmente la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des lymphocytes Th1, le cGAMP ne semble que très légèrement impacter la sécrétion d'IFN- $\gamma$  dans les CD8 par rapport aux CD4 (**Fig 31**).





**Figure 31 : Effet du cGAMP sur la sécrétion d'IFN- $\gamma$  des CD4 en comparaison aux CD8**

Analyse de l'expression d'*Irfng* (FC) et de la production d'IFN- $\gamma$  par qPCR et cytométrie en flux respectivement, dans des cellules CD4 ou CD8 naïves issues de souris WT, stimulées avec le cGAMP ou son contrôle et polarisées en Th1 ou Tc1

Si nous n'avons pas noté d'augmentation significative de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  *in vitro*, l'activation intrinsèque de STING peut cependant moduler la fonctionnalité des lymphocytes T CD8 *in vivo*, que ce soit directement ou indirectement par l'intermédiaire des cellules dendritiques CD8 $\alpha$ . Ainsi, bien que nos données montrent une activation intrinsèque de STING dans les CD4 et leur implication dans les effets antitumoraux du cGAMP, ces effets sont très probablement médiés, au moins en partie, par les cellules T CD8. Foote et al. ont d'ailleurs montré dans un modèle murin de cancer du sein (NT2.5), que les effets antitumoraux de l'ADU-S100, agoniste de STING actuellement en essai clinique de phase I, étaient fortement dépendants des CD4 et des CD8 (Foote, Kok et al. 2017). L'ensemble de nos données ainsi que celles de la littérature confirment donc que les CD4 comme les CD8 ont un rôle critique dans les effets antitumoraux des ligands de STING.

Que ce soit les CD8 ou les CD4, l'activation intrinsèque de STING peut moduler leurs propriétés effectrices et leurs fonctionnalités *in vitro* et *in vivo*. Il est cependant difficile d'évaluer les effets directs des ligands de STING sur les lymphocytes T par rapport aux effets indirects médiés par les cellules immunitaires innées. La plupart des études s'appuient sur des modèles murins peu représentatifs d'une situation clinique tels que des souris conditionnellement déficientes pour STING dans les cellules T, des souris RAG<sup>-/-</sup> reconstituées avec des cellules T, ou des souris porteuses d'une mutation conduisant à une voie de signalisation de STING constitutionnellement active. Les résultats obtenus dans ces modèles ont néanmoins permis de mettre en évidence l'impact de l'activation intrinsèque de STING sur la fonctionnalité et les propriétés antitumorales des lymphocytes T *in vivo*, et peuvent être exploités pour une évaluation en clinique chez l'homme. Li et al. ont d'ailleurs montré que l'expression de STING était fortement réduite chez les patients atteints de cancers (cancer du col de l'utérus, de l'endomètre ou des ovaires) en comparaison aux volontaires sains, que ce soit dans les CD8 ou dans les CD4 (Li, Lu et al. 2020), suggérant un mécanisme de résistance mis en place pour limiter la stimulation des lymphocytes T et la mise en

place d'une réponse antitumorale efficace. Ce type de mécanisme de résistance a en effet été observé dans les cellules tumorales chez l'homme où la baisse d'expression de STING était associée avec une réduction de l'immunogénicité (Barber 2015, Rivera Vargas, Benoit-Lizon et al. 2017). Il serait ainsi intéressant d'évaluer, d'une part l'expression de STING dans les lymphocytes T dans d'autres types de cancers, et d'une autre part s'il existe une corrélation entre l'infiltrat T CD4 et CD8 et l'efficacité de différents ligands de STING. En effet, il a été récemment montré chez l'homme que dans le cadre de traitements d'immunothérapie de type anti-PD-1, la qualité de l'infiltrat immunitaire pouvait prédire la réponse clinique (Tumeh, Harview et al. 2014, Zuazo, Arasanz et al. 2019). Ces informations seront essentielles pour identifier les patients les plus susceptibles de répondre aux ligands de STING.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

La détection du danger par les cellules du système immunitaire inné, telles que les cellules dendritiques, est essentielle pour l'activation des cellules T du système immunitaire adaptatif et la mise en place d'une réponse immunitaire efficace. C'est autour de ce principe que sont aujourd'hui développées les stratégies d'immunothérapies anticancéreuses. Parmi les nombreux récepteurs permettant la détection du danger, la protéine STING possède un rôle central dans la réponse immunitaire antitumorale. En effet son activation favorise une réponse inflammatoire et la sécrétion d'IFN- $\beta$  par les cellules dendritiques conduisant à l'activation des lymphocytes T, en particulier les lymphocytes T CD8. Aujourd'hui des ligands de STING sont en essai clinique seuls ou en association avec l'anti-PD1. Cependant, STING n'est pas uniquement exprimé par les cellules dendritiques, et il est important de connaître et comprendre de manière plus précise le rôle de STING dans l'ensemble des sous types cellulaires de l'environnement tumoral, notamment les lymphocytes T, pour optimiser l'efficacité des ligands de STING pour le traitement du cancer.

Ce projet nous a permis de mettre en évidence un rôle de STING sur les propriétés effectrices des cellules T CD4. La protéine STING est fortement exprimée par les lymphocytes T et son activation peut, dans certains contextes, conduire à leur mort. Néanmoins, précautionneusement manipulés les ligands de STING ont également un potentiel pour renforcer leurs fonctionnalités *in vitro* comme *in vivo*. *In vivo*, nous avons pu montrer qu'une activation intrinsèque de STING avec le cGAMP, favorisait une réponse antitumorale impliquant les CD4, notamment en induisant un phénotype pro-inflammatoire et en augmentant leur sécrétion d'IFN- $\gamma$ , cytokine clé de l'immunosurveillance. Nos données peuvent ainsi s'intégrer avec les études cliniques et précliniques qui associent les ligands de STING avec les thérapies par inhibiteurs de checkpoint, notamment l'anti-PD-1. En particulier parce que l'IFN- $\gamma$  peut induire l'expression de PD-L1 inhibant ainsi les lymphocytes T stimulés *in vivo* par les ligands de STING. Ghaffari et al. ont d'ailleurs montré que le 2'3'-c-di-AM(PS)<sub>2</sub>(Rp,Rp), favorisait une réponse immunitaire de type Th1 *in vivo* et une augmentation de gènes associés au CMH-II. Par ailleurs l'augmentation d'IFN- $\gamma$  induite par l'activation de STING dans la tumeur reste particulièrement élevée dans le sang même après déplétion des CD8 (Ghaffari, Peterson et al. 2018). Si les auteurs suggèrent un rôle des NK, il est possible compte tenu de nos résultats, que l'IFN- $\gamma$  puisse venir des T CD4 (Th1). En effet, dans une étude similaire utilisant cette fois le c-di-

GM(PS)2(Rp,Rp), seules les CD4, et non les NK, infiltrant la tumeur voient leur fréquence augmentée (Moore, Clavijo et al. 2016). Il serait ainsi intéressant de pouvoir prédire l'efficacité des stratégies d'immunothérapies, associant les ligands de STING aux inhibiteurs de checkpoint, en analysant l'IFN- $\beta$ , l'IFN- $\gamma$ , les CD4 et les CD8 en tant que biomarqueurs. Des études plus poussées seraient nécessaires afin de savoir si l'activation du STING affecte d'autres aspects associés à la fonctionnalité des T CD4, tels que leur persistance ou leur cytotoxicité. Par ailleurs si le cGAMP ne semble pas favoriser le développement de T régulateurs, il serait intéressant d'analyser l'effet des autres agonistes de STING sur l'ensemble des populations T CD4. En effet, plusieurs équipes ont cherché à développer des nouveaux ligands de STING efficaces par voie systémique tels que le diABZI, qui présente de fortes propriétés antitumorales dépendantes des CD8. Néanmoins des questions se posent quant à la toxicité d'un tel traitement risquant d'induire une forte réponse inflammatoire non contrôlée. Le SR-717 a été décrit en 2020 comme un ligand de STING systémique avec de fortes propriétés antitumorales dans les modèles MC38 et B16, favorisant l'activation des cellules dendritiques et des cellules T CD8 et NK. Contrairement aux ligands de STING tel que le cGAMP utilisé en intratumoral, le SR-717 est efficace seul sans association avec l'anti-PD-1, malgré une forte induction de PD-L1, illustrant le potentiel antitumoral de ce ligand dont l'efficacité semble dépendre de nombreux mécanismes cellulaires (Chin, Yu et al. 2020). Par ailleurs pour une efficacité comparable au diABZI, il induit une production d'IFN- $\beta$  beaucoup plus faible que son concurrent, limitant ainsi les risques d'induire une réponse inflammatoire systémique délétère. Les auteurs n'ont cependant pas analysé l'effet de ce ligand sur les CD4, nous prévoyons ainsi de tester l'implication de CD4 dans les effets antitumoral de ce ligand systémique.

En plus de l'augmentation de la sécrétion d'IFN- $\gamma$  par les cellules Th1, nos résultats montrent également que l'activation intrinsèque de STING dans les CD4 permet d'augmenter les propriétés effectrices des cellules Th9, de manière indépendante de l'axe IRF3/IFN- $\beta$ , mais dépendante de mTOR, soulignant les effets variables de STING en fonction du contexte de polarisation. Les cellules Th9 semblent d'ailleurs particulièrement résistante à la mort induite par STING. Des études antérieures ont déjà démontré que des signaux extrinsèques pouvaient favoriser la différenciation des cellules Th9. En effet, plusieurs signaux pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  ou OX40-L ont déjà été décrits comme favorisant la différenciation des cellules Th9 (Xiao, Balasubramanian et al. 2012, Vegran, Berger et

al. 2014, Zhao, Chu et al. 2016, Jiang, Chen et al. 2019, Xue, Jin et al. 2019). Ici, nous étendons ces découvertes en identifiant comment la différenciation des cellules Th9 peut être régulée intrinsèquement après le déclenchement de la voie de signalisation STING, qui favorise le développement de l'inflammation.

Si les stratégies de thérapie cellulaire adoptive sont davantage focalisées sur les CD8 pour leur cytotoxicité, les lymphocytes T CD4 sont essentiels pour maintenir et favoriser la prolifération et la fonctionnalité des cellules T CD8. Par ailleurs, la découverte d'épitopes restreints au CMH-II ainsi que le potentiel cytotoxique des cellules T CD4, justifie l'étude plus approfondie de ces cellules immunitaires pour une utilisation en transfert adoptif. Les cellules Th9 ont d'ailleurs été décrites comme le seul sous-type de T CD4 capable d'éradiquer efficacement des mélanome murins B16, en raison de leur persistance supérieure, de leurs fonctions cytolytiques et de leur résistance à la perte de fonctionnalité (Lu, Wang et al. 2018). Nos résultats montrent non seulement que l'activation intrinsèque de STING dans les cellules T CD4 potentialise l'effet antitumoral des cellules Th9 lors du transfert adoptif chez la souris, mais également que la différenciation des cellules Th9 humaines peut être améliorée par l'activation de la STING. Liu et al. ont d'ailleurs mis en évidence très récemment que les cellules CAR-T différenciées en condition de polarisation Th9 (TGF- $\beta$  + IL-4) (T9 CAR-T), présentaient des propriétés antitumorales supérieures aux cellules T1 CAR-T cultivées en présence d'IL-2. Ces cellules T9 CAR-T ont en effet une forte persistance *in vivo* et des capacités hyperprolifératives et permettent le contrôle de lignées humaines de leucémie lymphoblastique NALM-6 exprimant CD19 et de carcinome hépatiques HepG2 expriment GPC3, dans des souris immunodéficientes NSG (Liu, Bi et al. 2020). Cette nouvelle étude constitue une preuve supplémentaire quant au potentiel thérapeutique des cellules Th9. Ainsi nous pouvons imaginer que l'utilisation d'agonistes de STING puisse être associée à ces thérapies de transfert adoptif pour augmenter davantage l'effet antitumoral de ces cellules sécrétrices d'IL-9 aux propriétés antitumorales très prometteuses.

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdul-Wahid, A., M. Cydzik, A. Prodeus, M. Alwash, M. Stanojic, M. Thompson, E. H. Huang, J. E. Shively, S. D. Gray-Owen and J. Gariépy (2016). "Induction of antigen-specific TH 9 immunity accompanied by mast cell activation blocks tumor cell engraftment." *Int J Cancer* **139**(4): 841-853.
- Abe, T. and G. N. Barber (2014). "Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF-kappaB activation through TBK1." *J Virol* **88**(10): 5328-5341.
- Abe, T., A. Harashima, T. Xia, H. Konno, K. Konno, A. Morales, J. Ahn, D. Gutman and G. N. Barber (2013). "STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense." *Mol Cell* **50**(1): 5-15.
- Ablasser, A., F. Bauernfeind, G. Hartmann, E. Latz, K. A. Fitzgerald and V. Hornung (2009). "RIG-I-dependent sensing of poly(dA:dT) through the induction of an RNA polymerase III-transcribed RNA intermediate." *Nat Immunol* **10**(10): 1065-1072.
- Ablasser, A. and S. Hur (2020). "Regulation of cGAS- and RLR-mediated immunity to nucleic acids." *Nat Immunol* **21**(1): 17-29.
- Ablasser, A., J. L. Schmid-Burgk, I. Hemmerling, G. L. Horvath, T. Schmidt, E. Latz and V. Hornung (2013). "Cell intrinsic immunity spreads to bystander cells via the intercellular transfer of cGAMP." *Nature* **503**(7477): 530-534.
- Adams, S. (2009). "Toll-like receptor agonists in cancer therapy." *Immunotherapy* **1**(6): 949-964.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, J. Yang, N. G. Jacobson, N. Cereb, S. Y. Yang, T. L. Murphy and K. M. Murphy (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells." *Nat Immunol* **3**(6): 549-557.
- Ager, C. R., M. J. Reilly, C. Nicholas, T. Bartkowiak, A. R. Jaiswal and M. A. Curran (2017). "Intratumoral STING Activation with T-cell Checkpoint Modulation Generates Systemic Antitumor Immunity." *Cancer Immunol Res* **5**(8): 676-684.
- Ahn, J. and G. N. Barber (2014). "Self-DNA, STING-dependent signaling and the origins of autoinflammatory disease." *Curr Opin Immunol* **31**: 121-126.
- Ahn, J., D. Gutman, S. Saijo and G. N. Barber (2012). "STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(47): 19386-19391.
- Ahn, J., P. Ruiz and G. N. Barber (2014). "Intrinsic self-DNA triggers inflammatory disease dependent on STING." *J Immunol* **193**(9): 4634-4642.
- Ahn, J., T. Xia, H. Konno, K. Konno, P. Ruiz and G. N. Barber (2014). "Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING." *Nat Commun* **5**: 5166.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov and R. A. Flavell (2001). "Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3." *Nature* **413**(6857): 732-738.
- Angkasekwina, P., S. H. Chang, M. Thapa, H. Watarai and C. Dong (2010). "Regulation of IL-9 expression by IL-25 signaling." *Nat Immunol* **11**(3): 250-256.
- Antony, P. A., C. A. Piccirillo, A. Akpınarlı, S. E. Finkelstein, P. J. Speiss, D. R. Surman, D. C. Palmer, C. C. Chan, C. A. Klebanoff, W. W. Overwijk, S. A. Rosenberg and N. P. Restifo (2005). "CD8+ T cell immunity against a tumor/self-antigen is augmented by CD4+ T helper cells and hindered by naturally occurring T regulatory cells." *J Immunol* **174**(5): 2591-2601.
- Apetoh, L., F. Ghiringhelli, A. Tesniere, M. Obeid, C. Ortiz, A. Criollo, G. Mignot, M. C. Maiuri, E. Ullrich, P. Saulnier, H. Yang, S. Amigorena, B. Ryffel, F. J. Barrat, P. Saftig, F. Levi, R. Lidereau, C. Nogues, J. P. Mira, A. Chompret, V. Joulin, F. Clavel-Chapelon, J. Bourhis, F. André, S. Delaloge, T. Tursz, G. Kroemer and L. Zitvogel (2007). "Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy." *Nat Med* **13**(9): 1050-1059.
- Bai, L., W. Li, W. Zheng, D. Xu, N. Chen and J. Cui (2020). "Promising targets based on pattern recognition receptors for cancer immunotherapy." *Pharmacol Res* **159**: 105017.
- Baird, J. R., D. Friedman, B. Cottam, T. W. Dubensky, D. B. Kanne, S. Bambina, K. Bahjat, M. R. Crittenden and M. J. Gough (2016). "Radiotherapy Combined with Novel STING-Targeting Oligonucleotides Results in Regression of Established Tumors." *Cancer Res* **76**(1): 50-61.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-252.

Barbalat, R., S. E. Ewald, M. L. Mouchess and G. M. Barton (2011). "Nucleic acid recognition by the innate immune system." Annu Rev Immunol **29**: 185-214.

Barber, G. N. (2015). "STING: infection, inflammation and cancer." Nat Rev Immunol **15**(12): 760-770.

Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, R. A. Flavell, J. F. Miller and W. R. Heath (1998). "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." Nature **393**(6684): 478-480.

Bennett, S. R., F. R. Carbone, F. Karamalis, J. F. Miller and W. R. Heath (1997). "Induction of a CD8+ cytotoxic T lymphocyte response by cross-priming requires cognate CD4+ T cell help." J Exp Med **186**(1): 65-70.

Benoit-Lizon, I., E. Jacquin and L. Apetoh (2018). "Selective autophagy restricts IL-9 secretion from TH9 cells: relevance in cancer growth." Cell Cycle **17**(4): 391-392.

Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.

Bi, E., X. Ma, Y. Lu, M. Yang, Q. Wang, G. Xue, J. Qian, S. Wang and Q. Yi (2017). "Foxo1 and Foxp1 play opposing roles in regulating the differentiation and antitumor activity of TH9 cells programmed by IL-7." Sci Signal **10**(500).

Bouis, D., P. Kirstetter, F. Arbogast, D. Lamon, V. Delgado, S. Jung, C. Ebel, H. Jacobs, A. M. Knapp, N. Jeremiah, A. Belot, T. Martin, Y. J. Crow, I. Andre-Schmutz, A. S. Korganow, F. Rieux-Laucat and P. Soulas-Sprauel (2019). "Severe combined immunodeficiency in stimulator of interferon genes (STING) V154M/wild-type mice." J Allergy Clin Immunol **143**(2): 712-725 e715.

Braunstein, M. J., J. Kucharczyk and S. Adams (2018). "Targeting Toll-Like Receptors for Cancer Therapy." Target Oncol **13**(5): 583-598.

Bretscher, P. and M. Cohn (1970). "A theory of self-nonsel self discrimination." Science **169**(3950): 1042-1049.

Bridgeman, A., J. Malfait, T. Davenne, T. Partridge, Y. Peng, A. Mayer, T. Dong, V. Kaefer, P. Borrow and J. Rehwinkel (2015). "Viruses transfer the antiviral second messenger cGAMP between cells." Science **349**(6253): 1228-1232.

Burdette, D. L., K. M. Monroe, K. Sotelo-Troha, J. S. Iwig, B. Eckert, M. Hyodo, Y. Hayakawa and R. E. Vance (2011). "STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP." Nature **478**(7370): 515-518.

Burdette, D. L. and R. E. Vance (2013). "STING and the innate immune response to nucleic acids in the cytosol." Nat Immunol **14**(1): 19-26.

Burnet, F. M. (1967). "Immunological aspects of malignant disease." Lancet **1**(7501): 1171-1174.

Burnet, F. M. (1971). "Immunological surveillance in neoplasia." Transplant Rev **7**: 3-25.

Burnet, M. (1957). "Cancer; a biological approach. I. The processes of control." Br Med J **1**(5022): 779-786.

Burnette, B. C., H. Liang, Y. Lee, L. Chlewicki, N. N. Khodarev, R. R. Weichselbaum, Y. X. Fu and S. L. Auh (2011). "The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity." Cancer Res **71**(7): 2488-2496.

Cao, X., K. Leonard, L. I. Collins, S. F. Cai, J. C. Mayer, J. E. Payton, M. J. Walter, D. Piwnica-Worms, R. D. Schreiber and T. J. Ley (2009). "Interleukin 12 stimulates IFN-gamma-mediated inhibition of tumor-induced regulatory T-cell proliferation and enhances tumor clearance." Cancer Res **69**(22): 8700-8709.

Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury and J. Demengeot (2003). "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide." J Exp Med **197**(4): 403-411.

Caron, G., D. Duluc, I. Frémaux, P. Jeannin, C. David, H. Gascan and Y. Delneste (2005). "Direct stimulation of human T cells via TLR5 and TLR7/8: flagellin and R-848 up-regulate proliferation and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells." J Immunol **175**(3): 1551-1557.

Castro, F., A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves, K. Serre and M. J. Oliveira (2018). "Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion." Front Immunol **9**: 847.



Carboni, S., N. Jeremiah, M. Gentili, U. Gehrman, C. Conrad, M. C. Stolzenberg, C. Picard, B. Neven, A. Fischer, S. Amigorena, F. Rieux-Laucat and N. Manel (2017). "Intrinsic antiproliferative activity of the innate sensor STING in T lymphocytes." *J Exp Med* **214**(6): 1769-1785.

Chandra, D., W. Quispe-Tintaya, A. Jahangir, D. Asafu-Adjei, I. Ramos, H. O. Sintim, J. Zhou, Y. Hayakawa, D. K. Karaolis and C. Gravekamp (2014). "STING ligand c-di-GMP improves cancer vaccination against metastatic breast cancer." *Cancer Immunol Res* **2**(9): 901-910.

Chang, H. C., S. Sehra, R. Goswami, W. Yao, Q. Yu, G. L. Stritesky, R. Jabeen, C. McKinley, A. N. Ahyi, L. Han, E. T. Nguyen, M. J. Robertson, N. B. Perumal, R. S. Tepper, S. L. Nutt and M. H. Kaplan (2010). "The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation." *Nat Immunol* **11**(6): 527-534.

Chen, D. S. and I. Mellman (2013). "Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle." *Immunity* **39**(1): 1-10.

Chen, J., Y. Zhao, Y. Jiang, S. Gao, Y. Wang, D. Wang, A. Wang, H. Yi, R. Gu, Q. Yi and S. Wang (2018). "Interleukin-33 Contributes to the Induction of Th9 Cells and Antitumor Efficacy by Dectin-1-Activated Dendritic Cells." *Front Immunol* **9**: 1787.

Chen, Q., L. Sun and Z. J. Chen (2016). "Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing." *Nat Immunol* **17**(10): 1142-1149.

Chen, W., W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady and S. M. Wahl (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**(12): 1875-1886.

Chiappinelli, K. B., P. L. Strissel, A. Desrichard, H. Li, C. Henke, B. Akman, A. Hein, N. S. Rote, L. M. Cope, A. Snyder, V. Makarov, S. Budhu, S. Buhu, D. J. Slamon, J. D. Wolchok, D. M. Pardoll, M. W. Beckmann, C. A. Zahnow, T. Mergoub, T. Mergoub, T. A. Chan, S. B. Baylin and R. Strick (2015). "Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses." *Cell* **162**(5): 974-986.

Chin, E. N., C. Yu, V. F. Vartabedian, Y. Jia, M. Kumar, A. M. Gamo, W. Vernier, S. H. Ali, M. Kissai, D. C. Lazar, N. Nguyen, L. E. Pereira, B. Benish, A. K. Woods, S. B. Joseph, A. Chu, K. A. Johnson, P. N. Sander, F. Martínez-Peña, E. N. Hampton, T. S. Young, D. W. Wolan, A. K. Chatterjee, P. G. Schultz, H. M. Petrassi, J. R. Teijaro and L. L. Lairson (2020). "Antitumor activity of a systemic STING-activating non-nucleotide cGAMP mimetic." *Science* **369**(6506): 993-999.

Chiu, Y. H., J. B. Macmillan and Z. J. Chen (2009). "RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway." *Cell* **138**(3): 576-591.

Conlon, J., D. L. Burdette, S. Sharma, N. Bhat, M. Thompson, Z. Jiang, V. A. Rathinam, B. Monks, T. Jin, T. S. Xiao, S. N. Vogel, R. E. Vance and K. A. Fitzgerald (2013). "Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid." *J Immunol* **190**(10): 5216-5225.

Corrales, L., L. H. Glickman, S. M. McWhirter, D. B. Kanne, K. E. Sivick, G. E. Katibah, S. R. Woo, E. Lemmens, T. Banda, J. J. Leong, K. Metchette, T. W. Dubensky, Jr. and T. F. Gajewski (2015). "Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity." *Cell Rep* **11**(7): 1018-1030.

Corthay, A., K. U. Lundin, K. B. Lorvik, P. O. Hofgaard and B. Bogen (2009). "Secretion of tumor-specific antigen by myeloma cells is required for cancer immunosurveillance by CD4+ T cells." *Cancer Res* **69**(14): 5901-5907.

Corthay, A., D. K. Skovseth, K. U. Lundin, E. Røsjø, H. Omholt, P. O. Hofgaard, G. Haraldsen and B. Bogen (2005). "Primary antitumor immune response mediated by CD4+ T cells." *Immunity* **22**(3): 371-383.

Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein and J. D. Sedgwick (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." *Nature* **421**(6924): 744-748.

Curtin, J. F., N. Liu, M. Candolfi, W. Xiong, H. Assi, K. Yagiz, M. R. Edwards, K. S. Michelsen, K. M. Kroeger, C. Liu, A. K. Muhammad, M. C. Clark, M. Ardit, B. Comin-Anduix, A. Ribas, P. R. Lowenstein

and M. G. Castro (2009). "HMGB1 mediates endogenous TLR2 activation and brain tumor regression." *PLoS Med* **6**(1): e10.

Dardalhon, V., A. Awasthi, H. Kwon, G. Galileos, W. Gao, R. A. Sobel, M. Mitsdoerffer, T. B. Strom, W. Elyaman, I. C. Ho, S. Khoury, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2008). "IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells." *Nat Immunol* **9**(12): 1347-1355.

Demaria, O., A. De Gassart, S. Coso, N. Gestermann, J. Di Domizio, L. Flatz, O. Gaide, O. Michielin, P. Hwu, T. V. Petrova, F. Martinon, R. L. Modlin, D. E. Speiser and M. Gilliet (2015). "STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**(50): 15408-15413.

Deng, L., H. Liang, M. Xu, X. Yang, B. Burnette, A. Arina, X. D. Li, H. Mauceri, M. Beckett, T. Darga, X. Huang, T. F. Gajewski, Z. J. Chen, Y. X. Fu and R. R. Weichselbaum (2014). "STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors." *Immunity* **41**(5): 843-852.

Diamond, J. M., C. Vanpouille-Box, S. Spada, N. P. Rudqvist, J. R. Chapman, B. M. Ueberheide, K. A. Pilonis, Y. Sarfraz, S. C. Formenti and S. Demaria (2018). "Exosomes Shuttle TREX1-Sensitive IFN-Stimulatory dsDNA from Irradiated Cancer Cells to DCs." *Cancer Immunol Res* **6**(8): 910-920.

Diamond, M. S., M. Kinder, H. Matsushita, M. Mashayekhi, G. P. Dunn, J. M. Archambault, H. Lee, C. D. Arthur, J. M. White, U. Kalinke, K. M. Murphy and R. D. Schreiber (2011). "Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors." *J Exp Med* **208**(10): 1989-2003.

Diebold, S. S., M. Montoya, H. Unger, L. Alexopoulou, P. Roy, L. E. Haswell, A. Al-Shamkhani, R. Flavell, P. Borrow and C. Reis e Sousa (2003). "Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers." *Nature* **424**(6946): 324-328.

Diner, E. J., D. L. Burdette, S. C. Wilson, K. M. Monroe, C. A. Kellenberger, M. Hyodo, Y. Hayakawa, M. C. Hammond and R. E. Vance (2013). "The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING." *Cell Rep* **3**(5): 1355-1361.

Djuretic, I. M., D. Levanon, V. Negreanu, Y. Groner, A. Rao and K. M. Ansel (2007). "Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells." *Nat Immunol* **8**(2): 145-153.

Dobbs, N., N. Burnaevskiy, D. Chen, V. K. Gonugunta, N. M. Alto and N. Yan (2015). "STING Activation by Translocation from the ER Is Associated with Infection and Autoinflammatory Disease." *Cell Host Microbe* **18**(2): 157-168.

Dominguez-Villar, M., A. S. Gautron, M. de Marcken, M. J. Keller and D. A. Hafler (2015). "TLR7 induces anergy in human CD4(+) T cells." *Nat Immunol* **16**(1): 118-128.

Dong, H., S. E. Strome, D. R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D. B. Flies, P. C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V. A. Lennon, E. Celis and L. Chen (2002). "Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion." *Nat Med* **8**(8): 793-800.

Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White and S. A. Rosenberg (2002). "Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes." *Science* **298**(5594): 850-854.

Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, J. C. Yang, R. M. Sherry, S. L. Topalian, N. P. Restifo, R. E. Royal, U. Kammula, D. E. White, S. A. Mavroukakis, L. J. Rogers, G. J. Gracia, S. A. Jones, D. P. Mangiameli, M. M. Pelletier, J. Gea-Banacloche, M. R. Robinson, D. M. Berman, A. C. Filie, A. Abati and S. A. Rosenberg (2005). "Adoptive cell transfer therapy following non-myeloablative but lymphodepleting chemotherapy for the treatment of patients with refractory metastatic melanoma." *J Clin Oncol* **23**(10): 2346-2357.

Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old and R. D. Schreiber (2002). "Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape." *Nat Immunol* **3**(11): 991-998.

Dunn, G. P., A. T. Bruce, K. C. Sheehan, V. Shankaran, R. Uppaluri, J. D. Bui, M. S. Diamond, C. M. Koebel, C. Arthur, J. M. White and R. D. Schreiber (2005). "A critical function for type I interferons in cancer immunoediting." *Nat Immunol* **6**(7): 722-729.

Dunn, G. P., C. M. Koebel and R. D. Schreiber (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 836-848.

Dunn, G. P., L. J. Old and R. D. Schreiber (2004). "The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting." *Immunity* **21**(2): 137-148.

Dunphy, G., S. M. Flannery, J. F. Almine, D. J. Connolly, C. Paulus, K. L. Jønsson, M. R. Jakobsen, M. M. Nevels, A. G. Bowie and L. Unterholzner (2018). "Non-canonical Activation of the DNA Sensing Adaptor STING by ATM and IFI16 Mediates NF- $\kappa$ B Signaling after Nuclear DNA Damage." *Mol Cell* **71**(5): 745-760.e745.

Echchakir, H., M. Bagot, G. Dorothee, D. Martinvalet, S. Le Gouvello, L. Boumsell, S. Chouaib, A. Bensussan and F. Mami-Chouaib (2000). "Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis." *J Invest Dermatol* **115**(1): 74-80.

Elyaman, W., R. Bassil, E. M. Bradshaw, W. Orent, Y. Lahoud, B. Zhu, F. Radtke, H. Yagita and S. J. Khoury (2012). "Notch receptors and Smad3 signaling cooperate in the induction of interleukin-9-producing T cells." *Immunity* **36**(4): 623-634.

Ergun, S. L., D. Fernandez, T. M. Weiss and L. Li (2019). "STING Polymer Structure Reveals Mechanisms for Activation, Hyperactivation, and Inhibition." *Cell* **178**(2): 290-301.e210.

Fabbri, M., A. Paone, F. Calore, R. Galli, E. Gaudio, R. Santhanam, F. Lovat, P. Fadda, C. Mao, G. J. Nuovo, N. Zanesi, M. Crawford, G. H. Ozer, D. Wernicke, H. Alder, M. A. Caligiuri, P. Nana-Sinkam, D. Perrotti and C. M. Croce (2012). "MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic inflammatory response." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(31): E2110-2116.

Fang, Y., X. Chen, Q. Bai, C. Qin, A. O. Mohamud, Z. Zhu, T. W. Ball, C. M. Ruth, D. R. Newcomer, E. J. Herrick and M. B. Nicholl (2015). "IL-9 inhibits HTB-72 melanoma cell growth through upregulation of p21 and TRAIL." *J Surg Oncol* **111**(8): 969-974.

Feau, S., R. Arens, S. Togher and S. P. Schoenberger (2011). "Autocrine IL-2 is required for secondary population expansion of CD8(+) memory T cells." *Nat Immunol* **12**(9): 908-913.

Ferguson, B. J., D. S. Mansur, N. E. Peters, H. Ren and G. L. Smith (2012). "DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity." *Elife* **1**: e00047.

Ferris, S. T., V. Durai, R. Wu, D. J. Theisen, J. P. Ward, M. D. Bern, J. T. Davidson, P. Bagadia, T. Liu, C. G. Briseño, L. Li, W. E. Gillanders, G. F. Wu, W. M. Yokoyama, T. L. Murphy, R. D. Schreiber and K. M. Murphy (2020). "cDC1 prime and are licensed by CD4+ T cells to induce anti-tumour immunity." *Nature* **584**(7822): 624-629.

Fischer, M., M. Bijman, D. Molin, F. Cormont, C. Uyttenhove, J. van Snick, C. Sundström, G. Enblad and G. Nilsson (2003). "Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma." *Leukemia* **17**(12): 2513-2516.

Fontenot, J. D., M. A. Gavin and A. Y. Rudensky (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-336.

Foote, J. B., M. Kok, J. M. Leatherman, T. D. Armstrong, B. C. Marcinkowski, L. S. Ojalvo, D. B. Kanne, E. M. Jaffee, T. W. Dubensky and L. A. Emens (2017). "A STING Agonist Given with OX40 Receptor and PD-L1 Modulators Primes Immunity and Reduces Tumor Growth in Tolerized Mice." *Cancer Immunol Res* **5**(6): 468-479.

Fridman, W. H., F. Pagès, C. Sautès-Fridman and J. Galon (2012). "The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome." *Nat Rev Cancer* **12**(4): 298-306.

Frydrychowicz, M., M. Boruczkowski, A. Kolecka-Bednarczyk and G. Dworacki (2017). "The Dual Role of Treg in Cancer." *Scand J Immunol* **86**(6): 436-443.

Fu, J., D. B. Kanne, M. Leong, L. H. Glickman, S. M. McWhirter, E. Lemmens, K. Mechette, J. J. Leong, P. Lauer, W. Liu, K. E. Sivick, Q. Zeng, K. C. Soares, L. Zheng, D. A. Portnoy, J. J. Woodward, D. M. Pardoll, T. W. Dubensky and Y. Kim (2015). "STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade." *Sci Transl Med* **7**(283): 283ra252.

Fu, Y., J. Wang, G. Panangipalli, B. J. Ulrich, B. Koh, C. Xu, R. Kharwadkar, X. Chu, Y. Wang, H. Gao, W. Wu, J. Sun, R. S. Tepper, B. Zhou, S. C. Janga, K. Yang and M. H. Kaplan (2020). "STAT5 promotes accessibility and is required for BATF-mediated plasticity at the Il9 locus." *Nat Commun* **11**(1): 4882.

Fuertes, M. B., A. K. Kacha, J. Kline, S. R. Woo, D. M. Kranz, K. M. Murphy and T. F. Gajewski (2011). "Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 $\alpha$ + dendritic cells." *J Exp Med* **208**(10): 2005-2016.

Funderburg, N., A. A. Luciano, W. Jiang, B. Rodriguez, S. F. Sieg and M. M. Lederman (2008). "Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis." *PLoS One* **3**(4): e1915.

Galon, J., A. Costes, F. Sanchez-Cabo, A. Kirilovsky, B. Mlecnik, C. Lagorce-Pagès, M. Tosolini, M. Camus, A. Berger, P. Wind, F. Zinzindohoué, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman and F. Pagès (2006). "Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome." *Science* **313**(5795): 1960-1964.

Ganguly, D., G. Chamilos, R. Lande, J. Gregorio, S. Meller, V. Facchinetti, B. Homey, F. J. Barrat, T. Zal and M. Gilliet (2009). "Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8." *J Exp Med* **206**(9): 1983-1994.

Gao, F. G., V. Khammanivong, W. J. Liu, G. R. Leggatt, I. H. Frazer and G. J. Fernando (2002). "Antigen-specific CD4+ T-cell help is required to activate a memory CD8+ T cell to a fully functional tumor killer cell." *Cancer Res* **62**(22): 6438-6441.

Gao, P., M. Ascano, Y. Wu, W. Barchet, B. L. Gaffney, T. Zillinger, A. A. Serganov, Y. Liu, R. A. Jones, G. Hartmann, T. Tuschl and D. J. Patel (2013). "Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase." *Cell* **153**(5): 1094-1107.

Garg, A. D. and P. Agostinis (2017). "Cell death and immunity in cancer: From danger signals to mimicry of pathogen defense responses." *Immunol Rev* **280**(1): 126-148.

Gelman, A. E., J. Zhang, Y. Choi and L. A. Turka (2004). "Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival." *J Immunol* **172**(10): 6065-6073.

Gentili, M., J. Kowal, M. Tkach, T. Satoh, X. Lahaye, C. Conrad, M. Boyron, B. Lombard, S. Durand, G. Kroemer, D. Loew, M. Dalod, C. Théry and N. Manel (2015). "Transmission of innate immune signaling by packaging of cGAMP in viral particles." *Science* **349**(6253): 1232-1236.

Ghaffari, A., N. Peterson, K. Khalaj, N. Vitkin, A. Robinson, J. A. Francis and M. Koti (2018). "STING agonist therapy in combination with PD-1 immune checkpoint blockade enhances response to carboplatin chemotherapy in high-grade serous ovarian cancer." *Br J Cancer* **119**(4): 440-449.

Goswami, R., R. Jabeen, R. Yagi, D. Pham, J. Zhu, S. Goenka and M. H. Kaplan (2012). "STAT6-dependent regulation of Th9 development." *J Immunol* **188**(3): 968-975.

Gui, X., H. Yang, T. Li, X. Tan, P. Shi, M. Li, F. Du and Z. J. Chen (2019). "Autophagy induction via STING trafficking is a primordial function of the cGAS pathway." *Nature* **567**(7747): 262-266.

Gulen, M. F., U. Koch, S. M. Haag, F. Schuler, L. Apetoh, A. Villunger, F. Radtke and A. Ablasser (2017). "Signalling strength determines proapoptotic functions of STING." *Nat Commun* **8**(1): 427.

Haabeth, O. A., K. B. Lorvik, C. Hammarström, I. M. Donaldson, G. Haraldsen, B. Bogen and A. Corthay (2011). "Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer." *Nat Commun* **2**: 240.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.

Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.

Harding, S. M., J. L. Benci, J. Irianto, D. E. Discher, A. J. Minn and R. A. Greenberg (2017). "Mitotic progression following DNA damage enables pattern recognition within micronuclei." *Nature* **548**(7668): 466-470.

Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.

Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner and S. Bauer (2004). "Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8." *Science* **303**(5663): 1526-1529.

Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira (2000). "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA." *Nature* **408**(6813): 740-745.

Herr, H. W. and A. Morales (2008). "History of bacillus Calmette-Guerin and bladder cancer: an immunotherapy success story." *J Urol* **179**(1): 53-56.

Ho, S. S., W. Y. Zhang, N. Y. Tan, M. Khatoo, M. A. Suter, S. Tripathi, F. S. Cheung, W. K. Lim, P. H. Tan, J. Ngeow and S. Gasser (2016). "The DNA Structure-Specific Endonuclease MUS81 Mediates DNA Sensor STING-Dependent Host Rejection of Prostate Cancer Cells." *Immunity* **44**(5): 1177-1189.

Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, C. S. Tripp, S. F. Wolf, A. O'Garra and K. M. Murphy (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages." *Science* **260**(5107): 547-549.

Humblin, E., M. Thibaudin, F. Chalmin, V. Derangère, E. Limagne, C. Richard, R. A. Flavell, S. Chevrier, S. Ladoire, H. Berger, R. Boidot, L. Apetoh, F. Végran and F. Ghiringhelli (2017). "IRF8-dependent molecular complexes control the Th9 transcriptional program." *Nat Commun* **8**(1): 2085.

Hunder, N. N., H. Wallen, J. Cao, D. W. Hendricks, J. Z. Reilly, R. Rodmyre, A. Jungbluth, S. Gnjatic, J. A. Thompson and C. Yee (2008). "Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1." *N Engl J Med* **358**(25): 2698-2703.

Hung, K., R. Hayashi, A. Lafond-Walker, C. Lowenstein, D. Pardoll and H. Levitsky (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." *J Exp Med* **188**(12): 2357-2368.

Hwang, E. S., S. J. Szabo, P. L. Schwartzberg and L. H. Glimcher (2005). "T helper cell fate specified by kinase-mediated interaction of T-bet with GATA-3." *Science* **307**(5708): 430-433.

Imanishi, T., H. Hara, S. Suzuki, N. Suzuki, S. Akira and T. Saito (2007). "Cutting edge: TLR2 directly triggers Th1 effector functions." *J Immunol* **178**(11): 6715-6719.

Imanishi, T. and T. Saito (2020). "T Cell Co-stimulation and Functional Modulation by Innate Signals." *Trends Immunol.*

Imanishi, T., M. Unno, W. Kobayashi, N. Yoneda, S. Matsuda, K. Ikeda, T. Hoshii, A. Hirao, K. Miyake, G. N. Barber, M. Arita, K. J. Ishii, S. Akira and T. Saito (2019). "Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function." *Life Sci Alliance* **2**(1).

Isaacs, A., R. A. Cox and Z. Rothen (1963). "Foreign nucleic acids as the stimulus to make interferon." *Lancet* **2**(7299): 113-116.

Ishii, K. J., C. Coban, H. Kato, K. Takahashi, Y. Torii, F. Takeshita, H. Ludwig, G. Sutter, K. Suzuki, H. Hemmi, S. Sato, M. Yamamoto, S. Uematsu, T. Kawai, O. Takeuchi and S. Akira (2006). "A Toll-like receptor-independent antiviral response induced by double-stranded B-form DNA." *Nat Immunol* **7**(1): 40-48.

Ishii, K. J., T. Kawagoe, S. Koyama, K. Matsui, H. Kumar, T. Kawai, S. Uematsu, O. Takeuchi, F. Takeshita, C. Coban and S. Akira (2008). "TANK-binding kinase-1 delineates innate and adaptive immune responses to DNA vaccines." *Nature* **451**(7179): 725-729.

Ishikawa, H. and G. N. Barber (2008). "STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling." *Nature* **455**(7213): 674-678.

Ishikawa, H., Z. Ma and G. N. Barber (2009). "STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity." *Nature* **461**(7265): 788-792.

Ivanov, I. I., B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelletier, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells." *Cell* **126**(6): 1121-1133.

Ivanov, S., A. M. Dragoi, X. Wang, C. Dallacosta, J. Louten, G. Musco, G. Sitia, G. S. Yap, Y. Wan, C. A. Biron, M. E. Bianchi, H. Wang and W. M. Chu (2007). "A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA." *Blood* **110**(6): 1970-1981.

Iwai, Y., M. Ishida, Y. Tanaka, T. Okazaki, T. Honjo and N. Minato (2002). "Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12293-12297.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-995.

Iwasaki, A. and R. Medzhitov (2010). "Regulation of adaptive immunity by the innate immune system." Science **327**(5963): 291-295.

Jabeen, R., R. Goswami, O. Awe, A. Kulkarni, E. T. Nguyen, A. Attenasio, D. Walsh, M. R. Olson, M. H. Kim, R. S. Tepper, J. Sun, C. H. Kim, E. J. Taparowsky, B. Zhou and M. H. Kaplan (2013). "Th9 cell development requires a BATF-regulated transcriptional network." J Clin Invest **123**(11): 4641-4653.

Janeway, C. A. (1989). "Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **54 Pt 1**: 1-13.

Janeway, C. A. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." Immunol Today **13**(1): 11-16.

Jash, A., A. Sahoo, G. C. Kim, C. S. Chae, J. S. Hwang, J. E. Kim and S. H. Im (2012). "Nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1)-induced permissive chromatin modification facilitates nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)-mediated interleukin-9 (IL-9) transactivation." J Biol Chem **287**(19): 15445-15457.

Jenner, R. G., M. J. Townsend, I. Jackson, K. Sun, R. D. Bouwman, R. A. Young, L. H. Glimcher and G. M. Lord (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 U S A **106**(42): 17876-17881.

Jeremiah, N., B. Neven, M. Gentili, I. Callebaut, S. Maschalidi, M. C. Stolzenberg, N. Goudin, M. L. Frémond, P. Nitschke, T. J. Molina, S. Blanche, C. Picard, G. I. Rice, Y. J. Crow, N. Manel, A. Fischer, B. Bader-Meunier and F. Rieux-Laucat (2014). "Inherited STING-activating mutation underlies a familial inflammatory syndrome with lupus-like manifestations." J Clin Invest **124**(12): 5516-5520.

Jiang, Y., J. Chen, E. Bi, Y. Zhao, T. Qin, Y. Wang, A. Wang, S. Gao, Q. Yi and S. Wang (2019). "TNF- $\alpha$  enhances Th9 cell differentiation and antitumor immunity via TNFR2-dependent pathways." J Immunother Cancer **7**(1): 28.

Jin, L., K. K. Hill, H. Filak, J. Mogan, H. Knowles, B. Zhang, A. L. Perraud, J. C. Cambier and L. L. Lenz (2011). "MPYS is required for IFN response factor 3 activation and type I IFN production in the response of cultured phagocytes to bacterial second messengers cyclic-di-AMP and cyclic-di-GMP." J Immunol **187**(5): 2595-2601.

Jin, L., P. M. Waterman, K. R. Jonscher, C. M. Short, N. A. Reisdorph and J. C. Cambier (2008). "MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals." Mol Cell Biol **28**(16): 5014-5026.

Jones, C. P., L. G. Gregory, B. Causton, G. A. Campbell and C. M. Lloyd (2012). "Activin A and TGF- $\beta$  promote T(H)9 cell-mediated pulmonary allergic pathology." J Allergy Clin Immunol **129**(4): 1000-1010.e1003.

June, C. H., M. V. Maus, G. Plesa, L. A. Johnson, Y. Zhao, B. L. Levine, S. A. Grupp and D. L. Porter (2014). "Engineered T cells for cancer therapy." Cancer Immunol Immunother **63**(9): 969-975.

Jäger, E., D. Jäger, J. Karbach, Y. T. Chen, G. Ritter, Y. Nagata, S. Gnjatic, E. Stockert, M. Arand, L. J. Old and A. Knuth (2000). "Identification of NY-ESO-1 epitopes presented by human histocompatibility antigen (HLA)-DRB4\*0101-0103 and recognized by CD4(+) T lymphocytes of patients with NY-ESO-1-expressing melanoma." J Exp Med **191**(4): 625-630.

Jürgens, B., U. Hainz, D. Fuchs, T. Felzmann and A. Heitger (2009). "Interferon-gamma-triggered indoleamine 2,3-dioxygenase competence in human monocyte-derived dendritic cells induces regulatory activity in allogeneic T cells." Blood **114**(15): 3235-3243.

Kaplan, D. H., V. Shankaran, A. S. Dighe, E. Stockert, M. Aguet, L. J. Old and R. D. Schreiber (1998). "Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(13): 7556-7561.

Kaplan, M. H., U. Schindler, S. T. Smiley and M. J. Grusby (1996). "Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells." Immunity **4**(3): 313-319.

Karikó, K., H. Ni, J. Capodici, M. Lamphier and D. Weissman (2004). "mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3." *J Biol Chem* **279**(13): 12542-12550.

Karim, A. F., S. M. Reba, Q. Li, W. H. Boom and R. E. Rojas (2017). "Toll like Receptor 2 engagement on CD4." *Eur J Immunol* **47**(9): 1513-1524.

Kawai, T. and S. Akira (2010). "The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors." *Nat Immunol* **11**(5): 373-384.

Kawane, K., M. Ohtani, K. Miwa, T. Kizawa, Y. Kanbara, Y. Yoshioka, H. Yoshikawa and S. Nagata (2006). "Chronic polyarthritis caused by mammalian DNA that escapes from degradation in macrophages." *Nature* **443**(7114): 998-1002.

Kim, I. K., B. S. Kim, C. H. Koh, J. W. Seok, J. S. Park, K. S. Shin, E. A. Bae, G. E. Lee, H. Jeon, J. Cho, Y. Jung, D. Han, B. S. Kwon, H. Y. Lee, Y. Chung and C. Y. Kang (2015). "Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein co-stimulation facilitates tumor regression by inducing IL-9-producing helper T cells." *Nat Med* **21**(9): 1010-1017.

Kim, I. K., C. H. Koh, I. Jeon, K. S. Shin, T. S. Kang, E. A. Bae, H. Seo, H. J. Ko, B. S. Kim, Y. Chung and C. Y. Kang (2019). "GM-CSF Promotes Antitumor Immunity by Inducing Th9 Cell Responses." *Cancer Immunol Res* **7**(3): 498-509.

Kitai, Y., T. Kawasaki, T. Sueyoshi, K. Kobiyama, K. J. Ishii, J. Zou, S. Akira, T. Matsuda and T. Kawai (2017). "DNA-Containing Exosomes Derived from Cancer Cells Treated with Topotecan Activate a STING-Dependent Pathway and Reinforce Antitumor Immunity." *J Immunol* **198**(4): 1649-1659.

Klarquist, J., C. M. Hennies, M. A. Lehn, R. A. Reboulet, S. Feau and E. M. Janssen (2014). "STING-mediated DNA sensing promotes antitumor and autoimmune responses to dying cells." *J Immunol* **193**(12): 6124-6134.

Komai-Koma, M., L. Jones, G. S. Ogg, D. Xu and F. Y. Liew (2004). "TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(9): 3029-3034.

Kondo, T., J. Kobayashi, T. Saitoh, K. Maruyama, K. J. Ishii, G. N. Barber, K. Komatsu, S. Akira and T. Kawai (2013). "DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(8): 2969-2974.

Konno, H., K. Konno and G. N. Barber (2013). "Cyclic dinucleotides trigger ULK1 (ATG1) phosphorylation of STING to prevent sustained innate immune signaling." *Cell* **155**(3): 688-698.

Lande, R., J. Gregorio, V. Facchinetti, B. Chatterjee, Y. H. Wang, B. Homey, W. Cao, B. Su, F. O. Nestle, T. Zal, I. Mellman, J. M. Schröder, Y. J. Liu and M. Gilliet (2007). "Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide." *Nature* **449**(7162): 564-569.

Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-240.

Larkin, B., V. Ilyukha, M. Sorokin, A. Buzdin, E. Vannier and A. Poltorak (2017). "Cutting Edge: Activation of STING in T Cells Induces Type I IFN Responses and Cell Death." *J Immunol* **199**(2): 397-402.

Lau, L., E. E. Gray, R. L. Brunette and D. B. Stetson (2015). "DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway." *Science* **350**(6260): 568-571.

Leach, D. R., M. F. Krummel and J. P. Allison (1996). "Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade." *Science* **271**(5256): 1734-1736.

Lee, D. W., J. N. Kochenderfer, M. Stetler-Stevenson, Y. K. Cui, C. Delbrook, S. A. Feldman, T. J. Fry, R. Orentas, M. Sabatino, N. N. Shah, S. M. Steinberg, D. Stroncek, N. Tschernia, C. Yuan, H. Zhang, L. Zhang, S. A. Rosenberg, A. S. Wayne and C. L. Mackall (2015). "T cells expressing CD19 chimeric antigen receptors for acute lymphoblastic leukaemia in children and young adults: a phase 1 dose-escalation trial." *Lancet* **385**(9967): 517-528.

Lemaitre, B., E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart and J. A. Hoffmann (1996). "The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults." *Cell* **86**(6): 973-983.

Lemoli, R. M., A. Fortuna, A. Tafuri, A. Grande, M. Amabile, G. Martinelli, S. Ferrari and S. Tura (1997). "Interleukin-9 in human myeloid leukemia cells." *Leuk Lymphoma* **26**(5-6): 563-573.

Lemos, H., E. Mohamed, L. Huang, R. Ou, G. Pacholczyk, A. S. Arbab, D. Munn and A. L. Mellor (2016). "STING Promotes the Growth of Tumors Characterized by Low Antigenicity via IDO Activation." *Cancer Res* **76**(8): 2076-2081.

Li, K., S. Qu, X. Chen, Q. Wu and M. Shi (2017). "Promising Targets for Cancer Immunotherapy: TLRs, RLRs, and STING-Mediated Innate Immune Pathways." *Int J Mol Sci* **18**(2).

Li, L., Q. Yin, P. Kuss, Z. Maliga, J. L. Millan, H. Wu and T. J. Mitchison (2014). "Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs." *Nat Chem Biol* **10**(12): 1043-1048.

Li, T., H. Cheng, H. Yuan, Q. Xu, C. Shu, Y. Zhang, P. Xu, J. Tan, Y. Rui, P. Li and X. Tan (2016). "Antitumor Activity of cGAMP via Stimulation of cGAS-cGAMP-STING-IRF3 Mediated Innate Immune Response." *Sci Rep* **6**: 19049.

Li, W., L. Lu, J. Lu, X. Wang, C. Yang, J. Jin, L. Wu, X. Hong, F. Li, D. Cao, Y. Yang, M. Wu, B. Su, J. Cheng, X. Yang, W. Di and L. Deng (2020). "cGAS-STING-mediated DNA sensing maintains CD8+ T cell stemness and promotes antitumor T cell therapy." *Sci Transl Med* **12**(549).

Licona-Limón, P., J. Henao-Mejia, A. U. Temann, N. Gagliani, I. Licona-Limón, H. Ishigame, L. Hao, D. R. Herbert and R. A. Flavell (2013). "Th9 Cells Drive Host Immunity against Gastrointestinal Worm Infection." *Immunity* **39**(4): 744-757.

Liu, L., E. Bi, X. Ma, W. Xiong, J. Qian, L. Ye, P. Su, Q. Wang, L. Xiao, M. Yang, Y. Lu and Q. Yi (2020). "Enhanced CAR-T activity against established tumors by polarizing human T cells to secrete interleukin-9." *Nat Commun* **11**(1): 5902.

Liu, S., X. Cai, J. Wu, Q. Cong, X. Chen, T. Li, F. Du, J. Ren, Y. T. Wu, N. V. Grishin and Z. J. Chen (2015). "Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation." *Science* **347**(6227): aaa2630.

Liu, Y., Y. Gu, Y. Han, Q. Zhang, Z. Jiang, X. Zhang, B. Huang, X. Xu, J. Zheng and X. Cao (2016). "Tumor Exosomal RNAs Promote Lung Pre-metastatic Niche Formation by Activating Alveolar Epithelial TLR3 to Recruit Neutrophils." *Cancer Cell* **30**(2): 243-256.

Liu, Y., A. A. Jesus, B. Marrero, D. Yang, S. E. Ramsey, G. A. M. Sanchez, K. Tenbrock, H. Wittkowski, O. Y. Jones, H. S. Kuehn, C. R. Lee, M. A. DiMattia, E. W. Cowen, B. Gonzalez, I. Palmer, J. J. DiGiovanna, A. Biancotto, H. Kim, W. L. Tsai, A. M. Trier, Y. Huang, D. L. Stone, S. Hill, H. J. Kim, C. St Hilaire, S. Gurprasad, N. Plass, D. Chapelle, I. Horkayne-Szakaly, D. Foell, A. Barysenka, F. Candotti, S. M. Holland, J. D. Hughes, H. Mehmet, A. C. Issekutz, M. Raffeld, J. McElwee, J. R. Fontana, C. P. Minniti, S. Moir, D. L. Kastner, M. Gadina, A. C. Steven, P. T. Wingfield, S. R. Brooks, S. D. Rosenzweig, T. A. Fleisher, Z. Deng, M. Boehm, A. S. Paller and R. Goldbach-Mansky (2014). "Activated STING in a vascular and pulmonary syndrome." *N Engl J Med* **371**(6): 507-518.

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

Lu, Y., S. Hong, H. Li, J. Park, B. Hong, L. Wang, Y. Zheng, Z. Liu, J. Xu, J. He, J. Yang, J. Qian and Q. Yi (2012). "Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo." *J Clin Invest* **122**(11): 4160-4171.

Lu, Y., Q. Wang, G. Xue, E. Bi, X. Ma, A. Wang, J. Qian, C. Dong and Q. Yi (2018). "Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4(+) T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors." *Cancer Cell* **33**(6): 1048-1060 e1047.

Luecke, S., A. Holleufer, M. H. Christensen, K. L. Jønsson, G. A. Boni, L. K. Sørensen, M. Johannsen, M. R. Jakobsen, R. Hartmann and S. R. Paludan (2017). "cGAS is activated by DNA in a length-dependent manner." *EMBO Rep* **18**(10): 1707-1715.

Luksch, H., W. A. Stinson, D. J. Platt, W. Qian, G. Kalugotla, C. A. Miner, B. G. Bennion, A. Gerbaulet, A. Rosen-Wolff and J. J. Miner (2019). "STING-associated lung disease in mice relies on T cells but not type I interferon." *J Allergy Clin Immunol* **144**(1): 254-266 e258.

Mackenzie, K. J., P. Carroll, L. Lettice, Ž. Tarnauskaitė, K. Reddy, F. Dix, A. Revuelta, E. Abbondati, R. E. Rigby, B. Rabe, F. Kilanowski, G. Grimes, A. Fluteau, P. S. Devenney, R. E. Hill, M. A. Reijns and A. P. Jackson (2016). "Ribonuclease H2 mutations induce a cGAS/STING-dependent innate immune response." *EMBO J* **35**(8): 831-844.



Manel, N., D. Unutmaz and D. R. Littman (2008). "The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor ROR $\gamma$ ." Nat Immunol **9**(6): 641-649.

Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb and C. T. Weaver (2006). "Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage." Nature **441**(7090): 231-234.

Marcus, A., A. J. Mao, M. Lensink-Vasan, L. Wang, R. E. Vance and D. H. Raulet (2018). "Tumor-Derived cGAMP Triggers a STING-Mediated Interferon Response in Non-tumor Cells to Activate the NK Cell Response." Immunity **49**(4): 754-763.e754.

Matsuguchi, T., K. Takagi, T. Musikacharoen and Y. Yoshikai (2000). "Gene expressions of lipopolysaccharide receptors, toll-like receptors 2 and 4, are differently regulated in mouse T lymphocytes." Blood **95**(4): 1378-1385.

Mattes, J., M. Hulett, W. Xie, S. Hogan, M. E. Rothenberg, P. Foster and C. Parish (2003). "Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process." J Exp Med **197**(3): 387-393.

Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." Annu Rev Immunol **12**: 991-1045.

Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt and C. A. Janeway (1997). "A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity." Nature **388**(6640): 394-397.

Melki, I., Y. Rose, C. Ugenti, L. Van Eyck, M. L. Frémond, N. Kitabayashi, G. I. Rice, E. M. Jenkinson, A. Boulai, N. Jeremiah, M. Gattorno, S. Volpi, O. Sacco, S. W. J. Terheggen-Lagro, H. A. W. M. Tiddens, I. Meyts, M. A. Morren, P. De Haes, C. Wouters, E. Legius, A. Corveleyn, F. Rieux-Laucat, C. Bodemer, I. Callebaut, M. P. Rodero and Y. J. Crow (2017). "Disease-associated mutations identify a novel region in human STING necessary for the control of type I interferon signaling." J Allergy Clin Immunol **140**(2): 543-552.e545.

Miao, B. P., R. S. Zhang, H. J. Sun, Y. P. Yu, T. Chen, L. J. Li, J. Q. Liu, J. Liu, H. Q. Yu, M. Zhang, Z. G. Liu and P. C. Yang (2017). "Inhibition of squamous cancer growth in a mouse model by Staphylococcal enterotoxin B-triggered Th9 cell expansion." Cell Mol Immunol **14**(4): 371-379.

Moore, E., P. E. Clavijo, R. Davis, H. Cash, C. Van Waes, Y. Kim and C. Allen (2016). "Established T Cell-Inflamed Tumors Rejected after Adaptive Resistance Was Reversed by Combination STING Activation and PD-1 Pathway Blockade." Cancer Immunol Res **4**(12): 1061-1071.

Mosmann, T. R., H. Cherwinski, M. W. Bond, M. A. Giedlin and R. L. Coffman (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." J Immunol **136**(7): 2348-2357.

Motwani, M., S. Pawaria, J. Bernier, S. Moses, K. Henry, T. Fang, L. Burkly, A. Marshak-Rothstein and K. A. Fitzgerald (2019). "Hierarchy of clinical manifestations in SAVI N153S and V154M mouse models." Proc Natl Acad Sci U S A **116**(16): 7941-7950.

Mukai, K., H. Konno, T. Akiba, T. Uemura, S. Waguri, T. Kobayashi, G. N. Barber, H. Arai and T. Taguchi (2016). "Activation of STING requires palmitoylation at the Golgi." Nat Commun **7**: 11932.

Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang and S. L. Reiner (2001). "Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection." Science **292**(5523): 1907-1910.

Mullen, A. C., A. S. Hutchins, F. A. High, H. W. Lee, K. J. Sykes, L. A. Chodosh and S. L. Reiner (2002). "Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction." Nat Immunol **3**(7): 652-658.

Mumberg, D., P. A. Monach, S. Wanderling, M. Philip, A. Y. Toledano, R. D. Schreiber and H. Schreiber (1999). "CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8633-8638.

Muranski, P., A. Boni, P. A. Antony, L. Cassard, K. R. Irvine, A. Kaiser, C. M. Paulos, D. C. Palmer, C. E. Touloukian, K. Ptak, L. Gattinoni, C. Wrzesinski, C. S. Hinrichs, K. W. Kerstann, L. Feigenbaum, C. C. Chan and N. P. Restifo (2008). "Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma." Blood **112**(2): 362-373.

Murphy, C. A., C. L. Langrish, Y. Chen, W. Blumenschein, T. McClanahan, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick and D. J. Cua (2003). "Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation." *J Exp Med* **198**(12): 1951-1957.

Murugaiyan, G., V. Beynon, A. Pires Da Cunha, N. Joller and H. L. Weiner (2012). "IFN- $\gamma$  limits Th9-mediated autoimmune inflammation through dendritic cell modulation of IL-27." *J Immunol* **189**(11): 5277-5283.

Nakatsukasa, H., D. Zhang, T. Maruyama, H. Chen, K. Cui, M. Ishikawa, L. Deng, P. Zanvit, E. Tu, W. Jin, B. Abbatiello, N. Goldberg, Q. Chen, L. Sun, K. Zhao and W. Chen (2015). "The DNA-binding inhibitor Id3 regulates IL-9 production in CD4(+) T cells." *Nat Immunol* **16**(10): 1077-1084.

Nishikawa, H., T. Kato, I. Tawara, H. Ikeda, K. Kuribayashi, P. M. Allen, R. D. Schreiber, L. J. Old and H. Shiku (2005). "IFN- $\gamma$  controls the generation/activation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in antitumor immune response." *J Immunol* **175**(7): 4433-4440.

Nishimura, T., K. Iwakabe, M. Sekimoto, Y. Ohmi, T. Yahata, M. Nakui, T. Sato, S. Habu, H. Tashiro, M. Sato and A. Ohta (1999). "Distinct role of antigen-specific T helper type 1 (Th1) and Th2 cells in tumor eradication in vivo." *J Exp Med* **190**(5): 617-627.

Nishimura, T., M. Nakui, M. Sato, K. Iwakabe, H. Kitamura, M. Sekimoto, A. Ohta, T. Koda and S. Nishimura (2000). "The critical role of Th1-dominant immunity in tumor immunology." *Cancer Chemother Pharmacol* **46 Suppl**: S52-61.

Nonomura, Y., A. Otsuka, C. Nakashima, J. A. Seidel, A. Kitoh, T. Dainichi, S. Nakajima, Y. Sawada, S. Matsushita, M. Aoki, T. Takenouchi, T. Fujimura, N. Hatta, S. Koreeda, S. Fukushima, T. Honda and K. Kabashima (2016). "Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients." *Oncoimmunology* **5**(12): e1248327.

Numasaki, M., J. Fukushi, M. Ono, S. K. Narula, P. J. Zavadny, T. Kudo, P. D. Robbins, H. Tahara and M. T. Lotze (2003). "Interleukin-17 promotes angiogenesis and tumor growth." *Blood* **101**(7): 2620-2627.

O'Neill, L. A., D. Golenbock and A. G. Bowie (2013). "The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity." *Nat Rev Immunol* **13**(6): 453-460.

Ochi, A., A. H. Nguyen, A. S. Bedrosian, H. M. Mushlin, S. Zerbakhsh, R. Barilla, C. P. Zambirinis, N. C. Fallon, A. Rehman, Y. Pylayeva-Gupta, S. Badar, C. H. Hajdu, A. B. Frey, D. Bar-Sagi and G. Miller (2012). "MyD88 inhibition amplifies dendritic cell capacity to promote pancreatic carcinogenesis via Th2 cells." *J Exp Med* **209**(9): 1671-1687.

Ohkuri, T., A. Ghosh, A. Kosaka, J. Zhu, M. Ikeura, M. David, S. C. Watkins, S. N. Sarkar and H. Okada (2014). "STING contributes to antiglioma immunity via triggering type I IFN signals in the tumor microenvironment." *Cancer Immunol Res* **2**(12): 1199-1208.

Ohkuri, T., A. Kosaka, K. Ishibashi, T. Kumai, Y. Hirata, K. Ohara, T. Nagato, K. Oikawa, N. Aoki, Y. Harabuchi, E. Celis and H. Kobayashi (2017). "Intratumoral administration of cGAMP transiently accumulates potent macrophages for anti-tumor immunity at a mouse tumor site." *Cancer Immunol Immunother* **66**(6): 705-716.

Oppenheim, J. J. and D. Yang (2005). "Alarmins: chemotactic activators of immune responses." *Curr Opin Immunol* **17**(4): 359-365.

Osawa, E., A. Nakajima, T. Fujisawa, Y. I. Kawamura, N. Toyama-Sorimachi, H. Nakagama and T. Dohi (2006). "Predominant T helper type 2-inflammatory responses promote murine colon cancers." *Int J Cancer* **118**(9): 2232-2236.

Ossendorp, F., E. Mengedé, M. Camps, R. Filius and C. J. Melief (1998). "Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors." *J Exp Med* **187**(5): 693-702.

Pagès, F., A. Berger, M. Camus, F. Sanchez-Cabo, A. Costes, R. Molidor, B. Mlecnik, A. Kirilovsky, M. Nilsson, D. Damotte, T. Meatchi, P. Bruneval, P. H. Cugnenc, Z. Trajanoski, W. H. Fridman and J. Galon (2005). "Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer." *N Engl J Med* **353**(25): 2654-2666.

Pagès, F., B. Mlecnik, F. Marliot, G. Bindea, F. S. Ou, C. Bifulco, A. Lugli, I. Zlobec, T. T. Rau, M. D. Berger, I. D. Nagtegaal, E. Vink-Börger, A. Hartmann, C. Geppert, J. Kolwelter, S. Merkel, R. Grützmann, M. Van den Eynde, A. Jouret-Mourin, A. Kartheuser, D. Léonard, C. Remue, J. Y. Wang, P.

Bavi, M. H. A. Roehrl, P. S. Ohashi, L. T. Nguyen, S. Han, H. L. MacGregor, S. Hafezi-Bakhtiari, B. G. Wouters, G. V. Masucci, E. K. Andersson, E. Zavadova, M. Vocka, J. Spacek, L. Petruzelka, B. Konopasek, P. Dundr, H. Skalova, K. Nemejcova, G. Botti, F. Tatangelo, P. Delrio, G. Ciliberto, M. Maio, L. Laghi, F. Grizzi, T. Fredriksen, B. Buttard, M. Angelova, A. Vasaturo, P. Maby, S. E. Church, H. K. Angell, L. Lafontaine, D. Bruni, C. El Sissy, N. Haicheur, A. Kirilovsky, A. Berger, C. Lagorce, J. P. Meyers, C. Paustian, Z. Feng, C. Ballesteros-Merino, J. Dijkstra, C. van de Water, S. van Lent-van Vliet, N. Knijn, A. M. Muşină, D. V. Scripcariu, B. Popivanova, M. Xu, T. Fujita, S. Hazama, N. Suzuki, H. Nagano, K. Okuno, T. Torigoe, N. Sato, T. Furuhashi, I. Takemasa, K. Itoh, P. S. Patel, H. H. Vora, B. Shah, J. B. Patel, K. N. Rajvik, S. J. Pandya, S. N. Shukla, Y. Wang, G. Zhang, Y. Kawakami, F. M. Marincola, P. A. Ascierto, D. J. Sargent, B. A. Fox and J. Galon (2018). "International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study." *Lancet* **391**(10135): 2128-2139.

Pantelidou, C., O. Sonzogni, M. De Oliveria Taveira, A. K. Mehta, A. Kothari, D. Wang, T. Visal, M. K. Li, J. Pinto, J. A. Castrillon, E. M. Cheney, P. Bouwman, J. Jonkers, S. Rottenberg, J. L. Guerriero, G. M. Wulf and G. I. Shapiro (2019). "PARP Inhibitor Efficacy Depends on CD8+ T-cell Recruitment via Intratumoral STING Pathway Activation in BRCA-Deficient Models of Triple-Negative Breast Cancer." *Cancer Discov* **9**(6): 722-737.

Pardoll, D. M. and S. L. Topalian (1998). "The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity." *Curr Opin Immunol* **10**(5): 588-594.

Parrot, T., M. Allard, R. Oger, H. Benlalam, D. Raingeard de la Blétière, A. Coutolleau, L. Preisser, J. Desfrancois, A. Khammari, B. Dréno, N. Labarrière, Y. Delneste, P. Guardiola and N. Gervois (2016). "IL-9 promotes the survival and function of human melanoma-infiltrating CD4(+) CD8(+) double-positive T cells." *Eur J Immunol* **46**(7): 1770-1782.

Peng, G., Z. Guo, Y. Kiniwa, K. S. Voo, W. Peng, T. Fu, D. Y. Wang, Y. Li, H. Y. Wang and R. F. Wang (2005). "Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function." *Science* **309**(5739): 1380-1384.

Perez-Diez, A., N. T. Joncker, K. Choi, W. F. Chan, C. C. Anderson, O. Lantz and P. Matzinger (2007). "CD4 cells can be more efficient at tumor rejection than CD8 cells." *Blood* **109**(12): 5346-5354.

Porter, D. L., B. L. Levine, M. Kalos, A. Bagg and C. H. June (2011). "Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia." *N Engl J Med* **365**(8): 725-733.

Prabakaran, T., C. Bodda, C. Krapp, B. C. Zhang, M. H. Christensen, C. Sun, L. Reinert, Y. Cai, S. B. Jensen, M. K. Skouboe, J. R. Nyengaard, C. B. Thompson, R. J. Lebbink, G. C. Sen, G. van Loo, R. Nielsen, M. Komatsu, L. N. Nejsun, M. R. Jakobsen, M. Gyrd-Hansen and S. R. Paludan (2018). "Attenuation of cGAS-STING signaling is mediated by a p62/SQSTM1-dependent autophagy pathway activated by TBK1." *EMBO J* **37**(8).

Purwar, R., C. Schlapbach, S. Xiao, H. S. Kang, W. Elyaman, X. Jiang, A. M. Jetten, S. J. Khoury, R. C. Fuhlbrigge, V. K. Kuchroo, R. A. Clark and T. S. Kupper (2012). "Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells." *Nat Med* **18**(8): 1248-1253.

Quezada, S. A., T. R. Simpson, K. S. Peggs, T. Merghoub, J. Vider, X. Fan, R. Blasberg, H. Yagita, P. Muranski, P. A. Antony, N. P. Restifo and J. P. Allison (2010). "Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts." *J Exp Med* **207**(3): 637-650.

Ramanjulu, J. M., G. S. Pesiridis, J. Yang, N. Concha, R. Singhaus, S. Y. Zhang, J. L. Tran, P. Moore, S. Lehmann, H. C. Eberl, M. Muelbauer, J. L. Schneck, J. Clemens, M. Adam, J. Mehlmann, J. Romano, A. Morales, J. Kang, L. Leister, T. L. Graybill, A. K. Charnley, G. Ye, N. Nevins, K. Behnia, A. I. Wolf, V. Kasparcova, K. Nurse, L. Wang, A. C. Puhl, Y. Li, M. Klein, C. B. Hopson, J. Guss, M. Bantscheff, G. Bergamini, M. A. Reilly, Y. Lian, K. J. Duffy, J. Adams, K. P. Foley, P. J. Gough, R. W. Marquis, J. Smothers, A. Hoos and J. Bertin (2018). "Design of amidobenzimidazole STING receptor agonists with systemic activity." *Nature* **564**(7736): 439-443.

Ranoa, D. R., A. D. Parekh, S. P. Pitroda, X. Huang, T. Darga, A. C. Wong, L. Huang, J. Andrade, J. P. Staley, T. Satoh, S. Akira, R. R. Weichselbaum and N. N. Khodarev (2016). "Cancer therapies activate RIG-I-like receptor pathway through endogenous non-coding RNAs." *Oncotarget* **7**(18): 26496-26515.

Renauld, J. C., N. van der Lugt, A. Vink, M. van Roon, C. Godfraind, G. Warnier, H. Merz, A. Feller, A. Berns and J. Van Snick (1994). "Thymic lymphomas in interleukin 9 transgenic mice." *Oncogene* **9**(5): 1327-1332.

Reynolds, J. M. and C. Dong (2013). "Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function." *Trends Immunol* **34**(10): 511-519.

Reynolds, J. M., G. J. Martinez, Y. Chung and C. Dong (2012). "Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(32): 13064-13069.

Reynolds, J. M., B. P. Pappu, J. Peng, G. J. Martinez, Y. Zhang, Y. Chung, L. Ma, X. O. Yang, R. I. Nurieva, Q. Tian and C. Dong (2010). "Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease." *Immunity* **32**(5): 692-702.

Rice, G. I., M. P. Rodero and Y. J. Crow (2015). "Human disease phenotypes associated with mutations in TREX1." *J Clin Immunol* **35**(3): 235-243.

Rivera Vargas, T., I. Benoit-Lizon and L. Apetoh (2017). "Rationale for stimulator of interferon genes-targeted cancer immunotherapy." *Eur J Cancer* **75**: 86-97.

Rivera Vargas, T., Z. Cai, Y. Shen, M. Dosset, I. Benoit-Lizon, T. Martin, A. Roussey, R. A. Flavell, F. Ghiringhelli and L. Apetoh (2017). "Selective degradation of PU.1 during autophagy represses the differentiation and antitumour activity of TH9 cells." *Nat Commun* **8**(1): 559.

Rodero, M. P., A. Tesser, E. Bartok, G. I. Rice, E. Della Mina, M. Depp, B. Beitz, V. Bondet, N. Cagnard, D. Duffy, M. Dussiot, M. L. Frémond, M. Gattorno, F. Guillem, N. Kitabayashi, F. Porcheray, F. Rieux-Laucat, L. Seabra, C. Uggenti, S. Volpi, L. A. H. Zeef, M. A. Alyanakian, J. Bertrand, A. M. Bianco, N. Boddaert, C. Brouzes, S. Candon, R. Caorsi, M. Charbit, M. Fabre, F. Faletra, M. Girard, A. Harroche, E. Hartmann, D. Lasne, A. Marcuzzi, B. Neven, P. Nitschke, T. Pascreau, S. Pastore, C. Picard, P. Picco, E. Piscianz, M. Polak, P. Quartier, M. Rabant, G. Stocco, A. Taddio, F. Uettwiller, E. Valencic, D. Vozzi, G. Hartmann, W. Barchet, O. Hermine, B. Bader-Meunier, A. Tommasini and Y. J. Crow (2017). "Type I interferon-mediated autoinflammation due to DNase II deficiency." *Nat Commun* **8**(1): 2176.

Rosenberg, S. A., M. T. Lotze, L. M. Muul, S. Leitman, A. E. Chang, S. E. Ettinghausen, Y. L. Matory, J. M. Skibber, E. Shiloni and J. T. Vetto (1985). "Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer." *N Engl J Med* **313**(23): 1485-1492.

Rosenberg, S. A., B. S. Packard, P. M. Aebersold, D. Solomon, S. L. Topalian, S. T. Toy, P. Simon, M. T. Lotze, J. C. Yang and C. A. Seipp (1988). "Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report." *N Engl J Med* **319**(25): 1676-1680.

Rosenberg, S. A. and N. P. Restifo (2015). "Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer." *Science* **348**(6230): 62-68.

Rosenberg, S. A., P. Spiess and R. Lafreniere (1986). "A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes." *Science* **233**(4770): 1318-1321.

Rotem, Z., R. A. Cox and A. Isaacs (1963). "Inhibition of virus multiplication by foreign nucleic acid." *Nature* **197**: 564-566.

Roulois, D., H. Loo Yau, R. Singhanian, Y. Wang, A. Danesh, S. Y. Shen, H. Han, G. Liang, P. A. Jones, T. J. Pugh, C. O'Brien and D. D. De Carvalho (2015). "DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts." *Cell* **162**(5): 961-973.

Roy, S. and A. Awasthi (2019). "ATP Triggers Human Th9 Cell Differentiation via Nitric Oxide-Mediated mTOR-HIF1 $\alpha$  Pathway." *Front Immunol* **10**: 1120.

Ruangkiattikul, N., A. Nerlich, K. Abdissa, S. Lienenklaus, A. Suwandi, N. Janze, K. Laarmann, J. Spanier, U. Kalinke, S. Weiss and R. Goethe (2017). "cGAS-STING-TBK1-IRF3/7 induced interferon- $\beta$  contributes to the clearing of non tuberculous mycobacterial infection in mice." *Virulence* **8**(7): 1303-1315.

Saitoh, T., N. Fujita, T. Hayashi, K. Takahara, T. Satoh, H. Lee, K. Matsunaga, S. Kageyama, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, T. Kawai, K. Ishii, O. Takeuchi, T. Yoshimori and S. Akira (2009). "Atg9a controls

dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(49): 20842-20846.

Salazar, Y., X. Zheng, D. Brunn, H. Raifer, F. Picard, Y. Zhang, H. Winter, S. Guenther, A. Weigert, B. Weigmann, L. Dumoutier, J. C. Renauld, A. Waisman, A. Schmall, A. Tufman, L. Fink, B. Brüne, T. Bopp, F. Grimminger, W. Seeger, S. S. Pullamsetti, M. Huber and R. Savai (2020). "Microenvironmental Th9 and Th17 lymphocytes induce metastatic spreading in lung cancer." J Clin Invest **130**(7): 3560-3575.

Sancho, D., O. P. Joffre, A. M. Keller, N. C. Rogers, D. Martínez, P. Hernanz-Falcón, I. Rosewell and C. Reis e Sousa (2009). "Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity." Nature **458**(7240): 899-903.

Scaffidi, P., T. Misteli and M. E. Bianchi (2002). "Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation." Nature **418**(6894): 191-195.

Schattner, E. J., J. Mascarenhas, J. Bishop, D. H. Yoo, A. Chadburn, M. K. Crow and S. M. Friedman (1996). "CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells." Blood **88**(4): 1375-1382.

Schlapbach, C., A. Gehad, C. Yang, R. Watanabe, E. Guenova, J. E. Teague, L. Campbell, N. Yawalkar, T. S. Kupper and R. A. Clark (2014). "Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity." Sci Transl Med **6**(219): 219ra218.

Schmitt, E., T. Germann, S. Goedert, P. Hoehn, C. Huels, S. Koelsch, R. Kühn, W. Müller, N. Palm and E. Rüde (1994). "IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma." J Immunol **153**(9): 3989-3996.

Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa and C. J. Melief (1998). "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." Nature **393**(6684): 480-483.

Schüler, T., Z. Qin, S. Ibe, N. Noben-Trauth and T. Blankenstein (1999). "T helper cell type 1-associated and cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunity is impaired in interleukin 4-deficient mice." J Exp Med **189**(5): 803-810.

Sehra, S., W. Yao, E. T. Nguyen, N. L. Glosston-Byers, N. Akhtar, B. Zhou and M. H. Kaplan (2015). "TH9 cells are required for tissue mast cell accumulation during allergic inflammation." J Allergy Clin Immunol **136**(2): 433-440.e431.

Sen, T., B. L. Rodriguez, L. Chen, C. M. D. Corte, N. Morikawa, J. Fujimoto, S. Cristea, T. Nguyen, L. Diao, L. Li, Y. Fan, Y. Yang, J. Wang, B. S. Glisson, I. I. Wistuba, J. Sage, J. V. Heymach, D. L. Gibbons and L. A. Byers (2019). "Targeting DNA Damage Response Promotes Antitumor Immunity through STING-Mediated T-cell Activation in Small Cell Lung Cancer." Cancer Discov **9**(5): 646-661.

Shang, G., C. Zhang, Z. J. Chen, X. C. Bai and X. Zhang (2019). "Cryo-EM structures of STING reveal its mechanism of activation by cyclic GMP-AMP." Nature **567**(7748): 389-393.

Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old and R. D. Schreiber (2001). "IFN-gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity." Nature **410**(6832): 1107-1111.

Shrimpton, R. E., M. Butler, A. S. Morel, E. Eren, S. S. Hue and M. A. Ritter (2009). "CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self." Mol Immunol **46**(6): 1229-1239.

Sistigu, A., T. Yamazaki, E. Vacchelli, K. Chaba, D. P. Enot, J. Adam, I. Vitale, A. Goubar, E. E. Baracco, C. Remédios, L. Fend, D. Hannani, L. Aymeric, Y. Ma, M. Niso-Santano, O. Kepp, J. L. Schultze, T. Tüting, F. Belardelli, L. Bracci, V. La Sorsa, G. Ziccheddu, P. Sestili, F. Urbani, M. Delorenzi, M. Lacroix-Triki, V. Quidville, R. Conforti, J. P. Spano, L. Pusztai, V. Poirier-Colame, S. Delalogue, F. Penault-Llorca, S. Ladoire, L. Arnould, J. Cyrta, M. C. Dessoliers, A. Eggermont, M. E. Bianchi, M. Pittet, C. Engblom, C. Pfirschke, X. Prévaille, G. Uzè, R. D. Schreiber, M. T. Chow, M. J. Smyth, E. Proietti, F. André, G. Kroemer and L. Zitvogel (2014). "Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy." Nat Med **20**(11): 1301-1309.

Sivick, K. E., A. L. Desbien, L. H. Glickman, G. L. Reiner, L. Corrales, N. H. Surh, T. E. Hudson, U. T. Vu, B. J. Francica, T. Banda, G. E. Katibah, D. B. Kanne, J. J. Leong, K. Metchette, J. R. Brumfiel, C. O. Ndubaku, J. M. McKenna, Y. Feng, L. Zheng, S. L. Bender, C. Y. Cho, M. L. Leong, A. van Elsas, T. W.

Dubensky, Jr. and S. M. McWhirter (2018). "Magnitude of Therapeutic STING Activation Determines CD8(+) T Cell-Mediated Anti-tumor Immunity." *Cell Rep* **25**(11): 3074-3085 e3075.

Staudt, V., E. Bothur, M. Klein, K. Lingnau, S. Reuter, N. Grebe, B. Gerlitzki, M. Hoffmann, A. Ulges, C. Taube, N. Dehzad, M. Becker, M. Stassen, A. Steinborn, M. Lohoff, H. Schild, E. Schmitt and T. Bopp (2010). "Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells." *Immunity* **33**(2): 192-202.

Stetson, D. B., J. S. Ko, T. Heidmann and R. Medzhitov (2008). "Trex1 prevents cell-intrinsic initiation of autoimmunity." *Cell* **134**(4): 587-598.

Stetson, D. B. and R. Medzhitov (2006). "Recognition of cytosolic DNA activates an IRF3-dependent innate immune response." *Immunity* **24**(1): 93-103.

Stritesky, G. L., R. Muthukrishnan, S. Sehra, R. Goswami, D. Pham, J. Travers, E. T. Nguyen, D. E. Levy and M. H. Kaplan (2011). "The transcription factor STAT3 is required for T helper 2 cell development." *Immunity* **34**(1): 39-49.

Stutman, O. (1974). "Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice." *Science* **183**(4124): 534-536.

Su, T., Y. Zhang, K. Valerie, X. Y. Wang, S. Lin and G. Zhu (2019). "STING activation in cancer immunotherapy." *Theranostics* **9**(25): 7759-7771.

Sun, L., J. Wu, F. Du, X. Chen and Z. J. Chen (2013). "Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway." *Science* **339**(6121): 786-791.

Sun, W., Y. Li, L. Chen, H. Chen, F. You, X. Zhou, Y. Zhou, Z. Zhai, D. Chen and Z. Jiang (2009). "ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(21): 8653-8658.

Suschak, J. J., S. Wang, K. A. Fitzgerald and S. Lu (2016). "A cGAS-Independent STING/IRF7 Pathway Mediates the Immunogenicity of DNA Vaccines." *J Immunol* **196**(1): 310-316.

Swain, S. L., K. K. McKinstry and T. M. Strutt (2012). "Expanding roles for CD4<sup>+</sup> T cells in immunity to viruses." *Nat Rev Immunol* **12**(2): 136-148.

Szabo, S. J., S. T. Kim, G. L. Costa, X. Zhang, C. G. Fathman and L. H. Glimcher (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." *Cell* **100**(6): 655-669.

Takaoka, A., Z. Wang, M. K. Choi, H. Yanai, H. Negishi, T. Ban, Y. Lu, M. Miyagishi, T. Kodama, K. Honda, Y. Ohba and T. Taniguchi (2007). "DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response." *Nature* **448**(7152): 501-505.

Tamiya, T., K. Ichiyama, H. Kotani, T. Fukaya, T. Sekiya, T. Shichita, K. Honma, K. Yui, T. Matsuyama, T. Nakao, S. Fukuyama, H. Inoue, M. Nomura and A. Yoshimura (2013). "Smad2/3 and IRF4 play a cooperative role in IL-9-producing T cell induction." *J Immunol* **191**(5): 2360-2371.

Tanaka, Y. and Z. J. Chen (2012). "STING specifies IRF3 phosphorylation by TBK1 in the cytosolic DNA signaling pathway." *Sci Signal* **5**(214): ra20.

Tang, C. H., J. A. Zundell, S. Ranatunga, C. Lin, Y. Nefedova, J. R. Del Valle and C. C. Hu (2016). "Agonist-Mediated Activation of STING Induces Apoptosis in Malignant B Cells." *Cancer Res* **76**(8): 2137-2152.

Temann, U. A., G. P. Geba, J. A. Rankin and R. A. Flavell (1998). "Expression of interleukin 9 in the lungs of transgenic mice causes airway inflammation, mast cell hyperplasia, and bronchial hyperresponsiveness." *J Exp Med* **188**(7): 1307-1320.

Temann, U. A., P. Ray and R. A. Flavell (2002). "Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology." *J Clin Invest* **109**(1): 29-39.

Tepper, R. I., R. L. Coffman and P. Leder (1992). "An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4." *Science* **257**(5069): 548-551.

Thieu, V. T., Q. Yu, H. C. Chang, N. Yeh, E. T. Nguyen, S. Sehra and M. H. Kaplan (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* **29**(5): 679-690.

Thomas, L. (1982). "On immunosurveillance in human cancer." *Yale J Biol Med* **55**(3-4): 329-333.

Thomas, W. D. and P. Hersey (1998). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells." J Immunol **161**(5): 2195-2200.

Tian, J., A. M. Avalos, S. Y. Mao, B. Chen, K. Senthil, H. Wu, P. Parroche, S. Drabic, D. Golenbock, C. Sirois, J. Hua, L. L. An, L. Audoly, G. La Rosa, A. Bierhaus, P. Naworth, A. Marshak-Rothstein, M. K. Crow, K. A. Fitzgerald, E. Latz, P. A. Kiener and A. J. Coyle (2007). "Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE." Nat Immunol **8**(5): 487-496.

Topalian, S. L. (1994). "MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy." Curr Opin Immunol **6**(5): 741-745.

Topalian, S. L., L. Rivoltini, M. Mancini, N. R. Markus, P. F. Robbins, Y. Kawakami and S. A. Rosenberg (1994). "Human CD4+ T cells specifically recognize a shared melanoma-associated antigen encoded by the tyrosinase gene." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9461-9465.

Tumeh, P. C., C. L. Harview, J. H. Yearley, I. P. Shintaku, E. J. Taylor, L. Robert, B. Chmielowski, M. Spasic, G. Henry, V. Ciobanu, A. N. West, M. Carmona, C. Kivork, E. Seja, G. Cherry, A. J. Gutierrez, T. R. Grogan, C. Mateus, G. Tomasic, J. A. Glaspy, R. O. Emerson, H. Robins, R. H. Pierce, D. A. Elashoff, C. Robert and A. Ribas (2014). "PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance." Nature **515**(7528): 568-571.

Unterholzner, L. (2013). "The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors?" Immunobiology **218**(11): 1312-1321.

Unterholzner, L., S. E. Keating, M. Baran, K. A. Horan, S. B. Jensen, S. Sharma, C. M. Sirois, T. Jin, E. Latz, T. S. Xiao, K. A. Fitzgerald, S. R. Paludan and A. G. Bowie (2010). "IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA." Nat Immunol **11**(11): 997-1004.

Usui, T., R. Nishikomori, A. Kitani and W. Strober (2003). "GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet." Immunity **18**(3): 415-428.

Uyttenhove, C., R. J. Simpson and J. Van Snick (1988). "Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(18): 6934-6938.

Vanpouille-Box, C., A. Alard, M. J. Aryankalayil, Y. Sarfraz, J. M. Diamond, R. J. Schneider, G. Inghirami, C. N. Coleman, S. C. Formenti and S. Demaria (2017). "DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity." Nat Commun **8**: 15618.

Vegran, F., H. Berger, R. Boidot, G. Mignot, M. Bruchard, M. Dosset, F. Chalmin, C. Rebe, V. Derangere, B. Ryffel, M. Kato, A. Prevost-Blondel, F. Ghiringhelli and L. Apetoh (2014). "The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells." Nat Immunol **15**(8): 758-766.

Veldhoen, M., R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley and B. Stockinger (2006). "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells." Immunity **24**(2): 179-189.

Veldhoen, M., C. Uyttenhove, J. van Snick, H. Helmbly, A. Westendorf, J. Buer, B. Martin, C. Wilhelm and B. Stockinger (2008). "Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset." Nat Immunol **9**(12): 1341-1346.

Végran, F., H. Berger, R. Boidot, G. Mignot, M. Bruchard, M. Dosset, F. Chalmin, C. Rébé, V. Déragère, B. Ryffel, M. Kato, A. Prévost-Blondel, F. Ghiringhelli and L. Apetoh (2014). "The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells." Nat Immunol **15**(8): 758-766.

Wang, C., Y. Lu, L. Chen, T. Gao, Q. Yang, C. Zhu and Y. Chen (2020). "Th9 cells are subjected to PD-1/PD-L1-mediated inhibition and are capable of promoting CD8 T cell expansion through IL-9R in colorectal cancer." Int Immunopharmacol **78**: 106019.

Wang, H., S. Hu, X. Chen, H. Shi, C. Chen, L. Sun and Z. J. Chen (2017). "cGAS is essential for the antitumor effect of immune checkpoint blockade." Proc Natl Acad Sci U S A **114**(7): 1637-1642.

Wang, L., T. Yi, M. Kortylewski, D. M. Pardoll, D. Zeng and H. Yu (2009). "IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway." *J Exp Med* **206**(7): 1457-1464.

Wang, Y., Y. Bi, X. Chen, C. Li, Y. Li, Z. Zhang, J. Wang, Y. Lu, Q. Yu, H. Su, H. Yang and G. Liu (2016). "Histone Deacetylase SIRT1 Negatively Regulates the Differentiation of Interleukin-9-Producing CD4(+) T Cells." *Immunity* **44**(6): 1337-1349.

Wang, Z. and E. Celis (2015). "STING activator c-di-GMP enhances the anti-tumor effects of peptide vaccines in melanoma-bearing mice." *Cancer Immunol Immunother* **64**(8): 1057-1066.

Wang, Z., J. Chen, J. Hu, H. Zhang, F. Xu, W. He, X. Wang, M. Li, W. Lu, G. Zeng, P. Zhou, P. Huang, S. Chen, W. Li, L. P. Xia and X. Xia (2019). "cGAS/STING axis mediates a topoisomerase II inhibitor-induced tumor immunogenicity." *J Clin Invest* **129**(11): 4850-4862.

Warner, J. D., R. A. Irizarry-Caro, B. G. Bennion, T. L. Ai, A. M. Smith, C. A. Miner, T. Sakai, V. K. Gonugunta, J. Wu, D. J. Platt, N. Yan and J. J. Miner (2017). "STING-associated vasculopathy develops independently of IRF3 in mice." *J Exp Med* **214**(11): 3279-3292.

Watanabe, T., T. Inoue, H. Ochi, M. Terashima, Y. Asano and T. Nakatani (1999). "Lipid A directly inhibits IL-4 production by murine Th2 cells but does not inhibit IFN-gamma production by Th1 cells." *Eur J Immunol* **29**(2): 413-418.

Weng, J., P. Lai, L. Qin, Y. Lai, Z. Jiang, C. Luo, X. Huang, S. Wu, D. Shao, C. Deng, L. Huang, Z. Lu, M. Zhou, L. Zeng, D. Chen, Y. Wang, X. Chen, S. Geng, W. Robert, Z. Tang, C. He, P. Li and X. Du (2018). "A novel generation 1928zT2 CAR T cells induce remission in extramedullary relapse of acute lymphoblastic leukemia." *J Hematol Oncol* **11**(1): 25.

Wilhelm, C., K. Hirota, B. Stieglitz, J. Van Snick, M. Tolaini, K. Lahl, T. Sparwasser, H. Helmbj and B. Stockinger (2011). "An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation." *Nat Immunol* **12**(11): 1071-1077.

Williams, M. A., A. J. Tyznik and M. J. Bevan (2006). "Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells." *Nature* **441**(7095): 890-893.

Wong, M. T., J. J. Ye, M. N. Alonso, A. Landrigan, R. K. Cheung, E. Engleman and P. J. Utz (2010). "Regulation of human Th9 differentiation by type I interferons and IL-21." *Immunol Cell Biol* **88**(6): 624-631.

Woo, S. R., M. B. Fuertes, L. Corrales, S. Spranger, M. J. Furdyna, M. Y. Leung, R. Duggan, Y. Wang, G. N. Barber, K. A. Fitzgerald, M. L. Alegre and T. F. Gajewski (2014). "STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors." *Immunity* **41**(5): 830-842.

Wu, J. and Z. J. Chen (2014). "Innate immune sensing and signaling of cytosolic nucleic acids." *Annu Rev Immunol* **32**: 461-488.

Wu, J., N. Dobbs, K. Yang and N. Yan (2020). "Interferon-Independent Activities of Mammalian STING Mediate Antiviral Response and Tumor Immune Evasion." *Immunity* **53**(1): 115-126.e115.

Wu, J., L. Sun, X. Chen, F. Du, H. Shi, C. Chen and Z. J. Chen (2013). "Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA." *Science* **339**(6121): 826-830.

Xia, T., H. Konno, J. Ahn and G. N. Barber (2016). "Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis." *Cell Rep* **14**(2): 282-297.

Xia, T., H. Konno and G. N. Barber (2016). "Recurrent Loss of STING Signaling in Melanoma Correlates with Susceptibility to Viral Oncolysis." *Cancer Res* **76**(22): 6747-6759.

Xiao, X., S. Balasubramanian, W. Liu, X. Chu, H. Wang, E. J. Taparowsky, Y. X. Fu, Y. Choi, M. C. Walsh and X. C. Li (2012). "OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation." *Nat Immunol* **13**(10): 981-990.

Xiao, X., X. Shi, Y. Fan, X. Zhang, M. Wu, P. Lan, L. Minze, Y. X. Fu, R. M. Ghobrial, W. Liu and X. C. Li (2015). "GITR subverts Foxp3(+) Tregs to boost Th9 immunity through regulation of histone acetylation." *Nat Commun* **6**: 8266.

Xie, Y., A. Akpınarlı, C. Maris, E. L. Hipkiss, M. Lane, E. K. Kwon, P. Muranski, N. P. Restifo and P. A. Antony (2010). "Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma." *J Exp Med* **207**(3): 651-667.



Xue, G., G. Jin, J. Fang and Y. Lu (2019). "IL-4 together with IL-1 $\beta$  induces antitumor Th9 cell differentiation in the absence of TGF- $\beta$  signaling." Nat Commun **10**(1): 1376.

Yanai, H., T. Ban, Z. Wang, M. K. Choi, T. Kawamura, H. Negishi, M. Nakasato, Y. Lu, S. Hangai, R. Koshiba, D. Savitsky, L. Ronfani, S. Akira, M. E. Bianchi, K. Honda, T. Tamura, T. Kodama and T. Taniguchi (2009). "HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses." Nature **462**(7269): 99-103.

Yang, Y. G., T. Lindahl and D. E. Barnes (2007). "Trex1 exonuclease degrades ssDNA to prevent chronic checkpoint activation and autoimmune disease." Cell **131**(5): 873-886.

Ye, Z. J., Q. Zhou, W. Yin, M. L. Yuan, W. B. Yang, X. Z. Xiong, J. C. Zhang and H. Z. Shi (2012). "Differentiation and immune regulation of IL-9-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion." Am J Respir Crit Care Med **186**(11): 1168-1179.

Yi, G., V. P. Brendel, C. Shu, P. Li, S. Palanathan and C. Cheng Kao (2013). "Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides." PLoS One **8**(10): e77846.

Yoneyama, M., M. Kikuchi, K. Matsumoto, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, E. Foy, Y. M. Loo, M. Gale, S. Akira, S. Yonehara, A. Kato and T. Fujita (2005). "Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity." J Immunol **175**(5): 2851-2858.

Yoneyama, M., M. Kikuchi, T. Natsukawa, N. Shinobu, T. Imaizumi, M. Miyagishi, K. Taira, S. Akira and T. Fujita (2004). "The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses." Nat Immunol **5**(7): 730-737.

You, F. P., J. Zhang, T. Cui, R. Zhu, C. Q. Lv, H. T. Tang and D. W. Sun (2017). "Th9 cells promote antitumor immunity via IL-9 and IL-21 and demonstrate atypical cytokine expression in breast cancer." Int Immunopharmacol **52**: 163-167.

Zander, R., D. Schauder, G. Xin, C. Nguyen, X. Wu, A. Zajac and W. Cui (2019). "CD4 + T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8 + T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer." Immunity **51**(6): 1028-1042.e1024.

Zhang, C., G. Shang, X. Gui, X. Zhang, X. C. Bai and Z. J. Chen (2019). "Structural basis of STING binding with and phosphorylation by TBK1." Nature **567**(7748): 394-398.

Zhang, Q., M. Raouf, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki and C. J. Hauser (2010). "Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury." Nature **464**(7285): 104-107.

Zhang, X., H. Shi, J. Wu, L. Sun, C. Chen and Z. J. Chen (2013). "Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING." Mol Cell **51**(2): 226-235.

Zhang, Z., B. Yuan, M. Bao, N. Lu, T. Kim and Y. J. Liu (2011). "The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor STING in dendritic cells." Nat Immunol **12**(10): 959-965.

Zhao, Y., X. Chu, J. Chen, Y. Wang, S. Gao, Y. Jiang, X. Zhu, G. Tan, W. Zhao, H. Yi, H. Xu, X. Ma, Y. Lu, Q. Yi and S. Wang (2016). "Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumour immunity through the induction of Th9 cells." Nat Commun **7**: 12368.

Zheng, H., B. Yang, D. Xu, W. Wang, J. Tan, L. Sun, Q. Li and X. Xia (2017). "Induction of specific T helper-9 cells to inhibit glioma cell growth." Oncotarget **8**(3): 4864-4874.

Zheng, W. and R. A. Flavell (1997). "The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells." Cell **89**(4): 587-596.

Zhong, B., Y. Yang, S. Li, Y. Y. Wang, Y. Li, F. Diao, C. Lei, X. He, L. Zhang, P. Tien and H. B. Shu (2008). "The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation." Immunity **29**(4): 538-550.

Zhou, L., J. E. Lopes, M. M. Chong, I. I. Ivanov, R. Min, G. D. Victora, Y. Shen, J. Du, Y. P. Rubtsov, A. Y. Rudensky, S. F. Ziegler and D. R. Littman (2008). "TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR $\gamma$  function." Nature **453**(7192): 236-240.

Zhu, J., J. Cote-Sierra, L. Guo and W. E. Paul (2003). "Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation." Immunity **19**(5): 739-748.

Zhu, J., B. Min, J. Hu-Li, C. J. Watson, A. Grinberg, Q. Wang, N. Killeen, J. F. Urban, L. Guo and W. E. Paul (2004). "Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses." Nat Immunol **5**(11): 1157-1165.

Zhu, Y., X. An, X. Zhang, Y. Qiao, T. Zheng and X. Li (2019). "STING: a master regulator in the cancer-immunity cycle." Mol Cancer **18**(1): 152.

Zitvogel, L., A. Tesniere and G. Kroemer (2006). "Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion." Nat Rev Immunol **6**(10): 715-727.

Zuazo, M., H. Arasanz, G. Fernández-Hinojal, M. J. García-Granda, M. Gato, A. Bocanegra, M. Martínez, B. Hernández, L. Teijeira, I. Morilla, M. J. Lecumberri, A. Fernández de Lascoiti, R. Vera, G. Kochan and D. Escors (2019). "Functional systemic CD4 immunity is required for clinical responses to PD-L1/PD-1 blockade therapy." EMBO Mol Med **11**(7): e10293.

Škrnjug, I., C. A. Guzmán, C. Rueckert and C. Ruecker (2014). "Cyclic GMP-AMP displays mucosal adjuvant activity in mice." PLoS One **9**(10): e110150.

# ANNEXES

**Annexe 1 : Stratégies de « gating »**

**Annexe 2 : Analyse RNAseq – Suite de la Figure 22**

**Annexe 3 : “Rationale for STING-targeted cancer immunotherapy”**

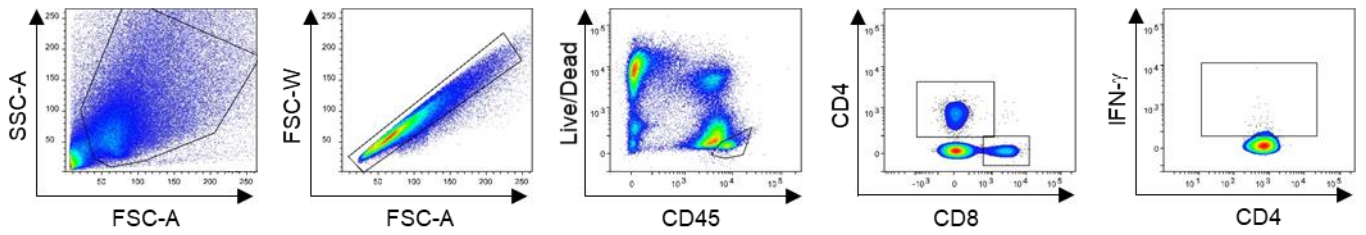
**Annexe 4 : “Harnessing Th9 cells in cancer immunotherapy”**

**Annexe 5 : “Selective autophagy restricts IL-9 secretion from TH9 cells: relevance in cancer growth”**

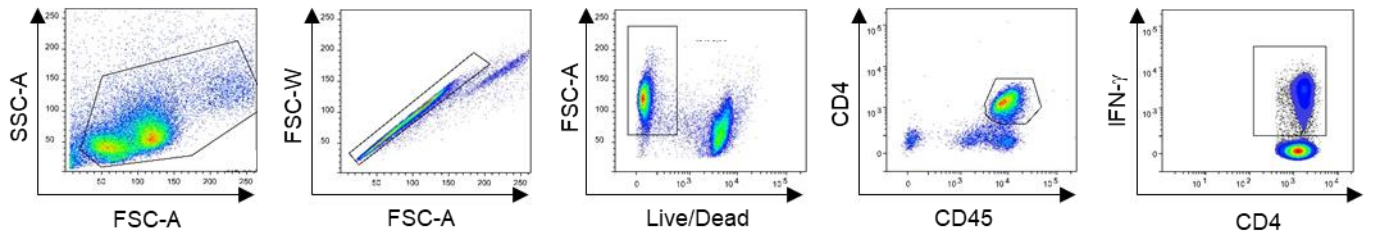
**Annexe 6 : Liste des communications orales et posters**

## Annexe 1 : Stratégies d'acquisition

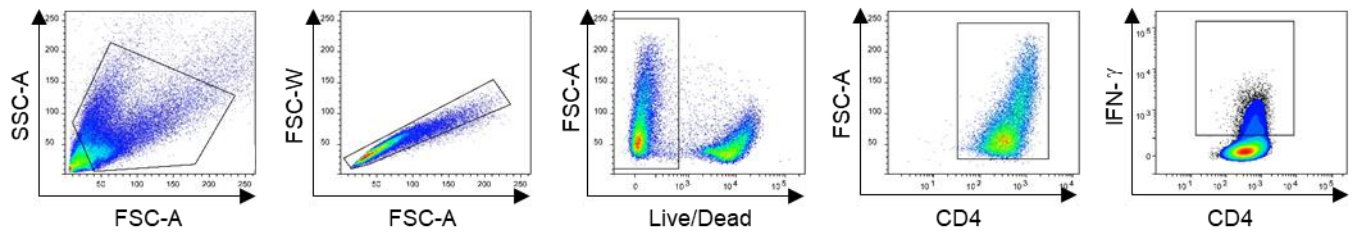
A



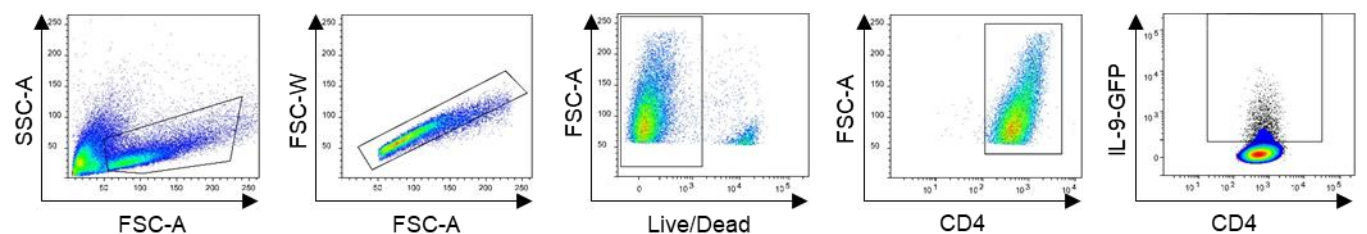
B



C



D



### Annexe 1 : Stratégies de « gating »

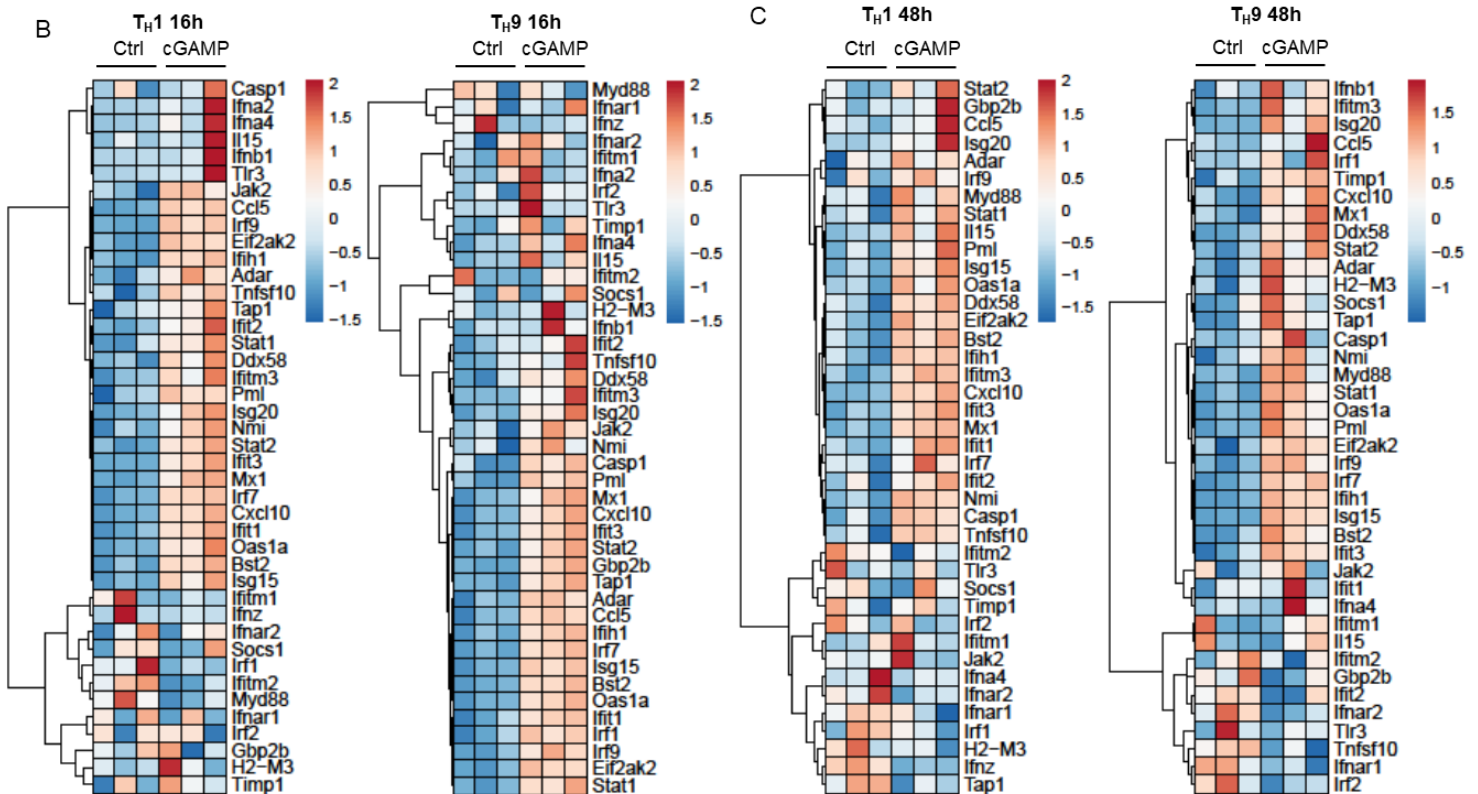
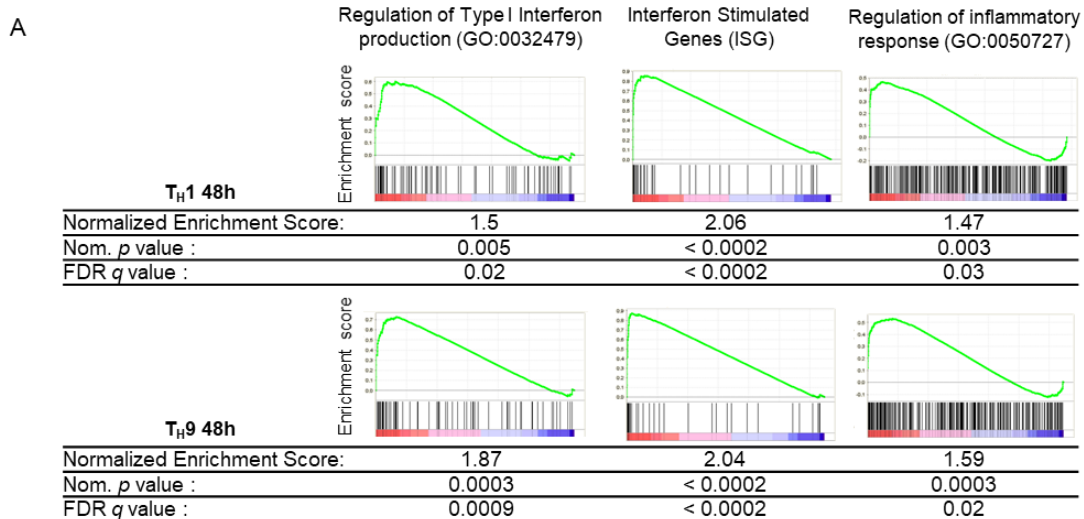
A. Stratégie utilisée pour l'analyse de l'IFN- $\gamma$  dans les TILs – Figure 14

B. Stratégie utilisée pour l'analyse de l'IFN- $\gamma$  dans les CD4 issus de souris STINGV154M/WT et leurs contrôles – Figure 15

C. Stratégie utilisée pour l'analyse de l'IFN- $\gamma$  dans les Th1 – Figures 18-19-23-24

D. Stratégie utilisée pour l'analyse de l'IL-9 dans les Th9 – Figures 18-19-23-24-25

## Annexe 2 : Analyse RNAseq – Suite de la figure 22



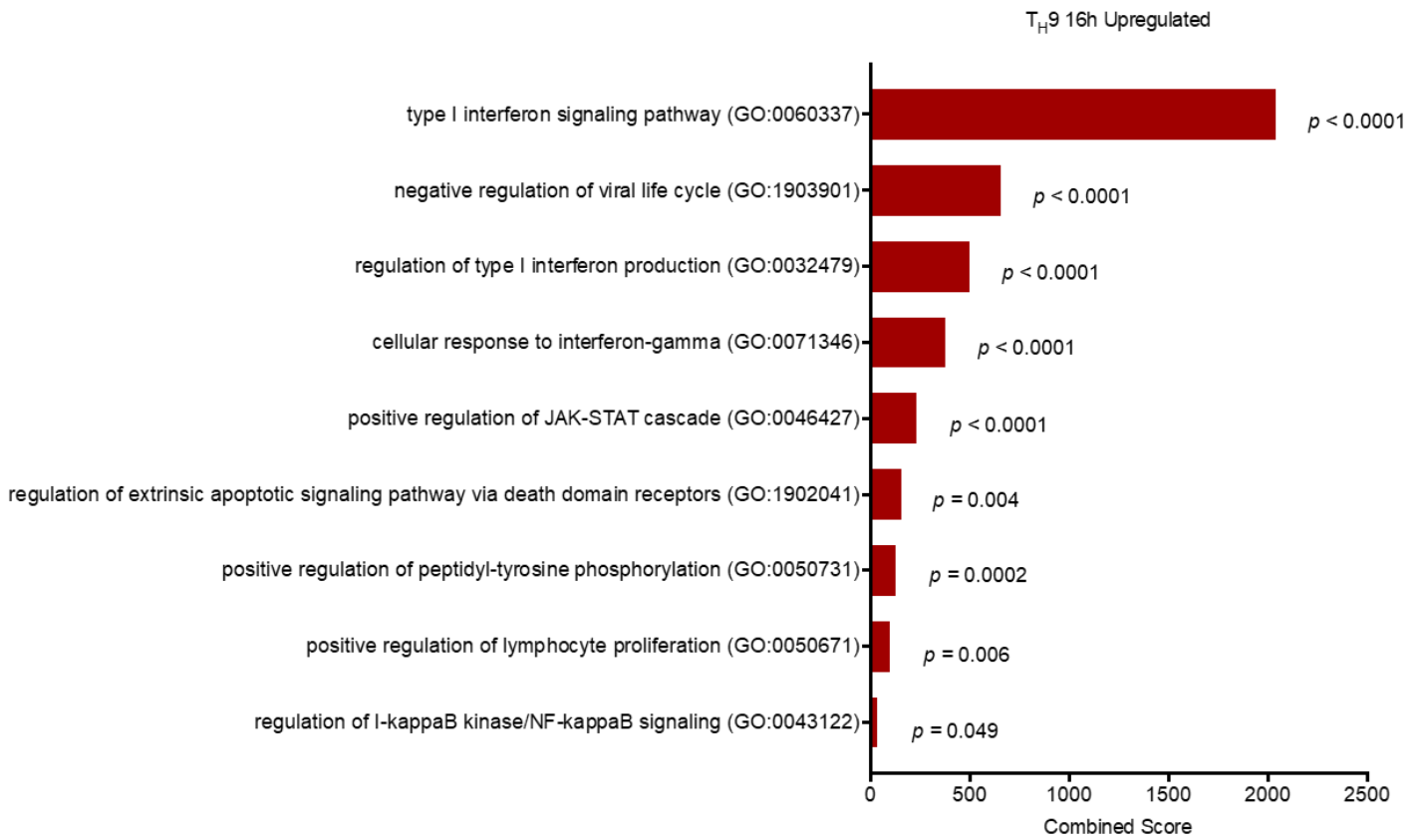
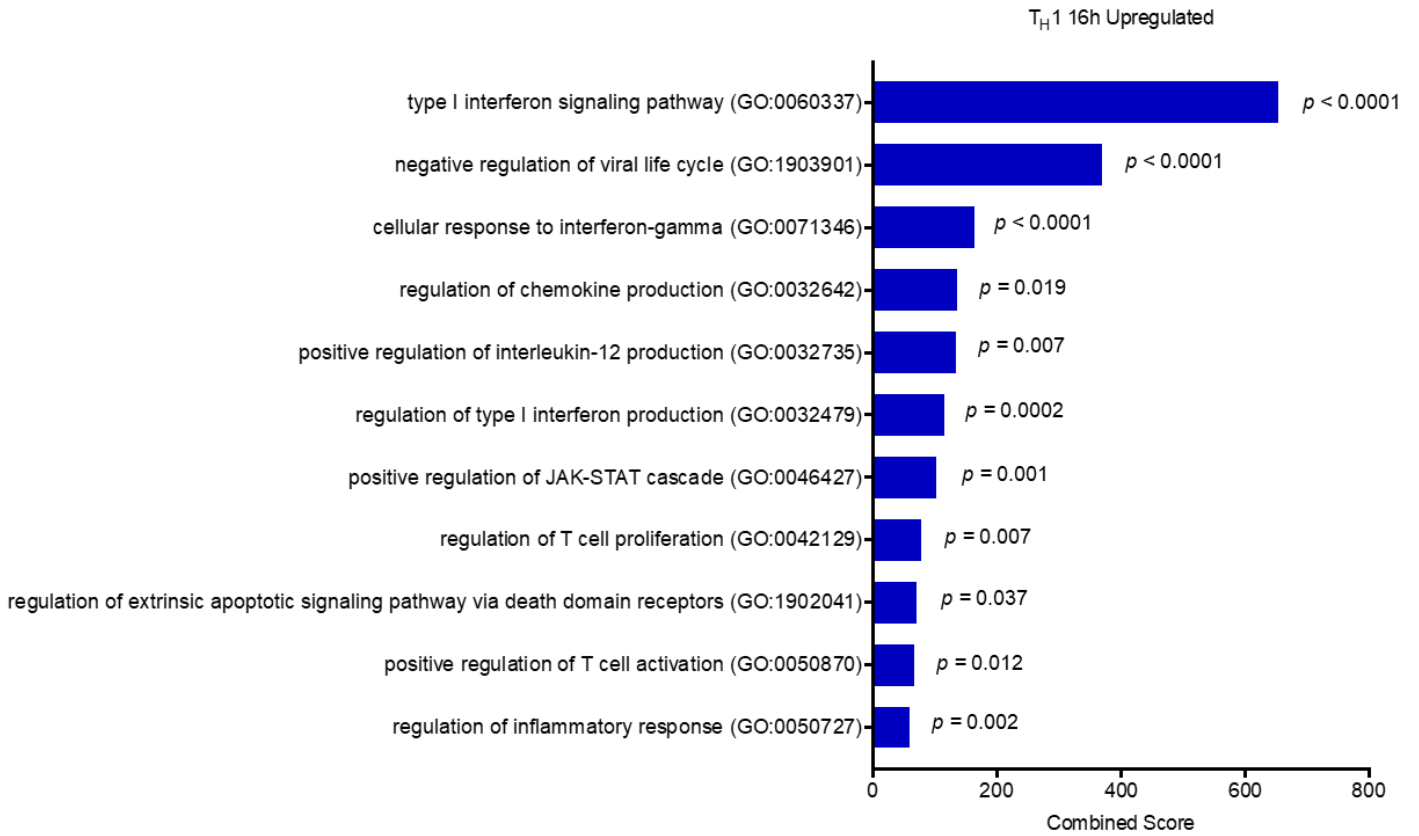
### Annexe 2 : Analyse RNAseq – Suite de la Figure 22

**A.** Analyse GSEA à 48h. Régulation de la production des Interférons de type I (GO:0032479), Gènes Stimulés par les Interférons (ISG), et Régulation de la réponse inflammatoire (GO:0050727).

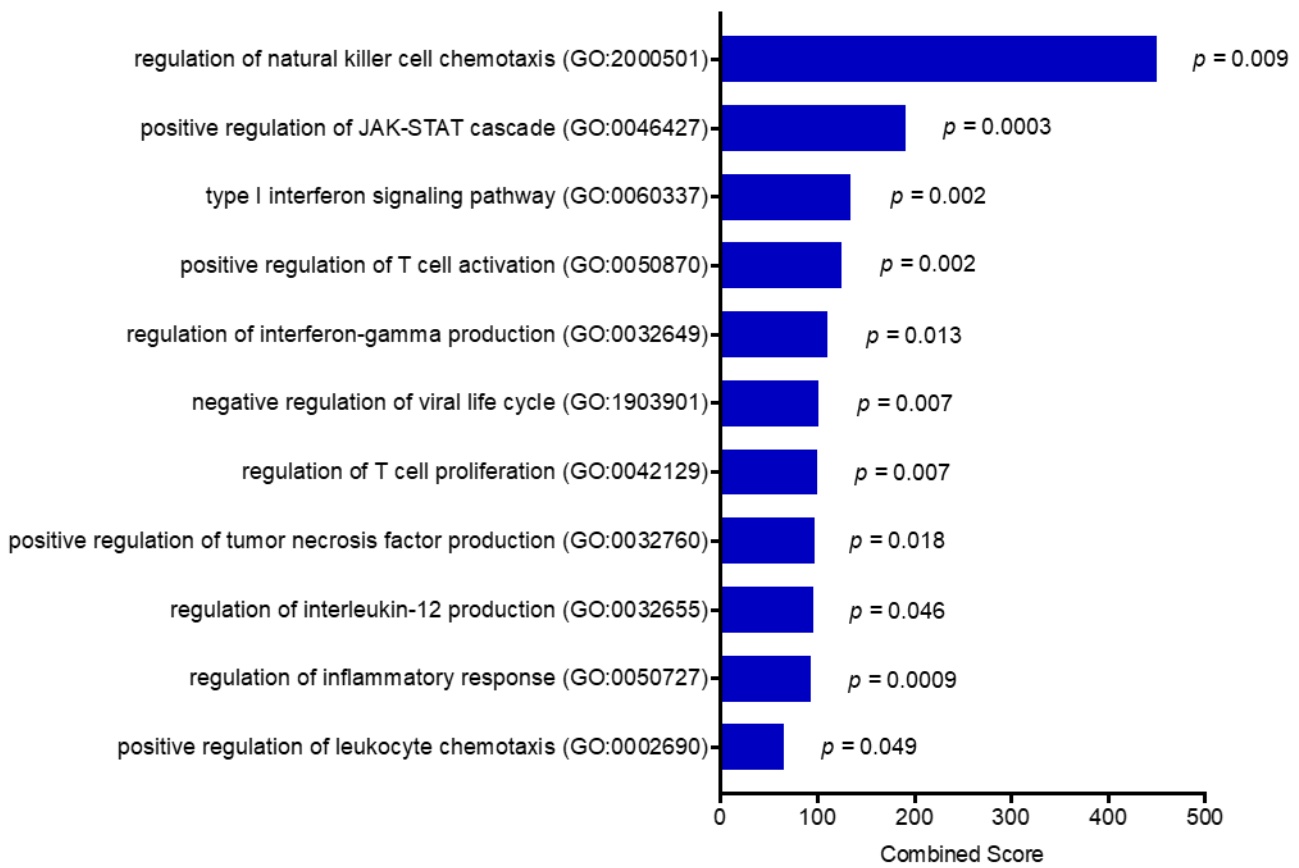
**B.** Heatmap illustrant le regroupement hiérarchique du niveau d'expression (rld values) des ISG.

**C.** Sélection des voies biologiques significativement augmentées dans les cellules Th1 ou Th9 stimulées avec le cGAMP. Réalisé avec l'outil web Enrichr et la base de données GO Biological Process 2018.

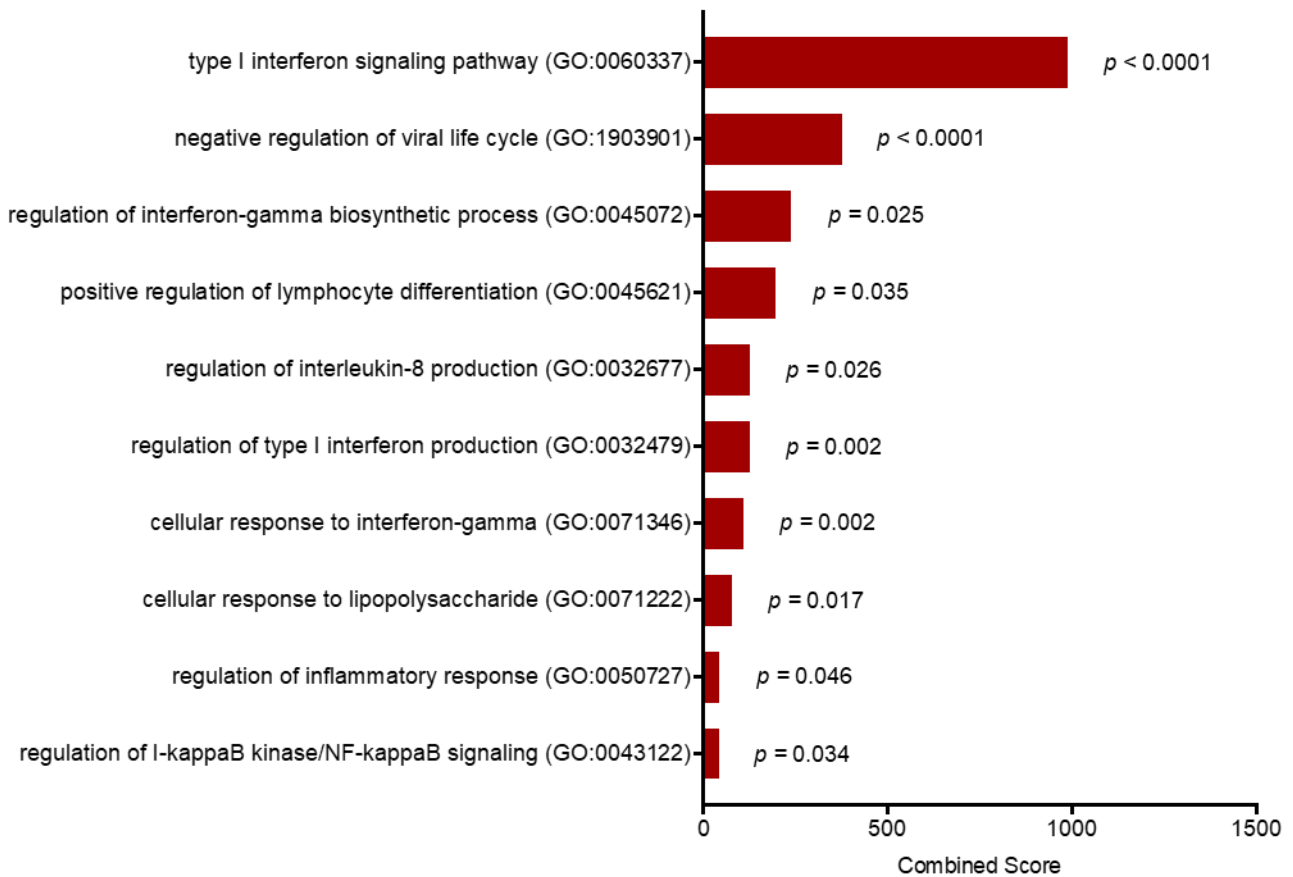
C



T<sub>H</sub>1 48h Upregulated



T<sub>H</sub>9 48h Upregulated





Published in final edited form as:

*Eur J Cancer*. 2017 April ; 75: 86–97. doi:10.1016/j.ejca.2016.12.028.

## Rationale for STING-targeted cancer immunotherapy

Thaiz Rivera Vargas<sup>#1,2</sup>, Isis Benoit-Lizon<sup>#1,2</sup>, and Lionel Apetoh<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup>Université de Bourgogne Franche Comté, Dijon, France

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

# These authors contributed equally to this work.

### Abstract

The efficacy of checkpoint inhibitor therapy illustrates that cancer immunotherapy, which aims to foster the host immune response against cancer to achieve durable anticancer responses, can be successfully implemented in a routine clinical practice. However, a substantial proportion of patients does not benefit from this treatment, underscoring the need to identify alternative strategies to defeat cancer. Despite the demonstration in the 1990's that the detection of danger signals, including the nucleic acids DNA and RNA, by dendritic cells (DCs) in a cancer setting is essential for eliciting host defense, the molecular sensors responsible for recognizing these danger signals and eliciting anticancer immune responses remain incompletely characterized, possibly explaining the disappointing results obtained so far upon the clinical implementation of DC-based cancer vaccines. In 2008, STING (Stimulator of Interferon Genes), was identified as a protein that is indispensable for the recognition of cytosolic DNA. The central role of STING in controlling anticancer immune responses was exemplified by observations that spontaneous and radiation-induced adaptive anticancer immunity was reduced in the absence of STING, illustrating the potential of STING-targeting for cancer immunotherapy. Here, we will discuss the relevance of manipulating the STING signaling pathway for cancer treatment and integrating STING-targeting based strategies into combinatorial therapies to obtain long-lasting anticancer immune responses.

### Keywords

Cancer immunotherapy; danger signal; DNA; anticancer therapies; adaptive immunity; innate immunity; STING

## 1 Introduction

Immunologists have long considered that the primary function of the immune system is to distinguish between self and non-self. However, the idea that the immune system only reacts to foreign organisms and is tolerant to self was difficult to reconcile with observations that individuals could feature antibodies to self-antigens, including DNA. In 1994, Polly

---

Corresponding author, Requests for reprints: Dr. Lionel Apetoh: Centre de Recherche, INSERM U1231, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France. Phone: (33) 3-80-39-33-71; Fax: 33-3-80-39-34-34. lionel.apetoh@inserm.fr.

Conflict of interest: Lionel Apetoh is a consultant for Roche and Merck.

Matzinger challenged the so-called Self-Nonself theory and proposed instead that the driving force that makes the immune system effective lies on its ability to recognize danger(1). Among the immune cell types able to detect danger, dendritic cells (DCs) are of central importance because of their ability to capture, process, and present antigens to T cells(2). The detection of danger by DCs relies on their expression of pattern recognition receptors (PRRs), which permit sensing, integration and transmission of danger signals to induce adaptive immunity. PRRs include membrane C-type lectins, Toll-like receptors (TLRs), cytoplasmic NOD-like receptors (NLRs) and DNA/RNA sensors(3, 4). These receptors allow DCs to sense pathogens as well as endogenous danger signals released from dying cells such as DNA(5, 6). These recognition mechanisms in DCs can be harnessed to generate more efficient cancer vaccines. For instance, immunogenicity of peptide-protein vaccines can be enhanced by the addition of adjuvants. These include agonists of various TLRs such as TLR3 (poly I:C), TLR4 (monophosphoryl lipid A; MPL), and TLR9 (CpG) (7–12).

The functional properties of DCs prompted their use as a tool in cancer immunotherapy with the aim of inducing anticancer immune responses. Initially, the use of non-targeted short peptides captured by DCs *in vivo* demonstrated that MHC class I-restricted antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell immunity could be mounted in patients with metastatic disease(13–15). The clinical successes were yet limited, possibly because of the lack of CD4<sup>+</sup> T cell help necessary for the generation of potent cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and long-lived memory CD8<sup>+</sup> T cells (16–18). While the clinical ineffectiveness of dendritic cell-based vaccines is attributable to the immunosuppressive cancer microenvironment that curtails the induction of anticancer immune responses(19, 20), the impressive successes of checkpoint inhibitor therapies, which result in 20-40% complete responses in some metastatic cancers, illustrate that cancer-induced immunosuppression can be pharmacologically overcome and anticancer immunity restored(21, 22). This altogether suggests that a better knowledge of DC biology is required to design DC vaccines able to reverse tumor-induced immunosuppression and elicit long-term anticancer responses.

DNA is a potent immune stimulatory molecule widely used as vaccine adjuvant to drive immunity(4, 23). Initially, TLR9 was identified as the sensor for DNA. TLR9 recognizes pathogen derived CpG DNA to trigger innate immune signaling predominantly in plasmacytoid dendritic cells (pDCs)(24). TLR9 was also shown to be responsible for the detection of self-DNA, leading to autoimmunity(25, 26). While TLR9 was promoting immune signaling following its interaction with DNA in endosomes, the mechanisms responsible for the detection of cytosolic DNA were unclear until the characterization of STING (Stimulator of Interferon Genes).

In 2008, STING was described as a transmembrane component of the endoplasmic reticulum (ER) essential for the production of type I IFN in fibroblasts, macrophages and dendritic cells (DCs) in response to cytoplasmic double-stranded DNA (dsDNA) as well as select DNA viruses and intracellular bacteria(27, 28). Interestingly, STING does not share homology with any known immunosensor and seems to represent a novel category of proteins involved in immune signaling in the context of cytosolic DNA presence, with an ability to link the majority of DNA sensors to immune signaling(29, 30). The detection of

DNA indeed relies on a variety of cytoplasmic DNA sensors, including the cyclic GMP-AMP synthase (cGAS)(31). The discovery of cGAS in 2013 actually represented a significant advance in our understanding of the signaling mechanisms underpinning innate DNA sensing. After binding to cytosolic DNA species from viruses, bacteria, or self-DNA from the nucleus or mitochondria, cGAS catalyzes the production of a type of cyclic dinucleotide (CDN) named cGAMP (cyclic GMP-AMP)(32, 33). Following binding to CDNs, STING activation leads to the phosphorylation of interferon regulatory factor 3 (IRF3) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) and the subsequent induction of cytokines and proteins, such as the type I interferons (IFN) that exert anti-pathogen activities(28, 34). STING was proposed to be activated by other cytoplasmic DNA sensors, including DAI, DHX9, DHX36, IFI204 (IFI16), DDX41, DDX60, Pol III, LRRFIP1, DNA-PK, cGAS and the DNA repair protein Mre11(35), that bind DNA directly and act upstream of STING to induce type I IFNs(30). This together defines STING as an adaptor protein that is essential for immune signaling following pathogen DNA detection by cytoplasmic DNA sensors (reviewed in (36)). Recent reports have also indicated that potent activators of the STING pathway may also include self-DNA that has leaked from the nucleus of the host cell, perhaps following cell division or as a consequence of DNA damage(37). STING is thus central to the induction of immune responses following DNA detection.

In this review, we discuss recent findings illustrating the links between STING signaling in immune and cancer cells and cancer progression. We also describe emerging strategies that exploit the STING signaling pathway to enhance anticancer immune responses. We eventually highlight the relevance of modulating the STING pathway for cancer immunotherapy.

## 2 STING signaling in tumor promotion

Studies have shown that STING activation could lead to inflammatory responses that promote tumorigenesis. Lemos and colleagues reported that DNA, apoptotic cells and STING agonists could induce STING-dependent tolerogenic responses. Mechanistically, they found that DNA sensing via the STING/IFN- $\beta$  pathway induces indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO), which catabolizes tryptophan to suppress effector and helper T-cell responses and activate regulatory T cells(38, 39) (Figure 1A). Moreover, IDO activity induced by STING in the tumor microenvironment promoted the growth of Lewis lung adenocarcinoma (LLC). In the LLC model, STING deficiency enhanced CD8<sup>+</sup> T-cell infiltration and tumor cell killing while decreasing myeloid-derived suppressor cell infiltration and IL-10 production in the tumor microenvironment(40). In a model of cutaneous skin tumors induced by 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene (DMBA), a potent carcinogen causing DNA damage, STING-driven inflammation also promoted tumor growth. In this context, DNA damage resulted in the leakage of DNA into the cytosol and the intrinsic chronic activation of the STING pathway was associated to the recruitment of phagocytes, inflammation and tumor development (41) (Figure 1B). Accordingly, STING deficiency protected against DMBA-induced tumorigenesis(41).

### 3 STING in spontaneous anti-cancer immunity

While the findings discussed above suggest that STING-driven chronic inflammation leads to cancer, STING-dependent DNA detection was also found to trigger anticancer immunity(29, 31). Importantly, activation of the STING pathway was correlated to the induction of a spontaneous antitumor T cell response involving the expression of Type I interferon (IFN) genes(29, 31). These observations are in line with several studies identifying type I IFN as critical mediator in the spontaneous priming of antitumor CD8<sup>+</sup> T cell responses(42, 43). Accordingly, Woo and colleagues reported that the spontaneous CD8<sup>+</sup> T cell priming against tumors was defective in mice lacking STING. Moreover, STING-deficient mice are unable to generate efficient antitumor T cell responses and prevent melanoma tumor growth(44) (Figure 2A). STING protein is predominantly expressed in macrophages, T cells, DCs endothelial cells and select fibroblasts and epithelial cells(27, 28, 45–47). However, in the tumor microenvironment, the main sources of IFN- $\beta$  are DCs and endothelial cells(48, 49). One hypothesis to account for these observations is that CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs engulf necrotic tumor cells, and the tumor cell-derived DNA triggers STING signaling in DCs(44, 50–52). The resultant type I IFNs, functioning in a paracrine or autocrine manner, enhance DCs cross-presentation activity and T cell activation. Similarly, in a mouse model of *de novo* gliomas, CD11b<sup>+</sup> brain-infiltrating leukocytes (BIL) are the main source of type I IFNs. Consequently, glioma-bearing mice with a single nucleotide variant (T596A) of STING that functions as a null allele and fails to produce detectable protein, showed shorter survival and lower expression levels of IFNs compared with wild-type mice. Furthermore, BILs of those mice showed increased CD11b<sup>+</sup> Gr-1<sup>+</sup> immature myeloid suppressor and CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells (Treg) and decreased IFN $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells(53). Accordingly, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells that received direct type I IFN signals showed lesser degrees of regulatory activity and increased levels of antitumor activity, respectively(53, 54).

### 4 STING in intestinal wound repair and therapy-induced anti-cancer immunity

The anticancer effects of STING activation were also demonstrated in a model of colitis-associated carcinogenesis (CAC). CAC can be experimentally induced by carcinogens and inflammatory agents such as azoxymethane (AOM) and dextran sulfate sodium (DSS)(52, 55). DNA damage induced by these agents resulted in the leakage of DNA into the cytosol and activation of the intrinsic STING pathway in intestinal cells. This event triggered wound repair cytokine expression such as IL-1 $\beta$ , IL-18 as well as IL-22 binding protein(56–59). This series of events contributed to tissue protection and prevented cancer development. Thus, STING signaling activation has important protective effects against colon cancer (Figure 2B).

Recent studies have shown that the STING pathway is also implicated in radiation-induced antitumor T cell responses(50). Antitumor effects of radiation were previously shown to be dependent on type I IFN signaling(60). Moreover, radiation induces cell stress and causes excess DNA breaks, indicating that nucleic acid sensing could account for the induction of

type I IFNs upon radiation. Accordingly, the induction of IFN- $\beta$  in tumors was reduced in the absence of STING in the host after radiation. In line with the immunogenicity of IFNs, the anticancer efficacy of radiation therapy was impaired in STING-deficient mice compared to controls, suggesting that STING-dependent cytosolic DNA sensing is critical for the therapeutic effect of radiation *in vivo*(50). STING was further shown to be essential for tumor-infiltrating DCs type I IFN production after radiation. The functional ability of DCs to cross-present antigen was augmented by the stimulation of irradiated-tumor cells compared to nonirradiated-tumor cells, whereas the deficiency of STING in DCs resulted in their inability to cross-prime CD8<sup>+</sup> T cells(50). Thus a component provided by irradiated-tumor cells, presumably DNA, somehow gains access to the cytosolic DNA sensing pathway to trigger STING-dependent type I IFN induction and anticancer immunity(50).

STING is a DNA sensor located in the cytosol of the cell. This observation raises a major question concerning the DNA immunogenicity and suggests that the presence of DNA outside of the nucleus is the key danger signal for STING-dependent immune activation. As discussed above, the host immune system is able to initiate innate immune sensing of tumor DNA leading to the induction of a STING-dependent adaptive immune response against tumors. Mechanistically, it is unknown how DNA is transferred to APCs cytosol from tumor cells in order to activate the STING pathway. It was suggested that CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> DCs engulf necrotic tumor cells, and the tumor cell-derived DNA triggers STING signaling in the DC(44, 50, 51). In line with this hypothesis, *in vitro* incubation of DCs with tumor-cell-derived DNA led to IFN- $\beta$  production and DC activation via the cGAS-STING-IRF3 axis(44). To determine whether tumor-derived DNA can be transferred to host APCs within the tumor microenvironment and lead to STING activation, B16 tumor cells stained *in vitro* with DNA-intercalating dye DRAQ5 were implanted *in vivo*. The analysis of tumor infiltrating DCs revealed the presence of CD45<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells positive for staining with tumor-cell-derived DRAQ5. In addition, multiple tumor cell lines were also labeled with the nucleotide analog EdU prior to injection into mice. Similar to DRAQ5, EdU staining was observed on a large population of tumor-infiltrating CD45<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> cells, arguing that this is a general phenomenon. Moreover, by a co-staining approach, using the nuclear and lysosomal markers Lamin A and LAMP-1, the authors showed that the majority of the signal did not colocalize with either marker suggesting that the DNA label detected in host APCs appears to be localized in the cytosol, which would provide access to the STING pathway for engagement. Subsequently, the ectopic presence of tumor-derived DNA in the cytosol of DCs correlated with STING pathway activation illustrated by IRF-3 translocation to the nucleus and expression of IFN- $\beta$  (Figure 2A)(44). Another study has shown that cGAS responds to irradiated-murine and -human tumor cells and initiates type I IFN to enhance DC cross-priming activity. Thus, DNA from irradiated-tumor cells somehow gains access to the cytosolic DNA sensing pathway to trigger STING-dependent type I IFN induction. The priming ability of DCs in response to irradiated-tumor cells was not impaired by the presence of DNase I, suggesting that DCs do not engulf free DNA fragments. By contrast, the addition of latrunculin B, an actin polymerization inhibitor, in the coculture of DCs and tumor irradiated cells led to a dramatic reduction in the ability of DCs to induce cross-priming suggesting that DNA delivery might be mediated by direct cell-cell contact. Production of IFN- $\beta$  by DCs in response to irradiated-tumor cells was also greatly decreased

by application of a physical barrier or an actin polymerization inhibitor. These results suggest that DNA from irradiated-tumor cells is sensed by host cGAS during a cell-cell contact-mediated process(50). Altogether, these results show that STING activation can trigger DNA-dependent anticancer immune responses.

## 5 STING expression shapes cancer cell immunogenicity

While the STING pathway has been mostly characterized in antigen presenting cells (APCs) in the tumor microenvironment, tumor cells, T cells, endothelial cells and fibroblasts all have been observed to produce type I IFN production upon stimulation with STING agonists *ex vivo*(61). The relevance of STING signaling in tumor cells was recently underscored. The oncogenes E7 and E1A expressed by DNA tumor viruses inhibit the cGAS-STING pathway and prevent innate immune signaling(62) (Figure 3A). Barber and colleagues also showed that STING signaling is inhibited in a wide variety of cancers. STING and/or cGAS expression is silenced through epigenetic hypermethylation processes. As a consequence of STING signaling loss, cancer cells featured impaired type I IFN secretion in response to DNA(63) (Figure 3B). Another study in lymphoma cells showed that cytosolic DNA contributes to the expression of retinoic acid early transcript 1 (RAE1) in response to DNA damage(64). The induction of RAE1 relies on a STING-dependent DNA sensor pathway involving the effector molecules TBK1 and IRF3. RAE1 is a ligand for the immunoreceptor NKG2D originally identified in natural killer cells that recognizes ligands that are upregulated on tumor cells. Expression of NKG2D ligands is activated by the DNA damage response, which is often activated constitutively in cancer cells, enabling their detection and killing by natural killer cells as a mechanism of immunosurveillance(65) (Figure 3C). The relevance of STING-driven enhancement of cancer immunogenicity was further shown in prostate cancer cells. In an elegant study, Ho et al. showed that the cleavage of genomic DNA by the endonuclease MUS81 was responsible for cytosolic DNA accumulation in prostate cancer cells, leading to their type I IFN-dependent rejection(66). These studies altogether demonstrate that STING expression by tumor cells can shape their immunogenicity and make a decisive contribution to cancer cell immunosurveillance (Figure 3D).

## 6 STING in cancer immunotherapy

### 6.1 Pioneering studies for pharmacological use of STING agonists in immunotherapy

The first pharmacological STING agonist was initially used as an anticancer drug long before the discovery of STING. Flavone acetic acid (FAA) has potent antitumor activity against murine colon tumors (Table 1)(67). The further characterization of FAA as vascular disrupting agent led to testing its clinical potential. However, FAA failed in a phase I clinical trial and showed no activity in rat tumor models implying possible species specificity issues(68). To obtain compounds able to induce tumor hemorrhagic necrosis, the molecular structure of FAA was modified giving rise to 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA), which not only showed activity against a rat mammary carcinoma but also featured IFNs and TNF-dependent anticancer functions in different mouse models(69, 70). Unfortunately Phase III trials in non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients failed to



confirm the anti-tumor effect of DMXAA in humans(71). Further molecular characterization revealed that the mechanism underlying DMXAA-induced type I IFNs and TNF- $\alpha$  secretion and anticancer activity was STING dependent(72). Importantly, structural studies of mouse and human STING showed that only mouse STING binds and signals in response to DMXAA. This species-specific DMXAA recognition by STING likely explains the negative results observed in phase III clinical trial in humans (Table 1)(73–75).

## 6.2 Cyclic dinucleotides (CDNs) STING agonists as potent anti-cancer agents in mice

As previously discussed, CDNs are second messengers able to activate the STING pathway, leading to type I IFNs and pro-inflammatory cytokine expression(76). In mice, cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP) showed anti-tumor effects in the 4T1 metastatic breast cancer model when daily injected at low doses after immunization with an attenuated *Listeria monocytogenes* (LM)-based vaccine (Table 1 and Figure 4A)(77). These observations were confirmed in the GL261 glioma murine model and in the B16 melanoma bearing mice treated with c-di-GMP associated with the TRIVAX vaccine, a mix of synthetic CD8 T cell epitopes (Table 1 and Figure 4B)(77, 78). A recent study using the 1000 Human Genome Project database allowed the identification of five human STING (hSTING) alleles named WT, REF, HAQ, AQ and Q. This variability on hSTING gene does not exist in mice, explaining the divergence concerning STING activation upon different CDNs treatments. Indeed, some of these natural variants of hSTING are poorly responsive to canonical CDNs(79). Thus, bacterial-derived canonical CDNs molecules may not be suitable for clinical development(80, 81).

Cyclic GMP-AMP (cGAMP) is also a natural STING ligand(31). Importantly, there are hSTING variants poorly responsive to cGAMP but normally responsive to DNA and cGAS signaling. In an effort to explain this paradox, Diner and colleagues found that the cGAS product is actually a noncanonical CDN [G(2'-5')pA(3'-5')p], which contains a single 2'-5' phosphodiester bond. These results indicate that hSTING variants are able to distinguish conventional (3'-5') CDNs, mainly produced by bacteria, from the noncanonical CDNs produced by mammalian cGAS(80). Like c-di-GMP and DMXAA, studies demonstrated CD8<sup>+</sup> T and type I IFNs dependent antitumor effect of cGAMP, in melanoma and colon cancer models in mice(48). It was also demonstrated that STING was required for type I IFN-dependent antitumor effects of ionizing-radiation with an enhanced antitumor immunity with cGAMP co-treatment(50). Intratumorally administered cGAMP after radiation effectively reduced tumor burden compared to radiation alone in mice, showing that cGAMP treatment potentiates the effect of radiation(50) (Figure 4C). In 2016, Li et al. confirmed the potent antitumor effect of cGAMP in CT26 colon adenocarcinoma bearing mice. The antitumor activity of cGAMP relied on DC activation and CD8<sup>+</sup> T cell cross-priming. The improved antitumor activity and the reduced toxicity of 5-FU in combination with cGAMP injection strengthened the therapeutic potential of cGAMP for applications in cancer immunotherapy(82) (Table 1 and Figure 4D). Woo and colleagues also tested the contribution of STING signaling in context of combined treatment with checkpoint inhibitors and found that the therapeutic effect of CTLA-4 and anti-PD-L1 mAbs was lost in STING-deficient mice(44). Their results suggest that the host STING pathway plays a critical role in the therapeutic efficacy of cancer immunotherapies and provide impetus to

deliberately activate STING using STING agonists for treating cancer. Thus, manipulation of STING signaling can be successfully integrated in the context of combination therapies (Table 1).

In addition to its established role as a signaling adaptor in the response to cytosolic DNA, STING was proposed to function as a direct sensor able to directly bind different DNA species or CDNs(76, 83). Biotin pull-down assays using *in vitro* transcribed STING and different biotinylated DNA species showed that STING directly binds ssDNA and dsDNA without a requirement for accessory molecules(83). Moreover, using radiolabeled c-di-GMP<sup>32</sup> binding assays, Burdette and colleagues shown that STING can also directly and specifically binds CDNs(76) in contrast to a study showing that c-di-GMP was detected by DDX41(84). To unveil the underlying mechanism, Parvatiyar and colleagues performed binding assays to determine the affinities of c-di-GMP for DDX41 and for STING in parallel. Physiologically, binding of c-di-GMP with endogenous DDX41 turned out to be greater than the association between c-di-GMP and endogenous STING. Accordingly, c-di-GMP bound to purified recombinant DDX41 with stronger affinity than purified recombinant STING in pulldown binding assays. These findings thus suggest that even though STING can directly bind c-di-GMP, DDX41 is the major sensor of c-di-GMP, operating upstream of STING to facilitate downstream signaling and type I IFN activation(84). In line with this work, Zhang and colleagues found that c-di-GMP bound to STING with a K<sub>d</sub> of 1.21 μM(85). Interestingly, both natural cGAMP and synthetic 2'3'-cGAMP bound to STING with a high affinity(85). Indeed, the K<sub>d</sub> of 2'3'-cGAMP was nearly 300 fold lower than those of c-di-GMP, 3'2'-cGAMP and 3'3'-cGAMP, and around 75 fold lower than that of 2'2'-cGAMP. In addition, unlike the binding of c-di-GMP, which is an exothermic process, the binding of natural and 2'3'-cGAMP to STING was endothermic, suggesting that the energy may be used for STING conformational change(85). The authors further showed that 2'3'-cGAMP and other cGAMP isomers are much more potent than c-di-GMP in inducing IFNβ in cells(85). Overall, these results illustrate the potential to design cGAMP isomers with a potentially enhanced ability to trigger type I IFN secretion, thereby resulting in more potent anticancer immune responses.

### 6.3 STING agonists for cancer treatment in humans

In 2014, Li discovered an ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase enzyme named ENPP1(86). This enzyme is a 2'3'-cGAMP hydrolyzing protein, giving rise to a hydrolysis-resistant bisphosphothioate analog of 2'3'-cGAMP named 2'3'-cG<sup>S</sup>A<sup>S</sup>MP. This improved hSTING agonist could have higher potency for cancer therapy as vaccine adjuvant in humans(86). In the light of Li's work a new synthetic CDN, ML RR-S2 CDA, with high stability, high anti-tumor effect and able to activate all hSTING variants, has been synthesized. This improved synthetic CDN contains, like endogenous human 2'3'-cGAMP, a phosphate bridge configuration with both 2'-5' and 3'-5' linkages, called "mixed linkage" (ML). This ML endows this molecule with increased binding affinity to STING. Moreover, like the 2'3'-cG<sup>S</sup>A<sup>S</sup>MP, the bisphosphothioate analog of ML-CDA (ML RR-S2 CDA) is protected against ENPP1 hydrolysis and has higher ability for STING stimulation. Accordingly, this new synthetic CDNs agonist has shown potent anti-tumor efficiency in various tumor models like B16F10 melanoma, 4T1 mammary adenocarcinoma and CT26



colon carcinoma dependent on STING and CD8<sup>+</sup> T priming. ML RR-S2 CDA also induced the establishment of long-term immune memory(87). This agonist has also been used in combination with other immunomodulatory agents. In 2015, Fu synthesized STINGVAX, a cell based cancer vaccine combining synthetic CDNs, used in Corrales study including ML RR-S2 CDA, with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)–producing cells (Table 1 and Figure 4F). The high efficiency of this treatment in B16 melanoma bearing mice could also be increased upon neutralization of the PD-1/PD-L1 pathway(88) (Figure 4E). Similar results were obtained in a mouse model of head and neck cancer(89). A clinical trial studying the safety and efficacy of ML RR-S2 CDA (also called MIW815 or ADU-S100) in patients with advanced/metastatic solid tumors or lymphomas (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02675439) is actually ongoing (Table 1). Despite all this encouraging evidence showing the rationale for implementing STING targeting therapy into the clinic, further characterization of the STING pathway is necessary for the development of tailored treatments relying on the modulation of the STING pathway.

## Conclusion

STING protein is essential for cytosolic DNA sensing in mammal cells. Although the precise mechanism of action of STING is currently not fully understood, STING acts as a scaffold protein for the assembly of multiprotein complexes driving type I IFN and inflammatory cytokine production. An increasing amount of evidence indicates that intratumoral STING agonists are promising cancer therapeutic agents. However, numerous questions still remain unanswered. It is still unclear how tumor derived DNA gains access to host APCs following tumor cell death. The role of STING signaling in the efficacy of other cancer therapeutics in addition to radiotherapy, including chemotherapy and kinase inhibitors, remains to be characterized. Little is also known about STING pathway regulation and the characterization of negative feedback mechanisms will facilitate the establishment of more accurate strategies to regulate the STING signaling pathway for therapeutic use. Eventually, we believe that STING axis activation and its functional consequences in different cell subsets within the tumor microenvironment need deeper characterization. CD4 and CD8 T cells actively participate in shaping antitumor immunity in the tumor microenvironment(90–92). Interestingly STING is expressed at high levels in lymphoid tissues and particularly, in T lymphocytes suggesting that STING might be an active player in T cell signaling cascades (our unpublished data and (93, 94)). Further investigation will be required to address this hypothesis, but even if we assume that STING-mediated induction of IFNs/ISG in T cells is not physiologically relevant in norm(95), it nevertheless becomes of high importance for the study of high affinity synthetic agonists of STING for their subsequent use as anticancer therapeutic agents.

## Acknowledgements

The authors are supported by grants from the Fondation de France (L.A. and T.R.V.), the Association pour la recherche sur le cancer (L.A.), the Ligue Régionale contre le cancer comité grand est (L.A.), the Institut Mérieux (L.A.), the Conseil Régional de Bourgogne and FEDER (L.A.), the Agence Nationale de la Recherche [ANR-13-JSV3-0001] (L.A.) and [ANR-11-LABX-0021]. L.A. has received funding from the European Research Council (ERC) under the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme (grant agreement N°677251).

## References

1. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:991–1045. [PubMed: 8011301]
2. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392(6673): 245–52. [PubMed: 9521319]
3. Barber GN. Innate immune DNA sensing pathways: STING, AIMII and the regulation of interferon production and inflammatory responses. *Curr Opin Immunol.* 2011; 23(1):10–20. [PubMed: 21239155]
4. Desmet CJ, Ishii KJ. Nucleic acid sensing at the interface between innate and adaptive immunity in vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12(7):479–91. [PubMed: 22728526]
5. Barbalat R, Ewald SE, Mouchess ML, Barton GM. Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol.* 2011; 29:185–214. [PubMed: 21219183]
6. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol.* 2012; 12(3):168–79. [PubMed: 22301850]
7. Dubensky TW Jr, Reed SG. Adjuvants for cancer vaccines. *Semin Immunol.* 2010; 22(3):155–61. [PubMed: 20488726]
8. Aarntzen EH, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJ, de Vries IJ. Dendritic cell vaccination and immune monitoring. *Cancer Immunol Immunother.* 2008; 57(10):1559–68. [PubMed: 18618110]
9. Kalinski P, Muthuswamy R, Urban J. Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines and combination immunotherapies. *Expert Rev Vaccines.* 2013; 12(3):285–95. [PubMed: 23496668]
10. Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(4): 265–77. [PubMed: 22437871]
11. Schuler G. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Eur J Immunol.* 2010; 40(8):2123–30. [PubMed: 20853498]
12. Krieg AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest.* 2007; 117(5):1184–94. [PubMed: 17476348]
13. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:175–208. [PubMed: 16551247]
14. Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, et al. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med.* 1998; 4(3):321–7. [PubMed: 9500606]
15. Speiser DE, Baumgaertner P, Voelter V, Devevre E, Barbey C, Rufer N, et al. Unmodified self antigen triggers human CD8 T cells with stronger tumor reactivity than altered antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(10):3849–54. [PubMed: 18319339]
16. Rosenberg SA, Sherry RM, Morton KE, Scharfman WJ, Yang JC, Topalian SL, et al. Tumor progression can occur despite the induction of very high levels of self/tumor antigen-specific CD8+ T cells in patients with melanoma. *J Immunol.* 2005; 175(9):6169–76. [PubMed: 16237114]
17. Janssen EM, Droin NM, Lemmens EE, Pinkoski MJ, Bensinger SJ, Ehst BD, et al. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature.* 2005; 434(7029):88–93. [PubMed: 15744305]
18. Filipazzi P, Pilla L, Mariani L, Patuzzo R, Castelli C, Camisaschi C, et al. Limited induction of tumor cross-reactive T cells without a measurable clinical benefit in early melanoma patients vaccinated with human leukocyte antigen class I-modified peptides. *Clin Cancer Res.* 2012; 18(23):6485–96. [PubMed: 23032742]
19. Melief CJ, van Hall T, Arens R, Ossendorp F, van der Burg SH. Therapeutic cancer vaccines. *J Clin Invest.* 2015; 125(9):3401–12. [PubMed: 26214521]
20. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(10):715–27. [PubMed: 16977338]
21. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, durable tumor remission, and long-term safety in patients with advanced melanoma receiving nivolumab. *J Clin Oncol.* 2014; 32(10):1020–30. [PubMed: 24590637]

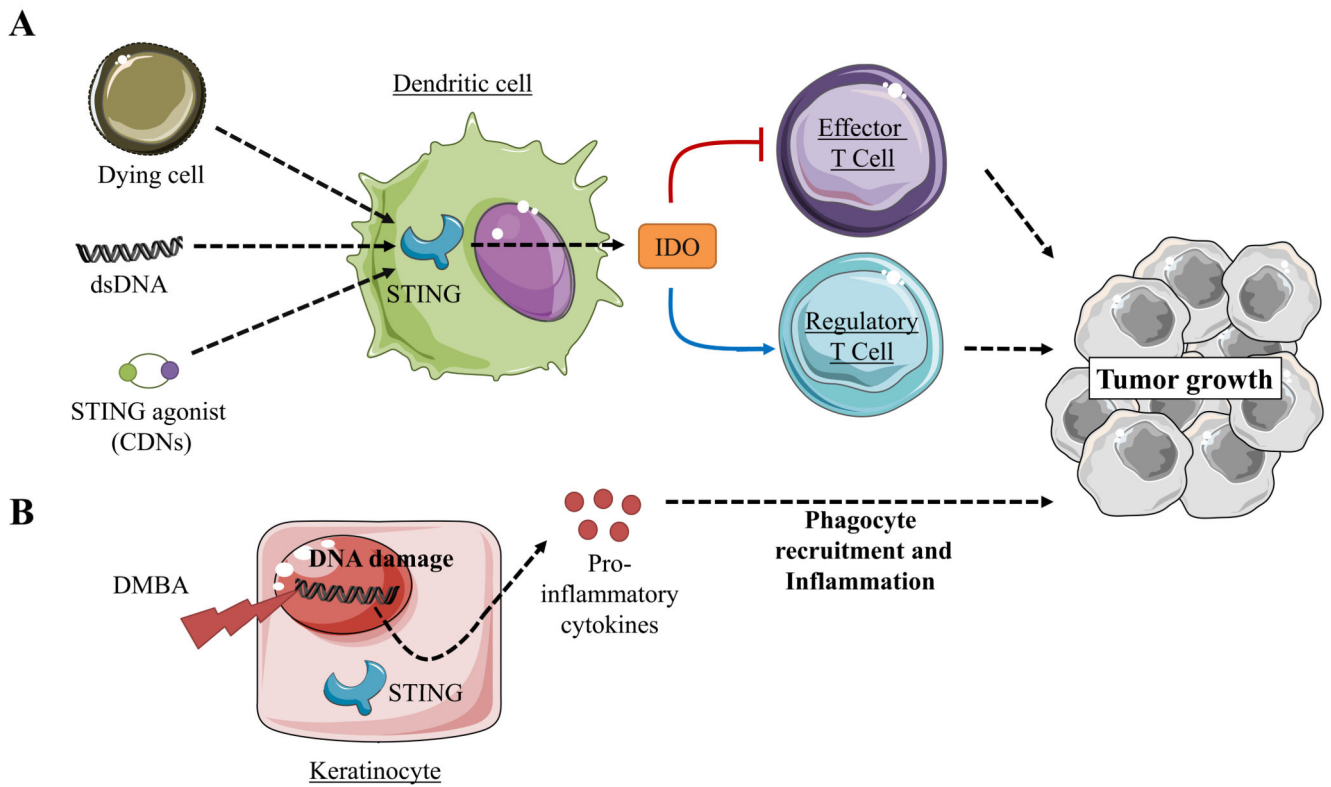
22. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med.* 2015; 372(4):320–30. [PubMed: 25399552]
23. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18:927–74. [PubMed: 10837079]
24. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature.* 2000; 408(6813):740–5. [PubMed: 11130078]
25. Krieg AM, Vollmer J. Toll-like receptors 7, 8, and 9: linking innate immunity to autoimmunity. *Immunol Rev.* 2007; 220:251–69. [PubMed: 17979852]
26. Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(11):823–35. [PubMed: 17063184]
27. Ishikawa H, Barber GN. STING is an endoplasmic reticulum adaptor that facilitates innate immune signalling. *Nature.* 2008; 455(7213):674–8. [PubMed: 18724357]
28. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN. STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature.* 2009; 461(7265):788–92. [PubMed: 19776740]
29. Barber GN. STING: infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2015; 15(12):760–70. [PubMed: 26603901]
30. Unterholzner L. The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology.* 2013; 218(11):1312–21. [PubMed: 23962476]
31. Chen Q, Sun L, Chen ZJ. Regulation and function of the cGAS-STING pathway of cytosolic DNA sensing. *Nat Immunol.* 2016; 17(10):1142–9. [PubMed: 27648547]
32. Sun L, Wu J, Du F, Chen X, Chen ZJ. Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway. *Science.* 2013; 339(6121):786–91. [PubMed: 23258413]
33. Wu J, Sun L, Chen X, Du F, Shi H, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP is an endogenous second messenger in innate immune signaling by cytosolic DNA. *Science.* 2013; 339(6121):826–30. [PubMed: 23258412]
34. Abe T, Barber GN. Cytosolic-DNA-mediated, STING-dependent proinflammatory gene induction necessitates canonical NF- $\kappa$ B activation through TBK1. *J Virol.* 2014; 88(10):5328–41. [PubMed: 24600004]
35. Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, et al. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110(8):2969–74. [PubMed: 23388631]
36. Paludan SR, Bowie AG. Immune sensing of DNA. *Immunity.* 2013; 38(5):870–80. [PubMed: 23706668]
37. Ahn J, Barber GN. Self-DNA, STING-dependent signaling and the origins of autoinflammatory disease. *Curr Opin Immunol.* 2014; 31:121–6. [PubMed: 25459004]
38. Lemos H, Huang L, McGaha TL, Mellor AL. Cytosolic DNA sensing via the stimulator of interferon genes adaptor: Yin and Yang of immune responses to DNA. *Eur J Immunol.* 2014; 44(10):2847–53. [PubMed: 25143264]
39. Huang L, Li L, Lemos H, Chandler PR, Pacholczyk G, Baban B, et al. Cutting edge: DNA sensing via the STING adaptor in myeloid dendritic cells induces potent tolerogenic responses. *J Immunol.* 2013; 191(7):3509–13. [PubMed: 23986532]
40. Lemos H, Mohamed E, Huang L, Ou R, Pacholczyk G, Arbab AS, et al. STING Promotes the Growth of Tumors Characterized by Low Antigenicity via IDO Activation. *Cancer Res.* 2016; 76(8):2076–81. [PubMed: 26964621]
41. Ahn J, Xia T, Konno H, Konno K, Ruiz P, Barber GN. Inflammation-driven carcinogenesis is mediated through STING. *Nat Commun.* 2014; 5:5166. [PubMed: 25300616]
42. Dunn GP, Bruce AT, Sheehan KC, Shankaran V, Uppaluri R, Bui JD, et al. A critical function for type I interferons in cancer immunoediting. *Nat Immunol.* 2005; 6(7):722–9. [PubMed: 15951814]
43. Diamond MS, Kinder M, Matsushita H, Mashayekhi M, Dunn GP, Archambault JM, et al. Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med.* 2011; 208(10):1989–2003. [PubMed: 21930769]

44. Woo SR, Fuertes MB, Corrales L, Spranger S, Furdyna MJ, Leung MY, et al. STING-dependent cytosolic DNA sensing mediates innate immune recognition of immunogenic tumors. *Immunity*. 2014; 41(5):830–42. [PubMed: 25517615]
45. Sun W, Li Y, Chen L, Chen H, You F, Zhou X, et al. ERIS, an endoplasmic reticulum IFN stimulator, activates innate immune signaling through dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106(21):8653–8. [PubMed: 19433799]
46. Zhong B, Yang Y, Li S, Wang YY, Li Y, Diao F, et al. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. *Immunity*. 2008; 29(4):538–50. [PubMed: 18818105]
47. Jin L, Waterman PM, Jonscher KR, Short CM, Reisdorph NA, Cambier JC. MPYS, a novel membrane tetraspanner, is associated with major histocompatibility complex class II and mediates transduction of apoptotic signals. *Mol Cell Biol*. 2008; 28(16):5014–26. [PubMed: 18559423]
48. Demaria O, De Gassart A, Coso S, Gestermann N, Di Domizio J, Flatz L, et al. STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(50):15408–13. [PubMed: 26607445]
49. Fuertes MB, Kacha AK, Kline J, Woo SR, Kranz DM, Murphy KM, et al. Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8 $\alpha$ + dendritic cells. *J Exp Med*. 2011; 208(10):2005–16. [PubMed: 21930765]
50. Deng L, Liang H, Xu M, Yang X, Burnette B, Arina A, et al. STING-Dependent Cytosolic DNA Sensing Promotes Radiation-Induced Type I Interferon-Dependent Antitumor Immunity in Immunogenic Tumors. *Immunity*. 2014; 41(5):843–52. [PubMed: 25517616]
51. Klarquist J, Hennies CM, Lehn MA, Reboulet RA, Feau S, Janssen EM. STING-mediated DNA sensing promotes antitumor and autoimmune responses to dying cells. *J Immunol*. 2014; 193(12):6124–34. [PubMed: 25385820]
52. Ahn J, Gutman D, Saijo S, Barber GN. STING manifests self DNA-dependent inflammatory disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(47):19386–91. [PubMed: 23132945]
53. Ohkuri T, Ghosh A, Kosaka A, Zhu J, Ikeura M, David M, et al. STING contributes to antiglioma immunity via triggering type I IFN signals in the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2(12):1199–208. [PubMed: 25300859]
54. Sauer JD, Sotelo-Troha K, von Moltke J, Monroe KM, Rae CS, Brubaker SW, et al. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic dinucleotides. *Infect Immun*. 2011; 79(2):688–94. [PubMed: 21098106]
55. Salcedo R, Cataisson C, Hasan U, Yuspa SH, Trinchieri G. MyD88 and its divergent toll in carcinogenesis. *Trends Immunol*. 2013; 34(8):379–89. [PubMed: 23660392]
56. Zhu Q, Man SM, Gurung P, Liu Z, Vogel P, Lamkanfi M, et al. Cutting edge: STING mediates protection against colorectal tumorigenesis by governing the magnitude of intestinal inflammation. *J Immunol*. 2014; 193(10):4779–82. [PubMed: 25320273]
57. Huber S, Gagliani N, Zenewicz LA, Huber FJ, Bosurgi L, Hu B, et al. IL-22BP is regulated by the inflammasome and modulates tumorigenesis in the intestine. *Nature*. 2012; 491(7423):259–63. [PubMed: 23075849]
58. Salcedo R, Worschech A, Cardone M, Jones Y, Gyulai Z, Dai RM, et al. MyD88-mediated signaling prevents development of adenocarcinomas of the colon: role of interleukin 18. *J Exp Med*. 2010; 207(8):1625–36. [PubMed: 20624890]
59. Ahn J, Konno H, Barber GN. Diverse roles of STING-dependent signaling on the development of cancer. *Oncogene*. 2015; 34(41):5302–8. [PubMed: 25639870]
60. Burnette BC, Liang H, Lee Y, Chlewicki L, Khodarev NN, Weichselbaum RR, et al. The efficacy of radiotherapy relies upon induction of type I interferon-dependent innate and adaptive immunity. *Cancer Res*. 2011; 71(7):2488–96. [PubMed: 21300764]
61. Corrales L, Gajewski TF. Molecular Pathways: Targeting the Stimulator of Interferon Genes (STING) in the Immunotherapy of Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21(21):4774–9. [PubMed: 26373573]
62. Lau L, Gray EE, Brunette RL, Stetson DB. DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway. *Science*. 2015; 350(6260):568–71. [PubMed: 26405230]

63. Xia T, Konno H, Ahn J, Barber GN. Deregulation of STING Signaling in Colorectal Carcinoma Constrains DNA Damage Responses and Correlates With Tumorigenesis. *Cell Rep*. 2016; 14(2): 282–97. [PubMed: 26748708]
64. Lam AR, Le Bert N, Ho SS, Shen YJ, Tang ML, Xiong GM, et al. RAE1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by STING-dependent DNA sensor pathways in lymphoma. *Cancer Res*. 2014; 74(8):2193–203. [PubMed: 24590060]
65. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005; 436(7054):1186–90. [PubMed: 15995699]
66. Ho SS, Zhang WY, Tan NY, Khatoo M, Suter MA, Tripathi S, et al. The DNA Structure-Specific Endonuclease MUS81 Mediates DNA Sensor STING-Dependent Host Rejection of Prostate Cancer Cells. *Immunity*. 2016; 44(5):1177–89. [PubMed: 27178469]
67. Plowman J, Narayanan VL, Dykes D, Szarvasi E, Briet P, Yoder OC, et al. Flavone acetic acid: a novel agent with preclinical antitumor activity against colon adenocarcinoma 38 in mice. *Cancer Treat Rep*. 1986; 70(5):631–5. [PubMed: 3708611]
68. Cummings J, Smyth JF. Flavone 8-acetic acid: our current understanding of its mechanism of action in solid tumours. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1989; 24(5):269–72. [PubMed: 2667786]
69. Liu JJ, Ching LM, Goldthorpe M, Sutherland R, Baguley BC, Kirker JA, et al. Antitumour action of 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid in rats bearing chemically induced primary mammary tumours. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2007; 59(5):661–9. [PubMed: 16944150]
70. Baguley BC, Ching LM. Immunomodulatory actions of xanthenone anticancer agents. *BioDrugs*. 1997; 8(2):119–27. [PubMed: 18020500]
71. Lara PN Jr, Douillard JY, Nakagawa K, von Pawel J, McKeage MJ, Albert I, et al. Randomized phase III placebo-controlled trial of carboplatin and paclitaxel with or without the vascular disrupting agent vadimezan (ASA404) in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2011; 29(22):2965–71. [PubMed: 21709202]
72. Prantner D, Perkins DJ, Lai W, Williams MS, Sharma S, Fitzgerald KA, et al. 5,6-Dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) activates stimulator of interferon gene (STING)-dependent innate immune pathways and is regulated by mitochondrial membrane potential. *J Biol Chem*. 2012; 287(47):39776–88. [PubMed: 23027866]
73. Gao P, Ascano M, Zillinger T, Wang W, Dai P, Serganov AA, et al. Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA. *Cell*. 2013; 154(4): 748–62. [PubMed: 23910378]
74. Kim S, Li L, Maliga Z, Yin Q, Wu H, Mitchison TJ. Anticancer flavonoids are mouse-selective STING agonists. *ACS Chem Biol*. 2013; 8(7):1396–401. [PubMed: 23683494]
75. Conlon J, Burdette DL, Sharma S, Bhat N, Thompson M, Jiang Z, et al. Mouse, but not human STING, binds and signals in response to the vascular disrupting agent 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid. *J Immunol*. 2013; 190(10):5216–25. [PubMed: 23585680]
76. Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, et al. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*. 2011; 478(7370):515–8. [PubMed: 21947006]
77. Chandra D, Quispe-Tintaya W, Jahangir A, Asafu-Adjei D, Ramos I, Sintim HO, et al. STING ligand c-di-GMP improves cancer vaccination against metastatic breast cancer. *Cancer Immunol Res*. 2014; 2(9):901–10. [PubMed: 24913717]
78. Wang Z, Celis E. STING activator c-di-GMP enhances the anti-tumor effects of peptide vaccines in melanoma-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother*. 2015; 64(8):1057–66. [PubMed: 25986168]
79. Yi G, Brendel VP, Shu C, Li P, Palanathan S, Cheng Kao C. Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides. *PLoS One*. 2013; 8(10):e77846. [PubMed: 24204993]
80. Diner EJ, Burdette DL, Wilson SC, Monroe KM, Kellenberger CA, Hyodo M, et al. The innate immune DNA sensor cGAS produces a noncanonical cyclic dinucleotide that activates human STING. *Cell Rep*. 2013; 3(5):1355–61. [PubMed: 23707065]
81. Gao P, Ascano M, Wu Y, Barchet W, Gaffney BL, Zillinger T, et al. Cyclic [G(2',5')pA(3',5')p] is the metazoan second messenger produced by DNA-activated cyclic GMP-AMP synthase. *Cell*. 2013; 153(5):1094–107. [PubMed: 23647843]



82. Li T, Cheng H, Yuan H, Xu Q, Shu C, Zhang Y, et al. Antitumor Activity of cGAMP via Stimulation of cGAS-cGAMP-STING-IRF3 Mediated Innate Immune Response. *Sci Rep.* 2016; 6:19049. [PubMed: 26754564]
83. Abe T, Harashima A, Xia T, Konno H, Konno K, Morales A, et al. STING recognition of cytoplasmic DNA instigates cellular defense. *Mol Cell.* 2013; 50(1):5–15. [PubMed: 23478444]
84. Parvatiyar K, Zhang Z, Teles RM, Ouyang S, Jiang Y, Iyer SS, et al. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nat Immunol.* 2012; 13(12):1155–61. [PubMed: 23142775]
85. Zhang X, Shi H, Wu J, Zhang X, Sun L, Chen C, et al. Cyclic GMP-AMP containing mixed phosphodiester linkages is an endogenous high-affinity ligand for STING. *Mol Cell.* 2013; 51(2): 226–35. [PubMed: 23747010]
86. Li L, Yin Q, Kuss P, Maliga Z, Millan JL, Wu H, et al. Hydrolysis of 2'3'-cGAMP by ENPP1 and design of nonhydrolyzable analogs. *Nat Chem Biol.* 2014; 10(12):1043–8. [PubMed: 25344812]
87. Corrales L, Glickman LH, McWhirter SM, Kanne DB, Sivick KE, Katibah GE, et al. Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep.* 2015; 11(7):1018–30. [PubMed: 25959818]
88. Fu J, Kanne DB, Leong M, Glickman LH, McWhirter SM, Lemmens E, et al. STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1 blockade. *Sci Transl Med.* 2015; 7(283):283ra52.
89. Moore E, Clavijo PE, Davis R, Cash H, Van Waes C, Kim Y, et al. Established T Cell-Inflamed Tumors Rejected after Adaptive Resistance Was Reversed by Combination STING Activation and PD-1 Pathway Blockade. *Cancer Immunol Res.* 2016; 4(12):1061–1071. [PubMed: 27821498]
90. Apetoh L, Smyth MJ, Drake CG, Abastado JP, Apte RN, Ayyoub M, et al. Consensus nomenclature for CD8+ T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology.* 2015; 4(4):e998538. [PubMed: 26137416]
91. Rivera Vargas T, Humblin E, Vegran F, Ghiringhelli F, Apetoh L. TH9 cells in anti-tumor immunity. *Semin Immunopathol.* 2016
92. Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12(4):298–306. [PubMed: 22419253]
93. Poltorak A, Kurmyshkina O, Volkova T. Stimulator of interferon genes (STING): A “new chapter” in virus-associated cancer research. Lessons from wild-derived mouse models of innate immunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016; 29:83–91. [PubMed: 26980676]
94. Monroe KM, Yang Z, Johnson JR, Geng X, Doitsh G, Krogan NJ, et al. IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science.* 2014; 343(6169):428–32. [PubMed: 24356113]
95. Berg RK, Rahbek SH, Kofod-Olsen E, Holm CK, Melchjorsen J, Jensen DG, et al. T cells detect intracellular DNA but fail to induce type I IFN responses: implications for restriction of HIV replication. *PLoS One.* 2014; 9(1):e84513. [PubMed: 24404168]

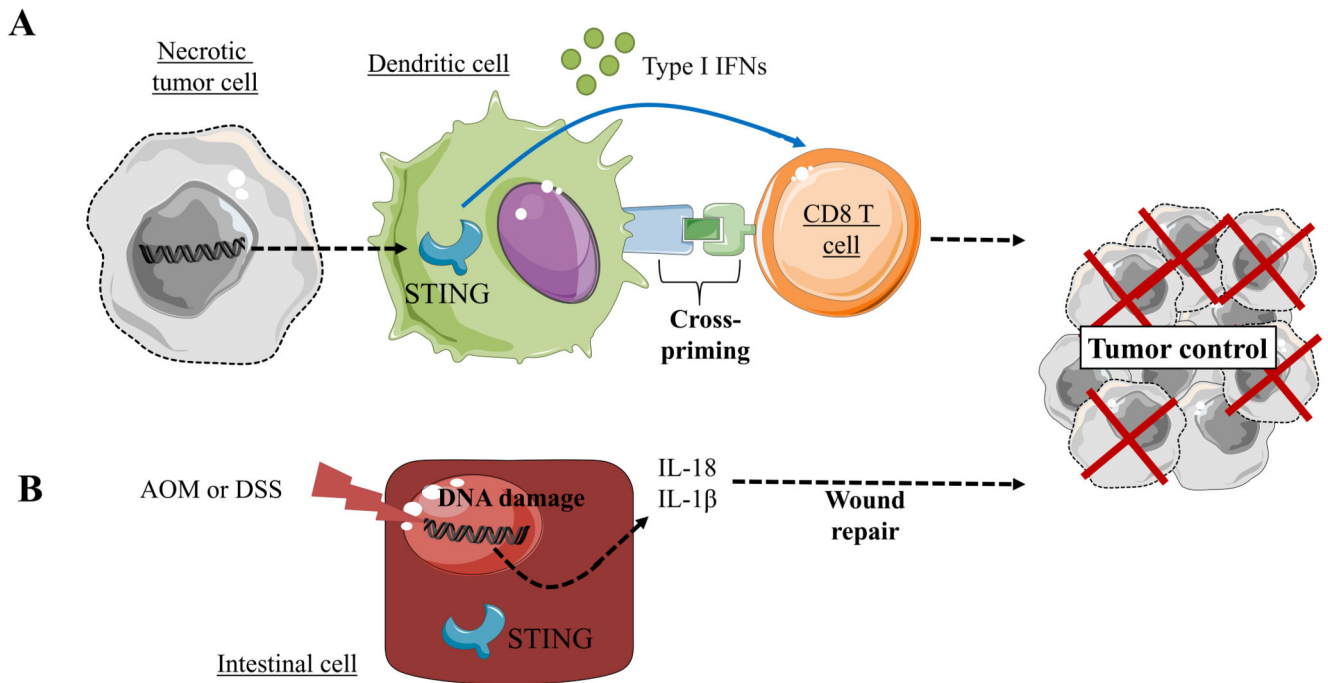


**Figure 1.**

Involvement of STING in the promotion of tumor growth

A) The stimulation of the STING signaling pathway by DNA elicits IDO dependent inhibition of effector T cells while promoting regulatory T cell activity resulting in enhanced tumor growth(38–40).

B) The leakage of DNA induced by 7,12-dimethylbenz[ $\alpha$ ]anthracene(DMBA), a potent carcinogen, can result in intrinsic chronic activation of STING signaling which drives phagocyte recruitment inflammation and tumor growth(41).

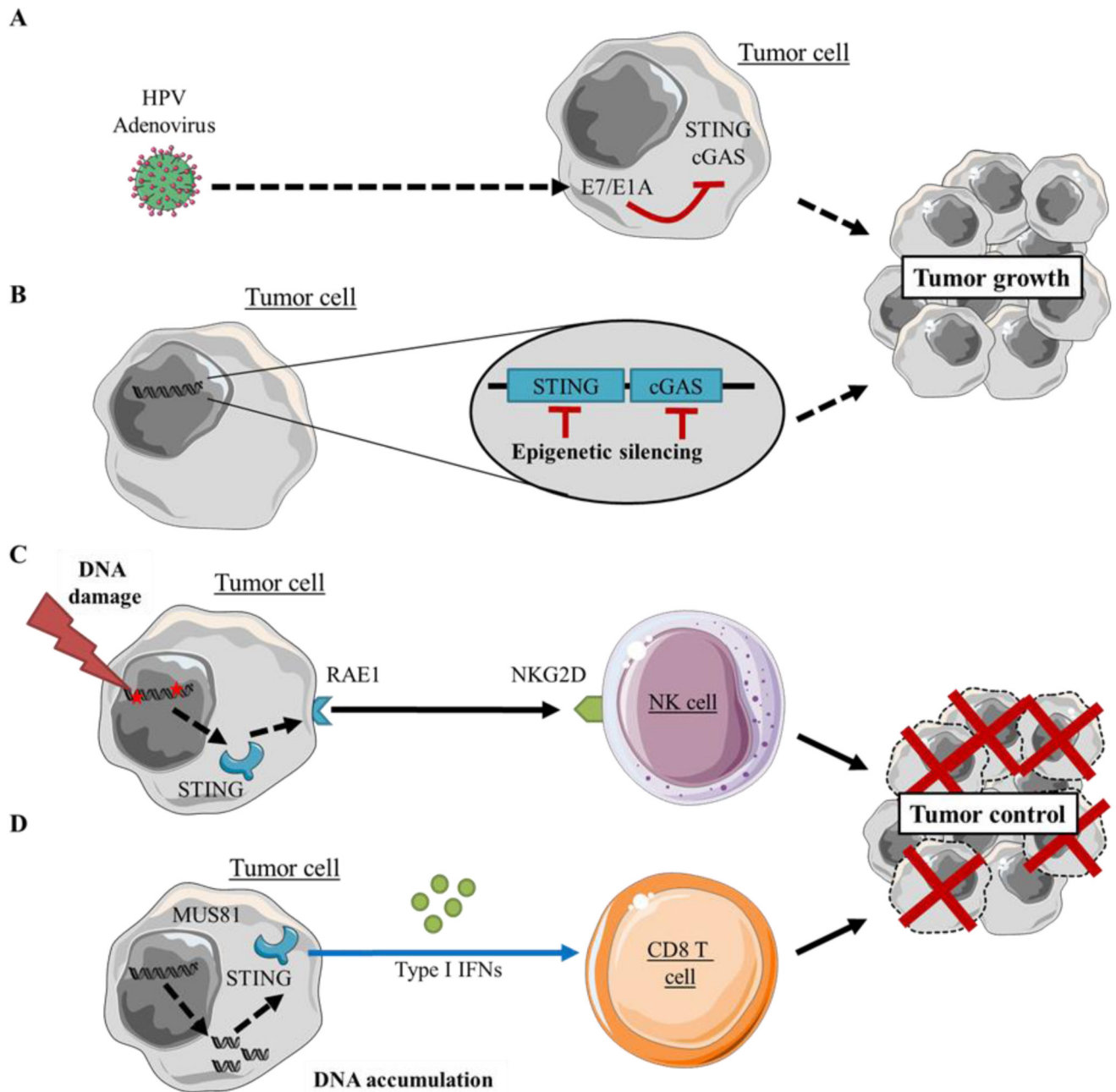


**Figure 2.**

STING-driven cytokine secretion can activate adaptive immunity and prevent tumor growth  
 A) Tumor derived-DNA recognition by STING, leads to IFN $\alpha/\beta$  secretion by CD8 $\alpha^+$  DC, increased cross-priming and T cell activation(44)

B) DNA damage induced by carcinogens, such as azoxymethane (AOM) or dextran sulfate sodium (DSS), triggers activation of the STING signaling pathway, resulting in IL-18 and IL-1 $\beta$  cytokine expression and favoring wound repair and tumor growth control(59).





**Figure 3.**

Cell-intrinsic effect of STING activation in tumor cells

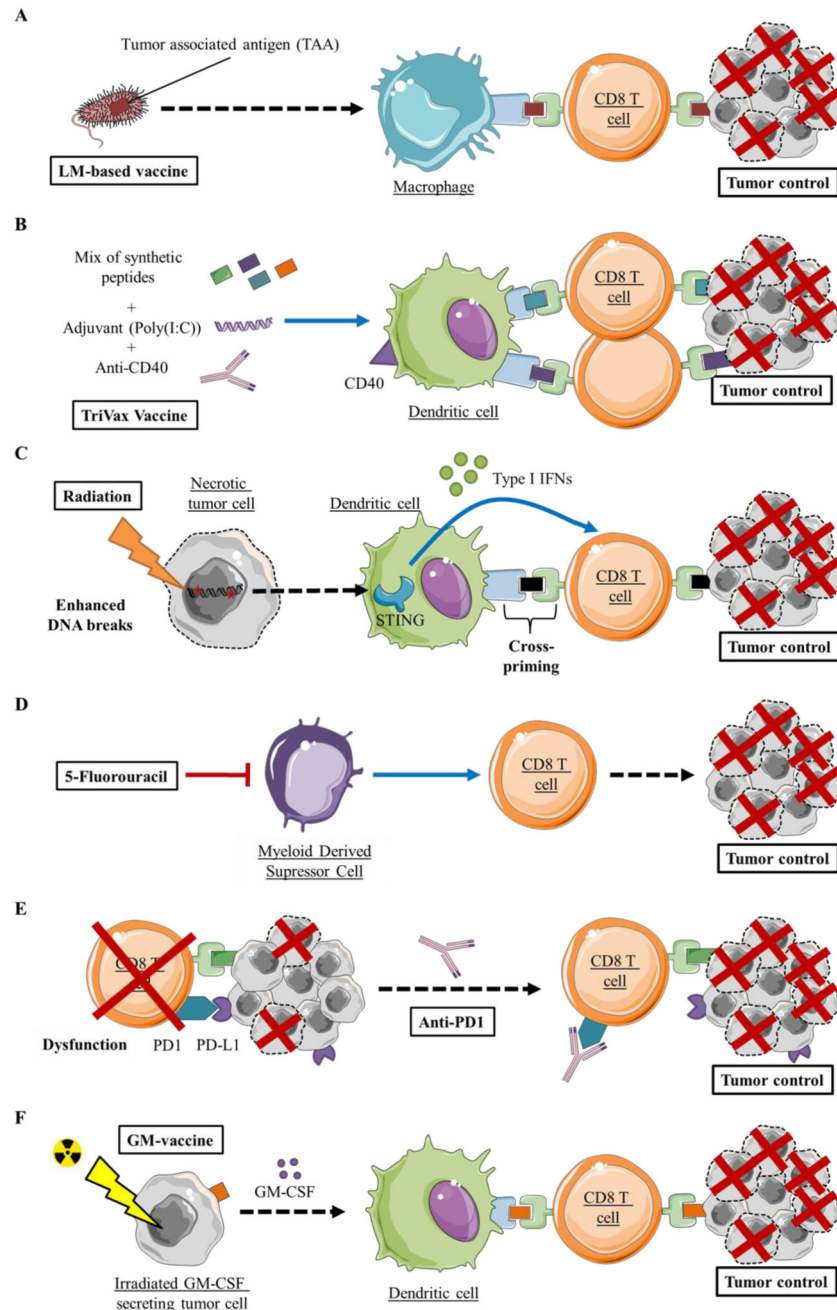
The functionality of the STING signaling pathway can be altered in tumors.

A) Oncolytic viruses like HPV or adenoviruses drive E7 or E1A oncoprotein expression. These proteins act as STING antagonists able to inhibit the STING pathway, possibly leading to their evasion from immune cells(62)

B) Spontaneous epigenetic silencing of STING signaling components is also observed in various cancer types(63)

C) Tumor DNA damage leads to Natural Killer cell activation through STING-dependent expression of RAE1(64).

D) MUS81 endonuclease induces genomic DNA cleavage and accumulation followed by STING, type I IFN and CD8 T cell dependent rejection of tumor cells(66)



**Figure 4.** Therapeutic strategies combining STING targeting with immunomodulation and anticancer therapies

The addition of STING agonists was shown to enhance the anticancer activity of the following anticancer therapies and immunomodulation strategies that elicit CD8 T cell dependent anticancer responses:

A) Vaccination using Tumor Associated Antigen expressing attenuated *Listeria Monocytogenes*(77)

- B) Vaccination using Trivax (anti-CD40 as a co-stimulation signal, Poly(I:C) as adjuvant and peptide mix)(78)
- C) Radiotherapy(50)
- D) Chemotherapy, such as 5-Fluorouracil(82)
- E) Checkpoint inhibitors, such as anti-PD1(88)
- F) Vaccination using irradiated GM-CSF secreting tumor cells(88)

Table 1

STING agonist	Co-treatment	Model	References
Flavone Acetic Acid (FAA)	-	Murine MC38 Colon model	Plowman and al, 1986, Cancer Treat Rep
	-	Phase I Clinical and Pharmacokinetic Trial of LM985 (Flavone Acetic Acid Ester) and Flavone Acetic Acid in patients with advanced cancer	Kerr and al, 1986, Cancer Res Havlin and al, 1991, J Natl Cancer Inst
DMXAA (ASA404)	-	Phase III clinical trial in patient with non-small-cell lung cancer	Lara and al, 2011, J Clin Oncol <a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00662597">ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00662597</a>
C-di-GMP	-	Murine 4T1 mammary model	Chandra and al, 2014, Cancer Immunol Res
	-	Murine GL261 glioma model	Ohkuri, 2015, Oncoimmunology
	TRIVAX vaccine association	Murine B16 melanoma model	Wang and Celis, 2015, Cancer Immunol Immunother
cGAMP	-	Murine B16 melanoma and MC38 Colon model	Demaria and al, 2015, PNAS USA
	ionizing-radiation co-treatment	Murine MC38 Colon model	Deng and al, 2014, Immunity
	Alone and 5-FU co-treatment	Murine CT26 colon model	Li and al, 2016, Sci Rep
Disodium dithio-(RP, RP)-[cyclic[A(2',5')p A(3',5')p]], (ML RR-S2 CDA)	-	Murine B16-F10 melanoma, 4T1 mammary and CT26 colon model	Corrales and al, 2016, Cell Rep
	GM-CSF producing cells association (STINGVAX)	Murine B16 melanoma model	Fu and al, 2015, Sci Transl Med
	STINGVAX and anti-PD1 co-treatment	Murine B16 melanoma model	Fu and al, 2015, Sci Transl Med
	-	Phase I clinical trial in patients with advanced/metastatic solid tumors or lymphomas	<a href="https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02675439">ClinicalTrials.gov Identifier : NCT02675439</a>

## **Harnessing T<sub>H</sub>9 cells in cancer immunotherapy**

Isis Benoit-Lizon<sup>1,2</sup> and Lionel Apetoh<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup>Faculté de Médecine, Université de Bourgogne Franche Comté, Dijon, France

<sup>3</sup>Evergrande Center for Immunologic Diseases and Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Harvard Medical School and Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA

Corresponding author:

Dr. Lionel Apetoh: Centre de Recherche, INSERM U1231, Facultés de Médecine et de Pharmacie, 7 Bd Jeanne d'Arc, 21079 Dijon, France. Phone: (33) 3-80-39-33-71; Fax: (33) 3-80-39-34-34; E-mail: lionel.apetoh@inserm.fr

### **Summary**

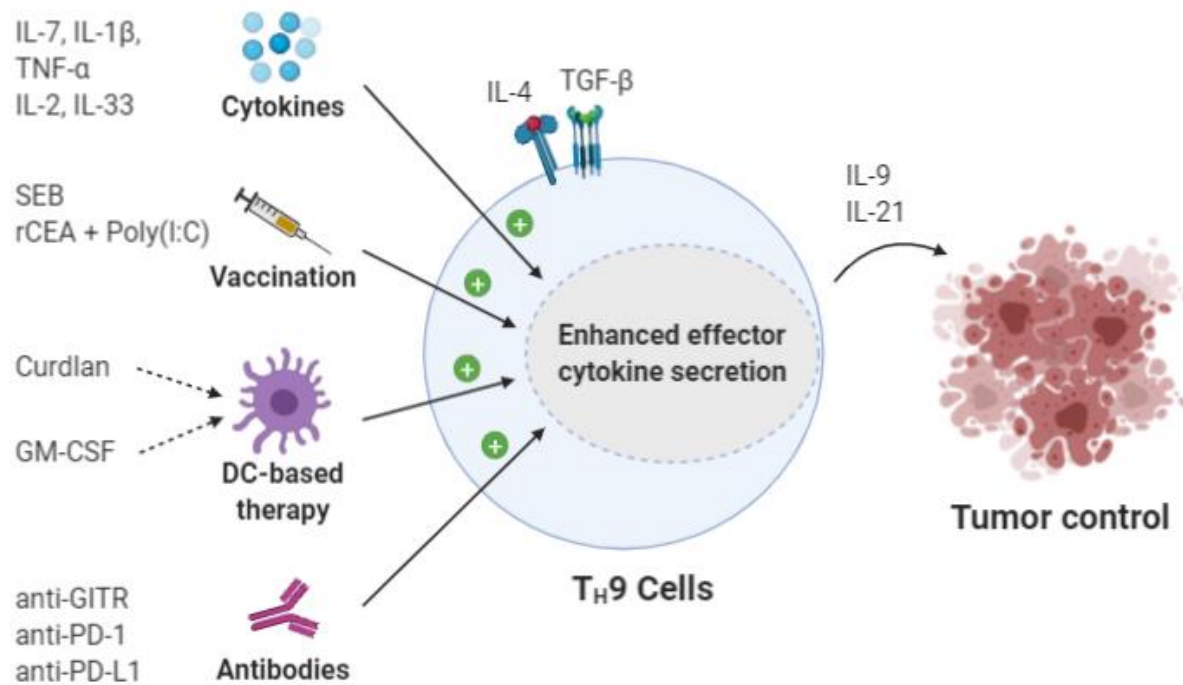
CD4 T cell effector subsets not only profoundly affect cancer progression, but recent evidence also underscores their critical contribution to the anticancer efficacy of immune checkpoint inhibitors. In 2012, the two seminal studies suggested the superior antimelanoma activity of T<sub>H</sub>9 cells over other T cell subsets upon adoptive T cell transfer. While these findings provided great impetus to investigate further the unique functions of T<sub>H</sub>9 cells and explore their relevance in cancer immunotherapy, the following questions still remain outstanding: are T<sub>H</sub>9 cell anticancer functions restricted to melanoma? What are the factors favouring T<sub>H</sub>9 cell effector functions? What is the contribution of T<sub>H</sub>9 cells to cancer immunotherapy treatments? Can T<sub>H</sub>9 cells be identified in humans and, if so, what is their clinical relevance? By reviewing the studies addressing these questions, we

will discuss how T<sub>H</sub>9 cells could be therapeutically harnessed for cancer immunotherapy strategies.

## Keywords

Cancer; Immunotherapy; T cell; Adoptive T cell transfer; Immune checkpoints; Immunomodulation

## Graphical abstract



## **1. Introduction: the relevance of CD4 T cells in cancer immunotherapy**

### **1.1. CD4 T cells shape cancer progression and response to immunotherapy**

Immune cells can eliminate cancer cells. Investigations into the abilities of immune cells to prevent cancer development were pioneered by Sir Mac Farlane Burnet who proposed in 1957 the cancer immunosurveillance hypothesis, *i.e.* the ability of immune cells to eliminate cancer cells before they form a clinically detectable tumour(1). Subsequent studies confirmed the relevance of immune cells in limiting cancer outgrowth not only in preclinical models but also in humans(2). Such knowledge has been exploited to develop immunotherapy strategies such as adoptive T cell therapy, which has proven successful in treating patients with advanced cancers(3). In addition, the validation of the cancer immunosurveillance hypothesis in humans has provided valuable insights that are now relevant to predict disease course and response to treatment in patients. Initial investigations from Pagès and Galon in metastatic colorectal cancer patients revealed that a higher presence of immune effector cells at the tumour site was associated with a better prognosis(4, 5). An international consortium later interrogated the relevance of immune parameters in stage I-II-III colon cancer patients and reported that the nature and quality of the tumour immune infiltrate, the Immunoscore, predicted the risk of recurrence(6). The relevance of immune infiltrates, and notably T cells, was also shown in other cancer types (reviewed in (7)). While these examples indicate that immune infiltrates can be used as a tool to assess patients' prognosis, the relevance of immune infiltrates extends even further. Indeed, a major change in the management of cancer was driven by the use of immune checkpoint inhibitors(7). In metastatic melanoma and lung cancer anti-CTLA-4 and anti-PD-1 treatments have documented efficacy with the



observation of long-term responders. Importantly, the pre-existence of CD8 T cells prior to anti-PD-1 therapy treatment was actually able to predict the response to the treatment(8). Thus, the monitoring of the nature of T cell infiltrates has become relevant in clinical cancer management in humans.

What is the relevance of CD4 T cells in cancer immunotherapy? Can CD4 T cells directly promote anticancer responses in humans? While it is being gradually recognized that CD4 T cells can enhance CD8 T cell functions(9, 10), much focus in clinical settings has been on CD8 T cells because of their proposed cytolytic functions against cancer cells(11). However, the relevance and the key contribution of CD4 T cells in cancer immunotherapy was also noted in humans. Investigations in a metastatic melanoma patient revealed that the adoptive transfer of tumour-antigen specific CD4 T cells drove complete tumour regression, leading to long term remission(12). Importantly, the transferred cells persisted *in vivo* for more than 12 weeks and the induction of T cell responses against other tumour antigens was observed, indicating that CD4 T cells can make a decisive contribution to anticancer immune responses in humans(12). The relevance of CD4 T cells in human cancer is not solely restricted to their ability to drive cancer elimination. CD4 T cell status can be used as a predictive marker for clinical responses to immunotherapy. This is underscored by two recent studies indicating that the functional status of CD4 T cells determines the therapeutic response to anti-PD-1 therapy(13, 14). In lung cancer patients, the levels and nature of CD4 T cells before anti-PD-1 therapy could predict the response to treatment(13). Patients benefiting from the treatment featured a high frequency of memory CD4 T cells as well as low expression of PD-1 and LAG-3 and proliferated strongly upon stimulation. Interestingly, the restoration

of CD8 T cell functionality in patients through anti-PD-1 administration was contingent on functional CD4 T cell responses(13). Thus, CD4 T cells can not only control cancer progression but can also be used as biomarkers of efficacy of immunotherapy.

## **1.2. T<sub>H</sub>9 cells, a subset of CD4 T cells with potent anticancer properties**

Naïve CD4 T cells can differentiate into various effector T cell subsets that exhibit functional specialization, explaining their exceptional ability to control several immunological processes(15). The description of the first two effector CD4 T cell subsets, T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 cells, was pioneered by Mossman and Coffman(16). In the setting of cancer, T<sub>H</sub>1 cells are ascribed with anticancer functions, notably because of their secretion of IFN- $\gamma$ . Accordingly, investigations in humans have demonstrated that T<sub>H</sub>1 cell infiltration is beneficial in the vast majority of cancers(17, 18). In contrast, T<sub>H</sub>2 cells, which secrete IL-4, IL-5 and IL-13 can promote tumour growth. In 2005, T<sub>H</sub>17 cells were identified as IL-17-secreting cells essential for antifungal immunity. Their contribution in cancer was subsequently investigated and conflicting results were obtained. Preclinical studies suggest that the adoptive transfer of highly polarized effector T<sub>H</sub>17 cells into tumour bearing-mice could prevent melanoma growth(19). However, other investigations revealed that T<sub>H</sub>17 cells were associated with enhanced cancer progression, notably because of the ability of IL-17 to promote tumour angiogenesis(20, 21). In humans, results suggest that, with the notable exception of ovarian cancer, T<sub>H</sub>17 cell infiltration in cancer is associated with a poor prognosis(22). All these studies underscore the relevance of CD4 T cell subsets in cancer progression.

Among effector CD4 T cell subsets, T<sub>H</sub>9 cells were the most recently identified. In 2008, T<sub>H</sub>9 cells were characterized as CD4 effector cells induced from naïve T cells activated in the presence of TGF- $\beta$  and IL-4 and producing high levels of IL-9 and able to trigger tissue inflammation and host defence against parasites(23, 24). The demonstration of the relevance of that T cell subset was subsequently provided in melanoma(25, 26). Importantly, T<sub>H</sub>9 cells were proposed to harbour more potent anticancer properties compared to all other known CD4 T cell subsets. Other investigators subsequently confirmed the strong anticancer properties of T<sub>H</sub>9 cells, including recent investigations suggesting that the beneficial effect of the microbiota against mouse melanoma relies, at least in part, on T<sub>H</sub>9 cells(27, 28). Substantial research efforts unveiled immunomodulation strategies boosting T<sub>H</sub>9 cell properties, suggesting that they can be harnessed for human use. However, the relevance of T<sub>H</sub>9 cells in the control of human cancers remains to be established. This review will discuss the latest advances in understanding T<sub>H</sub>9 cell functions in cancer.

## **2. TH9 cell effector functions in cancer**

### **2.1. IL-9, a cytokine not originally coined with anticancer functions**

IL-9 is the major effector cytokine secreted by TH9 cells. IL-9 was initially characterized in 1988 as a protein secreted from T cell clones and acting as a T cell growth factor(29). Further research has demonstrated that naïve T cells could secrete IL-9 upon activation, and this was potentiated by TGF- $\beta$  and IL-4(30). The functional properties of IL-9 were subsequently documented for transformed T cells. IL-9 indeed supports the proliferation of transformed murine T cells and human T cell leukemia cells and has been associated with poor prognosis in patients with Hodgkin's lymphoma(31, 32). Accordingly, *in vivo* overexpression of IL-9 in mouse models also favored the development of thymic lymphomas(33). These results indicated the importance of IL-9/IL-9 receptor signaling in some hematological tumors as a feedforward loop that further strengthened their oncogenic potential. While these studies were completed before the formal characterization of TH9 cells, they strongly suggested that T-cell-derived IL-9 would be detrimental in cancer. Why and how was the contribution of IL-9 in tumors revisited years later?

### **2.2. TH9 cell-derived IL-9 promotes anticancer activity against melanoma**

The relevance of TH17 cells was investigated in melanoma growth. For this, authors relied on mice lacking the key TH17 cell transcription factor *Rorc*(25). They found that the genetic absence of *Rorc* was preventing melanoma growth, suggesting that TH17 cell responses were detrimental in this context. Upon interrogating the status of *Rorc*-deficient T cells through functional genomics, the authors identified a marked increase in *Il9* expression in *Rorc* negative CD4 T cells, providing impetus to explore the contribution

of IL-9 in the functional responses observed *in vivo*. To do this, they neutralized IL-9 *in vivo*, and found that IL-9 was indeed responsible for enhanced anticancer immune responses in *Rorc*-deficient mice. Because T<sub>H</sub>9 cells had been characterized 4 years earlier, the investigators compared the anticancer efficacy of effector T cell subsets against melanoma upon adoptive transfer of *in vitro* polarized T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 and T<sub>H</sub>9 cells. Strikingly, they found that T<sub>H</sub>9 cells featured the best anticancer activity in that setting(25). They found in this system that the anticancer efficacy was also IL-9-dependent. Their investigations further revealed that IL-9 could be beneficial *in vivo* against LLC1 lung cancer tumors but, in line with the studies discussed in section 2.1., not EL4 T cell lymphomas. The reasons for these discrepant effects have been addressed by assessing IL-9R expression on the different cancer cell lines. As expected, EL-4 cells expressed IL-9R. However, B16 and LLC1 cells expressed marginal levels of IL-9R and did not respond *in vitro* to IL-9 stimulation. The findings showed altogether that the anticancer effects of T<sub>H</sub>9 cells will also be greatly determined by the sensitivity of tumor cells to the proliferative effects of IL-9(25). In an independent study, T<sub>H</sub>9 cells similarly promoted anticancer immunity against melanoma in an IL-9-dependent manner(26). It is noteworthy that the mechanistic grounds accounting for the anticancer effects differed between those two studies regarding the involvement of adaptive immunity. Indeed, Purwar *et al.* proposed that the anticancer effects of T<sub>H</sub>9 cells were driven through IL-9-induced mast cell activation(25). In contrast, Lu *et al.* found that T<sub>H</sub>9-cell derived IL-9 enhanced Ccl20-dependent recruitment of dendritic cells, ultimately resulting in anticancer CD8 T cell responses(26). The differences observed could be due to the anatomical location of the tumours because the work of Lu *et al.* mainly relied on the use

of intravenously injected melanoma cells forming tumour foci in the lungs. Collectively, these investigations revealed that depending on the environmental context T<sub>H</sub>9 cells exert anticancer functions in melanoma through the activation of innate as well as adaptive immune effectors.

### **2.3. Transcriptional regulation of T<sub>H</sub>9 cell anticancer functions**

Which are the molecular factors that directly affect T<sub>H</sub>9 cell anticancer functions in cancer? The group of Kaplan addressed this question by investigating the transcription factors required for the acquisition of an IL-9-secreting phenotype in T helper cells(34). Specifically, they showed that STAT5 was a key transcription factor that bound early to the *Il9* locus during initiation of T<sub>H</sub>9 cell differentiation and allowed the subsequent binding of BATF, thereby enabling IL-9-secretion. Because of the known ability of IL-2 to induce STAT5 activity(35), these findings were congruent with early studies demonstrating a key role for IL-2 in mediating IL-9 secretion from T cells(30, 36). After showing that under T<sub>H</sub>17-skewing conditions, overexpression of a constitutively active form of STAT5 (caSTAT5) and BATF skewed these T<sub>H</sub>17 cells to IL-9-secreting cells, they transferred antigen-specific CD4 T cells polarized into T<sub>H</sub>17 cells and expressing or not caSTAT5 and BATF into melanoma-bearing mice. T<sub>H</sub>17 cells with enhanced expression of IL-9 due to caSTAT5 and BATF featured superior anticancer activity over controls(34). This overall suggests that STAT5 signalling and BATF expression in T<sub>H</sub>17 cells turned them into IL-9-producing CD4 T cells with enhanced anticancer potential.

Some other key transcription factors controlling T<sub>H</sub>9 cell differentiation were shown to directly affect their anticancer properties. Nakatsukasa *et al.* reported that the transcription factor *Id3* was a negative regulator of T<sub>H</sub>9 cell differentiation(37). TGF- $\beta$  and

IL-4 accordingly triggered *Id3* downregulation through the activation of the kinase TAK1, thereby allowing IL-9 secretion. Because *Id3*-deficient T cells differentiate into T<sub>H</sub>9 cells following stimulation with TGF- $\beta$  alone, the authors then tested the anticancer potential of those cells using adoptive transfer. They found that *Id3*-deficient T cells prevented melanoma growth *in vivo* in an IL-9-dependent manner, thereby illustrating that *Id3* negatively regulates T<sub>H</sub>9 cell anticancer functions(37). Conversely, Foxo1 was shown to induce IL-9 expression from both T<sub>H</sub>9 and T<sub>H</sub>17 cells(38, 39). Bi *et al.* additionally demonstrated the relevance of the transcription factors *Foxo1* and *Foxp1* in T<sub>H</sub>9 cell differentiation and effector functions in cancer(40). Foxo1 promoted IL-9 secretion from T<sub>H</sub>9 cells and *Foxo1*-deficient T<sub>H</sub>9 cells had reduced antimelanoma activity upon adoptive transfer. *Foxp1*-deficient T<sub>H</sub>9 cells, which secreted higher IL-9 levels compared to control cells, also featured enhanced ability to prevent melanoma growth(40). We subsequently outlined the key contribution of T<sub>H</sub>9 cell-related transcription factors in mediating the anticancer activity of T<sub>H</sub>9 cells. Notably, we showed that the transcription factor interferon regulatory factor 8 (IRF8), which was required for optimal IL-9 production during T<sub>H</sub>9 cell differentiation, also controlled their anticancer properties. Indeed, downregulation of IRF8 expression limited the anticancer activity of T<sub>H</sub>9 cells upon adoptive transfer(41). Likewise, the transcription factor PU.1, which was identified by the group of Mark Kaplan as a key regulator of IL-9-secretion from T<sub>H</sub>9 cells(42), had a decisive role for their anticancer properties. We identified that differentiating T<sub>H</sub>9 cells underwent selective autophagy, which drove the degradation of PU.1, thereby reducing IL-9 secretion and T<sub>H</sub>9 cell anticancer properties(43). Accordingly, blockade of autophagy using chloroquine in differentiating T<sub>H</sub>9 cells enhanced PU.1 expression and favoured their anticancer

activity(43). It is noteworthy that while the vast majority of the aforementioned results were obtained in adoptive transfer studies in the B16 mouse melanoma model, we and others have extended those results to mouse colon and lung tumour models(25, 43), underscoring the potential relevance of T<sub>H</sub>9 cells in these diseases. Altogether, this myriad of studies clearly establishes a direct link between transcription factors responsible for enhanced IL-9 secretion from developing T<sub>H</sub>9 cells and their anticancer activity.

#### **2.4. Cytokine-driven enhancement of T<sub>H</sub>9 cell anticancer functions**

The findings suggesting that some key transcription factors involved in T<sub>H</sub>9 cell differentiation were also essential for T<sub>H</sub>9 cell anticancer properties indicates that therapeutic strategies modulating the T<sub>H</sub>9 cell transcriptional program would be valuable to harness their anticancer potential. IL-7 enhanced T<sub>H</sub>9 cell differentiation and anticancer properties notably through engagement of STAT5 signalling and by facilitating the translocation of Foxo1 to the nucleus(40) (**Figure 1**). We and others additionally explored the ability of proinflammatory cytokines to affect T<sub>H</sub>9 cell differentiation. We identified that IL-1 $\beta$  was promoting the anticancer activities of T<sub>H</sub>9 cells(44). This was due to the induction in T<sub>H</sub>9 cells of the expression of the IRF1 transcription factor, which bound to the *Il9* and *Il21* promoters and transactivated these genes, resulting in IL-9 and IL-21 secretion(44). Overexpression of IRF1 in T<sub>H</sub>9 cells also enhanced their anticancer properties upon adoptive transfer, indicating the key role of IL-1 $\beta$ -induced IRF1 in mediating T<sub>H</sub>9 cell anticancer functions(44) (**Figure 1**). The importance of IL-1 signalling in driving T<sub>H</sub>9 cell development *in vitro* and *in vivo* was confirmed by Xue *et al.*(45). While investigating the cytokines which, together with IL-4, promoted IL-9 secretion from CD4



T cells upon *in vitro* differentiation, they found a strong ability of IL-1 $\beta$  to induce IL-9 secretion from T cells. TGF- $\beta$  was dispensable for this effect. Examination of the transcriptional signatures of IL-9-secreting CD4 T cells differentiated with IL-4 and IL-1 $\beta$  revealed that these cells exhibited a distinct transcriptional program from conventionally differentiated T<sub>H9</sub> cells(45). The former cells indeed preferentially relied on the NF- $\kappa$ B signalling for IL-9 secretion in contrast to T<sub>H9</sub> cells differentiated with TGF- $\beta$  and IL-4. Importantly, adoptive transfer of IL-4 and IL-1 $\beta$ -induced IL-9-producing T cells resulted in enhanced anticancer activity over classical T<sub>H9</sub> cells upon adoptive transfer. Altogether, in echo with early studies(46), recent investigations suggest a key contribution of IL-1 $\beta$  in the anticancer properties of T<sub>H9</sub> cells(**Figure 1**).

Other proinflammatory cytokines were proposed to enhance T<sub>H9</sub> cell anticancer functions. TNF $\alpha$  was shown to enhance IL-9 secretion from T<sub>H9</sub> cells through STAT5 and NF- $\kappa$ B signaling(47)(**Figure 1**). T<sub>H9</sub> cell survival and proliferation were also enhanced upon treatment with TNF $\alpha$ . Finally, TNF $\alpha$  endowed T<sub>H9</sub> cells with anticancer functions upon adoptive transfer *in vivo*. IL-33 was similarly demonstrated to have a major impact on mouse and human T<sub>H9</sub> cell differentiation. The relevance of harnessing T<sub>H9</sub> cells anticancer functions with IL-33 was notably shown in the context of hemopoietic cell transplantation. Ramadan *et al.* found that T<sub>H9</sub> cells induced with IL-33 feature not only enhanced antileukemic activity *in vivo* compared to conventionally differentiated T<sub>H9</sub> cells, but they also prevent graft versus host disease severity(48). Importantly, human IL-33-induced T<sub>H9</sub> cells, which featured enhanced production of granzyme B and perforin compared to conventional T<sub>H9</sub> cells, also featured strong antileukemic activity (**Figure 1**). Thus, in contrast to the activity of IL-9 that can promote the growth of some hematological

tumors as discussed in section 2.1., the anticancer activities of T<sub>H</sub>9 cells can be harnessed in multiple cancers.

## **2.5. Modulation of T<sub>H</sub>9 cell metabolism for anticancer purposes**

While effector T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and T<sub>H</sub>17 cells were shown to rely on glycolysis for their development(49), the metabolic events responsible for the differentiation of T<sub>H</sub>9 cells are still incompletely understood. Wang *et al.* underscored a key contribution of the histone deacetylase SIRT1 in T<sub>H</sub>9 cell differentiation. Using T adoptive transfer studies, they uncovered that the deficiency of SIRT1 in T<sub>H</sub>9 cells not only enhanced their IL-9 secretion but also their anticancer activities. Mechanistically, the absence of SIRT1 augmented T<sub>H</sub>9 cell glycolytic activity through the activation of mTOR/HIF-1 $\alpha$  signalling(50), thus indicating that T<sub>H</sub>9 cells relied on glycolysis for the full acquisition of their effector properties. Additional signalling pathways accounting for the differentiation of T<sub>H</sub>9 cells were recently uncovered. Protein kinase C $\beta$  (PKC- $\beta$ ) was for instance demonstrated to enhance T<sub>H</sub>9 cell differentiation through the engagement of the NF- $\kappa$ B pathway. This event was triggered by the engagement of Fas in differentiating T<sub>H</sub>9 cells, which were endowed with improved anticancer functions upon adoptive transfer(51). Finally, through an elegant proteomic analysis of mouse T<sub>H</sub>0 and T<sub>H</sub>9 cells, the group of Amit Awasthi has identified protein phosphatase PP2A as an important protein in T<sub>H</sub>9 cell differentiation(52). Pharmacological inhibition of PP2A activity reduced IL-9 secretion from differentiating T<sub>H</sub>9 cells and their anticancer activity upon adoptive T cell transfer(52). While the proposed interaction of PP2A with key transcription factors required for T<sub>H</sub>9 cell differentiation suggests that PP2A could be an attractive druggable target to modulate T<sub>H</sub>9 cell differentiation(52), the exact role of PP2A in T<sub>H</sub>9 cells still remains to be

determined. Altogether, these studies highlight that increased knowledge in the signaling events driving T<sub>H</sub>9 cell differentiation can subsequently be exploited for therapeutic purposes.

### **3. T<sub>H</sub>9 cells and cancer immunotherapy strategies**

#### **3.1. Induction of T<sub>H</sub>9 cell anticancer responses in tumor-bearing hosts through vaccination**

As initially reported by Purwar *et al.*, the frequency of tumor-infiltrating T<sub>H</sub>9 cells is low(25), prompting for therapeutic strategies to enhance their induction *in vivo*. Administration of TGF- $\beta$ , IL-4 or IL-33 in mice failed to enhance T<sub>H</sub>9 cell frequency(48). However, other attempts to generate T<sub>H</sub>9 cells *in vivo* using immunization with tumor antigens and immunomodulation were successful. Staphylococcal enterotoxin B (SEB) is a superantigen that potently activates T cells(53). Two studies reported that *in vivo* administration of SEB along with squamous cancer or glioma cell lysates favored T<sub>H</sub>9 cell development(54, 55). In both studies, investigators showed that immunizations led to enhanced IL-9 presence in the serum of treated animals, increased CD4 T cell-derived IL-9 secretion and fostered the generation of antigen-specific T cells. SEB induced primarily a T<sub>H</sub>9 cell response, as illustrated by the cytokine levels of other effector CD4 T cell subsets that were unaffected by the treatments. The vaccine eventually induced antigen-specific T<sub>H</sub>9 cells and triggered tumor elimination in an IL-9-dependent manner. This illustrates the proof of principle that T<sub>H</sub>9-cell derived anticancer immune responses can be induced *in vivo*.

The aforementioned findings are further supported by a study from Abdul-Wahid and colleagues who uncovered an attractive strategy to induce antigen-specific T<sub>H</sub>9 cell responses *in vivo*(56). The carcinoembryonic antigen (CEA) is a glycoprotein that is overexpressed in several cancer types and was targeted for cancer immunotherapy(57). Because CEA is also expressed by normal cells, vaccination strategies need to overcome immune tolerance to self-antigens. Upon investigating strategies to enhance the vaccination efficacy against CEA, Abdul-Wahid *et al.* found that the use of the Toll-like receptor 3 ligand Poly I:C as an adjuvant for mouse immunization with a recombinant CEA N domain yielded much better protection against subsequent MC38-CEA-expressing tumor cells compared to the other adjuvants Alum or Squalene(56). They subsequently noted a correlation between the vaccination efficacy and the induction of CEA-specific T<sub>H</sub>9 cell responses *in vivo*. Neutralization of IL-9 or depletion of T cells in vaccinated mice abrogated the protective effect of vaccination. CD4 T cell depletion yielded similar effects, thereby suggesting a direct involvement of T<sub>H</sub>9 cells in that process. The authors eventually underscored a key contribution of mast cells in the beneficial effects of the vaccine because pharmacological neutralization or targeting of mast cells using cromoglycate or anti-CD117 antibody compromised the efficacy of the vaccine. While the precise mechanisms responsible for the vaccine-driven induction of T<sub>H</sub>9 cells remain elusive, it is notable that this work outlined in a preclinical model an effective vaccination strategy that specifically harnessed the anticancer functions of T<sub>H</sub>9 cells.

### 3.2. T<sub>H</sub>9 cells and dendritic cell-based anticancer therapy

Dendritic cells (DCs) are essential for the induction of T cell activation and the subsequent promotion of anticancer immune responses(58). When investigating the interactions between T<sub>H</sub>9 cells and DCs, Park *et al.* uncovered that the IL-3 secretion from T<sub>H</sub>9 cells was important to promote DC survival and anticancer functions upon adoptive transfer(59). Subsequent studies extended these findings by documenting how DCs drove T<sub>H</sub>9 cell induction *in vivo*. Zhao *et al.* showed that dectin-1 signaling in DCs promoted the development of T<sub>H</sub>9 cell responses(60). Immunization of mice with DCs treated with curdlan, which engages dectin-1 signaling, triggered higher IL-9 levels in the mouse sera compared to control DCs. Recall experiments performed on spleens and lymph nodes from immunized mice using specific antigenic peptides revealed that mice immunized with curdlan-treated DCs featured enhanced IL-9 secretion from CD4 T cells compared to control DCs. Importantly, those effects were not observed with dectin-1-deficient DCs, underscoring the relevance of the engagement of dectin-1 on DCs for T<sub>H</sub>9 cell induction *in vivo*. Finally, authors found that the ability success of curdlan-treated DC to immunize mice against growing melanoma tumors was dependent on IL-9. In line with IL-33 documented ability to potentiate T<sub>H</sub>9 cells *in vivo* anticancer properties(48), they found later that IL-33 was responsible for the induction of T<sub>H</sub>9 cell differentiation and anticancer functions by dectin-1-activated DCs(61). Altogether, these results show that DC activation can be tailored to promote the induction of anticancer T<sub>H</sub>9 cell responses.

This contention was further illustrated by the demonstration that the beneficial effect of the addition of GM-CSF to a cancer vaccine preparation relied on the induction of T<sub>H</sub>9 cell anticancer immunity(62). Upon noting that GM-CSF acted as an adjuvant in the

context of anticancer vaccination, Kim *et al.* found that the potentiation of the anticancer vaccination effect by GM-CSF in melanoma relied on IL-9(62). Further *in vitro* investigations revealed that, while the addition of GM-CSF failed to enhance T<sub>H</sub>9 cell differentiation from naïve T cells activated with anti-CD3 and anti-CD28, it was able to do so if T cells were activated in the presence of APCs, suggesting that GM-CSF acted on DCs to promote T<sub>H</sub>9 cell induction. Similar results were found for human T<sub>H</sub>9 cells. Finally, the transfer of GMCSF-treated DCs was beneficial in preventing tumor outgrowth and induced CD8 T cell anticancer immune responses in IL-9-dependent manner. Overall, these studies indicate that the manipulation of DC biology provides means to induce effective T<sub>H</sub>9 cell anticancer immune responses *in vivo*(62).

### 3.3. T<sub>H</sub>9 cells and immunomodulation through co-signalling receptors

The importance of co-stimulatory molecules in the regulation of T<sub>H</sub>9 cell induction was initially demonstrated by observations that the engagement of tumor necrosis factor receptor superfamily member 4 (OX40) signalling promoted T<sub>H</sub>9 cell differentiation, resulting in enhanced airway inflammation(63). However, few studies investigated the relevance of T cell co-signalling receptors in cancer. The involvement of another member of the TNF receptor superfamily, tumor necrosis factor receptor superfamily member 18 (GITR), in T<sub>H</sub>9 cell differentiation was also assessed. Two studies revealed enhanced T<sub>H</sub>9 cell differentiation upon GITR engagement. Importantly, the anticancer efficacy of GITR triggering *in vivo* by an agonist anti-GITR antibody relied on the induction of T<sub>H</sub>9 cell-driven anticancer immune responses(64, 65)(**Figure 2**). The promotion of GITR signaling in tumor-bearing hosts also reduced the frequency of Treg cells in the tumor

microenvironment (TME), thereby explaining the therapeutic success of the treatment. Thus, GITR engagement could not only induce T<sub>H</sub>9 cell effector responses *in vivo* but also relieved immunosuppression to induce anticancer immunity. More recently, as discussed in section 2.5., the relevance of an additional TNF receptor superfamily member, Fas, in T<sub>H</sub>9 cell differentiation was investigated(51). In contrast to its well-documented function in driving T cell death(66), the engagement of Fas signaling in T<sub>H</sub>9 cells did not affect their proliferation or viability(51). Instead, Fas ligation during naïve CD4 T cell differentiation into T<sub>H</sub>9 cells enhanced their IL-9 secretion and their anticancer functions *in vivo*(51). These results are in line with earlier observations pointing to the ability of Fas signaling to provide a co-stimulation signal to T cells(67). Finally, Nonomura *et al.* suggested that the co-inhibitory receptor PD-1 represses the differentiation of T<sub>H</sub>9 cells(68). Upon stimulating human PBMCs with TGF- $\beta$  and IL-4 in the presence or not of anti-PD-1 or anti-PD-L1 antibodies, they noted enhanced IL-9 secretion from CD4 T cells when PD-1 signaling was blunted(68) **(Figure 2)**. This indicates that T<sub>H</sub>9 cell functions can be enhanced through targeting of co-signaling receptors for therapeutic purposes.

## **4. Clinical relevance of T<sub>H</sub>9 cells in solid tumours**

### **4.1. How to characterize human T<sub>H</sub>9 cells in cancer?**

While mouse T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 and Treg cells were proposed to secrete low levels of IL-9 upon activation(69), T<sub>H</sub>9 cells were characterised as high producers of IL-9 and low producers of T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and T<sub>H</sub>17 cytokines(23). Purwar *et al.* first interrogated whether human T<sub>H</sub>9 cells could be identified in a cancer setting. Following their identification in the blood of human memory T cells secreting IL-9, but not IFN $\gamma$ , IL-4 or IL-17, the authors found that these T<sub>H</sub>9 cells were also present in the skin of healthy donors. T<sub>H</sub>9 cells were also identified in TILs obtained from metastatic melanoma patients' lesions, however at a lower frequency in comparison to healthy skin, suggesting that T<sub>H</sub>9 cell infiltration might be beneficial to prevent melanoma development(25). These findings were later supported by immunohistochemistry analyses performed on human skin cancers. Nonomura *et al.* indeed demonstrated that the presence of IL-9-secreting cells in the TME and their proximity to effector CD8 T cells(68). However, despite the findings of additional investigators demonstrating the existence of human T<sub>H</sub>9 cells and their propensity to migrate to the skin(70), the direct contribution of human T<sub>H</sub>9 cells in cancer remains debated, as discussed further below.

### **4.2. What is the impact of human T<sub>H</sub>9 cells on the tumor microenvironment?**

In human melanoma, a population of double positive (DP) CD4 and CD8 T cells was found to be sensitive to IL-9(71). Those DP T cells expressed high levels of IL-9 receptor in the TME(71). In addition, IL-9 supported their cytokine secretion and killing activity against tumor cells, underscoring overall the beneficial properties of IL-9 on the effector functions of DP T cells in melanoma(71). While these results lent support to



anticancer functions for IL-9 in melanoma, whether T cells are the major source of IL-9 in the TME remains unclear and further research is warranted to determine T<sub>H</sub>9 cell contribution to this disease. You *et al.* investigated how T<sub>H</sub>9 cells shaped breast cancer progression. They initially noted higher levels of IL-9 in the sera of breast cancer patients compared to healthy volunteers. In line with this, PBMCs from patients also featured enhanced IL-9 secretion following activation(72). In addition, the authors revealed that the restimulation of the T<sub>H</sub>9 cells obtained from patients also secreted IL-10 and IL-21. Because IL-9 and IL-21 were both proposed to support CD8 T cell functions(10, 72), the ability of breast cancer patient-derived T<sub>H</sub>9 cells to enhance CD8 T cell cytotoxicity was further investigated. Not only the authors revealed that T<sub>H</sub>9 cells were enhancing the anticancer properties of effector CD8 T cells, but they also uncovered that these observations were dependent on IL-9 and IL-21. Altogether, these findings suggest a beneficial contribution of T<sub>H</sub>9 cells in breast cancer, notably because of their ability to promote CD8 T cell anticancer functions in an IL-9 and IL-21-dependent manner(72). The beneficial functions of T<sub>H</sub>9 cells in cancer were further underscored by Shen *et al.*(51). In a cohort of 36 lung cancer patients, those harboring a low proportion of CD4<sup>+</sup> IL-9<sup>+</sup> (T<sub>H</sub>9) cells in the TME featured a reduced time to recurrence, thereby suggesting a positive role of T<sub>H</sub>9 cells in lung cancer. However, these observations were recently questioned by a report pointing to a detrimental effect of T<sub>H</sub>9 cell in this disease, notably because of an IL-9-dependent contribution to tumor cell growth and metastasis(73). The latter results were reminiscent of two earlier studies showing that T<sub>H</sub>9 cells could promote STAT3 activation and favored the growth of lung and hepatocellular cancer cells(74, 75). While these studies altogether confirm that T<sub>H</sub>9 cells impact both cancer cells and immune cells

present in the TME in human cancers, how these observations ultimately affect patients' survival remains unclear and additional work with larger cohorts of patients is required to resolve this issue.

### **4.3. Human T<sub>H</sub>9 cells: a biomarker of response to immunotherapy?**

As discussed in section 1.1., T cells can not only shape cancer progression, but also affect cancer response to immunotherapy. The later property is important to help defining biomarkers of response to therapy. In a prospective study including 46 melanoma cancer patients treated with anti-PD-1 therapy, the predictive value of the frequency of the different circulating CD4 T cell populations before and after treatment was determined. While authors found no notable differences between responders and non-responders in the frequency of blood T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2, T<sub>H</sub>17 and T<sub>H</sub>22 cells pre- and post-treatment, the levels of circulating T<sub>H</sub>9 cells post-treatment were markedly enhanced in responders(68). In addition, as discussed in section 3.3., human T<sub>H</sub>9 cell effector functions could also be enhanced *in vitro* by blockade of PD-1/PD-L1 signaling(68). The effector functions of infiltrating T<sub>H</sub>9 cells in colon cancer were also controlled through the PD-1/PD-L1 pathway(76). These findings thus underscore the potential use of T<sub>H</sub>9 cells as a biomarker of efficacy following anti-PD-1 therapy. It is noteworthy that following the treatment of metastatic melanoma patients with adoptive TIL therapy, IL-9 serum levels before TIL infusion was proposed to predict the response to the treatment(77). Although further research is warranted to establish the predictive value of IL-9 and T<sub>H</sub>9 cells in other cancer and treatment types (discussed in (78) and (79)), this suggests that the potential predictive value of T<sub>H</sub>9 cells might extend to other immunotherapies.

## 5. Conclusions

Since the characterization of T<sub>H</sub>9 cells in 2008, substantial progress has been made into understanding the molecular mechanisms accounting for their superior anticancer functions. In preclinical models, this has resulted in the identification of therapeutic strategies that were able to harness T<sub>H</sub>9 cell anticancer functions *in vivo*. It is notable that the anticancer activity of T<sub>H</sub>9 cells was frequently established in adoptive transfer settings. In a setting mimicking the clinical situation, we and others showed that the adoptive transfer of T<sub>H</sub>9 cells in melanoma-bearing mice previously treated with cyclophosphamide led to remarkable anticancer effects(44, 80). The strong anticancer functions of T<sub>H</sub>9 cells in this context was attributable to their ability to resist the TME-driven T cell dysfunction and their long-term persistence *in vivo*(80). Likewise, human chimeric antigen receptor (CAR) T cells featured a potent anticancer activity *in vivo* when stimulated with the T<sub>H</sub>9-cell-inducing cytokines TGF- $\beta$  and IL-4(81). This suggests that T<sub>H</sub>9 cells may be an attractive candidate for evaluation in the adoptive T cell therapy of cancer in a clinical setting.

While human T<sub>H</sub>9 cells have been identified in several human cancer types, the delineation of their contribution awaits further clinical investigations with larger cohorts of patients. However, the mouse and human findings indicating that PD-1 signalling restricts the anticancer functions of T<sub>H</sub>9 cells are particularly intriguing. Because of the medical importance of anti-PD-1 therapy in cancer immunotherapy strategies, these observations provide impetus for further evaluating whether human T<sub>H</sub>9 cells are contributing to and/or reflecting the success of this therapeutic venue.

## Figure Legends

### Figure 1. Harnessing T<sub>H</sub>9 cell anticancer properties through cytokines

T<sub>H</sub>9 cell effector functions can be mobilized through the addition of different cytokines. Under T<sub>H</sub>9-skewing conditions, selected cytokines promote a cascade of intracellular signalling events that ultimately result in enhanced transcription of the *IL9* gene, IL-9 secretion and T<sub>H</sub>9-cell mediated anticancer effects. **A)** IL-7 promotes T<sub>H</sub>9 cell anticancer effects through Stat5 and the translocation of Foxo1 to the nucleus(40). **B)** IL-1 $\beta$  drives the phosphorylation of Stat1, which then triggers Irf1 binding to the *IL9* and *IL21* promoters and subsequent secretion of IL-9 and IL-21(44). **C)** In the absence of TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$  and IL-4 promote the secretion of IL-9 in an NF- $\kappa$ B (p65)-dependent manner(45). **D)** The ability of TNF $\alpha$  to enhance T<sub>H</sub>9 cell differentiation relies on Stat5 and NF- $\kappa$ B signalling(47). While the binding of p50 is shown here, the binding of three dimers c-Rel-p50, p50-RelB and p52-RelB was reported(47). **E)** IL-33 drives increased expression of the transcription factor PU.1 and harnesses T<sub>H</sub>9 cell anticancer functions as reflected with large release of IL-9, Granzyme B (GrzmB) and enhanced T<sub>H</sub>9-cell mediated killing activity(48).

### Figure 2. Harnessing T<sub>H</sub>9 cell anticancer properties through co-receptor signalling

The mechanisms explaining how co-stimulatory or co-inhibitory receptors can be exploited to harness T<sub>H</sub>9 cell functions are progressively unravelled. **A)** Engagement of GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor) in differentiating T<sub>H</sub>9 cells promotes the activation of NF- $\kappa$ B signalling and enhances their IL-9 secretion and anticancer activity(64). **B)** Antibody-mediated prevention of the interactions PD-1

(programmed cell death protein 1) with PD-1 ligands restores human T<sub>H</sub>9 cell effector functions(68). APC: Antigen-presenting Cell. PD-L1: Programmed death-ligand 1

### **Author contributions**

L.A. drafted the manuscript and the figures. I.B.L. edited manuscript and the figures. L.A. and I.B.L. approved the final paper. Figures were created with BioRender.com.

### **Conflict of Interest Statement**

L.A. has performed consultancy work for Roche, Merck, and Bristol-Myers Squibb. L.A. was a recipient of a research grant from Sanofi.

### **Funding**

This work was funded by grants from the Conseil Régional de Bourgogne and FEDER, the Agence Nationale de la Recherche [ANR-11-LABX-0021], the Acteria Foundation, the European Research Council (ERC) (grant agreement N°677251) and the Fondation ARC [DOC20190509200].

### **References**

1. Burnet M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J*. 1957;1(5022):779-86.
2. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.
3. Rosenberg SA, Restifo NP. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science*. 2015;348(6230):62-8.
4. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005;353(25):2654-66.
5. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science*. 2006;313(5795):1960-4.
6. Pagès F, Mlecnik B, Marliot F, Bindea G, Ou FS, Bifulco C, et al. International validation of the consensus Immunoscore for the classification of colon cancer: a prognostic and accuracy study. *Lancet*. 2018;391(10135):2128-39.

7. Dosset M, Joseph EL, Rivera Vargas T, Apetoh L. Modulation of Determinant Factors to Improve Therapeutic Combinations with Immune Checkpoint Inhibitors. *Cells*. 2020;9(7).
8. Tumei PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*. 2014;515(7528):568-71.
9. Ferris ST, Durai V, Wu R, Theisen DJ, Ward JP, Bern MD, et al. cDC1 prime and are licensed by CD4+ T cells to induce anti-tumour immunity. *Nature*. 2020;584(7822):624-9.
10. Zander R, Schauder D, Xin G, Nguyen C, Wu X, Zajac A, et al. CD4+ T Cell Help Is Required for the Formation of a Cytolytic CD8+ T Cell Subset that Protects against Chronic Infection and Cancer. *Immunity*. 2019;51(6):1028-42.e4.
11. Apetoh L, Smyth MJ, Drake CG, Abastado JP, Apte RN, Ayyoub M, et al. Consensus nomenclature for CD8 + T cell phenotypes in cancer. *Oncoimmunology*. 2015;4(4):e998538.
12. Hunder NN, Wallen H, Cao J, Hendricks DW, Reilly JZ, Rodmyre R, et al. Treatment of metastatic melanoma with autologous CD4+ T cells against NY-ESO-1. *N Engl J Med*. 2008;358(25):2698-703.
13. Zuazo M, Arasanz H, Fernández-Hinojal G, García-Granda MJ, Gato M, Bocanegra A, et al. Functional systemic CD4 immunity is required for clinical responses to PD-L1/PD-1 blockade therapy. *EMBO Mol Med*. 2019;11(7):e10293.
14. Kagamu H, Kitano S, Yamaguchi O, Yoshimura K, Horimoto K, Kitazawa M, et al. CD4 + T-cell Immunity in the Peripheral Blood Correlates with Response to Anti-PD-1 Therapy. *Cancer Immunol Res*. 2020;8(3):334-44.
15. Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):811-6.
16. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136(7):2348-57.
17. Fridman WH, Zitvogel L, Sautès-Fridman C, Kroemer G. The immune contexture in cancer prognosis and treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2017;14(12):717-34.
18. Fridman WH, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012;12(4):298-306.
19. Muranski P, Borman ZA, Kerkar SP, Klebanoff CA, Ji Y, Sanchez-Perez L, et al. Th17 cells are long lived and retain a stem cell-like molecular signature. *Immunity*. 2011;35(6):972-85.
20. Wang L, Yi T, Kortylewski M, Pardoll DM, Zeng D, Yu H. IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med*. 2009;206(7):1457-64.
21. Berger H, Végran F, Chikh M, Gilardi F, Ladoire S, Bugaut H, et al. SOCS3 transactivation by PPAR $\gamma$  prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer Res*. 2013;73(12):3578-90.
22. Martin F, Apetoh L, Ghiringhelli F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF- $\beta$ -dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol Med*. 2012;18(12):742-9.
23. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1347-55.
24. Veldhoen M, Uyttenhove C, van Snick J, Helmby H, Westendorf A, Buer J, et al. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol*. 2008;9(12):1341-6.

25. Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, Kang HS, Elyaman W, Jiang X, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med*. 2012;18(8):1248-53.
26. Lu Y, Hong S, Li H, Park J, Hong B, Wang L, et al. Th9 cells promote antitumor immune responses in vivo. *J Clin Invest*. 2012;122(11):4160-71.
27. Almeida RR, Vieira RS, Castoldi A, Terra FF, Melo ACL, Canesso MCC, et al. Host dysbiosis negatively impacts IL-9-producing T-cell differentiation and antitumour immunity. *Br J Cancer*. 2020;123(4):534-41.
28. Apetoh L. Anticancer effects of the microbiota: how the microbiome shapes the development of IL-9-producing T cells. *Br J Cancer*. 2020;123(4):497-8.
29. Uyttenhove C, Simpson RJ, Van Snick J. Functional and structural characterization of P40, a mouse glycoprotein with T-cell growth factor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(18):6934-8.
30. Schmitt E, Germann T, Goedert S, Hoehn P, Huels C, Koelsch S, et al. IL-9 production of naive CD4+ T cells depends on IL-2, is synergistically enhanced by a combination of TGF-beta and IL-4, and is inhibited by IFN-gamma. *J Immunol*. 1994;153(9):3989-96.
31. Matsushita K, Arima N, Ohtsubo H, Fujiwara H, Hidaka S, Fukumori J, et al. Frequent expression of interleukin-9 mRNA and infrequent involvement of interleukin-9 in proliferation of primary adult T-cell leukemia cells and HTLV-I infected T-cell lines. *Leuk Res*. 1997;21(3):211-6.
32. Fischer M, Bijman M, Molin D, Cormont F, Uyttenhove C, van Snick J, et al. Increased serum levels of interleukin-9 correlate to negative prognostic factors in Hodgkin's lymphoma. *Leukemia*. 2003;17(12):2513-6.
33. Renaud JC, van der Lugt N, Vink A, van Roon M, Godfraind C, Warnier G, et al. Thymic lymphomas in interleukin 9 transgenic mice. *Oncogene*. 1994;9(5):1327-32.
34. Fu Y, Wang J, Panangipalli G, Ulrich BJ, Koh B, Xu C, et al. STAT5 promotes accessibility and is required for BATF-mediated plasticity at the Il9 locus. *Nat Commun*. 2020;11(1):4882.
35. Hou J, Schindler U, Henzel WJ, Wong SC, McKnight SL. Identification and purification of human Stat proteins activated in response to interleukin-2. *Immunity*. 1995;2(4):321-9.
36. Houssiau FA, Renaud JC, Fibbe WE, Van Snick J. IL-2 dependence of IL-9 expression in human T lymphocytes. *J Immunol*. 1992;148(10):3147-51.
37. Nakatsukasa H, Zhang D, Maruyama T, Chen H, Cui K, Ishikawa M, et al. The DNA-binding inhibitor Id3 regulates IL-9 production in CD4(+) T cells. *Nat Immunol*. 2015;16(10):1077-84.
38. Malik S, Sadhu S, Elesela S, Pandey RP, Chawla AS, Sharma D, et al. Transcription factor Foxo1 is essential for IL-9 induction in T helper cells. *Nat Commun*. 2017;8(1):815.
39. Malik S, Awasthi A. Transcriptional Control of Th9 Cells: Role of Foxo1 in Interleukin-9 Induction. *Front Immunol*. 2018;9:995.
40. Bi E, Ma X, Lu Y, Yang M, Wang Q, Xue G, et al. Foxo1 and Foxp1 play opposing roles in regulating the differentiation and antitumor activity of TH9 cells programmed by IL-7. *Sci Signal*. 2017;10(500).
41. Humblin E, Thibaudin M, Chalmin F, Derangère V, Limagne E, Richard C, et al. IRF8-dependent molecular complexes control the Th9 transcriptional program. *Nat Commun*. 2017;8(1):2085.

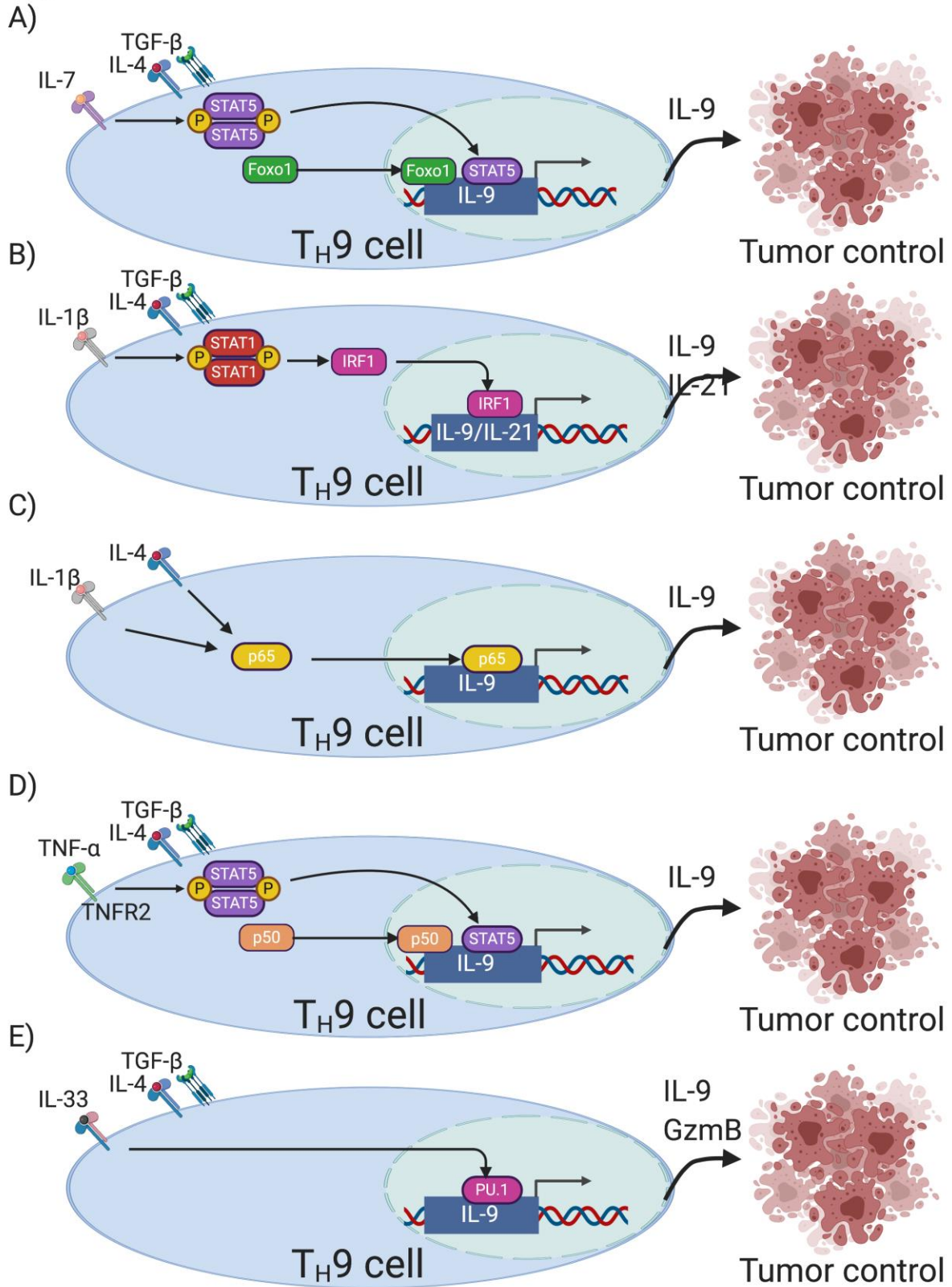


42. Chang HC, Sehra S, Goswami R, Yao W, Yu Q, Stritesky GL, et al. The transcription factor PU.1 is required for the development of IL-9-producing T cells and allergic inflammation. *Nat Immunol.* 2010;11(6):527-34.
43. Rivera Vargas T, Cai Z, Shen Y, Dosset M, Benoit-Lizon I, Martin T, et al. Selective degradation of PU.1 during autophagy represses the differentiation and antitumor activity of TH9 cells. *Nat Commun.* 2017;8(1):559.
44. 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. *Nat Immunol.* 2014;15(8):758-66.
45. Xue G, Jin G, Fang J, Lu Y. IL-4 together with IL-1 $\beta$  induces antitumor Th9 cell differentiation in the absence of TGF- $\beta$  signaling. *Nat Commun.* 2019;10(1):1376.
46. Schmitt E, Beuscher HU, Huels C, Monteyne P, van Brandwijk R, van Snick J, et al. IL-1 serves as a secondary signal for IL-9 expression. *J Immunol.* 1991;147(11):3848-54.
47. Jiang Y, Chen J, Bi E, Zhao Y, Qin T, Wang Y, et al. TNF- $\alpha$  enhances Th9 cell differentiation and antitumor immunity via TNFR2-dependent pathways. *J Immunother Cancer.* 2019;7(1):28.
48. Ramadan A, Griesenauer B, Adom D, Kapur R, Hanenberg H, Liu C, et al. Specifically differentiated T cell subset promotes tumor immunity over fatal immunity. *J Exp Med.* 2017;214(12):3577-96.
49. Waickman AT, Powell JD. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *Immunol Rev.* 2012;249(1):43-58.
50. Wang Y, Bi Y, Chen X, Li C, Li Y, Zhang Z, et al. Histone Deacetylase SIRT1 Negatively Regulates the Differentiation of Interleukin-9-Producing CD4(+) T Cells. *Immunity.* 2016;44(6):1337-49.
51. Shen Y, Song Z, Lu X, Ma Z, Lu C, Zhang B, et al. Fas signaling-mediated th9 cell differentiation favors bowel inflammation and antitumor functions. *Nat Commun.* 2019;10(1):2924.
52. Roy S, Goel R, Aggarwal S, Asthana S, Yadav AK, Awasthi A. Proteome analysis revealed the essential functions of protein phosphatase PP2A in the induction of Th9 cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):10992.
53. Peavy DL, Adler WH, Smith RT. The mitogenic effects of endotoxin and staphylococcal enterotoxin B on mouse spleen cells and human peripheral lymphocytes. *J Immunol.* 1970;105(6):1453-8.
54. Miao BP, Zhang RS, Sun HJ, Yu YP, Chen T, Li LJ, et al. Inhibition of squamous cancer growth in a mouse model by Staphylococcal enterotoxin B-triggered Th9 cell expansion. *Cell Mol Immunol.* 2017;14(4):371-9.
55. Zheng H, Yang B, Xu D, Wang W, Tan J, Sun L, et al. Induction of specific T helper-9 cells to inhibit glioma cell growth. *Oncotarget.* 2017;8(3):4864-74.
56. Abdul-Wahid A, Cydzik M, Prodeus A, Alwash M, Stanojic M, Thompson M, et al. Induction of antigen-specific TH 9 immunity accompanied by mast cell activation blocks tumor cell engraftment. *Int J Cancer.* 2016;139(4):841-53.
57. Berinstein NL. Carcinoembryonic antigen as a target for therapeutic anticancer vaccines: a review. *J Clin Oncol.* 2002;20(8):2197-207.
58. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998;392(6673):245-52.

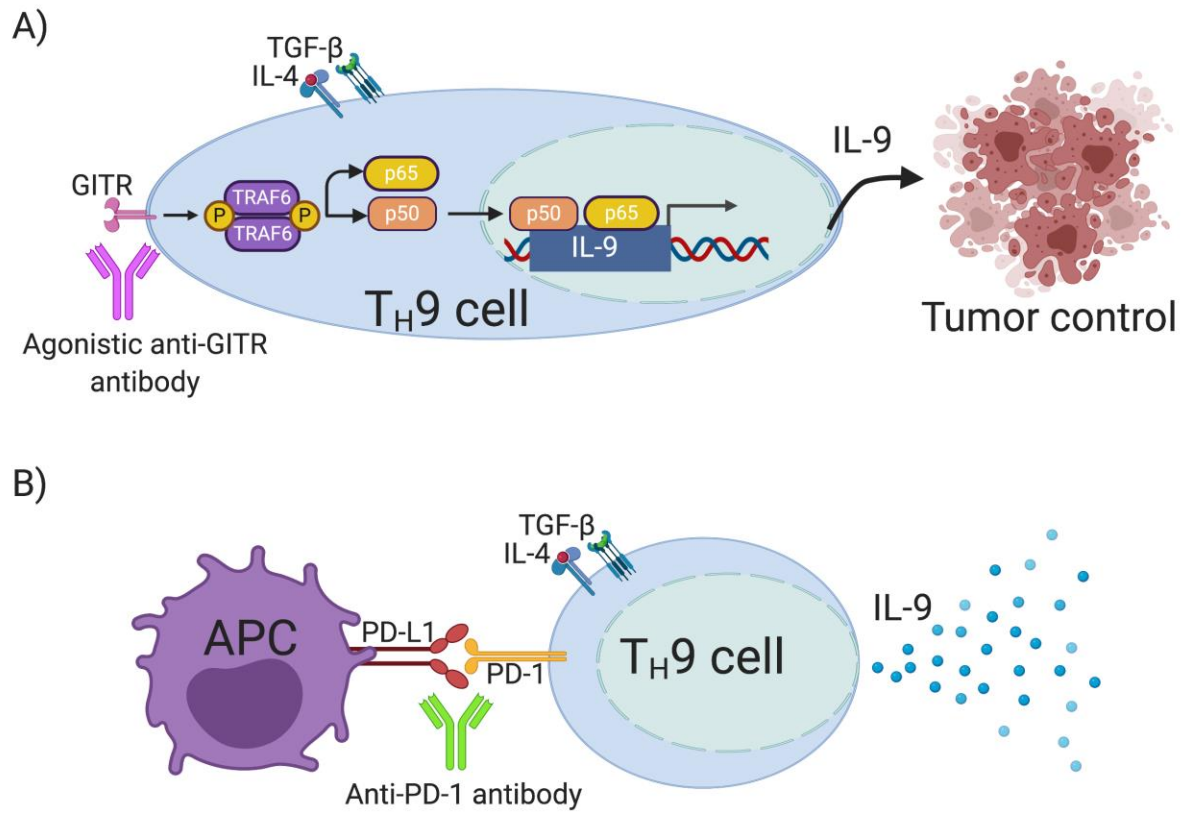
59. Park J, Li H, Zhang M, Lu Y, Hong B, Zheng Y, et al. Murine Th9 cells promote the survival of myeloid dendritic cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2014;63(8):835-45.
60. Zhao Y, Chu X, Chen J, Wang Y, Gao S, Jiang Y, et al. Dectin-1-activated dendritic cells trigger potent antitumor immunity through the induction of Th9 cells. *Nat Commun.* 2016;7:12368.
61. Chen J, Zhao Y, Jiang Y, Gao S, Wang Y, Wang D, et al. Interleukin-33 Contributes to the Induction of Th9 Cells and Antitumor Efficacy by Dectin-1-Activated Dendritic Cells. *Front Immunol.* 2018;9:1787.
62. Kim IK, Koh CH, Jeon I, Shin KS, Kang TS, Bae EA, et al. GM-CSF Promotes Antitumor Immunity by Inducing Th9 Cell Responses. *Cancer Immunol Res.* 2019;7(3):498-509.
63. Xiao X, Balasubramanian S, Liu W, Chu X, Wang H, Taparowsky EJ, et al. OX40 signaling favors the induction of T(H)9 cells and airway inflammation. *Nat Immunol.* 2012;13(10):981-90.
64. Kim IK, Kim BS, Koh CH, Seok JW, Park JS, Shin KS, et al. Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related protein co-stimulation facilitates tumor regression by inducing IL-9-producing helper T cells. *Nat Med.* 2015;21(9):1010-7.
65. Xiao X, Shi X, Fan Y, Zhang X, Wu M, Lan P, et al. GITR subverts Foxp3(+) Tregs to boost Th9 immunity through regulation of histone acetylation. *Nat Commun.* 2015;6:8266.
66. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature.* 1995;373(6513):441-4.
67. Alderson MR, Armitage RJ, Maraskovsky E, Tough TW, Roux E, Schooley K, et al. Fas transduces activation signals in normal human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1993;178(6):2231-5.
68. Nonomura Y, Otsuka A, Nakashima C, Seidel JA, Kitoh A, Dainichi T, et al. Peripheral blood Th9 cells are a possible pharmacodynamic biomarker of nivolumab treatment efficacy in metastatic melanoma patients. *Oncoimmunology.* 2016;5(12):e1248327.
69. Nowak EC, Weaver CT, Turner H, Begum-Haque S, Becher B, Schreiner B, et al. IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med.* 2009;206(8):1653-60.
70. Schlapbach C, Gehad A, Yang C, Watanabe R, Guenova E, Teague JE, et al. Human TH9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. *Sci Transl Med.* 2014;6(219):219ra8.
71. Parrot T, Allard M, Oger R, Benlalam H, Raingeard de la Blétière D, Coutolleau A, et al. IL-9 promotes the survival and function of human melanoma-infiltrating CD4(+) CD8(+) double-positive T cells. *Eur J Immunol.* 2016;46(7):1770-82.
72. You FP, Zhang J, Cui T, Zhu R, Lv CQ, Tang HT, et al. Th9 cells promote antitumor immunity via IL-9 and IL-21 and demonstrate atypical cytokine expression in breast cancer. *Int Immunopharmacol.* 2017;52:163-7.
73. Salazar Y, Zheng X, Brunn D, Raifer H, Picard F, Zhang Y, et al. Microenvironmental Th9 and Th17 lymphocytes induce metastatic spreading in lung cancer. *J Clin Invest.* 2020;130(7):3560-75.
74. Ye ZJ, Zhou Q, Yin W, Yuan ML, Yang WB, Xiong XZ, et al. Differentiation and immune regulation of IL-9-producing CD4+ T cells in malignant pleural effusion. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186(11):1168-79.

75. Tan H, Wang S, Zhao L. A tumour-promoting role of Th9 cells in hepatocellular carcinoma through CCL20 and STAT3 pathways. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(2):213-21.
76. Wang C, Lu Y, Chen L, Gao T, Yang Q, Zhu C, et al. Th9 cells are subjected to PD-1/PD-L1-mediated inhibition and are capable of promoting CD8 T cell expansion through IL-9R in colorectal cancer. *Int Immunopharmacol.* 2020;78:106019.
77. Forget MA, Haymaker C, Hess KR, Meng YJ, Creasy C, Karpinets T, et al. Prospective Analysis of Adoptive TIL Therapy in Patients with Metastatic Melanoma: Response, Impact of Anti-CTLA4, and Biomarkers to Predict Clinical Outcome. *Clin Cancer Res.* 2018;24(18):4416-28.
78. Lee J, Lozano-Ruiz B, Yang FM, Fan DD, Shen L, González-Navajas JM. The Multifaceted Role of Th1, Th9, and Th17 Cells in Immune Checkpoint Inhibition Therapy. *Front Immunol.* 2021;12:625667.
79. Zheng N, Lu Y. Targeting the IL-9 pathway in cancer immunotherapy. *Hum Vaccin Immunother.* 2020;16(10):2333-40.
80. Lu Y, Wang Q, Xue G, Bi E, Ma X, Wang A, et al. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4(+) T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell.* 2018;33(6):1048-60 e7.
81. Liu L, Bi E, Ma X, Xiong W, Qian J, Ye L, et al. Enhanced CAR-T activity against established tumors by polarizing human T cells to secrete interleukin-9. *Nat Commun.* 2020;11(1):5902.

# Figure 1



## Figure 2



## Selective autophagy restricts IL-9 secretion from T<sub>H</sub>9 cells: relevance in cancer growth

Isis Benoit-Lizon<sup>a,b</sup>, Elise Jacquin<sup>a,b</sup> and Lionel Apetoh<sup>a,b,c</sup>

<sup>a</sup>INSERM, U1231, Dijon 21000, France; <sup>b</sup>Université de Bourgogne Franche Comté, Dijon 21000, France; <sup>c</sup>Centre Georges François Leclerc, Dijon 21000, France

**ARTICLE HISTORY** Received 22 November 2017; Accepted 5 December 2017

**KEYWORDS** Autophagy; cancer; adaptive immunity; T cells; IL-9

Autophagy is a cellular process by which cytosolic constituents are sequestered in a double-membrane, the phagophore, which elongates to form a membrane bound autophagosome. After fusion with lysosomes, the content of the autolysosome is degraded. Under stress conditions, autophagy can serve as a survival mechanism through the non-selective degradation of cytosolic constituents for recycling. In tumors and tumor microenvironment, autophagy is induced by metabolic stress. While the role of autophagy in the biology of cancer cells has been abundantly discussed [1], its function in tumor-infiltrating immune cells has received less attention. In particular, the putative contribution of autophagy to the differentiation of CD4 T cells, an essential event that shapes adaptive immune responses, is incompletely understood. How can autophagy affect CD4 T cell fate? What are the consequences of this biological process for anticancer immune responses?

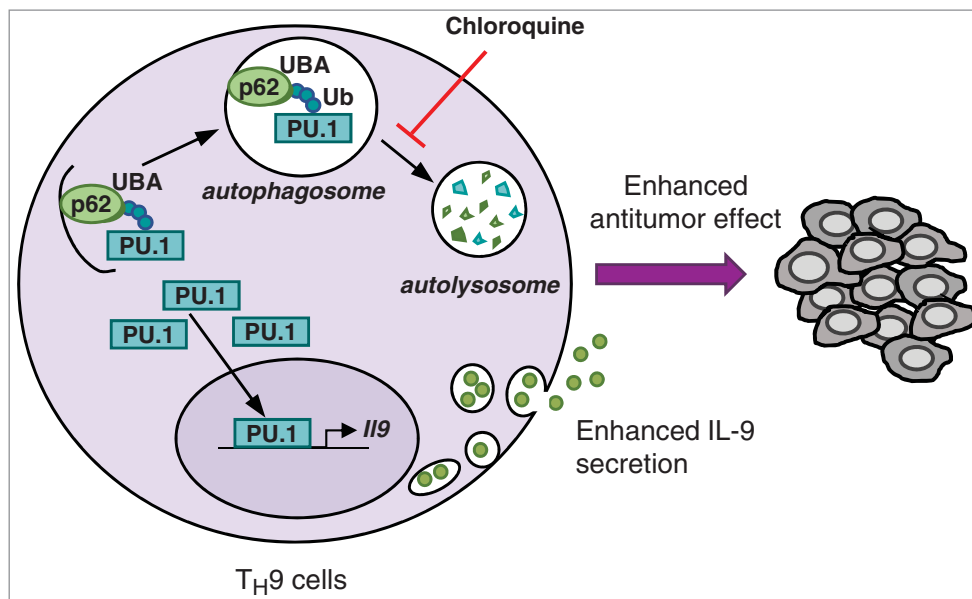
Early investigations revealed that T cell receptor stimulation induces autophagy, which contributes to T cell survival and antigen-dependent proliferation. Li et al. accordingly detected autophagosomes in activated T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 effector cells that were differentiated in vitro from naive T cells [2]. More recently, Wei et al. found that autophagy controlled the survival and stability of regulatory T cells [3]. However, the contribution of autophagy to the differentiation of effector T cells from naive T cells remains unclear.

Our study showed that while autophagy failed to modulate T<sub>H</sub>1, T<sub>H</sub>2 and T<sub>H</sub>17 cell differentiation, it markedly dampened IL-9 secretion from T<sub>H</sub>9 cells [4]. Given that we and others previously ascribed potent anticancer effects to T<sub>H</sub>9 cells [5], this

finding suggested that autophagy could restrict T<sub>H</sub>9 cell anti-cancer properties. We explored the mechanisms responsible for these observations and found that PU.1, the master T<sub>H</sub>9 cell transcription factor, is recruited by p62 to be degraded through selective autophagy (Figure 1). In line with this, T<sub>H</sub>9 cells treated with chloroquine, which inhibits lysosomal function and autophagic degradation, have increased IL-9 secretion and anticancer effects. We eventually showed that genetic autophagy inhibition in T cells leads to IL-9-dependent inhibition of tumor growth in mice bearing MC38 colon cancer and B16 melanoma [4].

While these results lend further support to the anticancer functions played by T<sub>H</sub>9 cells, they suggest that the induction of autophagy in tumor microenvironment represses T<sub>H</sub>9 cell development and/or function. These findings are actually in line with previous studies indicating low frequencies of T<sub>H</sub>9 cells in mouse and human tumor lesions [6]. The blockade of autophagy in vivo may thus restore anticancer immunity not only by disrupting the stability of regulatory T cells but also by promoting T<sub>H</sub>9 cell-dependent anticancer immune responses.

Beyond their activity in cancer, T<sub>H</sub>9 cells can promote tissue inflammation. Indeed, they have first been described to induce colitis in mice [7], and subsequent studies showed that IL-9 expression is significantly higher in patients with inflammatory bowel disease. Conversely, autophagy can downregulate inflammation, as illustrated by the promotion of intestinal inflammation in the absence of autophagy. Our findings thus raise the hypothesis that autophagy possibly controls inflammation by repressing T<sub>H</sub>9 cell inflammatory properties.



**Figure 1.** Selective autophagy prevents TH9 cell differentiation. During TH9 cell differentiation ubiquitinated (Ub) PU.1 is recruited by p62, which recognizes K63 ubiquitination through its UBA domain. PU.1 is then degraded by selective autophagy, which leads to reduced IL-9 expression and anticancer immune responses in the tumor microenvironment. Chloroquine treatment, which inhibits lysosomal functions, prevents PU.1 degradation and drives enhanced TH9 cell-derived IL-9 secretion and anticancer effects.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Funding

Agence Nationale de la Recherche [ANR-13-JSV3-0001]; H2020 European Research Council [677251]; Fondation pour la Recherche Médicale [ARF20170938687].

### References

- [1] White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest.* 2015;125(1):42–46. doi:10.1172/JCI73941. PMID:25654549.
- [2] Li C, Capan E, Zhao Y, et al. Autophagy is induced in CD4+ T cells and important for the growth factor-withdrawal cell death. *J Immunol.* 2006;177(8):5163–5168. doi:10.4049/jimmunol.177.8.5163. PMID:17015701.
- [3] Wei J, Long L, Yang K, et al. Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis. *Nat Immunol.* 2016;17:277–285. doi:10.1038/ni.3365. PMID:26808230.
- [4] Rivera Vargas T, Cai Z, Shen Y, et al. Selective degradation of PU.1 during autophagy represses the differentiation and antitumor activity of TH9 cells. *Nat Commun.* 2017;8(1):559. doi:10.1038/s41467-017-00468-w. PMID:28916785.
- [5] Végran F, Berger H, Boidot R, et al. The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat Immunol.* 2014;15(8):758–766. doi:10.1038/ni.2925. PMID:24973819.
- [6] Purwar R, Schlapbach C, Xiao S, et al. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med.* 2012;18:1248–1253. doi:10.1038/nm.2856. PMID: 22772464.
- [7] Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, et al. IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat Immunol.* 2008;9(12):1347–1355. doi:10.1038/ni.1677. PMID:18997793.

## **Annexe 7 : Liste des communications orales et posters**

- STING activation cell-intrinsically modulates CD4 T cell differentiation and enhances the antitumor activity of Th1 and Th9 cells [Communication orale]. Canceropôle Grand-Est 11<sup>th</sup> Forum ; 15-16 Novembre 2018 ; Reims, France
- STING activation cell-intrinsically modulates CD4 T cell differentiation and enhances the antitumor activity of Th9 cells [Poster]. Keystone Symposia - Cancer Immunotherapy: Mechanistic Insights to Improve Clinical Benefit ; 10-14 Mars 2019 ; Whistler, Canada
- STING activation cell-intrinsically modulates CD4 T cell differentiation and enhances the antitumor activity of Th1 and Th9 cells [Communication orale]. Forum des Jeunes Chercheurs (FJC) 25th Edition ; 13-14 Juin 2019 ; Dijon, France
- STING Activation Modulates CD4 T Cell Differentiation and Enhances the Antitumor Activity of Th9 Cells [Communication orale]. FOCIS 2019 ; 18-21 June 2019 ; Boston, Massachusetts, USA



**Titre :** Etude du rôle de STING dans la biologie des lymphocytes T CD4 : applications en immunothérapie anticancéreuse

**Mots clés :** CD4 - STING - Cancer

**Résumé :** La reconnaissance des signaux de danger par les récepteurs PRR exprimés par les cellules immunitaires innées est cruciale pour la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative efficace. STING (Stimulator of Interferon genes) est une protéine localisée dans le réticulum endoplasmique caractérisée en 2008 comme étant indispensable pour la détection des ADNs cytosoliques et l'établissement d'une réponse immunitaire antivirale médiée par les Interférons (IFN) de type I. La protéine STING joue également un rôle clé dans la mise en place des réponses immunitaires antitumorales spontanées et l'administration de ligands de STING chez des souris porteuses de tumeurs permet le contrôle de la croissance tumorale. Ces observations sont vérifiées dans le cadre d'essais cliniques chez des patients atteints de mélanome, illustrant le potentiel thérapeutique de l'activation de STING en immunothérapie anticancéreuse.

Toutefois, les mécanismes expliquant l'efficacité antitumorale des ligands de STING restent peu clairs. In vivo, les ligands de STING conduisent à l'activation des cellules dendritiques qui sont ensuite responsables de la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Si les lymphocytes T CD8 cytotoxiques présentent de fortes propriétés antitumorales, les lymphocytes T CD4, dits auxiliaires, sont également essentiels pour la mise en place d'une réponse immunitaire antitumorale efficace. La voie de signalisation STING a surtout été décrite dans les cellules myéloïdes. Néanmoins, plusieurs études ont montré que celle-ci était fonctionnelle au sein des lymphocytes T. Le rôle intrinsèque de STING sur les propriétés effectrices et antitumorales des lymphocytes T CD4 reste cependant mal caractérisé [...]. Mes travaux de thèse ont pour but d'étudier le rôle de STING dans la biologie des lymphocytes T CD4 et les potentielles applications en immunothérapie anticancéreuse.

**Title :** Role of STING in the biology of CD4 T lymphocytes: applications in anticancer immunotherapy

**Keywords :** CD4 - STING - Cancer

**Abstract:** Recognition of danger signals by intracellular or extracellular receptors expressed by innate immune cells is crucial for the establishment of an effective adaptive immune response. STING (Stimulator of Interferon Genes) is a protein located in the endoplasmic reticulum discovered in 2008 as being essential for the detection of cytosolic DNAs and the establishment of antiviral immune response mediated by type I interferons (IFNs). The STING protein also plays a key role in spontaneous anti-tumor immune responses and the administration of STING ligands in tumor-bearing mice favors tumor growth control. These observations have been verified in clinical trials in patients with melanoma, illustrating the therapeutic potential of activating STING in cancer immunotherapy.

However, the mechanisms explaining the antitumor efficacy of STING ligands remain unclear. In vivo, STING ligands lead to dendritic cell activation. Dendritic cells are then responsible for setting up the adaptive immune response. While cytotoxic CD8 T lymphocytes have strong anti-tumor properties, helper CD4 T lymphocytes are also essential for the establishment of an effective anti-tumor immune response. The STING signaling pathway has mainly been described in myeloid cells, however several studies have shown that STING signaling pathway is functional in T lymphocytes. However, the intrinsic role of STING on the effector and antitumor properties of CD4 T lymphocytes remains unclear [...]. My work aims to study the role of STING in CD4 T cell biology and its potential applications in cancer immunotherapy.