



HAL
open science

Identification des fonctions non-canoniques de NLRP3 dans les Th17 - Intérêts thérapeutiques pour promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale

Théo Accogli

► **To cite this version:**

Théo Accogli. Identification des fonctions non-canoniques de NLRP3 dans les Th17 - Intérêts thérapeutiques pour promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale. Biochimie [q-bio.BM]. Université Bourgogne Franche-Comté, 2021. Français. NNT : 2021UBFCI025 . tel-04086844

HAL Id: tel-04086844

<https://theses.hal.science/tel-04086844>

Submitted on 2 May 2023

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.



UBFC

UNIVERSITÉ
BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ



ÉCOLE DOCTORALE
Environnements - Santé



THÈSE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Bourgogne Franche-Comté

Discipline : *Sciences Vie*

Spécialités : *Immunologie, Biologie Cellulaire et Moléculaire*

Présentée et Soutenue publiquement par

Théo ACCOGLI

Le 15 Octobre 2021 à Dijon

UFR des Sciences de Santé, 7 bd Jeanne d'Arc

Identification des fonctions non-canoniques de NLRP3 dans les Th17 – Intérêts thérapeutiques pour promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale

Directeurs de thèse

Dr Frédérique Végran

Pr François Ghiringhelli

Membres du Jury :

Dr Marie-Caroline Dieu-Nosjean

Dr Virginie Pétrilli

Pr Christophe Borg

Pr Éric Tartour

Dr Frédérique Végran

Pr François Ghiringhelli

Rapportrice

Rapportrice

Président du Jury et Examineur

Examineur

Co-Directrice de Thèse

Directeur de Thèse



« L'ignorance rend plus sûr de soi que la connaissance »

Le goût du vrai – **Etienne Klein**

« Une théorie qui n'est réfutable par aucun événement qui se puisse concevoir est dépourvue de caractère scientifique. Pour les théories, l'irréfutabilité n'est pas (comme on l'imagine souvent) vertu mais défaut. »

Conjectures et réfutations – **Karl Popper**

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier les différents membres du jury de ma thèse, qui m'ont fait l'honneur de juger mon travail. Je remercie particulièrement la Dr. Virginie Pétrilli et la Dr. Marie-Caroline Dieu-Nosjean pour le temps qu'elles auront consacré à mon travail en leur qualité de rapportrices de ma thèse. Je souhaite également remercier le Pr. Christophe Borg et le Pr. Éric Tartour d'avoir accepté d'être examinateurs de mon travail.

Je remercie ensuite la Ligue Contre le Cancer, qui a cru en ce projet et a financé ces quatre années de thèse. Une pensée particulière pour son ancien président, Axel Khan qui a récemment été rattrapé par cette maladie, mais aura été une source d'inspiration et de motivation jusqu'au bout.

Je tiens ensuite à remercier le Pr. François Ghiringhelli, qui aura su apporter ses conseils et son soutien au cours de ces quatre années de thèses effectuées dans son équipe et sous sa direction. Merci pour la confiance et les échanges qui m'auront éclairé, ainsi que pour l'opportunité d'intégrer l'équipe.

Je dois également remercier le Dr. Ronan Quéré, le premier à m'avoir donné l'opportunité d'effectuer un stage en laboratoire. Un stage encadré à merveille par le Dr. Anne Buffière qui aura été la première à me faire découvrir la vie d'un jeune chercheur dans un laboratoire. Ton écoute, ta patience et tes réponses m'ont motivé et poussé à continuer dans cette voie. Merci encore pour cette expérience charnière dans mon parcours, qui aura été des plus enrichissantes.

C'est ensuite au Dr. Romain Boidot que je tiens à adresser mes remerciements. D'abord pour m'avoir accordé sa confiance durant les 6 mois de mon stage de Master 2, qui fut une période très riche en apprentissage pour moi, ta patience, tes conseils et ta bienveillance m'auront beaucoup apporté. C'est entre autres grâce à toi que j'ai rejoint l'équipe pour y faire ma thèse et je t'en suis très reconnaissant. Merci également pour les conseils et l'aide précieuse que tu as pu apporter tout au long de ces quatre années de travail, afin de mener à bien ce projet.

Je souhaite bien évidemment remercier le Dr. Frédérique Végran pour toutes ces années. C'est en majeure partie à toi que je dois d'avoir atteint cet objectif de devenir chercheur que je m'étais fixé il y a 10 ans. C'est toi qui m'as donné l'opportunité de faire cette thèse pour laquelle tu m'as aidé à me préparer dès la fin de mon master. C'est ensuite avec toi que j'ai pu partager au jour le jour toutes les joies et les satisfactions mais aussi les déceptions et les frustrations qui ont rythmé ces quatre années de travail. C'est avec nos deux caractères bien différents que nous avons traversé ensemble ces revirements, chacun à sa manière mais toujours avec une idée commune en tête, finir par découvrir ce qui nous échappait encore et comprendre comment fonctionnait ce que nous avions sous les yeux depuis le début. Tu auras su faire preuve de patience et d'écoute, tu m'auras aiguillé par ton expérience et tes idées pour ne pas que je me perde, retenu lorsque je partais dans le mur et poussé lorsque mes idées t'ont convaincue. Tu as toujours été ouverte à l'échange et tu m'auras laissé assez de place pour que j'apprenne à devenir un vrai chercheur. Je ne te remercierai probablement jamais assez pour tout cela, mais sache que je t'en serai toujours infiniment reconnaissant.

Je tiens aussi à remercier le Dr. Etienne Humblin, à qui l'on a confié la (lourde ?) tâche de m'aider dans mes premiers pas en thèse. Ces premiers mois de thèse passés à profiter de ton expérience au quotidien auront été des plus précieux, tant à la paillassa que pour les analyses, et sans bien sûr oublier les soirées passées au bar. Merci encore pour tous ces précieux moments de détente et d'apprentissage.

C'est maintenant à mes acolytes de paillasse, de bureau et de soirée que je tiens à adresser mes remerciements. Romain, ou devrais-je maintenant dire « Dr. Mary », que de bons souvenirs partagés au laboratoire et en dehors. Toujours présent pour partager un bon café, un repas, ou une bonne bière. Toujours prompt à la rigolade pour laquelle nous étions probablement inépuisables, mais aussi à des discussions plus sérieuses. Qu'il a été agréable de travailler à tes côtés, tu étais toujours prêt à rendre service ou disposé à discuter d'un point de vue scientifique sur des expérimentations ou des résultats. Un précieux collègue qui est rapidement devenu un allié de choix pour passer des soirées mémorables, tantôt à rire dans des bars et tantôt à échanger sur la musique dont nous avons une passion commune, ça a d'ailleurs toujours été très enrichissant malgré le fait que j'ai l'avantage d'être bassiste (on sait tous que c'est bien mieux que la guitare au fond). Je n'en oublie pas l'autre guitariste du trio, j'ai nommé Antoine également devenu Dr. Bernard. Encore et toujours plus de bons souvenirs et de rigolades, de soirées arrosées à l'issue parfois inattendue mais toujours drôle. Tu auras toi aussi été un allié de choix pour traverser une partie de ces quatre années de travail durant lesquelles ton soutien, au laboratoire comme en dehors, aura été d'une aide infinie. Mention spéciale tout de même pour cette invraisemblable et mémorable conférence de Raëliens qui aura mis notre esprit critique à rude épreuve mais n'aura pas été sans rires. Merci encore à vous deux pour tous ces agréables moments partagés et pour avoir rendu les moments difficiles plus supportables et sublimé les moments les plus euphoriques.

Je continuerai dans ma lancée en remerciant Joséphine et Christophe, mes deux autres acolytes du quotidien qui ont partagé ces moments évoqués précédemment avec Antoine et Romain. Vous aurez été d'une grande aide également au quotidien. Joséphine toujours présente pour partager une discussion autour d'un bon café ou d'une bière en fonction de l'heure, merci pour ta bonne humeur au quotidien et nos échanges, tantôt sur la musique, les théories farfelues ou encore nos lectures et séries/films du moment. Merci aussi pour l'aide précieuse que tu es toujours prête à apporter et les discussions scientifiques que l'on a pu avoir. Christophe, l'infatigable parleur, merci d'avoir été présent pour partager ces bons moments, entre répliques et blagues, ta bonne humeur aura permis d'égayer le quotidien au laboratoire comme en dehors. Merci également pour toute ton aide apportée sur le projet qui n'aurait jamais pu être aussi complet sans toi, les échanges scientifiques que nous avons pu avoir auront été enrichissants.

Je tiens aussi à remercier les autres membres de l'équipe que j'ai côtoyés au quotidien. La Dr Fanny Chalmin, pour toute l'aide que tu auras pu m'apporter durant ces années, que ce soit à la paillasse comme lors de discussions autour de nos expérimentations. Merci pour ta participation au projet comme pour ton point de vue toujours précieux sur ce dernier. Merci à la Dr Mélanie Bruchard, pour l'aide que tu as toujours pu m'apporter lorsque j'en ai eu besoin et tes conseils vis-à-vis du projet. Merci à Mannon, la dernière arrivée dans l'équipe, tu sauras faire perdurer la bonne entente qui règne entre les membres de l'équipe et la bonne ambiance des soirées, ainsi que l'ambiance de travail sérieuse et les moments de détente du quotidien. Merci enfin à Sabrina qui aura été d'une aide précieuse durant la dernière ligne droite, ta curiosité et tes questions ont ouvert des discussions toujours intéressantes !

Je tiens également à remercier les autres comparses qui ont pu partager les journées et les soirées que j'aurai vécues à Dijon, au gré des différents contrats et stages. Je tiens à remercier Dylan, avec qui j'ai pu partager une bonne partie de mon master et qui aura toujours été un précieux soutien vers lequel se tourner pour discuter science ou se changer les idées. Je tiens également à remercier Pierre, qui était toujours le premier arrivé et le dernier parti du bar et avec qui j'ai partagé de nombreux moments de détente. Merci également à Marine, Marion, Pauline, Julie, Baptiste, Etienne, Aurélien et Emma qui auront apporté leur bonne humeur à notre groupe durant leurs stages, et merci également à tous les

stagiaires qui sont venus apporter un vent frais pour quelques semaines dans l'équipe. Merci enfin à tous les collègues que j'aurai eu l'occasion de côtoyer au sein de laboratoire et qui participent à faire du 3^{ème} étage de l'UFR des Sciences de Santé un endroit agréable pour le travail. Merci Elise pour les nombreuses discussions que l'on a pu partager autour de la science et de la vulgarisation. Je tiens également à remercier mes collègues de master avec lesquels j'ai partagé mes journées et soirées durant ces deux années, merci à Anne-Sophie, Lisa, Antoinette, Corinne, Nathalie, Stéphanie, Lucine, Naim, Thomas et tous ceux que j'oublie.

Je souhaite également remercier chaleureusement toute l'équipe de l'Experimentarium que j'ai eu l'occasion de côtoyer, Coralie, Lionel, Robin, Juliette, et merci également à Elise, qui font tous un travail formidable autour de la vulgarisation en permettant à des jeunes chercheurs de rencontrer des classes et du publique, et participent aussi à l'organisation de l'incroyable Nuit des Chercheurs tous les ans à Dijon.

Une pensée toute particulière également pour Virginie Tuillon. Tu as eu un rôle décisif dans ma vie de lycéen, c'est avec tes cours que je me suis réellement pris de passion pour la biologie, passion que tu t'évertue à transmettre avec bienveillance à tous tes élèves. Ces années de lycée passées à suivre tes cours m'ont encouragé dans cet amour de l'apprentissage, de la découverte et de la transmission dont tu fais toi-même preuve.

Enfin je souhaite adresser mes plus profonds remerciements à ma famille et mes amis. A commencer par mes grands-parents, qui tous les quatre ont toujours été présents pour moi, qui m'ont encouragé dès le plus jeune âge à m'intéresser à tout et à poursuivre mes études là où elles m'emmèneraient. Tous m'auront vu commencer cette thèse mais j'ai une pensée émue pour ceux qui ne m'auront pas vu la finir. Merci également à mon parrain, Philou, tu auras toujours su être présent pour moi et être un indéfectible soutien. Merci à Catherine ma marraine, c'est toujours un plaisir d'échanger avec toi autour de mon projet et d'avoir l'opportunité de venir en discuter avec tes classes de lycéens, événements qui ont toujours été des expériences très enrichissantes. Merci Phiphi pour les discussions que l'on peut avoir autour de la science, l'intérêt contagieux que tu y portes, et pour tes conseils qui m'ont guidé dans mon cursus. Merci à Odile, Christophe, Franck et Cathy pour votre soutien et la famille que vous avez bâti et dont je suis heureux de faire partie, avec tous les cousins, Marion, Clémence et Romain, ainsi que Simon, Lou, Romane, Fannie, Alex et Lisa, que je remercie pour tous les agréables moments passés ensemble, vous êtes une source inépuisable de réconfort. Merci également à mes deux frères Baptiste et Lohann, pour tous ces moments partagés, la famille soudée que l'on forme encore aujourd'hui et la bienveillance et l'amitié qui règne entre nous. Merci également à Kevin de t'être glissé dans la famille pour partager de bons moments entre frères. Merci Marc, et merci Clément pour toutes ces années d'amitié et de soutien, merci également à tous les copains et amis avec lesquels j'ai pu partager et je partage encore de beaux moments.

Et puis un merci tout particulier à Frédérique, ma maman, qui a été et sera toujours un modèle incroyable pour moi. Tu as su, malgré ce que l'on a traversé, faire de tes trois fils ce qu'ils sont aujourd'hui. Depuis très jeune tu nous as toujours encouragés à apprendre, à se poser des questions et à aimer chercher les réponses. Tu m'as toujours soutenu dans mes études et fait confiance, en me donnant ce très précieux conseil de faire ce que j'aimais, tu m'as toujours encouragé à suivre le cursus universitaire et la fierté qui se reflète dans tes yeux aujourd'hui est probablement le plus beau cadeau que tu ne pourras jamais me faire. D'autant qu'elle doit compter double pour combler celle que m'en témoignerait sans l'ombre d'un doute papa, qui n'est malheureusement plus parmi nous depuis longtemps déjà, mais qui a lui-même été dans mon enfance un père que beaucoup enviaient probablement tant il était présent pour ses enfants. C'est pourquoi je tiens à vous remercier profondément tous les deux, pour ce que vous représentez à mes yeux et ce que vous m'avez permis

de devenir, par vos encouragements, vos enseignements, votre fermeté mais votre justesse, votre confiance et votre bienveillance. C'est à vous que je dois d'être fier de pouvoir faire partie du monde de la recherche aujourd'hui, et j'espère encore pour plusieurs années pour mener d'exaltant projets.

Projets futurs que je partagerai sans doute avec celle que je souhaitais remercier en dernier du fait de la place qu'elle occupe aujourd'hui dans ma vie. Akhésa, ma future femme, toi qui partages mon quotidien depuis les tous débuts de ma thèse et qui a été mon plus proche soutien tout au long de ces quatre années. Merci d'avoir été là tout ce temps, de m'avoir aidé, d'avoir partagé avec moi cette passion commune pour la recherche et la biologie, mais aussi d'avoir été mon plus fidèle ami lorsqu'il s'agit de s'amuser et de se détendre, de se faire plaisir et de partir à la découverte de nouveaux horizons. La difficulté du travail quotidien de la recherche s'atténue à tes côtés et j'espère que nos projets nous mèneront loin tous les deux, autant sur le plan professionnel que sur le plan personnel. Merci encore infiniment de me rendre tous les jours l'amour que je te porte.

Résumé

Depuis plusieurs décennies les cancers sont devenus un enjeu majeur de santé publique et occupent aujourd'hui la première place des causes de mortalité prématurée en France. L'une des caractéristiques des cellules cancéreuses est leur capacité à échapper au système immunitaire, notamment par la mise en place d'un environnement immunosuppresseur dans la tumeur. NLRP3 est une protéine étudiée majoritairement dans le contexte de l'inflammasome qu'elle forme afin de promouvoir l'inflammation principalement via la sécrétion d'IL-1 β . Mais elle possède également des fonctions de facteur de transcription dans les lymphocytes T CD4⁺. Plus particulièrement dans les Th2, dont la fonction nécessite l'activité transcriptionnelle de NLRP3, en coopération avec IRF4 qui forment ensemble un complexe capable d'augmenter l'expression de l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 dans ces cellules.

Ce travail porte sur les lymphocytes Th17, une population de lymphocytes T auxiliaires dont il existe plusieurs sous-types aux fonctions différentes. Parmi ces sous-types, deux s'opposent dans le contexte du cancer, les Th17 inflammatoires (Th17i) qui ont des propriétés anti-tumorales et les Th17 régulateurs (Th17r) qui ont des propriétés pro-tumorales.

Le travail réalisé durant cette thèse a permis de mettre en évidence que la protéine NLRP3 participe à la balance entre Th17i et Th17r. En effet la déficience en NLRP3 limite l'apparition d'un profil Th17r au profit d'un phénotype plus proche des Th17i avec une augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires caractéristiques des Th17i telles que l'IFN γ , le GM-CSF ou l'IL-21. Cela confère à ces Th17r une activité activatrice des lymphocytes T CD8⁺ qui sécrètent des quantités plus importantes d'IFN γ et de Granzyme B. Bien que l'interaction NLRP3/IRF4 existe dans le noyau des Th17r, c'est une autre fonction de NLRP3 qui module l'expression des gènes responsables de cette modification phénotypique. En effet, NLRP3 participe à la répression de gènes clés du programme transcriptionnel des Th17i, notamment en favorisant la phosphorylation de SMAD3. Ces éléments se traduisent par une activité anti-tumorale des cellules permettant de ralentir *in vivo* le développement tumoral. Ainsi, les infiltrats immunitaires observés dans les souris CD4_{cre}xNLRP3^{fllox} porteuses de tumeurs B16F10 et LLC1 en modèles sous-cutanés comme après un transfert adoptif de Th17rOT-II NLRP3^{-/-} chez des souris porteuses de tumeurs B16F10_{OVA}, sont caractérisés par un infiltrat plus important en lymphocytes T CD8⁺ dont les capacités cytotoxiques sont accrues, et une diminution de l'infiltrat en Treg, entraînant une diminution de l'immunosuppression au sein de la tumeur.

Ce travail a donc permis d'identifier NLRP3 comme un facteur clé de la polarisation Th17r, et a mis en lumière son rôle dans l'acquisition des fonctions immunosuppressives de cette sous-population de Th17.

Abstract

Since decades, cancers have become a major public health issue, occupying the first premature mortality cause in France. One of the hallmarks of cancer cells is their ability to escape the immune system surveillance, notably through setting up an immunosuppressive environment within the tumor. The NLRP3 protein is largely studied in the inflammasome context, which is assembled in order to promote inflammation through IL-1 β secretion. However, this protein also functions as a transcription factor in CD4+ T cells. Indeed, in Th2 cells, NLRP3 cooperate together with IRF4, to form a complex that is able to activate the transcription of IL4, IL5 and IL13, which are necessary for the function of Th2 cells.

This work is focusing on Th17 cells, a CD4+ T cell population of which there are different subtypes with different functions. Among these subtypes, two are opposite in the context of cancer, inflammatory Th17 (Th17i) which has antitumor properties, and regulatory Th17 (Th17r) which has pro-tumor properties.

The work achieved during this thesis allowed showing that NLRP3 participate to Th17i / Th17r balance. Indeed, NLRP3 deficiency limit the emergence of a Th17r profile in favor of a Th17i-like profile, with the increase in the expression of Th17i characteristic inflammatory cytokines such as IFN γ , GM-CSF or IL-21. This gives to Th17 the ability to stimulate CD8+ T cells to increase their IFN γ and Granzyme B secretion. Although the interaction between NLRP3 and IRF4 exist in the nucleus of Th17r, another NLRP3 function modulate the expression of genes responsible for the phenotypic switch. Indeed, NLRP3 participate to repression of key genes of the Th17i transcriptional program, notably through facilitating SMAD3 phosphorylation. These phenomenon translate into an antitumor activity, which result in a decrease in tumor development in vivo. Consistently, the immune infiltrate of B16-F10 and LLC1 cancer cell line from CD4_{cre}xNLRP3^{fllox} mice or Th17rOT-II Nlrp3^{-/-} transferred B16-F10OVA bearing mice, are enriched in CD8+ T cells which show greater cytotoxicity and a decrease in TReg infiltrate, resulting in a decrease in the immunosuppression within the tumor.

To summarize, this work allowed to identify NLRP3 as a key factor in Th17r polarization, and highlighted its role in Th17r immunosuppressive functions acquisition.

Sommaire

Remerciements	3
Résumé.....	7
Abstract	8
Sommaire	9
Liste des tableaux	11
Liste des figures.....	12
Liste des abréviations	14
Introduction.....	17
I. Préambule	18
II. Les lymphocytes T CD4 ⁺ dans le cancer.....	20
A. Immunité et Cancer.....	20
B. Les sous types de lymphocytes T CD4 ⁺	22
III. Plasticité des lymphocytes T CD4 ⁺	26
A. Environnement et transdifférenciation	26
B. Mécanismes cytosoliques de la transdifférenciation.....	27
C. Transdifférenciation et régulation des gènes	29
IV. Intérêt des lymphocytes T CD4 ⁺ en cancérologie	30
A. Impact du microenvironnement tumoral sur la réponse T CD4 ⁺	31
V. Différenciation, fonctions et plasticité des Th17	33
A. Mécanismes de différenciation, plasticité et profil sécrétoire	35
B. Fonctions et implications en pathologie	40
C. Ambivalence des Th17 en cancérologie.....	40
VI. NLRP3 une protéine multifonctionnelle.....	42
A. Structure de NLRP3 et fonctions dépendantes de l'inflammasome.....	42
B. Fonctions indépendantes de l'inflammasome	46
C. Rôles dans diverses pathologies.....	49
But de la thèse.....	51
Matériel et Méthodes	52
I. Souris	53
II. Différenciation de lymphocytes T CD4 ⁺ in vitro	53
III. Microscopie à immunofluorescence	55
IV. Extraction ARNm	55

V. Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel (RTqPCR).....	55
VI. ELISA.....	58
VII. Suivi de croissance tumorale.....	58
VIII. Isolation des cellules immunitaires infiltrants les tumeurs	58
IX. Cytométrie en flux.....	59
X. Séquençage ARN	60
XI. Test de taux de glycolyse par Seahorse®.....	60
XII. Co-cultures de cellules CD4 ⁺ , CD8 ⁺ et B16-F10.....	60
XIII. Modèles de transfert adoptif de cellules T	61
XIV. Test de ligature de proximité, Duolink®	61
XV. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)	62
XVI. Analyses statistiques	64
Résultats	65
I. La déficience en NLRP3 modifie les fonctions des Th17 dans le cancer	66
II. La déficience en NLRP3 favorise le phénotype Th17 inflammatoire.....	75
III. Les Th17 déficients pour NLRP3 perdent leur activité immunosuppressive.....	81
IV. La déficience en NLRP3 inhibe la plasticité Th17 vers T _{Reg}	85
V. Des fonctions de NLRP3 indépendantes de l'inflammasome sont impliquées dans la régulation des Th17.....	90
VI. Les Th17 Nlrp3 ^{-/-} sont efficaces en thérapie cellulaire.....	98
Discussion	101
Références Bibliographiques.....	108
Publications scientifiques.....	141
I. Articles et revues	141
II. Présentations orales ou posters.....	141
III. Vulgarisation scientifique	141

Liste des tableaux

Tableau 1 : Effets des cytokines du microenvironnement tumoral sur la réponse immunitaire, les lymphocytes T CD4⁺ et la croissance tumorale	33
Tableau 2 : Facteurs secondaires impliqués dans l'orientation phénotypique des Th17	38
Tableau 3 : Concentration des anticorps et cytokines utilisées pour les différenciations T CD4⁺ in vitro	54
Tableau 4 : Inhibiteurs utilisés en prétraitement lors de différenciations T CD4⁺ in vitro	54
Tableau 5 : Programme RTqPCR PowerUp SYBR Green Master Mix en cycle rapide sur ViiA7	56
Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de RTqPCR	57
Tableau 7 : Anticorps utilisés en cytométrie en flux	59
Tableau 8 : Programme de fragmentation de chromatine sur appareil Covaris M220	63
Tableau 9 : Récapitulatif des réactifs du mix de précipitation de la chromatine	63

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des différentes étapes de l'immunosurveillance.	21
Figure 2 : Populations de lymphocytes T CD4 ⁺	23
Figure 3 : Plasticité des différentes populations de lymphocytes T CD4 ⁺	27
Figure 4 : Voies intracellulaires régulant la plasticité des lymphocytes T CD4 ⁺	29
Figure 5 : Découverte de l'IL-23 dans le contexte de l'EAE.	34
Figure 6 : Etapes de différenciation des Th17.	37
Figure 7 : Caractéristiques et profil sécrétoire des Th17i et des Th17r.	39
Figure 8 : Impact des sous-populations de Th17 dans un contexte tumoral.	42
Figure 9 : Induction et fonctions de l'inflammasome NLRP3.	44
Figure 10 : Fonctions de NLRP3 indépendantes de l'inflammasome.	48
Figure 11 : Validation de la déficience en NLRP3 dans des cellules CD4 ⁺ de souris CD4 _{cre} xNLRP3 ^{flox}	66
Figure 12 : La croissance tumorale est ralentie de manière plus importante chez les souris CD4 _{cre} xNLRP3 ^{flox} qu'avec un anti-IL-4.	67
Figure 13 : L'impact de NLRP3 sur la croissance tumorale est indépendant de la sécrétion d'IL-1β et de fonctions liées à l'inflammasome.	68
Figure 14 : Les lymphocytes T CD4 ⁺ TILs issus de tumeurs de souris CD4 _{cre} NLRP3 ^{flox} produisent plus d'IFNγ.	69
Figure 15 : Caractérisation des populations de lymphocytes T CD4 ⁺ TILs issus de tumeurs B16-F10.	70
Figure 16 : Impact de la déficience en NLRP3 sur l'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription et les cytokines clés des populations de lymphocytes T CD4 ⁺	71
Figure 17 : Impact de la déficience en NLRP3 sur l'expression de FOXP3 par les T _{Reg}	72
Figure 18 : La déficience en NLRP3 dans les Th17 induit une production accrue d'IFNγ.	72
Figure 19 : Les Th17 TILs de souris CD4 _{cre} xNLRP3 ^{flox} porteuses de tumeurs B16-F10 produisent de l'IFNγ.	73
Figure 20 : L'absence de cellules RORγt ralentit la croissance de tumeurs B16-F10 et LLC1.	74
Figure 21 : La déplétion des cellules RORγt des souris CD4 _{cre} xNLRP3 ^{flox} accélère la croissance de tumeurs B16-F10.	74
Figure 22 : Les Th17 déficients pour NLRP3 s'apparentent à des Th17i.	75
Figure 23 : Les Th17 Nlrp3 ^{-/-} surexpriment des gènes signatures du profil Th17 inflammatoire.	76
Figure 24 : Les Th17 Nlrp3 ^{-/-} acquièrent un profil Th17i au cours du temps.	76
Figure 25 : Les Th17 Nlrp3 ^{-/-} ne surexpriment pas le marqueur CXCR3.	77
Figure 26 : Les Th17r Nlrp3 ^{-/-} sécrètent plus de TNFα, de Granzyme B et de GM-CSF.	77
Figure 27 : Les Th17 Nlrp3 ^{-/-} présentent un profil inflammatoire in vivo.	78
Figure 28 : La déficience en NLRP3 n'impacte pas l'expression ni la fonction des ectonucléotidases.	79
Figure 29 : Les Th17 Nlrp3 ^{-/-} ont une activité glycolytique normale.	80
Figure 30 : Les Th17 Nlrp3 ^{-/-} ne sont pas cytotoxiques.	81
Figure 31 : Les lymphocytes T CD8 ⁺ participent au ralentissement de la croissance tumorale des souris CD4 _{cre} xNLRP3 ^{flox}	82
Figure 32 : Les lymphocytes T CD8 ⁺ TILs de souris CD4 _{cre} xNLRP3 ^{flox} ont une activité accrue.	82
Figure 33 : Les Th17 Nlrp3 ^{-/-} sont moins immunosuppresseurs.	83
Figure 34 : Les lymphocytes T CD8 ⁺ TILs de souris CD4 _{cre} xNLRP3 ^{flox} sont plus cytotoxiques.	84
Figure 35 : Caractérisation des populations de lymphocytes T CD4 ⁺ TILs issus de tumeurs LLC1.	85

Figure 36 : La déficience en NLRP3 diminue l'expression de FOXP3 dans les Th17.	86
Figure 37 : La déficience en NLRP3 abroge la transdifférenciation des Th17 dans les poumons.	87
Figure 38 : La déficience en NLRP3 abroge la transdifférenciation des Th17 dans les DLN et la rate.	88
Figure 39 : La déplétion T _{Reg} ralentit peu la croissance de tumeurs chez des souris CD4 _{cre} xNLRP3 ^{flox} .	89
Figure 40 : NLRP3 possède des fonctions indépendantes de l'inflammasome dans les Th17.....	90
Figure 41 : NLRP3 transloque dans le noyau et interagit avec IRF4 dans les Th17.	91
Figure 42 : L'inhibition de IRF4 n'impact pas l'expression du gène <i>Ifng</i>	91
Figure 43 : L'augmentation de l'expression de l' <i>Ifng</i> dans les Th17 ne dépend pas de T-bet, EOMES, IRF1 ou pSTAT1.	92
Figure 44 : pSMAD3 est impliquée dans la signalisation médiée par NLRP3.	93
Figure 45 : NLRP3 est co-localisé avec le TGFBR1.....	94
Figure 46 : pSMAD3 interagit avec le promoteur de l' <i>Ifng</i>	95
Figure 47 : L'expression de <i>Gzmb</i> est dépendante de l'IFN γ	96
Figure 48 : pSMAD3 interagit avec le promoteur de <i>Csf2</i> mais pas de <i>Tnfa</i> et <i>Il21</i>	97
Figure 49 : Les Th17r Nlrp3 ^{-/-} réduisent le nombre de foci tumoraux pulmonaires.....	98
Figure 50 : L'infiltrat T _{Reg} est diminué lorsque les Th17 sont déficients pour NLRP3.	99
Figure 51 : Les T _{Reg} sont responsable de l'immunosuppression médiée par les Th17.....	99
Figure 52 : Les lymphocytes T CD8 ⁺ sont responsables de l'effet anti-tumoral médié par les Th17r Nlrp3 ^{-/-}	100
Figure 53 : Résumé graphique.....	107

Liste des abréviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

ADO : Adénosine

Ahr: Aryl hydrocarbon receptor

AMP: Adénosine MonoPhosphate

APC: Antigen Presenting Cell

ASC: Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD

ATP: Adénosine TriPhosphate

BATF: Basic leucine zipper transcription factor ATF-like

BCL6: B Cell Lymphoma 6

C2TA: MHC class 2 transcription activator

CAPs: syndromes périodiques associés à la cryopyrine

CARD : caspase recruitment domain

CAR-T: Chimeric Antigen Receptor T

CCR: C-C chemokine receptor

CD: Cluster de Différenciation

CD5L: CD5-like molecule

CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4

CXCR: C-X-C Motif Chemokine Receptor

DCs: Cellules Dendritiques

EAE: encéphalomyélite auto-immune expérimentale

FOXO: Forkhead box O

FOXP3: Forkhead Box P3

FRA2: Fos-related antigen 2

GATA3: GATA binding protein 3

Gfi-1: Growth Factor Independent 1 Transcriptional Repressor

GLUT1: Glucose Transporter 1

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

Gpi-1: Glucose-6-phosphate isomérase 1

GSDMD: Gasdermine D

HxKx: Histone x, Lysine x

HET-E: incompatibility locus protein from *Podospora anserina*

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

IRF: Interferon Regulatory Factor

JAK: JAnus Kinase

KPNA2: Karyopherin Subunit Alpha 2

LAG: Lymphocyte Activating Gene protein

LRR: Leucine Rich Repeat

Lt: Lymphotoxine

MAF: cellular Muscular Aponeurotic Fibrosarcoma

MAVs: Protéines de signal antiviral mitochondriales

MDSCs: myeloid-derived suppressor cells

MHC-II: Major Histocompatibility Complex de type II

MMP: matrix metalloproteinase

mROS: ROS mitochondriaux

mTOR: mechanistic Target Of Rapamycin

NACHT: NAIP, C2TA, HET-E & TP1 domain

NAIP: neuronal apoptosis inhibitor protein

NEK7: NIMA-Related Kinase 7

NIMA: Never in mitosis gene

NK: Natural Killer

NLR: nucleotide-binding domain, leucine rich containing

NLRP3: NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3

NOD: nucleotide-binding oligomerization domain-containing receptor

OVA: Ovalbumine de poulet

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns

PD-1: Programmed cell Death 1

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PRRs: pattern recognition receptors

PTEN: Phosphatase and TENSin homolog

PYD: Pyrin domain

RAR: Retinoic acid receptor

ROR: RAR-related Orphan Receptor

ROS: Espèces Réactives de l'Oxygène

Rag: Recombination-activating genes

RNA: RiboNucleic Acid

RNAseq: séquençage ARN

RUNX: Runt related transcription factor

SLAMF7: Signaling lymphocytic activation molecule family member 7

α SMA: alpha Smooth Muscle Actin

SMAD: Mothers Against Decapentaplegic homolog

SOCS3: Suppressor of cytokine signaling

STAT: Signal Transducer and Activator of Transcription

STIM-1: Stromal interaction molecule 1

T-bet : T-box expressed in T cells

TCR: T-Cell Receptor

TEM: Transition Epithélio-Mésenchymateuse

TGF: Transforming Growth Factor

Th: T helper

Th17i: Th17 inflammatoire

Th17r: Th17 régulateur

TLR: Toll-like receptor

TME: Transition Mésenchymo-Epithéliale

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR: TNF receptor

TP1 : telomerase-associated protein

T_{Reg}: T régulateur

USP19: Ubiquitin Specific Peptidase 19

VEGF: facteur de croissance vasculaire endothélial

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

Introduction

I. Préambule

Le vieillissement global de la population mondiale et l'exposition à certains facteurs environnementaux ont fait émerger depuis plusieurs décennies de nouveaux enjeux de santé publique, qui sont devenus majeurs dans les pays aux populations les plus vieillissantes. Les cancers représentent actuellement le plus important de ces enjeux, notamment en France où ils sont devenus la première cause de mortalité prématurée. Aujourd'hui la première arme pour lutter contre ces maladies réside dans la prévention des cancers évitables, qui représentent près de la moitié des cancers et sont liés principalement au tabagisme, à l'alcoolisme, l'obésité et l'alimentation. Mais cette lutte repose historiquement sur le traitement des patients atteints, avec des traitements lourds tels que la chimiothérapie ou la radiothérapie. L'inconvénient principal de ces thérapies est de provoquer d'importants effets indésirables chez les patients. C'est pourquoi la recherche contre le cancer s'articule autour de l'approfondissement des connaissances sur la biologie cellulaire, moléculaire et la physiologie des tumeurs, ainsi que l'impact exact des traitements, afin d'optimiser les traitements existants et en découvrir de nouveaux. La diversité des cancers et le fait que leur évolution diffère chez chaque patient rend la tâche complexe. Un traitement efficace chez certains patients peut échouer pour d'autres, parfois sans que l'on ait encore découvert la cause de cet échec. Cette notion de diversité des cancers pousse vers une individualisation de la prise en charge où après investigation sur les caractéristiques de la tumeur du patient (mutations, immunogénicité, expression d'inhibiteurs de points de contrôles), une proposition de traitements adaptés au patient pourra être faite. Les résultats obtenus avec certaines thérapies comme l'hormonothérapie, ou l'immunothérapie constituent un espoir en ce sens.

Cet espoir concernant l'immunothérapie lui a d'ailleurs valu d'être couronnée en 2018 par l'attribution du prix Nobel de Physiologie ou Médecine à James Allison et Tasuku Honjo qui ont tous deux œuvré à la mise en évidence de l'efficacité des traitements bloquant les inhibiteurs de point de contrôle des lymphocytes T dans la lutte contre le cancer. Ces travaux débutés dans les années 90 se sont définitivement concrétisés une vingtaine d'années plus tard, et allaient ouvrir la porte à cette nouvelle catégorie de traitements que sont les immunothérapies. Aujourd'hui reconnus et couramment utilisés pour traiter des patients, les anticorps bloquant les points de contrôle ont été rejoints par la thérapie cellulaire dans l'arsenal disponible pour lutter contre les cancers. Si les anticorps bloquant tels que les anti-Programmed cell Death 1 (PD-1) et anti-Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4 (CTLA4) s'avèrent redoutables pour traiter certaines tumeurs solides, ou que la thérapie cellulaire basée sur les cellules Chimeric Antigen Receptor T (CAR-T) se montre efficace dans le traitement de certains cancers du sang, il reste cependant que ces thérapies ne constituent pas encore une solution définitive pour un certain nombre de patients. C'est donc dans l'optique d'améliorer les traitements existants et diversifier les cibles thérapeutiques que les recherches continuent, afin de pouvoir proposer des solutions efficaces à une proportion toujours plus large de patients. Les enjeux actuels de la recherche en immunologie des cancers sont de comprendre dans les détails les plus fins possibles comment les cellules tumorales, et le microenvironnement qui se crée autour de ces dernières, interagissent avec les cellules immunitaires présentes dans cet environnement et participent à la modulation de la réponse immunitaire.

Dans cette optique les nombreux aspects de la réponse immunitaire antitumorale sont étudiés. Mais elle recèle une complexité qui demande du temps pour en percer les secrets. Le premier point qui illustre cette complexité étant que les deux composantes de la réponse immunitaire, l'immunité innée et l'immunité adaptative, participent activement à la réponse immunitaire antitumorale et ont un impact durable sur le microenvironnement tumoral et l'immunosuppression qui peut s'y installer. L'immunité innée fait intervenir des cellules de la lignée myéloïde telles que les macrophages, les

Introduction

neutrophiles, les cellules dendritiques et d'autres comme les cellules tueuses naturelles. L'immunité adaptative intervient également par le biais des cellules de la lignée lymphoïde, parmi lesquelles les lymphocytes B et lymphocytes T jouent un rôle important. Concernant les lymphocytes T, si les lymphocytes T CD8⁺ ont historiquement bénéficié de la majorité de l'attention des chercheurs, les découvertes récentes de ces vingt dernières années sur les lymphocytes T CD4⁺, dits lymphocytes T auxiliaires ou T helper (Th), ont suscité un intérêt grandissant autour de leur impact sur la réponse immunitaire antitumorale.

C'est particulièrement le cas des Th17, le sous-type de lymphocytes T CD4⁺ sur lequel portent les travaux effectués durant cette thèse, qui ont été découverts au début des années 2000 et dont le rôle ambivalent dans les cancers dévoile peu à peu ses origines. Tantôt pro-tumoraux, et tantôt antitumoraux, les Th17 sont un sous-type de lymphocytes T CD4⁺ qui comportent maintes subtilités et semblent plus sensibles à leur environnement que ne peuvent l'être les deux premiers sous-types de lymphocytes T auxiliaires découverts, les Th1 et les Th2. Cette sensibilité combinée à la complexité du microenvironnement tumoral participe sans aucun doute au voile de mystère qui entoure encore la participation des Th17 à la réponse immunitaire antitumorale. Cependant, à mesure que se dévoilent les mécanismes qui entourent la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en Th17 et la stabilité du phénotype de ces derniers, il apparaît que cette sous-population pourrait être plus transitoire et plastique que ne le sont les Th1 ou les Th2. Sous l'influence de signaux externes, les Th17 sont en effet capables de s'orienter progressivement vers un phénotype différent, proche d'autres phénotypes de T auxiliaires ayant été décrits. Cet aspect pose la question de la possibilité de moduler certains signaux afin de contrôler l'orientation des Th17. C'est notamment un angle particulièrement intéressant dans le traitement de différentes maladies auto-immunes où ces derniers jouent un rôle prépondérant, et qui pourrait aussi trouver un intérêt dans le traitement des cancers dans lesquels ils interviennent également.

C'est précisément sur ces différents points que s'attardent ces travaux de thèses, afin de venir humblement contribuer à l'édifice de la compréhension du fonctionnement des Th17 et de leur rôle dans le cancer ainsi que de la possibilité d'influer sur ces derniers dans le but de désinhiber la réponse immunitaire antitumorale.

II. Les lymphocytes T CD4⁺ dans le cancer

A. Immunité et Cancer

Il conviendrait plutôt de parler « des » cancers que « du » cancer, comme on l'entend souvent dans le langage courant. Tous, cependant partagent une caractéristique, ils sont dûs au dysfonctionnement de cellules qui se divisent de manière incontrôlée et vont empêcher un ou des organes de fonctionner correctement. On distingue une cellule cancéreuse d'une cellule saine grâce à une palette de caractéristiques qui ont été décrites et étoffées au cours du temps par Douglas Hanahan et Robert A Weinberg^{1,2}. Ces caractéristiques peuvent émerger suite à des mutations provoquées par des dommages causés à l'ADN, impactant le fonctionnement intrinsèque des cellules. Ces cellules peuvent devenir résistantes à la mort cellulaire, acquérir une capacité d'autosuffisance en signaux prolifératifs, de résistance aux signaux antiprolifératifs ou encore de division illimitée. Parmi ces caractéristiques, certaines impliquent le système immunitaire et ses relations avec le microenvironnement tumoral.

En effet les cellules cancéreuses sont capables d'influencer et de modifier leur environnement à leur avantage. Outre le fait qu'elles puissent pousser des cellules saines alentours à sécréter des facteurs de croissance ou induire de la néoangiogenèse, elles peuvent également inhiber la réponse immunitaire antitumorale et détourner des cellules immunitaires afin qu'elles soutiennent le développement de la tumeur. On peut notamment ici citer plusieurs types cellulaires de la lignée myéloïde qui favorisent la néoangiogenèse, tels que les macrophages, les neutrophiles, les cellules mastoïdes et les progéniteurs myéloïdes. L'inflammation chronique, qui peut être induite par différents facteurs, peut également promouvoir l'émergence de cellules cancéreuses³⁻⁵. Ceci implique le développement d'un microenvironnement tumoral infiltré en cellules immunitaires qui vont avoir une influence notable sur les cellules cancéreuses. Mais celles-ci vont pouvoir *in fine* échapper au système immunitaire.

La théorie de l'immunosurveillance formulée par Burnet en 1970⁶, et étoffée depuis⁷, décrit 3 phases qui mènent à cette capacité d'échappement des cellules cancéreuses. Elle postule qu'au cours de sa vie, un être humain sera l'hôte de plusieurs tumeurs que son système immunitaire sera capable d'éliminer. L'importance des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules Natural Killer (NK) dans cette étape a été démontrée et est aujourd'hui admise⁸. Cependant cette phase dite d'élimination impose une pression de sélection sur la tumeur naissante. Si le système immunitaire ne parvient pas à éradiquer toutes les cellules cancéreuses, s'engage alors la phase d'équilibre, durant laquelle une course s'opère entre la rapidité à laquelle le système immunitaire est capable d'éliminer les cellules cancéreuses et la vitesse à laquelle celles-ci compensent ces pertes en se multipliant. Cette pression de sélection imposée aux cellules va favoriser l'émergence de clones moins immunogènes au sein de la tumeur. Ces clones perdent l'expression des néo antigènes tumoraux qui permettaient l'élimination par le système immunitaire et expriment des inhibiteurs de point de contrôle immunitaire. C'est cette phase qui représente le concept d'*Immunoediting*, soit le modelage de la tumeur par le système immunitaire, qui a récemment été démontré chez l'humain sur des cancers du poumon encore non-traités au moment des prélèvements pour analyse⁹. En effet, dans cette étude, les auteurs ont pu analyser 258 échantillons issus de 88 tumeurs différentes et déterminer qu'un tiers présentent une hétérogénéité de l'infiltrat immunitaire. Certaines régions d'une même tumeur sont hautement infiltrées tandis que d'autres le sont faiblement. En analysant la diversité clonale de ces différentes régions, les auteurs ont mis en évidence une corrélation inverse entre la diversité des clones de cellules tumorales et le taux d'infiltration en cellules immunitaires. En clair, plus la réponse immunitaire antitumorale est importante, plus elle modifie la tumeur en ne laissant en vie qu'une partie des clones de cellules

Introduction

tumorales. Tous ces événements favorisent l'émergence de clones ayant la capacité d'échapper au système immunitaire et de mettre en place un microenvironnement immunosuppresseur au sein de la tumeur, menant à la troisième phase, dite d'échappement. Cette troisième et dernière phase est celle qui aboutit à la croissance incontrôlée de la tumeur et entraîne des symptômes chez les patients. A cette étape le microenvironnement tumoral est infiltré par de nombreuses cellules immunosuppressives neutrophiles et monocytaires^{10,11}. La fréquence des cellules dendritiques présentes dans le sang périphérique des patients est également diminuée dans de nombreux cancers¹²⁻¹⁶, ce qui participe à l'échappement en réduisant l'ampleur de la réponse antitumorale dépendante des lymphocytes T. Concernant les lymphocytes eux-mêmes, plusieurs perturbations ont été relevées et contribuent à l'immunosuppression qui règne au sein des tumeurs. La population de lymphocytes B régulateurs y participe notamment dans différents cancers via la sécrétion d'IL-10¹⁷ et en favorisant la population de lymphocytes T auxiliaires régulateurs (T_{Reg})¹⁸. Eux-mêmes sont largement étudiés pour l'immunosuppression qu'ils exercent dans le microenvironnement tumoral¹⁹. Les lymphocytes T CD8⁺ sont quant à eux également impactés, notamment par les inhibiteurs de points de contrôles immunitaires que peuvent exprimer les cellules tumorales. Ces dernières peuvent également diminuer l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (MHC-I) à leur surface pour éviter d'être reconnues par les lymphocytes T CD8⁺, ou encore sécréter des enzymes de dégradation de la perforine pour en contrecarrer l'action cytotoxique²⁰. Quant aux lymphocytes T CD4⁺, outre la présence des T_{Reg} déjà évoquée, les autres populations ont aussi été observées dans le microenvironnement tumoral. Chaque sous-population ayant ses fonctions propres, elle interagit de manière différente avec les cellules du microenvironnement tumoral et impacte la croissance de la tumeur différemment des autres.

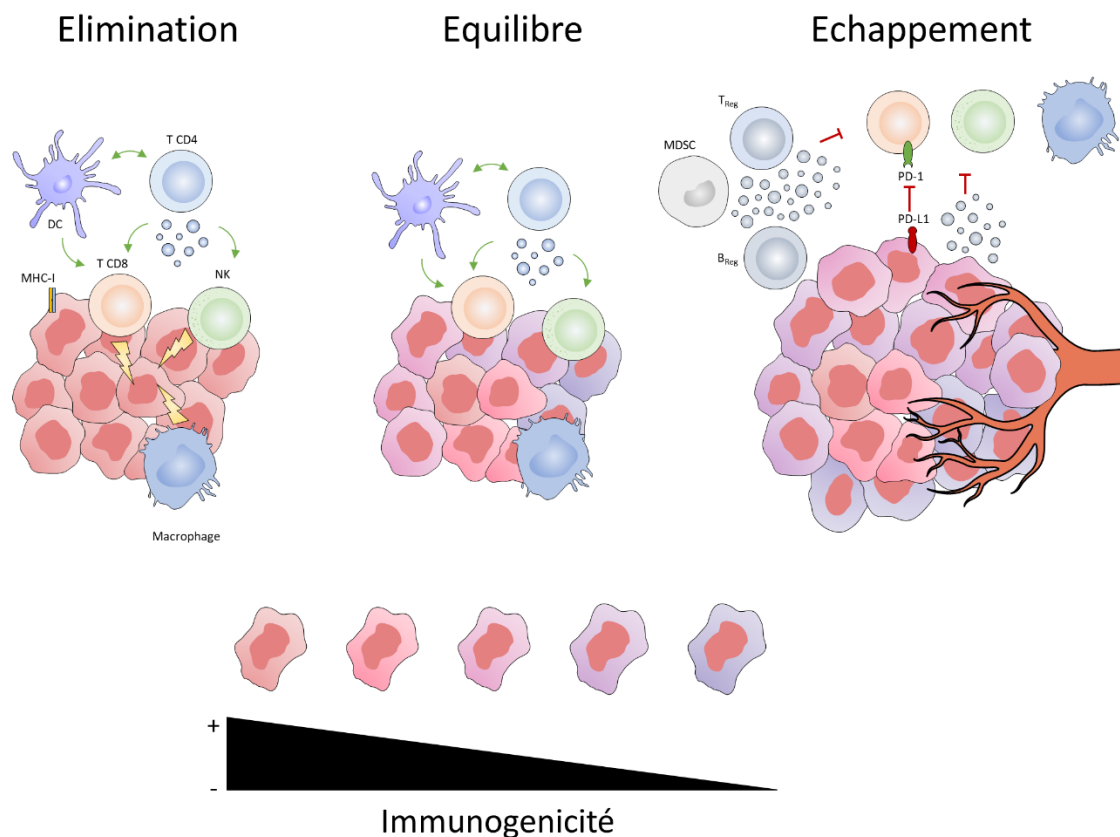


Figure 1 : Schéma des différentes étapes de l'immunosurveillance. La phase d'élimination induit une pression de sélection sur les cellules tumorales. S'ensuit la phase d'équilibre durant laquelle des clones moins immunogènes ont émergé de cette sélection. Enfin la phase d'échappement représente l'instant où la tumeur échappe au contrôle du système immunitaire.

B. Les sous types de lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ représentent en effet plusieurs sous populations possédant chacune leurs spécificités et fonctions associées. Toutes sont issues de lymphocytes T CD4⁺ dits naïfs, dont la différenciation va s'opérer sous l'impulsion de deux signaux primordiaux reçus par les cellules. Le premier est la liaison entre le récepteur des cellules T (TCR) et le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC-II) présent sur les cellules présentatrices d'antigènes²¹. Le MHC-II est présent sur différents types de cellules nommées cellules présentatrices d'antigènes (APC), que sont les cellules dendritiques, les macrophages ou même certains lymphocytes B, et que les lymphocytes T CD4⁺ rencontrent dans les organes lymphoïdes secondaires. Le second signal est nommé signal de costimulation, il est induit par la liaison du récepteur CD28 présent à la surface des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, avec l'un de ses ligands CD80 ou CD86, présents à la surface des APCs.

Si ces deux signaux permettent la survie et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺, ce sont les cytokines présentes dans leur microenvironnement qui vont orienter leur différenciation et déterminer leur fonction. Ces cytokines vont participer à la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ selon un schéma commun à chaque population. Les cytokines vont se lier à leur récepteur et activer des voies de signalisation impliquant les protéines Janus tyrosine Kinase (JAK) et les Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT). En fonction des cytokines présentes dans l'environnement, différentes protéines STATs vont être impliquées. Ces facteurs vont initier la différenciation en favorisant l'expression de facteurs de transcription clés et spécifiques de chaque population de lymphocytes T CD4⁺, qui ont un rôle crucial dans ce processus. Ils permettent en effet de maintenir et de stabiliser le phénotype des cellules et sont un des marqueurs forts utilisés pour identifier et classer les lymphocytes T CD4⁺ dans les différentes populations décrites. Ainsi, après activation du TCR, ces facteurs coopèrent avec les STATs afin de moduler un programme transcriptionnel qui va décider du phénotype des cellules une fois différenciées. Tout cela implique de promouvoir la survie des cellules et d'établir leur capacité migratoire et leur fonction.

Dès 1986, le travail de Mosman et Coffman²² a permis de subdiviser les lymphocytes T CD4⁺ en deux populations, l'une produisant de l'Interféron Gamma (IFN γ) et l'autre de l'Interleukine 4 (IL-4). Les décennies de travaux suivantes ont permis d'identifier de nouvelles populations de lymphocytes T CD4⁺ et leurs rôles dans divers contextes, physiologiques comme pathologiques. Approfondir les connaissances acquises vis-à-vis de la différenciation et de la fonction des lymphocytes T CD4⁺ est ainsi devenu une question centrale afin de comprendre les dysfonctionnements auxquels ils participent.

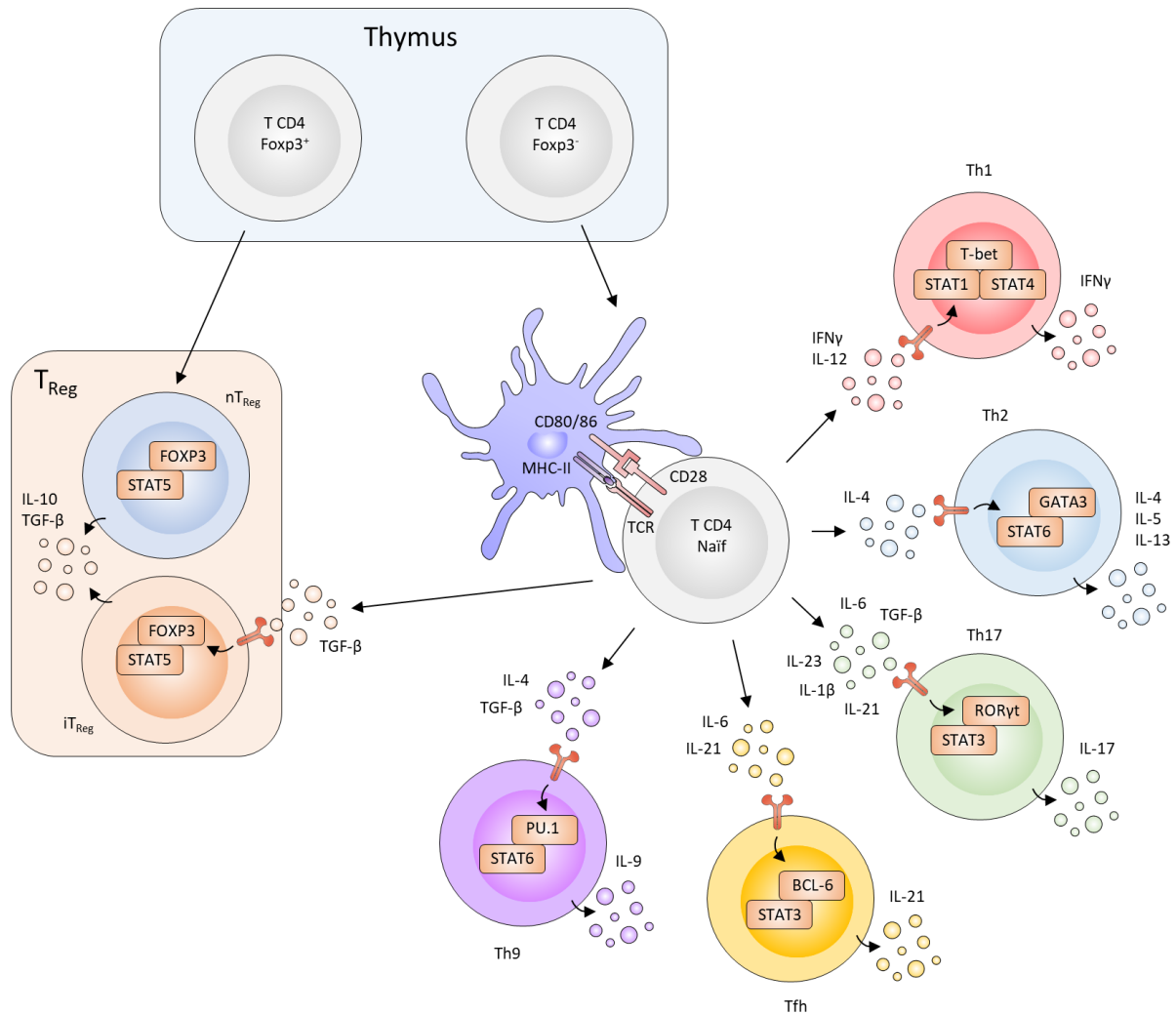


Figure 2 : Populations de lymphocytes T CD4⁺. Les différentes populations de lymphocytes T CD4⁺ se différencient après avoir reçu le signal de co-stimulation TCR/CD28. Leur différenciation s'oriente en fonction des cytokines présente dans leur environnement. Chaque population est caractérisée par des facteurs de transcription clés et un profil sécrétoire qui leur confère des propriétés propres.

i. Les Th1

La première population identifiée, les Th1, se différencie en présence d'IL-12p70 et d'IFN γ . Ces deux cytokines orientent la différenciation en Th1 via l'activité de STAT4, STAT1 et STAT5. La phosphorylation de STAT4 qui suit la réception du signal de l'IL-12 par son récepteur l'IL-12R va lui permettre d'augmenter la transcription de gènes, dont *Tbx21*, codant T-box expressed in T cells (T-bet) le facteur de transcription clé des Th1, et *Ifng*²³⁻²⁵. La sécrétion d'IFN γ qui en résulte entraîne une boucle de rétrocontrôle positif de l'expression de *Tbx21* et *Ifng* via l'activité de la forme phosphorylée de STAT1²⁶⁻²⁸. En parallèle, l'IL-2 permet la phosphorylation de STAT5, également nécessaire à la différenciation Th1, en augmentant la transcription de *Tbx21* mais aussi celle du gène *Il12rb2* rendant les cellules plus sensibles à l'IL-12^{29,30}.

L'IFN γ sécrété par les Th1 leur permet d'activer les macrophages³¹, les cellules dendritiques et les cellules NK³² pour lutter contre les pathogènes intracellulaires. Les Th1 sont aussi capables de sécréter la lymphotoxine alpha (L α) et sont associés au développement de maladies auto-immunes³³. Ils sont également producteur d'IL-2 et de Tumor Necrosis Factor (TNF α)³⁴ leur permettant de stimuler la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques³⁵.

Introduction

ii. Les Th2

Les Th2 qui furent eux aussi initialement décrits par Mosman & Coffman, se différencient en présence d'IL-4, capable d'activer la voie de signalisation dépendante de STAT6³⁶. C'est ce facteur qui promeut l'expression du facteur de transcription clé des Th2, GATA binding protein 3 (GATA3)³⁷. Comme dans les Th1, l'IL-2 est impliquée dans la phosphorylation de STAT5 qui dans ce contexte va favoriser l'expression de GATA3 et du récepteur de l'IL-4³⁸. STAT5 va également favoriser l'expression de NLRP3 qui participe à la différenciation et au maintien du phénotype Th2 en augmentant la transcription de l'IL4, l'IL5 et l'IL13, les cytokines clés de cette population³⁹.

Ces cytokines permettent aux Th2 de soutenir la production d'immunoglobuline E (IgE) par les lymphocytes B^{40,41} afin d'activer les mastocytes et les polynucléaires basophiles⁴². L'IL-5 permet également le recrutement des éosinophiles⁴³. Tout cela permet aux Th2 de participer à la lutte contre les pathogènes extra-cellulaires via l'immunité humorale⁴⁴.

iii. Les Th17

A cela sont venues s'ajouter d'autres populations de lymphocytes T CD4⁺, dont les Th17 au début des années 2000. Ils se différencient en présence d'IL-6 et de Transforming Growth Factor Beta (TGF- β) ou d'IL1- β , mais également d'IL-21 et d'IL-23 dont la signalisation est principalement médiée par STAT3⁴⁵⁻⁴⁷. Ce facteur de transcription va favoriser l'expression de RAR-related Orphan Receptor Gamma (ROR γ t), communément admis comme le facteur de transcription clé des Th17. STAT3 favorise également l'expression de l'IL-17A, cytokine clé de ces cellules^{45,48}. Il permet aussi d'induire une boucle de rétrocontrôle positif via la production d'IL-21 et l'expression du récepteur de l'IL-23⁴⁹, et de limiter l'expression de Forkhead Box P3 (FOXP3), promue par le TGF- β , qui favorise la différenciation en T_{Reg}⁵⁰. Dans ce contexte le TGF- β permet tout de même de lever l'inhibition exercée par Growth Factor Independent Protein 1 (Gfi-1) sur l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73, et de favoriser des fonctions immunosuppressives des Th17⁵¹.

Les Th17 possèdent cependant des fonctions pro-inflammatoires, notamment via la sécrétion d'IL-17A et sont impliqués dans la lutte contre les infections fongiques et les pathogènes extracellulaires⁵²⁻⁵⁴. L'IL-22 participe également à cette lutte en favorisant l'auto renouvellement des barrières et la sécrétion de peptides anti-bactériens⁵⁵. L'IL-21 promeut la réponse immunitaire médiée par les cellules NK et les lymphocytes T et B^{46,56}. Les Th17 peuvent également acquérir la capacité de sécréter de l'IFN γ ⁵⁷, mais lorsqu'ils sont différenciés avec une balance assez forte en faveur de l'IL-6 et du TGF- β uniquement, les Th17 peuvent acquérir des fonctions immunosuppressives par l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 mais également la sécrétion d'IL-10⁵⁸. Ceci souligne le fait que derrière la classification des T auxiliaires se cache une complexité plus importante, qui ne permet pas de leur assigner des fonctions systématiques. Celles-ci dépendent fortement de l'environnement dans lequel se trouvent les cellules. Les Th17 présentent en fait une complexité importante et regroupent plusieurs sous-populations dont les fonctions différentes sont finement régulées en fonction du contexte, et seront détaillées dans une partie dédiée.

iv. Les T_{Reg}

Les T_{Reg}, dont on distingue les nT_{Reg} qui se différencient dans le thymus, et les iT_{Reg} qui se différencient, comme les autres populations de lymphocytes T CD4⁺, en périphérie, font également partie des populations de lymphocytes T CD4⁺. Les iT_{Reg} se différencient en présence de TGF- β et d'IL-2. Le TGF- β induit l'expression de Foxp3 directement via la voie Mothers Against Decapentaplegic homolog 3 (SMAD3), et parallèlement, l'IL-2, en se fixant à son récepteur CD25, induit la phosphorylation de STAT5, qui favorise également l'expression de Foxp3^{59,60}.

Introduction

Ces lymphocytes T auxiliaires sont capables de sécréter des cytokines immunosuppressives telles que le TGF- β lui-même⁶¹, l'IL-10⁶² ou encore l'IL-35⁶³. Ces cytokines leur permettent de maintenir une tolérance immunitaire indispensable pour éviter des réactions auto-immunes. De manière plus étonnante les T_{Reg} peuvent exercer une immunosuppression via des fonctions cytotoxiques. En effet ils sont capables de sécréter de la perforine et du granzyme afin d'éliminer des T effecteurs et des APC^{64,65}. En outre, ils expriment un récepteur CD25 qui présente une forte affinité pour l'IL-2, la rendant moins disponible pour favoriser la prolifération des cellules NK et des autres T effecteurs^{66,67}. Ils expriment également les ectonucléotidases CD39 et CD73 permettant de dégrader l'adénosine triphosphate (ATP) en adénosine, capable d'inhiber l'activité des lymphocytes T CD8⁶⁸. Les T_{Reg} expriment également à leur surface des molécules inhibitrices limitant l'activation des lymphocytes T, telles que CTLA-4^{69,70} ou Lymphocyte Activating Gene protein 3 (LAG-3)⁷¹.

Ces cellules sont donc garantes de la tolérance immunitaire et leur activation est souvent une cible de choix afin de lutter contre les maladies auto-immunes, tandis qu'elles peuvent s'avérer néfastes dans un contexte tumoral⁷².

v. Les T_{fh}

Plus récemment, les T_{fh} sont venus compléter la liste des sous-populations de lymphocytes T auxiliaires. Ils sont induits en présence d'IL-6, via la phosphorylation de STAT3, qui va elle-même induire l'activation de BCL-6, le facteur de transcription clé de cette population, et la production d'IL-21 indispensable à la différenciation et au maintien du phénotype T_{fh}⁷³⁻⁷⁵. Les T_{fh} sont également reconnaissables par l'expression simultanée à leur surface de PD-1 et C-X-C Motif Chemokine Receptor 5 (CXCR5).

L'expression de CXCR5 guide les T_{fh} vers les centres germinatifs où ils vont promouvoir la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes via l'expression d'IL-21⁷⁶. Les T_{fh} présentent une certaine plasticité et sont également capables de sécréter de l'IL-4, de l'IFN γ ou encore de l'IL-10, ce qui leur permet d'orienter la commutation de classe des IgG⁷⁷. Ces lymphocytes T CD4⁺ ont donc des fonctions particulièrement impliquées dans la mise en place d'une mémoire immunitaire dépendante des lymphocytes B.

vi. Les Th9

Les Th9 sont une population récemment mise en évidence et qui fut d'abord considérée comme une sous-population de Th2. En effet les Th9 nécessitent, tout comme les Th2, l'activation de STAT5 et STAT6 pour leur différenciation, d'où la difficulté à les distinguer des Th2. Cependant STAT6 est nécessaire à l'expression des facteurs GATA3, Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4) et Basic leucine zipper transcription factor ATF-like (BATF), qui sont essentiels pour la sécrétion d'IL-9, la cytokine clé des Th9⁷⁸. Quant à STAT5, il permet l'expression de l'IL4R α ainsi que celle de IRF4 et de l'IL-9, tout en limitant l'activité du facteur B Cell Lymphoma 6 (Bcl6), qui réprime la différenciation Th9^{79,80}.

Leur production d'IL-9 permet aux Th9 de promouvoir le développement des cellules Th17 et induit le recrutement de cellules immunitaires qui favorisent l'inflammation^{81,82}. Cette cytokine favorise également l'activation des mastocytes via le maintien de leurs capacités sécrétrices et leur survie⁸³.

Les lymphocytes T CD4⁺ représentent donc un groupe hétérogène de cellules dont les différentes populations sont classées selon des caractéristiques bien précises, qui s'avèrent pourtant moins exclusives que cette classification peut le laisser penser. En outre, il serait trop simpliste de placer toutes les populations de lymphocytes T CD4⁺ à un même stade de différenciation et de plasticité.

III. Plasticité des lymphocytes T CD4⁺

La plasticité des lymphocytes T CD4⁺ concerne toutes les sous-populations dans une mesure plus ou moins importante. Tout d'abord cette notion de plasticité peut prendre plusieurs formes, en premier lieu l'expression simultanée de facteurs caractéristiques de différentes populations de lymphocytes T CD4⁺ ainsi que la modification de l'expression de ces facteurs au cours du temps. Récemment des études par single cell RNA sequencing (RNAseq) ont révélé une grande hétérogénéité dans ce qui était conceptualisé comme des sous populations relativement homogènes, telles que décrites précédemment. Concernant les Th17 notamment, des études ont confirmé qu'ils présentaient une variété de génotypes correspondant à des phénotypes allant de cellules inflammatoires à régulatrices^{84,85}. Des preuves de cette plasticité globale des lymphocytes T CD4⁺ ont également été observées chez l'homme, grâce à l'analyse phénotypique de cellules couplée au séquençage de TCR, qui a permis de montrer que les clones d'une même cellule T pouvaient présenter des fonctions différentes^{86,87}. Cette plasticité s'avère être une caractéristique inhérente aux lymphocytes T CD4⁺ qui leur permet d'adapter leurs fonctions aux changements de leur environnement. Cela implique de conceptualiser les signalisations clés de chaque sous-type défini non plus comme des voies hermétiques et scellées, mais comme des nœuds de signalisation intégrés qui se maintiennent ou se remodelent en fonction des signaux extérieurs reçus par la cellule.

A. Environnement et transdifférenciation

Le signal prédominant intervenant dans la reprogrammation des lymphocytes T CD4⁺ provient des cytokines environnantes. De nombreuses preuves de la capacité de cytokines particulières à modifier la fonction de lymphocytes T auxiliaires déjà différenciés existent. Dès 1995, on constate que l'exposition de Th1 à de l'IL-4 peut par exemple inhiber leur sécrétion d'IFN γ au profit d'une sécrétion d'IL-4⁸⁸. A l'inverse, l'exposition de Th2 aux IFN de type I, l'IFN γ et l'IL-12 amorce une reprogrammation qui débouche sur un phénotype hybride capable de sécréter de l'IL-4 et de l'IFN γ et coexprimant les facteurs Tbet et GATA3⁸⁹. Les Th9, dont le programme transcriptionnel est proche de celui des Th2, peuvent également être obtenus à partir de ces derniers s'ils sont exposés à du TGF β ⁹⁰. De la même manière, les T_{fh} peuvent être obtenus à partir d'autres populations de T effecteurs, en transitant par un phénotype hybride, en présence d'IL-6 et d'IL-21, et vice versa en présence des cytokines clés de chaque sous-type⁹¹. Les T_{Reg} n'échappent pas non plus à ce mécanisme et peuvent être convertis en cellules sécrétrices d'IL-17 en présence d'IL-6, d'IL-1 β et d'IL-23⁹² ou sécrétrices d'IFN γ en présence d'IL-12⁹³. Concernant les Th17 ils sont notamment capables d'adopter un phénotype pro-inflammatoire dans un milieu contenant de l'IL-12 ou de l'IL-23^{94,95} ou à l'inverse un phénotype immunosuppresseur en présence de TGF- β ^{96,97}. Cette plasticité des Th17 au profit d'un phénotype régulateur en réponse au TGF- β leur permet ainsi de participer à la résolution de l'inflammation.

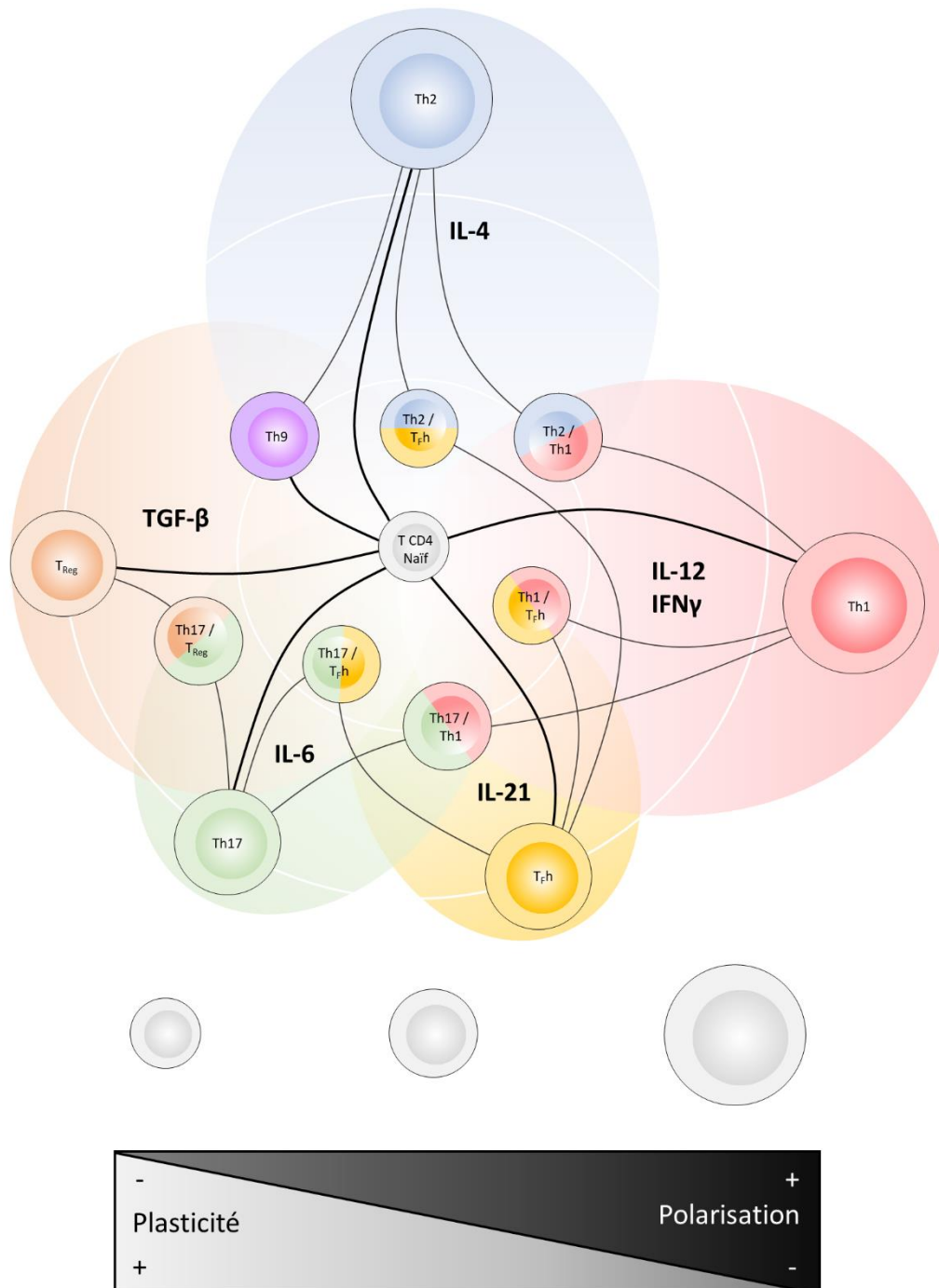


Figure 3 : Plasticité des différentes populations de lymphocytes T CD4⁺. Les populations de lymphocytes T CD4⁺ ne représentent pas des populations homogènes et hermétiques, mais des populations hétérogènes qui s'adaptent à leur environnement et forment un continuum de profils entre les populations dites classiques.

B. Mécanismes cytosoliques de la transdifférenciation

Ces signaux extracellulaires entraînent la transduction de voies intracellulaires, et notamment d'un axe primordial pour le contrôle de la plasticité, l'axe Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt-mechanistic Target Of Rapamycin (mTOR). Cette voie peut être activée par les récepteurs CD3 et CD28 comme par l'IL-2R, et son activité est inhibée par la Phosphatase and Tensine Homolog (PTEN), dont le rôle est antagoniste à celui de PI3K. L'un des points notables concernant cette voie étant qu'elle est activée et

Introduction

requis pour la fonction de la plupart des lymphocytes T CD4⁺, excepté pour les T_{Reg}, où PTEN l'inhibe justement^{98,99}. La déficience en mTOR empêche quant à elle les différenciations Th1, Th2 et Th17 et favorise l'expression de Foxp3, réprimant la reprogrammation des T_{Reg} en lymphocytes T CD4⁺ effecteurs¹⁰⁰⁻¹⁰². Cependant, là où son inhibition promeut la différenciation des T_{Reg}, l'activité des nT_{Reg} semble aussi dépendre des mTOR^{103,104}. Le rôle exact des mTOR dans les lymphocytes T CD4⁺ n'a donc pas encore livré tous ses secrets et semble dépendant d'un jeu complexe de régulations entre mTORC1 et mTORC2.

Outre les cytokines, les lymphocytes T CD4⁺ sont également sensibles à d'autres composantes de leur microenvironnement que sont les sources d'énergie, la disponibilité des nutriments et celle de l'oxygène. Elles répondent à ces signaux par des modifications de leur métabolisme qui ont un impact direct sur leur fonction. Le récepteur CD28 est notamment responsable de l'expression du glucose transporter 1 (GLUT1), en lien direct avec la voie PI3K-Akt-mTOR, aboutissant à une augmentation de l'import de glucose dans la cellule¹⁰⁵. De manière intéressante, il s'avère que si la déficience en GLUT1 impacte négativement la différenciation et la survie des T effecteurs et prévient l'apparition de maladies inflammatoires, elle n'affecte pas la fonction ni la survie des T_{Reg}¹⁰⁶. A l'inverse la déficience en PTEN dans les T_{Reg} est concomitante avec une diminution de l'expression de Foxp3 et l'augmentation de la production de cytokines effectrices, via une augmentation de la glycolyse¹⁰⁷. En outre, les voies activées par les inhibiteurs de point de contrôle, notamment CTLA-4 et PD-1, antagonisent l'import de glucose et la glycolyse, diminuant l'activation des cellules T^{108,109}. Mais à l'image du rôle des mTOR dans les T_{Reg}, le rôle de la glycolyse y est également plus complexe. En effet, la glycolyse peut à l'inverse maintenir les fonctions suppressives des nT_{Reg} via la voie PI3K-Akt-mTOR en réponse à la costimulation du TNF receptor 2 (TNFR2)¹¹⁰, s'opposant à l'idée que favoriser la glycolyse dans les lymphocytes T CD4⁺ engendrerait une reprogrammation strictement favorable à l'inflammation.

En parallèle de la glycolyse, le métabolisme de la glutamine est également important dans l'acquisition et le maintien des fonctions des lymphocytes T CD4⁺. Cette voie métabolique génère notamment de l' α -cétoglutarate, requis pour les Th1 mais bloquant les fonctions des T_{Reg} là encore via mTORC1¹¹¹.

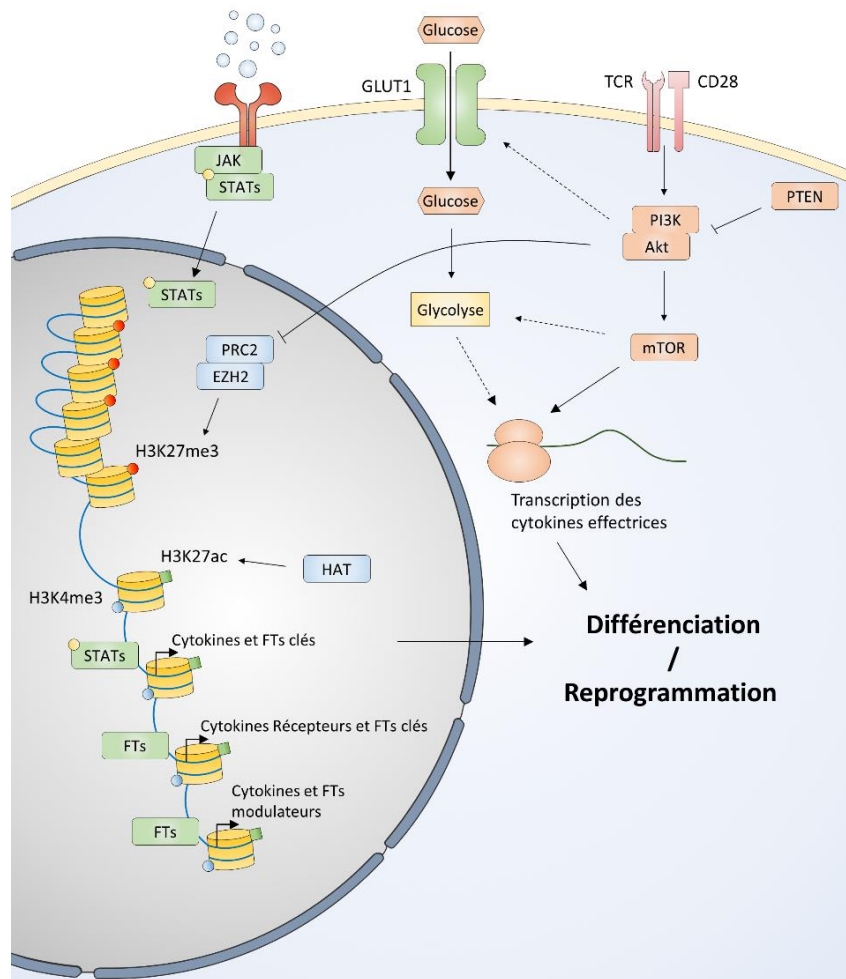


Figure 4 : Voies intracellulaires régulant la plasticité des lymphocytes T CD4⁺. La différenciation et la plasticité des lymphocytes T CD4⁺ est influencée par des facteurs extérieurs qui entraînent des modifications intracellulaires. Ces modifications permettent la stabilisation ou la modification du programme transcriptionnel des cellules et résulte en un maintien des fonctions ou au contraire un changement phénotypique.

C. Transdifférenciation et régulation des gènes

Si les STATs contrôlent la polarisation et la plasticité des lymphocytes T CD4⁺ en réponse aux cytokines présentes dans l'environnement avec la coopération des facteurs de transcription clés, ces deux centres de contrôle de la polarisation et de la plasticité des lymphocytes T CD4⁺ ne sont pas suffisants pour en expliquer toute la complexité au niveau transcriptionnel. Tout d'abord si les facteurs de transcription clés sont souvent abordés comme des marqueurs exclusifs délimitant les différentes populations de lymphocytes T CD4⁺, il serait en fait plus juste de les considérer comme des exécuteurs plus ou moins exprimés en fonction de l'environnement des lymphocytes T CD4⁺ et dont les fonctions antagonistes créent des balances qui penchent en faveur d'une population ou d'une autre. Beaucoup d'autres facteurs de transcription entrent en jeu dans le maintien du phénotype des lymphocytes T CD4⁺, dont les protéines Runt related transcription factor (RUNX)^{112,113}, les Interferon regulatory factor (IRF)¹¹⁴, les retinoic acid receptor (RAR)^{115,116}, le facteur Cellular Muscular Aponeurotic Fibrosarcoma (MAF)¹¹⁷⁻¹¹⁹, le facteur Aryl hydrocarbon receptor (Ahr)^{120,121} ou encore les protéines Forkhead Box O (FOXO)¹²²⁻¹²⁴. Ces facteurs eux-mêmes peuvent être sujets à une régulation sensible au microenvironnement des lymphocytes T CD4⁺. IRF1 est par exemple régulé par épissage alternatif dans

Introduction

les Th1, et le microenvironnement tumoral est capable d'influencer cette régulation¹²⁵. En effet, il favorise une isoforme d'IRF1 tronquée et capable d'altérer, par inhibition compétitive, l'activation de la transcription d'*Il12rb1*, entraînant une diminution de la sécrétion d'IFN γ par les cellules.

Cependant, tous ces facteurs de transcription sont soumis à une contrainte commune qui vient ajouter encore un niveau de complexité et de finesse dans la régulation des lymphocytes T CD4⁺, et qui n'est autre que l'accessibilité de la chromatine.

Le contrôle de l'accession des facteurs à la chromatine est en effet un aspect déterminant de la différenciation et de la plasticité des lymphocytes T CD4⁺. Dans ce contexte, la méthylation/acétylation des histones est un important facteur modulateur et particulièrement la méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me). Le polycomb répresseur Ezh2 est notamment capable, même à de faibles concentrations, d'induire une triméthylation d'H3K27 sur des sites de régulation des gènes *Tbx21* et *Ifng* dans les Th2 et à l'inverse des gènes *Gata3* et divers gènes codant pour des cytokines associées aux Th2 dans les Th1¹²⁶. Ce mécanisme permet de diminuer l'accès des facteurs de transcription à des *loci* particuliers afin de stabiliser la différenciation et le phénotype des lymphocytes T CD4⁺, en empêchant l'expression de facteurs et de cytokines entrant en compétition avec la différenciation initialement induite¹²⁷. Ezh2 est également impliqué dans le maintien de la fonction des T_{Reg} en réprimant, en coopération avec Foxp3, l'expression de gènes, afin de stabiliser le phénotype et d'en diminuer la plasticité¹²⁸. De manière opposée, certains facteurs peuvent induire une ouverture de la chromatine, notamment en déméthylant H3K27 et en l'acétylant, ou en tri-méthylant H3K4. Ainsi plusieurs enzymes peuvent être recrutées par des STATs sur certains *loci* afin de maintenir leur accessibilité durant la différenciation des lymphocytes T CD4⁺¹²⁹⁻¹³².

IV. Intérêt des lymphocytes T CD4⁺ en cancérologie

Le fait que les lymphocytes T CD4⁺ soient de véritables chefs d'orchestre de la réponse immunitaire, dotés d'une plasticité qui leur permet de s'adapter à leur environnement, rend leur rôle particulièrement intéressant dans l'immunité antitumorale. Plus encore, il semble aujourd'hui de plus en plus clair que les lymphocytes T CD4⁺ participent à la réponse antitumorale induite par les immunothérapies, même lorsque ces dernières ciblent en première intention les lymphocytes T CD8⁺. De nombreuses études se sont déjà penchées sur la question du rôle de chaque population de lymphocytes T CD4⁺ dans différents cancers, et la compréhension de ces mécanismes semble cruciale pour apprécier pleinement le fonctionnement et les dysfonctionnements des immunothérapies.

Chaque population de lymphocytes T CD4⁺ a été étudiée pour en connaître l'impact sur la croissance tumorale, et en premier lieu les Th1. Il est aujourd'hui admis que ces cellules exercent une activité antitumorale principalement par leur sécrétion d'IFN γ et de TNF α et sont associés à un meilleur pronostic¹³³⁻¹³⁶. À l'inverse les T_{Reg} ont largement été associés à un impact positif sur la croissance tumorale, via la sécrétion de cytokines immunosuppressives qui inhibent la réponse immunitaire antitumorale^{137,138}. Ces cellules peuvent représenter jusqu'à 30 % des lymphocytes T CD4⁺ infiltrants la tumeur et des études ont montré que la plasticité des lymphocytes T CD4⁺ permettait la reprogrammation de T effecteurs en T_{Reg} au sein de la tumeur^{139,140}. Les T_{Reg} sont aussi capables d'inhiber l'activité des APCs et des lymphocytes T effecteurs grâce à CTLA-4^{70,141} et LAG-3¹⁴². Les Th9 semblent également avoir une activité antitumorale bien caractérisée¹⁴³⁻¹⁴⁶, tandis que les Th2, s'ils peuvent avoir des effets anti-tumoraux¹⁴⁷, sont principalement associés à un mauvais pronostic et des effets pro-tumoraux^{39,148,149}. Pour ce qui est des Tfh, ils semblent quant à eux participer à la réponse immunitaire antitumorale et être associés à un bon pronostic¹⁵⁰⁻¹⁵². Quant aux Th17, ils ont une

Introduction

certaines ambivalence et peuvent parfois être associés à une réponse antitumorale et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires¹⁵³⁻¹⁵⁵, tandis qu'ils s'avèrent dans d'autres cas pro-tumoraux et capables de sécréter des cytokines immunosuppressives^{51,153,156}.

De plus, au-delà de leur capacité à soutenir la réponse immunitaire antitumorale, les lymphocytes T CD4⁺ peuvent également exercer une action cytotoxique directe sur les cellules tumorales. En effet, plusieurs équipes ont démontré récemment qu'une population de lymphocytes T CD4⁺ cytolytique était capable de produire du Granzyme B et de la perforine, exerçant des fonctions cytotoxiques qui favorisent le rejet des tumeurs^{157,158}. Cette population est inhibée par la présence de T_{Reg} qui captent préférentiellement l'IL-2, responsable de l'induction du Granzyme B via Blimp1¹⁵⁷. Des analyses de single cell RNAseq ont révélé que ces cellules sont caractérisées par l'expression de RUNX3, des différents Granzymes et de Perforine ainsi que de Signaling lymphocytic activation molecule family member 7 (SLAMF7)¹⁵⁸.

Ces découvertes soulignent encore la capacité d'adaptation des lymphocytes T CD4⁺, héritée de leur plasticité, et l'intérêt de mieux appréhender la manière dont ils influencent et sont influencés par le microenvironnement tumoral afin d'optimiser les immunothérapies.

A. Impact du microenvironnement tumoral sur la réponse T CD4⁺

La communication des cellules entre elles s'opère par divers signaux, qui peuvent s'incarner dans le relargage d'ions, un contact entre des récepteurs membranaires ou la sécrétion de cytokines. Le microenvironnement tumoral est un environnement riche en cellules productrices de cytokines qui peuvent se subdiviser en différentes familles selon leurs rôles : interleukines, interférons, TNF, facteurs de croissance et chemokines. Ainsi lorsque des lymphocytes T CD4⁺ infiltrent une tumeur, ils vont être exposés à différentes cytokines capables de moduler leurs fonctions.

i. Le TGF-β et IL-6

Le TGF-β est une cytokine immunosuppressive présente dans le microenvironnement tumoral, sécrétée par différentes cellules immunitaires mais également par les cellules tumorales elles-mêmes. Si elle permet la différenciation T_{Reg} elle exerce aussi un impact non-négligeable sur les autres populations de lymphocytes T CD4⁺ en inhibant l'expression de leurs facteurs clés^{159,160}. Une étude récente a notamment montré que l'inhibition spécifique de la signalisation du TGF-β sur les lymphocytes T CD4⁺, grâce à un anticorps anti-CD4 couplé à un récepteur au TGF-β, avait un effet antitumoral dépendant de la sécrétion d'IL-4¹⁶¹.

L'IL-6 qui peut être produite par les cellules cancéreuses elles-mêmes est connue pour bloquer l'activité de FOXP3 au sein des lymphocytes T CD4⁺ et ainsi limiter la capacité du TGF-β à promouvoir la population T_{Reg}¹⁶². Elle participe à la différenciation des Th17 et des T_H, augmentant ainsi l'inflammation et la réponse antitumorale associée à ces deux populations. Cependant comme détaillé plus loin, la balance entre le TGF-β et l'IL-6 peut faire émerger une population de Th17 immunosuppresseurs, qui favorisent la croissance tumorale.

ii. L'IL-2

L'IL-2 est une cytokine clé dans la différenciation, la survie et la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et représente la cytokine la plus étudiée dans le domaine du cancer^{163,164}. Cependant, le récepteur de l'IL-2 est composé de 3 sous-unités (α, β et γ), dont la forme hétérotrimérique possède la plus grande affinité pour l'IL-2¹⁶⁵. Cette forme est majoritairement exprimée par les T_{Reg} qui vont pouvoir exercer leur immunosuppression en privant notamment les autres lymphocytes T CD4⁺ d'IL-2¹⁶⁶. Dans un

Introduction

environnement riche en IL-2 et en TGF- β , les lymphocytes T CD4⁺ vont également exprimer FOXP3 et produire de l'IL-10, participant ainsi à la mise en place et au maintien de l'immunosuppression dans le microenvironnement tumoral. A noter que l'IL-2 fait partie des premières cibles de thérapies basées sur les cytokines à avoir été utilisées¹⁶⁴ et fait encore aujourd'hui l'objet de recherches afin notamment de traiter des patients avec de l'IL-2 recombinante à faible affinité pour l'IL2R α , évitant ainsi la prolifération des T_{Reg} tout en stimulant la prolifération des T effecteurs¹⁶⁷.

iii. L'IL-1 β et IL-17

Le rôle de l'IL-1 β dans le microenvironnement tumoral est quant à lui plus difficile à cerner, et semble plutôt ambivalent. En effet, l'IL-1 β sécrétée dans le microenvironnement tumoral induit la sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes T CD4⁺, et accentue par ce biais l'immunosuppression^{168,169}, l'angiogenèse et la croissance tumorale^{170,171}. A l'inverse, l'IL-1 β est également associée à l'éradication de lymphomes¹⁷² ou de mélanomes¹⁷³ via une réponse Th1 dépendante, et aux fonctions antitumorales des Th9^{146,174}, où il remplace le TGF- β nécessaire à la différenciation de ces derniers¹⁷⁵. Il semble que la clé pour comprendre cette ambiguïté se trouve dans la concentration d'IL-1 β présente dans le microenvironnement tumoral. En effet si de faibles concentrations favorisent la croissance tumorale, de fortes concentrations vont à l'inverse promouvoir la réponse immunitaire anti-tumorale¹⁷⁶.

iv. Le TNF α

Le TNF α a été identifié dès 1975 comme une cytokine capable d'induire la nécrose de sarcomes de souris, capacité dont il tire son nom¹⁷⁷. Cette cytokine semble être l'une des armes des CD8⁺ spécifiques de la tumeur afin de l'éradiquer¹⁷⁸, et peut également être sécrétée par les lymphocytes T CD4⁺ dans ce même but¹⁷⁹. Les auteurs mentionnent également que cet effet nécessiterait la sécrétion simultanée d'IFN γ . Cependant, si le TNF α peut avoir un impact délétère direct sur les cellules tumorales, il peut aussi en favoriser indirectement le développement. En effet, le TNF α est également connu pour promouvoir l'immunosuppression dans le microenvironnement tumoral¹⁸⁰⁻¹⁸³ et stimuler les T_{Reg} qui expriment son récepteur, le TNFR2, dans des proportions plus importantes que les autres lymphocytes T CD4⁺¹⁸⁴. Les effets du TNF α semblent eux aussi dépendants de la dose de cytokine présente dans le milieu, mais également de synergies avec d'autres cytokines, et notamment l'IFN γ , afin de promouvoir la réponse immunitaire antitumorale.

v. Les IFNs

Les IFNs sont classés en trois catégories, des types I à III. Les interférons de type I, l'IFN α et l'IFN β présentent notamment des propriétés anti-tumorales¹⁸⁵. Ils sont associés à l'activation des CD8⁺ infiltrants les tumeurs¹⁸⁶, mais également à une augmentation de l'activation des lymphocytes T CD4⁺¹⁸⁷ et une réduction de la fréquence des T_{Reg}¹⁸⁸. L'IFN γ représente quant à lui le seul interféron de type II et a beaucoup été étudié pour ses fonctions dans le microenvironnement tumoral. Il est entre autre capable d'augmenter l'expression du CMH-I par les cellules tumorales, augmentant ainsi leur antigénicité¹⁸⁹. Il est aussi connu pour stimuler l'activité cytotoxique des CD8⁺ et des NK¹⁹⁰ et orienter la polarisation des macrophages vers un phénotype inflammatoire M1¹⁹¹, conduisant à une inhibition de la croissance tumorale. Il peut également inhiber la prolifération des cellules cancéreuses^{192,193}, induire leur apoptose¹⁹⁴, ou encore inhiber l'angiogenèse^{195,196}. Cependant, si l'IFN γ a longtemps été considéré comme central dans la réponse immunitaire antitumorale, il pourrait également posséder des propriétés pro-tumorales indirectes, notamment dûes à la pression qu'il impose sur les cellules entraînant la sélection des clones les moins immunogènes et l'échappement de la tumeur¹⁹⁷. Mentionnons également que l'IL-12 possède des propriétés antitumorales par le biais de la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ en Th1 et leur sécrétion d'IFN γ ¹⁹⁸.

Parmi les cytokines sécrétées par les cellules tumorales, certaines sont capables de favoriser la différenciation et la reprogrammation des lymphocytes T CD4⁺ vers un profil Th2. En retour les lymphocytes T CD4⁺ vont produire de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13, inhibant la réponse Th1¹⁹⁹, et corrélées avec l'infiltration de myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) dans le microenvironnement tumoral²⁰⁰. Toutefois l'IL-4 est également capable d'induire des fonctions antitumorales dans certains contextes²⁰¹, ne rendant pas le rôle favorable des Th2 envers la croissance tumorale systématique.

Tableau 1 : Effets des cytokines du microenvironnement tumoral sur la réponse immunitaire, les lymphocytes T CD4⁺ et la croissance tumorale²⁰²

Cytokines	Effets sur la réponse immunitaire	Population de T CD4 associée	Effets sur la croissance tumorale
TGF-β	Immunosuppressive	Treg, Th9	Promoteur
IL-6	Inflammatoire	Th17	Promoteur
IL-2	Inflammatoire	Toutes	Ambivalent
IL-1β	Inflammatoire	Th17, Th9	Ambivalent
TNFα	Inflammatoire	Th1, Th17	Ambivalent
IL-17	Inflammatoire	Th17	Promoteur
IL-4	Immunosuppressive	Th2, Th9	Ambivalent
IL-13	Immunosuppressive	Th2	Promoteur
IFNs type I	Inflammatoire	Th1	Inhibiteur
IFN type II	Inflammatoire	Th1	Inhibiteur
IL-12	Inflammatoire	Th1	Inhibiteur

Toutes ces cytokines influant sur le phénotype des lymphocytes T CD4⁺ et elles-mêmes sécrétées par les lymphocytes T CD4⁺ ont un fonctionnement fin et complexe, dépendant de la dose et souvent de synergies et de balances entre elles, ainsi que de l'affinité des récepteurs exprimés par les populations de cellules dont elles sont la cible. Tous ces points sont autant de difficultés rencontrées pour élaborer des traitements à base de cytokines ou inhibant leurs actions et mettent en évidence l'intérêt de chercher d'autres moyens de moduler les lymphocytes T CD4⁺ dans le cancer. Ceci concerne d'autant plus les populations les plus plastiques et versatiles, telles que les Th17.

V. Différenciation, fonctions et plasticité des Th17

Les Th17 sont, comme évoqué plus tôt, la troisième population de lymphocytes T CD4⁺ à avoir été découverte, mettant fin au paradigme Th1/Th2 qui existait alors depuis plus d'une décennie. Leur découverte s'est faite dans le contexte de l'auto-immunité, et plus particulièrement l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Cette maladie est provoquée chez la souris par une immunisation contre la myéline, responsable d'une inflammation du système nerveux central entraînant une démyélinisation des neurones. Des Th1 auto-réactifs y ont été associés car capables de transmettre l'EAE après transfert à des souris saines, mais aussi après constat que des souris déficientes pour STAT4 ou T-bet y étaient insensibles et que les thérapies basées sur des anticorps polyclonaux ciblant l'IL-12 s'avéraient efficaces. Cependant le fait que des souris déficientes pour l'IFNγ ou l'IL-12p35 et leurs récepteurs respectifs n'étaient pas protégées contre l'EAE semblait contre intuitif et remettait en question l'implication des Th1²⁰³⁻²⁰⁵. Ce n'est qu'avec la découverte au début des années 2000 d'une nouvelle chaîne de cytokine, p19, que la pièce manquante du puzzle allait être

Introduction

trouvée. En effet cette chaîne de cytokine forme avec l'IL-12p40 un dimère qui a été nommé IL-23²⁰⁶. Et il s'avère que les souris déficientes en IL-23p19 étaient bel et bien résistantes à l'EAE, expliquant le paradoxe entre l'échec du KO IL-12p35 et le succès des anticorps polyclonaux ciblant l'IL-12 à stopper la maladie²⁰⁷. Rapidement après, il fut découvert que l'induction de l'EAE par l'IL-23 était imputable à une population de lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-17 et se différenciant en présence d'IL-23²⁰⁸. C'est sur cette base qu'ont été découverts et nommés les Th17^{54,209}, avec cependant encore une part d'ombre évidente sur les signaux cytokiniques nécessaires à leur différenciation étant donné que les lymphocytes T CD4⁺ naïfs n'expriment pas le récepteur de l'IL-23²¹⁰.

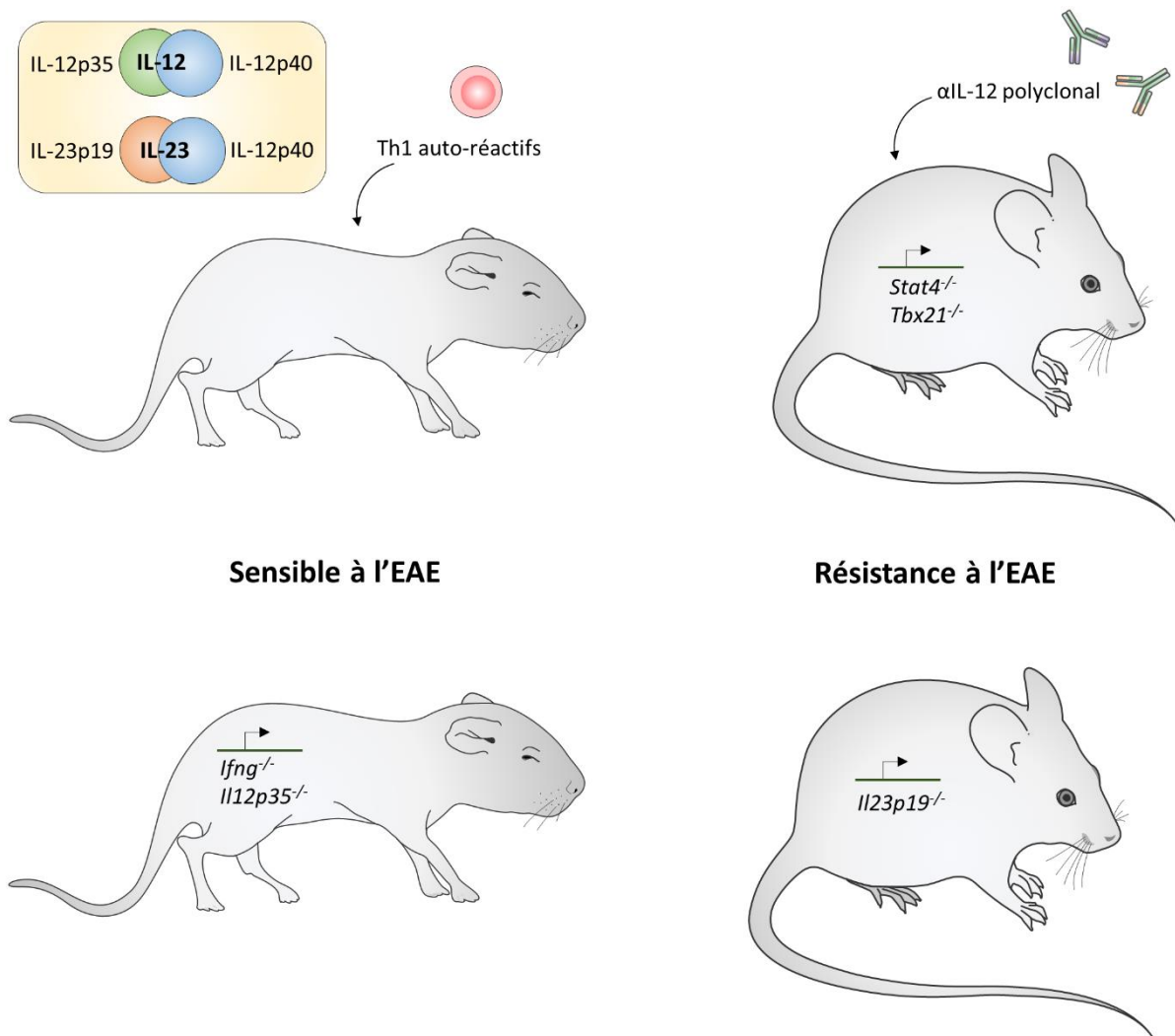


Figure 5 : Découverte de l'IL-23 dans le contexte de l'EAE. Les souris auxquelles sont transférés des Th1 auto-réactifs développent des EAE et un traitement à l'anti-IL-12 polyclonal ou la déficience en Stat4 ou Tbet les en prémunit, désignant les Th1 comme responsables de la maladie. Pourtant les souris déficientes pour *Ifng* ou *Il12p35* n'y sont pas résistantes. Il s'est avéré que des souris déficientes en *Il23* sont résistantes à l'EAE, IL-23 qui partage une sous unité avec l'IL-12, expliquant l'efficacité des traitements polyclonaux. La découverte de l'IL-23 dans ce contexte a permis d'identifier et caractériser les Th17.

A. Mécanismes de différenciation, plasticité et profil sécrétoire

Comme décrit brièvement plus tôt (Les lymphocytes T CD4⁺ dans le cancer II.B.iii), les Th17 se différencient en présence de deux cytokines aux effets opposés, l'IL-6 et le TGF- β ²¹⁰⁻²¹², qui par une balance d'effets antagonistes permettent l'induction du programme transcriptionnel des Th17. L'IL-6 est en effet capable d'inhiber l'induction de FOXP3 par le TGF- β , et des souris déficientes en IL-6 présentent un déficit en Th17 au profit de T_{Reg}. Cependant, lorsque ces derniers sont déplétés dans des souris *Il6*^{-/-}, une population de lymphocytes T CD4⁺ producteurs d'IL-17 reste malgré tout présente, grâce à l'IL-21 qui semble suffisante pour remplacer l'IL-6 en l'absence de T_{Reg}⁴⁶. Les facteurs déjà évoqués, STAT3 et ROR γ t (Les lymphocytes T CD4⁺ dans le cancer II.B.iii), impliqués dans l'axe dit critique de la différenciation Th17 induit par l'IL-6, représentent la conception classique à deux facteurs de la différenciation des lymphocytes T CD4⁺. Mais cette conception sous-estime malheureusement la complexité multifactorielle de la différenciation Th17 et les nuances intrinsèques des sous-populations existantes. Car si ces facteurs sont effectivement indispensables pour générer des cellules productrices d'IL-17, une myriade d'autres facteurs viennent moduler finement les fonctions des Th17.

i. Rôle des cytokines dans la différenciation Th17

Le premier point de complexité à aborder concerne l'IL-23 et son récepteur absent des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. L'expression de ce récepteur est en fait consécutive à la signalisation autocrine d'IL-21 induite dans les lymphocytes T CD4⁺ par l'IL-6⁴⁵. Et si l'absence d'IL-21 n'empêche pas la différenciation des Th17, elle limite l'apparition d'un phénotype inflammatoire de ces derniers en diminuant leur sensibilité à l'IL-23^{46,213}. De plus, une étude récente a montré que l'IL-21 semble cruciale dans la différenciation Th17 induite en l'absence de TGF- β , et qu'elle permet, par une boucle de rétrocontrôle positif, d'amplifier l'expression de ROR γ t, par le biais de STAT3²¹⁴.

Ensuite si l'IL-6 est surtout mentionnée pour son activation de STAT3, entraînant simultanément l'expression de ROR γ t et la répression de FOXP3, elle est aussi capable d'activer STAT1^{215,216}. Cette balance d'activation penche clairement en faveur de fonctions inflammatoires et ainsi d'un phénotype nommé Th17 inflammatoire (Th17i). En parallèle cependant, ROR γ t réprime quant à lui la transcription de *Tbx21*, évitant une éventuelle transdifférenciation complète en Th1²¹⁷. En outre, la présence ou l'absence de TGF- β est un pivot déterminant entre le devenir immunosuppresseur⁵⁸, produisant de l'IL-10, et inflammatoire des Th17²¹⁸. En considérant qu'*in vivo* l'absence totale de TGF- β soit assez peu probable, il peut alors émerger un modèle où le caractère inflammatoire des Th17 est inversement proportionnel à la concentration de TGF- β . Ceci place les Th17 comme un pivot entre inflammation et immunosuppression, s'adaptant à leur environnement. Dans ce contexte, différents facteurs vont favoriser et caractériser les Th17i et les Th17 immunosuppresseurs, nommés Th17 régulateurs (Th17r).

Pour revenir à l'IL-23 qui favorise le phénotype Th17i, elle tire cette caractéristique du fait qu'elle active STAT4 et T-bet, qui vont provoquer la hausse simultanée de l'expression d'IL-17 et d'IFN γ ^{94,219,220}. En parallèle cependant, l'IL-23 permet l'augmentation de la transcription d'AhR impliqué dans la régulation de la différenciation Th17²²¹. Etant donné que ce facteur possède des sites de fixation putatifs dans les promoteurs des gènes *Foxp3*, *Stat1* et *Stat5*, il est possible qu'AhR joue un rôle dans la régulation du phénotype des Th17 via l'expression de ces gènes²²².

Une autre cytokine, l'IL-1 β , semble jouer un rôle clé dans l'acquisition d'un phénotype inflammatoire Th17. Cette cytokine est connue pour son potentiel inflammatoire, et des souris déficientes pour son récepteur sont résistantes à l'EAE et ont une proportion de Th17 inférieure aux souris WT²²³. En cohérence, l'IL-1 β est également connue pour limiter l'inhibition qu'exerce l'IL-2 sur l'expression de ROR γ t et l'IL23R²²⁴. De plus, elle est capable de diminuer l'expression de Suppressor of cytokine

Introduction

signaling 3 (SOCS3), entraînant une stabilisation de l'activité de pSTAT3 et faisant pencher la balance pSTAT3/pSTAT5 en faveur du phénotype Th17i²²⁵.

Le TGF- β est quant à lui connu pour induire la différenciation des T_{Reg}, mais est également un acteur majeur de la polarisation des Th17r et la répression du phénotype Th17i. En effet en l'absence de TGF- β *in vitro* ou la répression de son activité par SMAD7, les Th17 acquièrent un phénotype plus inflammatoire²²⁶, tandis que des quantités relativement faibles de cette cytokine suffisent à maintenir un phénotype plutôt régulateur^{227,228}. En activant la voie R-Smad, le TGF- β participe d'une part à augmenter la transcription de facteurs clés des Th17 via la coopération de Smad2 avec STAT3, mais également à augmenter la transcription de gènes associés à l'immunosuppression via SMAD3, facteur connu pour augmenter l'expression de *Foxp3*²²⁹.

ii. Facteurs de transcription et polarisation des Th17

Dans la chronologie des facteurs activés et associés à la différenciation Th17, d'autres facteurs que les STATs et notamment STAT3, semblent intervenir en amont de ROR γ t. C'est le cas de IRF4 et de BATF, qui ont émergé comme deux facteurs primordiaux pour les Th17. En effet, des souris déficientes pour IRF4 sont résistantes à l'EAE et l'expression de ROR γ t est fortement diminuée dans des lymphocytes T CD4⁺ *Irf4*^{-/-} exposés à de l'IL-6 et du TGF- β . Restaurer l'expression de IRF4 ne suffit en outre pas à complètement restaurer la production d'IL-17 dans ces cellules²³⁰. En parallèle, BATF participe lui aussi à la différenciation Th17 en amont de ROR γ t et son absence induit une diminution de la production d'IL-17 qui ne peut, elle non plus, être restaurée par la surexpression de ROR γ t²³¹. Ces effets communs aux deux facteurs peuvent s'expliquer par le fait que l'activation du TCR induit l'assemblage d'un complexe hétérodimérique IRF4-BATF, indépendamment de la signalisation cytokinique. Ils sont notamment retrouvés sur des sites de régulation des gènes *Il17a* et *Il17f* dont ils maintiennent la chromatine ouverte et par conséquent les sites accessibles pour d'autres facteurs de transcription²³². Le constat que ces deux facteurs sont également induits dans des conditions de différenciation Th0, où les cellules sont activées en l'absence de cytokines, a fait émerger l'idée qu'ils constituent des facteurs pionniers de la différenciation lymphocytes T CD4⁺. Dans les Th17 ils seraient à l'origine d'un remodelage de la chromatine, constituant une première étape de la différenciation. Dans une seconde étape, ceci permet aux facteurs de transcription clés, régulés par les voies de signalisation induites par les cytokines, d'accéder aux promoteurs des gènes afin d'engager les cellules dans un programme transcriptionnel Th17. Mais l'implication de IRF4 dans la différenciation Th17 semble être plus complexe encore. Il permet également de limiter l'apparition d'un phénotype Th17i en fonction de sa persistance²³³. En effet, IRF4 est rapidement dégradé dans les Th17i, contrairement à des Th17 non-inflammatoires dans lesquels il persiste plus longtemps. De plus l'inhibition de sa dégradation empêche la polarisation Th17i. Cet impact de IRF4 sur le phénotype des Th17 n'est qu'un exemple parmi une multitude de facteurs secondaires (**Tableau 2**), qui interviennent dans le maintien et la modulation fine de certaines fonctions des Th17. Le tout en appont de la balance des facteurs clés des différentes populations classiques de lymphocytes T CD4⁺.

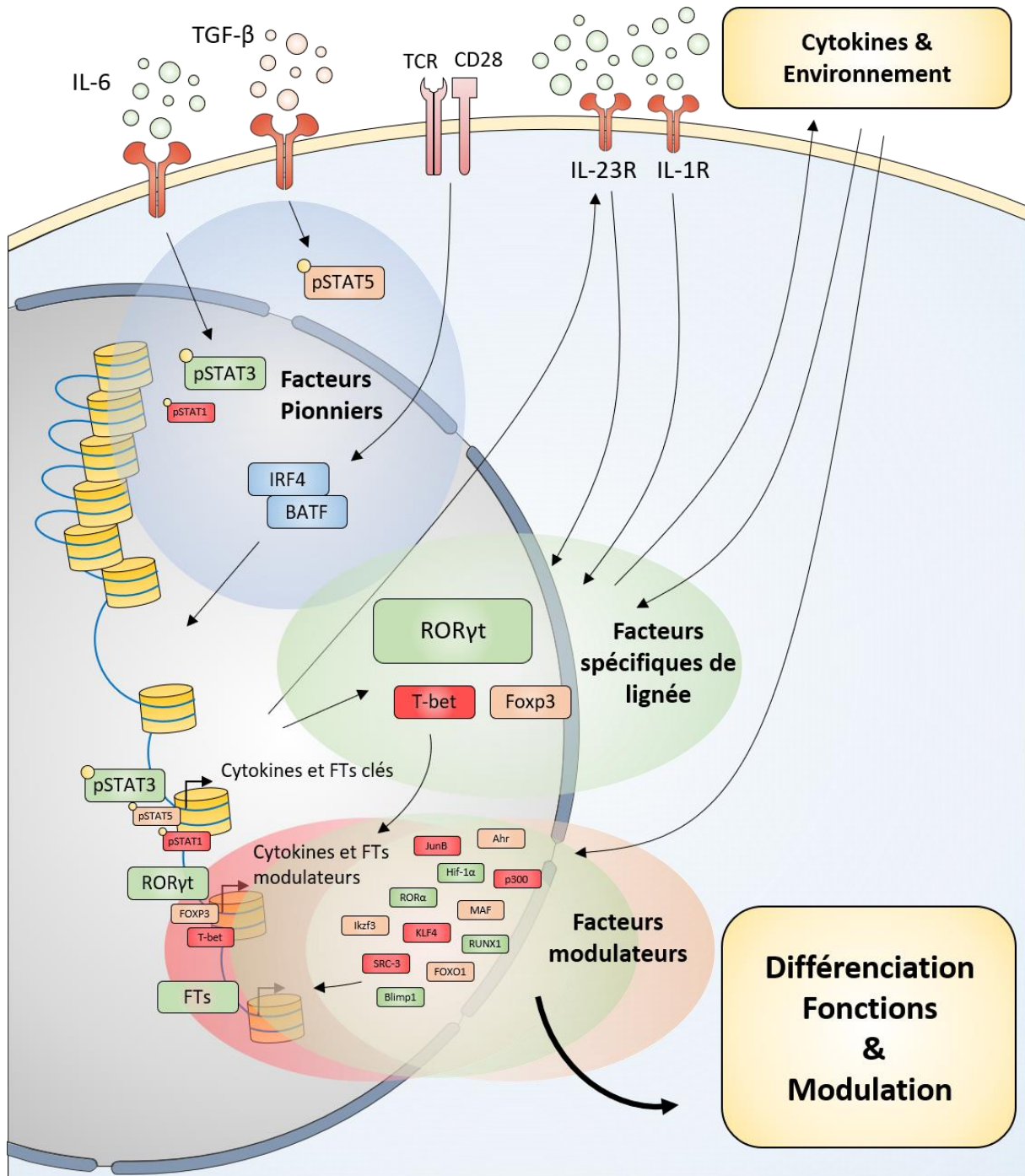


Figure 6 : Etapes de différenciation des Th17. Lors de leur différenciation, les Th17 passent d'abord par une étape d'initiation qui mobilise IRF4, BATF et STAT3 afin de rendre accessibles les gènes et d'initier la transcription des gènes codant pour les facteurs spécifiques de lignée. Ces facteurs vont ensuite eux-mêmes activer la transcription de gènes modulateurs qui vont orienter et stabiliser le phénotype des Th17 en fonction de leur environnement.

Ces facteurs ont souvent la particularité, contrairement à RORγt, de ne pas être indispensables à la différenciation Th17. Cependant, leur absence se traduit par une augmentation de la plasticité ou une polarisation vers un phénotype Th17i ou Th17r. Parmi ces facteurs on peut citer SMAD3 qui induit l'expression de FOXP3, et dont la phosphorylation est directement induite par le TGF-β, faisant pencher la balance du côté Th17r. MAF et AhR sont aussi connus pour leur impact favorable au phénotype Th17r dans cette balance. En parallèle, RUNX1 semble être un facteur pivot du phénotype Th17 par le

biais de la compétition entre FOXP3, ROR γ t et T-bet pour interagir avec lui et faire pencher la balance d'un côté ou de l'autre.

On peut également illustrer le potentiel d'adaptabilité des Th17 par les mécanismes impliquant des modifications métaboliques. CD5-like molecule (CD5L) n'est par exemple pas un facteur essentiel à la différenciation Th17, qui a cependant un impact important sur la balance phénotypique. Il est impliqué dans la balance entre acides gras, et lorsque cette balance penche du côté polyinsaturé ou saturé, les Th17 acquièrent un phénotype respectivement régulateur ou inflammatoire⁸⁵. La signalisation calcique, la génération d'espèces réactives de l'Oxygène (ROS) et la glycolyse sont également impliquées dans cette balance²³⁴⁻²³⁸. Un taux plus élevé de glycolyse, notamment dû à l'activité de l'enzyme Glucose-6-phosphate isomérase 1 (Gpi-1)²³⁵, entraîne dans les Th17 l'activation d'une voie impliquant c-Rel et favorisant le phénotype Th17i²³⁴. De la même manière, l'activité de Stromal interaction molecule 1 (STIM1) dans la signalisation calcique régule positivement la phosphorylation oxydative qui favorise le phénotype Th17i, tandis que leur inhibition permet la génération de ROS qui vont faire pencher la balance du côté Th17r²³⁷.

En conséquence, plusieurs études ont déjà démontré qu'il était possible de différencier les Th17i et les Th17r du point de vue de leur profil transcriptionnel. Ces études étant faites dans le contexte de l'EAE, elles ont notamment permis de mettre en évidence et de valider une signature génétique des Th17 pathogéniques^{218,239-241}.

Tableau 2 : Facteurs secondaires impliqués dans l'orientation phénotypique des Th17

FACTEURS SECONDAIRES IMPLIQUES	IMPACT SUR LE PHENOTYPE DES TH17	REFERECENCES
SRC-3	Associé aux Th17i	242
T-bet	Associé aux Th17i	243
RORα	Stabilisation du phénotype Th17	244
FOXO1	Associé aux Th17r	245
RUNX1	Ambivalent	228,246
RBPJ	Associé aux Th17i	247
JunB	Associé aux Th17i	248
Blimp1	Ambivalent	157,249,250
KLF4	Associé aux Th17i	251
p300	Associé aux Th17i	242
Foxp3	Associé aux Th17r	252
IRF4	Associé aux Th17r	233,253
Hif-1α	Ambivalent	254-256
MAF	Associé aux Th17r	257,258
AhR	Associé aux Th17r	256
IKZF3	Associé aux Th17r	259
SMAD3	Associé aux Th17r	229
CD5L	Associé aux Th17r	85
OXPHOS	Associé aux Th17i	260
ROS	Ambivalent	237,261
Stim1	Ambivalent	236,237
Gpi-1	Associé aux Th17i	262

Introduction

iii. Profil des sous-populations de Th17

La diversité de facteurs décrits précédemment et l'équilibre entre leurs effets, induisent une diversité tout aussi importante de Th17. Ils s'étalent dans un continuum de degrés de polarisation, allant du profil Th17r, proche des T_{Reg}, au profil Th17i, proche des Th1, en passant par un stade plus neutre que l'on détermine classiquement comme le stade Th17. On peut considérer le stade Th17 comme une étape de la différenciation en amont des phénotypes Th17i et Th17r, ou placer ces trois phénotypes sur une même ligne sur laquelle un Th17 peut naviguer durant son existence, en fonction des signaux qu'il reçoit de son environnement.

Quoi qu'il en soit, les Th17i et Th17r se différencient par un certain nombre de caractéristiques phénotypiques évoquées précédemment et dont ils tirent leurs fonctions. Si ces deux populations sécrètent toujours de l'IL-17, expriment le récepteur C-C chemokine receptor type 6 (CCR6) à leur surface et ROR γ t, les Th17i se distinguent par leur sécrétion accrue de TNF α , d'IFN γ et de Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) et l'expression de CXCR3²⁶³, tandis que les Th17r vont plutôt se distinguer par une sécrétion plus importante de TGF- β et d'IL-10²⁶⁴. Les Th17r se distinguent aussi par l'expression des ectonucléotidases, CD39 qui dégrade l'ATP en adénosine mono-phosphate (AMP), et CD73 qui dégrade l'AMP en adénosine (ADO), possédant un fort potentiel immunosuppresseur⁵¹.

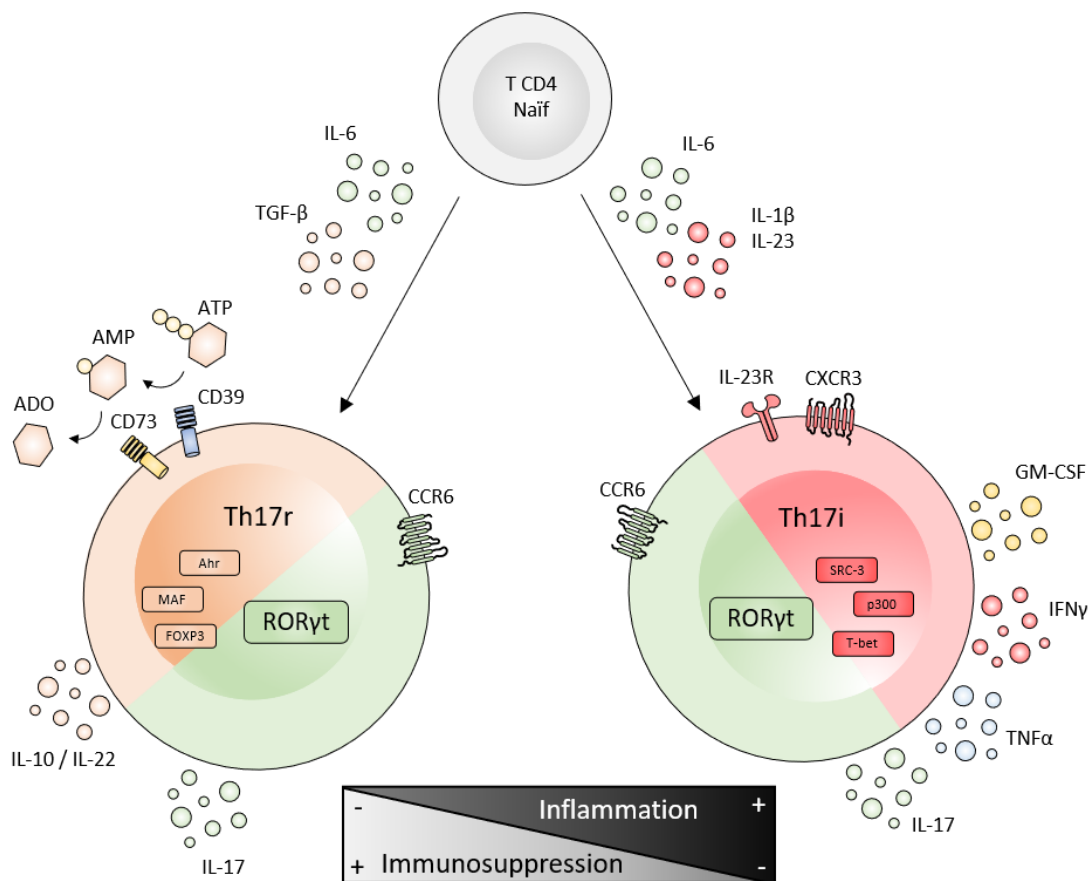


Figure 7 : Caractéristiques et profil sécrétoire des Th17i et des Th17r. Les Th17r se différencient dans un environnement riche en TGF- β , ils sont capables de dégrader l'ATP en adénosine et sécrètent de l'IL-10 et de l'IL-22, leur conférant des propriétés immunosuppressives. A l'inverse les Th17i se différencient dans un milieu riche en IL-1 β et IL-23, ils sécrètent du GM-CSF, de l'IFN γ et du TNF α qui leur confèrent des propriétés pro-inflammatoires. Chacune de ces deux sous-populations est caractérisées par l'expression de facteurs de transcription qui orientent leur programme.

Introduction

La plasticité et l'adaptabilité des Th17 laisse encore de grandes zones d'ombre qui rendent difficile l'intégration de toutes leurs voies de régulations. Cela permettrait cependant de dégager un schéma de compréhension global de leur fonctionnement, dont l'enjeu est d'inhiber ou contrôler la reprogrammation des Th17 afin d'en faire des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement de maladies dans lesquelles ils sont impliqués.

B. Fonctions et implications en pathologie

Dans le cadre d'une réponse immunitaire fonctionnelle, les Th17 sont souvent associés à la réponse immunitaire dirigée contre les bactéries et les champignons. Ils sont d'ailleurs majoritairement présents dans la *lamina propria* de l'intestin où ils régulent le transport d'IgA et le recrutement de granulocytes et stimulent l'immunité anti-microbienne via les cytokines qu'ils sécrètent. Ils y exercent une fonction de régulation de l'homéostasie qui vise à éliminer efficacement les pathogènes tout en préservant le microbiote commensale²⁶⁵. Ils ont également une fonction similaire dans les muqueuses orales ou dans la peau²⁶⁶. Cependant les dérégulations de l'environnement des Th17 peuvent les conduire à s'orienter vers le phénotype Th17i qui induit des colites de par la sécrétion d'IFN γ et de GM-CSF ou de l'arthrite rhumatoïde²⁶⁷, du psoriasis²⁶⁸ et du lupus érythémateux²⁶⁹. A l'inverse l'absence de Th17 fonctionnels augmente les risques d'infections de ces compartiments par des pathogènes opportunistes comme *Candida albicans*. Certaines inflammations liées aux Th17 peuvent également être provoquées en deux temps, à cause du mécanisme de réactivité croisée dont sont dotés les Th17. En effet, il a récemment été démontré qu'une infection intestinale par *C.albicans* pouvait stimuler la prolifération de Th17 à réactivité croisée, qui peuvent ensuite être recrutés dans les poumons suite à une infection par *Aspergillus Fumigatus* et y provoquer l'inflammation des voies respiratoires²⁷⁰.

Comme déjà évoqué, l'EAE chez la souris repose également sur une inflammation médiée par des Th17i, nommés Th17 pathogéniques dans ce contexte. Ici aussi, le GM-CSF et l'IFN γ sécrétés par les Th17 jouent un rôle important dans la pathogénicité de ces derniers²⁷¹. Chez des patients atteints de sclérose en plaque, les Th17, dont on retrouve une fréquence plus élevée dans les lésions cérébrales²⁷², semblent également jouer un rôle dans l'inflammation du SNC. De même, les productions d'IL-17, de GM-CSF et d'IFN β sont associées à la maladie^{273,274}.

Dans ces compartiments l'équilibre de la balance Th17i/Th17r est primordiale pour maintenir une réponse immunitaire adaptée et éviter une inflammation chronique. Les Th17 sont également présents dans une multitude de tumeurs différentes : lymphome²⁷⁵ et myélome²⁷⁶, cancers gastrique²⁷⁷ et du colon²⁷⁸, mélanomes²⁷⁹, cancers des ovaires²⁷⁹, de la prostate²⁸⁰ et du pancréas²⁷⁹.

Le microenvironnement varié de ces tumeurs peut avoir un fort impact sur la reprogrammation des lymphocytes T CD4⁺, et donc sur la balance Th17i/Th17r.

C. Ambivalence des Th17 en cancérologie

Les Th17 n'étant pas une population homogène, leur impact sur la réponse immunitaire antitumorale en tant que population globale est complexe à déterminer. Les premières recherches à ce sujet ont dégagé une ambivalence qui s'explique par le fait que les différentes sous-populations de Th17 n'ont pas les mêmes propriétés et donc un impact différent sur la croissance tumorale.

Malgré tout, les Th17 sont connus pour favoriser la néovascularisation des tumeurs qu'ils infiltrent par le biais de leur sécrétion d'IL-17. En effet, l'IL-17A stimule la production de facteurs de croissance

Introduction

vasculaire endothélial (VEGF) par les fibroblastes du microenvironnement tumoral, permettant la création de nouveaux vaisseaux sanguins²⁸¹. L'IL-17A permet également le recrutement de neutrophiles pro-tumoraux dans des cancers du sein²⁸² et de MDSCs dans des souris porteuses de tumeurs²⁸³. Elle favorise également la croissance de cellules cancéreuses de colon²⁸⁴ et son expression est associée à un mauvais pronostic chez des patients atteints²⁷⁸. L'une des premières publications à mettre en évidence un rôle délétère de l'IL-17A étudiait son effet sur une lignée de cellules de tumeur des cervicales²⁸⁵. En outre, l'IL-17 favorise la progression de cancers de la peau, et la croissance de cellules tumorales B16-F10 est réduite dans des souris déficientes en IL-17 et augmentée dans des souris déficientes en IFN γ ²⁸⁶. Les IL-17A, B et F semblent également favoriser la croissance tumorale de cancers gastriques²⁸⁷. Les capacités immunosuppressives des Th17, via l'expression des ectonucléotidases CD39 et CD73 qui convertissent l'ATP en adénosine leur permettent également de diminuer la réponse immunitaire anti-tumorale⁵¹, tout comme leur capacité à sécréter de l'IL-10 ou de l'IL-22^{258,288}. Les cellules hybrides, exprimant l'IL-17 et FOXP3, infiltrants les tumeurs, sont aussi associées à une progression de cette dernière via l'inhibition des CD8 spécifiques de la tumeur, et pourraient dériver d'une transdifférenciation de Th17^{289,290}.

En parallèle du rôle pro-tumoral attribué aux Th17, des preuves d'un rôle opposé ont été obtenues. L'IL-17 pourrait également être associée à des effets inhibiteurs sur la progression du cancer via le recrutement et l'activation de lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺ et cellules NK^{279,291,292}. Une balance Th17/T_{Reg} en faveur des Th17 est également associée à un meilleur pronostic pour les patients atteints de tumeurs des glandes salivaires²⁹³. De même, les Th17 infiltrants les tumeurs de patients atteints d'un carcinome œsophagiens, sont aussi associés à un meilleur pronostic²⁹⁴. En outre, il a été montré que les Th17 spécifiques de l'antigène de mélanocytes TRP-1 ou de l'Ovalbumine de poulet (OVA), étaient capables dans des modèles de transfert adoptif d'éradiquer respectivement des mélanomes B16-F10²⁹⁵ et B16-F10_{OVA}⁵⁷. Il a également été montré que la déficience en Th17 chez des souris porteuses de thymomes EG7 favorisait la croissance des tumeurs, notamment via l'inhibition de l'infiltration de CD8⁺ cytotoxiques spécifiques²⁹⁶. L'absence d'IL-17A est également corrélée à une augmentation de la progression de tumeurs colorectales MC38 chez la souris²⁹⁷. Ces constats sont appuyés par le fait que les Th17 peuvent subir une polarisation vers un phénotype Th17i dans un contexte tumoral, acquérant entre autre la capacité d'éliminer des cellules tumorales grâce à leurs sécrétions d'IFN γ et de TNF α ^{226,298}.

Introduction

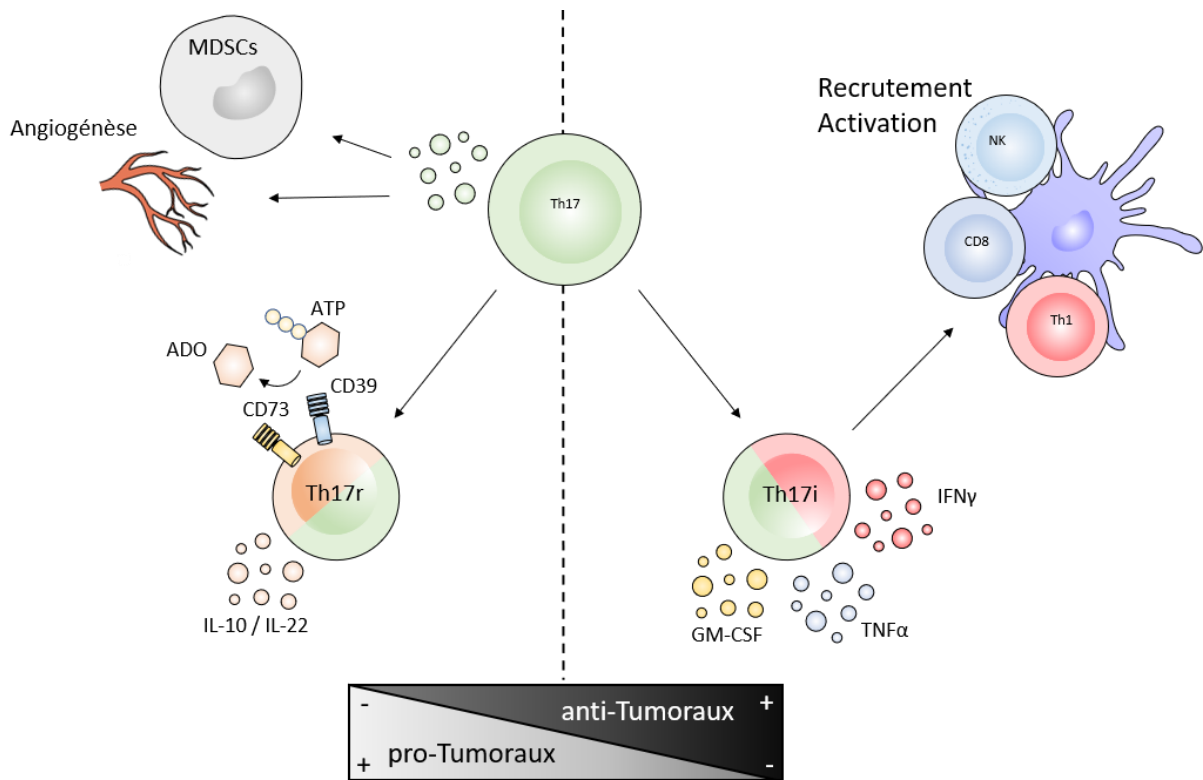


Figure 8 : Impact des sous-populations de Th17 dans un contexte tumoral. Les Th17, par leur sécrétion d'IL-17, possèdent des propriétés pro-tumorales comme la stimulation de l'angiogénèse et le recrutement de MDSCs. Les Th17r ont en plus la capacité de participer activement à l'immunosuppression, tandis que les Th17i sont capables de stimuler la réponse immunitaire anti-tumorale.

VI. NLRP3 une protéine multifonctionnelle

Dans la myriade de facteurs évoquée précédemment, beaucoup restent probablement encore à découvrir. Non pas que pour la plupart leur existence ne soit déjà connue, mais plutôt que leur rôle précis dans la régulation des lymphocytes T CD4⁺ ne le soit pas. Le rôle de Fos-related antigen 2 (FRA2), codé par le gène *Fosl2* était par exemple considéré comme marginal dans les lymphocytes T CD4⁺ suite au peu d'impact de sa déficience sur ces cellules²⁹⁹, avant qu'une étude bio-informatique ne vienne en souligner un rôle de modulateur dans les Th17²³². C'est également le cas pour la protéine NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3 (NLRP3) qui nous intéresse ici. Très étudiée dans le contexte de l'inflammasome, elle s'est avérée avoir d'autres fonctions indépendantes de ce dernier, notamment dans les fibroblastes ou dans la régulation de certaines cellules immunitaires.

A. Structure de NLRP3 et fonctions dépendantes de l'inflammasome

La protéine NLRP3 fait partie de la famille des nucleotide-binding domain, leucine rich containing (NLR). Cette famille est divisée en plusieurs sous-familles, « NLRP », « NLRC », « NLRB », sur la base du domaine N-terminal qui compose les protéines. NLRP3 appartient à la famille des NLRPs, qui comprends quatorzes membres. Ces protéines présentent un domaine Pyrin domain (PYD) sur leur extrémité N-terminale, un domaine central Neuronal Apoptosis Inhibitor Protein (NAIP) MHC class 2 Transcription Activator (C2TA) incompatibility locus protein from *Podospora anserina* (HET-E) and

Introduction

Telomerase-associated Protein (TP1) (NACHT) et un domaine Leucine Rich Repeat (LRR) en C-terminal, à l'exception de NLRP10 qui ne possède pas de domaine LRR.

Chacun de ces domaines possède une fonction propre et ils permettent à NLRP3 de participer à la formation de l'inflammasome qui porte son nom, en tant que senseur. Le domaine NACHT possède une activité ATPase essentielle à la formation de l'inflammasome et il permet, via une interaction homotypique, l'oligomérisation de NLRP3 suite à une stimulation. Le domaine PYD de NLRP3 est également capable d'interactions homotypiques et va permettre à NLRP3 de recruter la protéine Apoptosis-associated Speck-like protein containing a caspase recruitment domain (CARD) (ASC) qui contient elle-même un domaine PYD. Cette dernière est capable de recruter la pro-Caspase-1 via l'interaction de leurs domaines CARD, le tout permettant de rapprocher plusieurs pro-Caspase-1 et de déclencher leur auto-clivage en Caspase-1. L'inflammasome NLRP3 comprend également la protéine Never in mitosis gene a (NIMA)-Related Kinase 7 (NEK7), qui interagit spécifiquement avec NLRP3 et semble avoir un rôle essentiel dans la formation de l'inflammasome. Si le rôle de la plupart des protéines de la sous-famille NLRP dans la formation d'un inflammasome est admis³⁰⁰, les fonctions de certains autres membres sont moins claires. L'absence de domaine LRR dans la protéine NLRP10 a par exemple fait émerger l'hypothèse qu'elle pourrait avoir un rôle de régulateur des autres NLRs, mais cette hypothèse a été écartée au profit de rôles plus divers, tels que participer à l'initiation de la réponse adaptative dans les DCs³⁰¹, ou l'inhibition posttraductionnelle de la protéine Abin-1 afin de favoriser une réponse inflammatoire³⁰².

Parmi les autres membres de la famille des NLRs, NLRC1 et NLRC2, aussi connus sous le nom de nucleotide-binding oligomerization domain-containing receptors (NOD), NOD1 et NOD2, agissent quant à eux sur l'activation de NFκB et des MAPK en réponse à une infection bactérienne, ou des Interferons en réponse à une infection virale.

En outre, NLRC5, joue un rôle de facteur de transcription au sein d'un complexe favorisant la transcription du CMH-I³⁰³. Un rôle qu'il partage avec la protéine Class II Major Histocompatibility Complex Transactivator (CIITA), également capable d'activer la transcription du CMH-II. En effet CIITA est essentiel à l'expression des gènes codant pour les CMH-II, il est capable d'interagir avec les différents facteurs présents sur le module SXY de la région promotrice de ces gènes³⁰⁴. Une fois fixé, il va servir de plateforme permettant le recrutement de nombreux co-activateurs de la transcription, notamment des protéines permettant le remodelage de la chromatine, afin de faciliter la transcription du gène. De la même manière, NLRC5 est capable d'interagir avec d'autres facteurs fixés au module SXY présents dans la région promotrice des gènes codant pour les CMH-I, et sert ensuite de plateforme afin de recruter des protéines permettant le remodelage de la chromatine³⁰⁴. Un point notable concernant ces deux facteurs étant qu'ils ne possèdent pas eux même de domaine de liaison à l'ADN.

De manière plus conventionnelle, NLRC4 possède la capacité de former un inflammasome avec les protéines ASC et caspase-1, tout comme la protéine Absent In Melanoma 2 (AIM2), un récepteur cytosolique à l'ADN, également capable de former un inflammasome avec ASC et caspase-1.

Cet assemblage de l'inflammasome fait partie d'un processus inflammatoire qui aboutit à la sécrétion d'IL-1β et d'IL-18 et à la mort par pyroptose des cellules. Outre son rôle dans la différenciation et l'activation des lymphocytes T CD4⁺ en Th17 et Th9, l'IL-1β est connue pour stimuler le recrutement des leukocytes, la fonction des neutrophiles et des macrophages et l'activation des DCs qui mène elle-même à l'activation des lymphocytes T³⁰⁵. L'IL-18 quant à elle stimule la production d'IFNγ et la réponse Th1, ainsi que l'activation des NK³⁰⁶. Compte tenu de ses conséquences, l'assemblage de l'inflammasome est donc finement régulé, et comprend deux étapes, une d'initiation et l'autre d'activation.

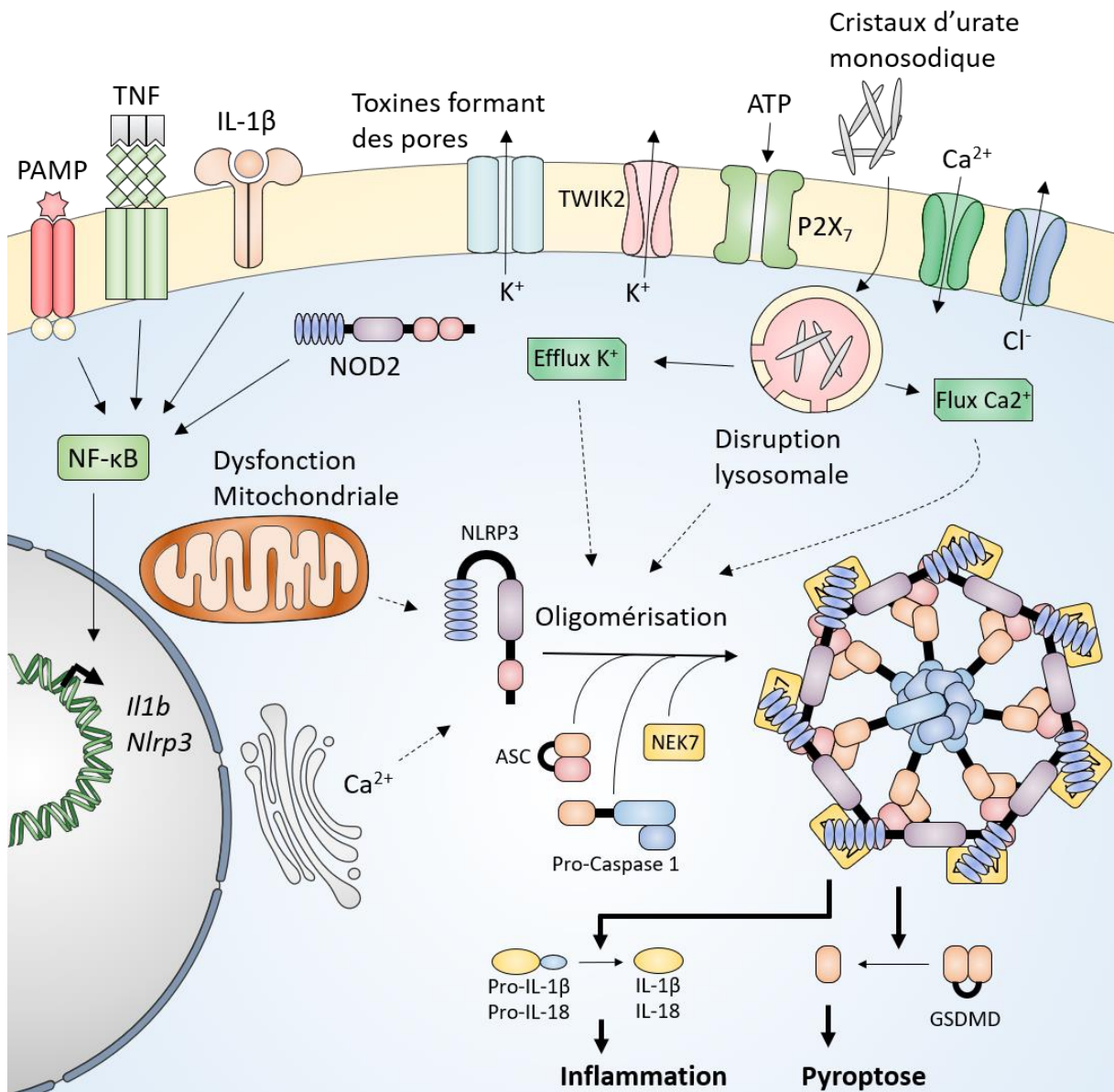


Figure 9 : Induction et fonctions de l'inflammasome NLRP3. L'assemblage de l'inflammasome NLRP3 nécessite deux étapes. La première consiste en une étape d'initiation, déclenchée par différents signaux qui vont induire l'expression de NLRP3 et *Il1b*. Une fois les protéines synthétisées, un second signal, qui peut être d'origines diverses, permet l'assemblage de l'inflammasome. Il permet ensuite le clivage de la pro-IL-1-β et la pro-IL-18 en leur formes actives pour stimuler l'inflammation, et le clivage de la Gasdermine D pour aboutir à la pyroptose.

La première phase est déclenchée par des cytokines comme le TNFα³⁰⁷ ou par la reconnaissance de pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) ou damage-associated molecular patterns (DAMPs) ou encore des pattern recognition receptors (PRRs), dont on peut citer les Toll-like receptors (TLRs) ou NOD2. Ceci active la transcription des gènes codant pour NLRP3 et *Il1b*. Ces signaux d'initiation permettent également d'induire des modifications post-traductionnelles sur NLRP3 afin de maintenir la protéine dans un état stable et inactif mais prête à détecter un signal d'activation. La phase d'activation qui s'ensuit est initiée par la reconnaissance de multiples signaux qui vont entraîner une cascade de signalisation qui comprends plusieurs étapes. L'activation par l'ATP du récepteur ionotrope P2X purinoreceptor 7 (P2X₇), un porteur d'ion K⁺/H⁺, ou la formation de pores dans la membrane

Introduction

plasmique par des toxines telles que la nigéricine, sont des activateurs de l'oligomérisation de l'inflammasome connus de longue date^{308,309}. Ils entraînent un efflux d'ions K^+ nécessaire à l'activation de l'inflammasome dans la plupart des cas. Le récepteur $P2X_7$ en faisant entrer des ions Na^+ et Ca^{2+} crée un gradient qui coordonne l'efflux d'ions K^+ via le canal two-pore domain weak inwardly rectifying K^+ channel 2 (TWIK2)³¹⁰. Ce mécanisme peut être amplifié par le relargage d'ions Ca^{2+} du reticulum endoplasmique vers le cytosol. Le LPS peut également participer à cette seconde phase en activant la cascade du complément, qui va créer des pores dans la membrane permettant également l'efflux d'ions K^+ et le relargage d'ATP qui entraîne lui-même l'activation de $P2X_7$, accentuant encore l'efflux d'ions K^+ . De plus la déstabilisation des lysosomes par l'accumulation de cristaux et de matières particulaires en leur sein entraîne leur disruption et le relargage de Cathepsin dans le cytoplasme, qui vont également favoriser l'oligomérisation de l'inflammasome, via le relargage d'ATP activant $P2X_7$ ou l'induction de stress oxydatif^{311,312}. En outre, ces bouleversements au sein de la cellule peuvent entraîner une dysfonction mitochondriale. Ceci résulte en un relargage d'ADN mitochondrial, de ROS mitochondriaux et de cardiolipines qui vont eux aussi favoriser l'oligomérisation de l'inflammasome³¹⁰.

Comme évoqué précédemment, des mécanismes de régulation post-traductionnelle des NLRs interviennent dans la régulation de l'inflammasome. Concernant NLRP3, un certain nombre de ces modifications et leurs conséquences sur l'activité de l'inflammasome ont été décrites. Ces modifications sont présentes dans différents domaines de la protéine et consistent en des ubiquitinations, sumoylations ou phosphorylations et leurs réactions inverses. Trois sites d'ubiquitination ont été mis en évidence sur NLRP3, exerçant une régulation négative sur l'activité de l'inflammasome en favorisant la dégradation de la protéine³¹³. A l'inverse, la déubiquitination du domaine LRR de NLRP3 par BRCC3 favorise l'activité de l'inflammasome. Concernant les sumoylations et phosphorylations, la conséquence n'est pas systématiquement la même. En effet, si la sumoylation de la Lysine 689, entre les domaines LRR et NACHT de NLRP3, entraîne une inhibition de l'activité de l'inflammasome, celle de la Lysine 204, entre les domaines NACHT et PYD, provoque quant à elle l'effet inverse³¹³. De la même manière, la déphosphorylation des domaines LRR et PYD favorise l'activité de l'inflammasome, tout comme la phosphorylation de la Serine 198, entre les domaines NACHT et PYD³¹³. Toutes ces modifications ajoutent un niveau de régulation de l'inflammasome qui permet de moduler finement son activation.

Une fois activé, l'inflammasome NLRP3 permet à la caspase-1 d'être active et de cliver la pro-IL-1 β et la pro-IL-18 en leurs formes actives qui seront ensuite sécrétées. Il permet également d'initier la pyroptose qui consiste en une mort cellulaire programmée notamment induite par la gasdermine D (GSDMD), clivée par la caspase-1, et qui possède la capacité de former des pores dans la membrane plasmique de la cellule³¹⁴⁻³¹⁶. La pyroptose est également capable d'induire la sécrétion d'IL-1 α ³¹⁷ et β ³¹⁸ et d'IL-18 par le biais de la caspase 8³¹⁹. En outre, le LPS cytosolique peut être détecté par les caspases 4 et 5 chez l'homme et la caspase 11 chez la souris et induire l'activation de l'inflammasome NLRP3³²⁰. Cette voie peut aussi impliquer chez la souris l'activation du TLR4 par le LPS extracellulaire et la réponse simultanée des IFN de type I et du complément C3-C3aR pour augmenter l'expression de la caspase-11³²¹. Enfin, une voie d'activation de l'inflammasome absente chez la souris a été observée dans des cellules monocytaires humaines, et elle implique l'activation de la caspase 8 par un mécanisme en aval du récepteur TLR4, qui aboutit à l'assemblage de l'inflammasome³²².

Notons que des études récentes suggèrent que l'inflammasome NLRP3 peut être activé dans les lymphocytes B, où il permet la sécrétion d'IL-1 β ³²³⁻³²⁵. L'activation de l'inflammasome pourrait également être responsable de la mort des lymphocytes T CD4⁺ par pyroptose lors d'infections par le virus de l'immunodéficience humaine³²⁶ (VIH), et une étude suggère qu'il permet la stimulation de la sécrétion d'IFN γ par les Th1, par signalisation autocrine de l'IL-1 β ³²⁷. Mais relativement peu d'études

Introduction

semblent porter sur l'assemblage de l'inflammasome dans les lymphocytes à ce jour, cependant, d'autres fonctions de NLRP3 y ont été découvertes.

B. Fonctions indépendantes de l'inflammasome

i. Fonctions mitochondriales dans les cellules épithéliales

La première description d'une fonction indépendante de NLRP3 vis-à-vis de l'inflammasome remonte probablement à 2010 et l'étude menée par Shigeoka et ses collègues³²⁸. L'étude visait à évaluer l'implication de NLRP3 dans un modèle de lésions rénales ischémiques. Si NLRP3 et ASC sont exprimés dans l'épithélium tubulaire des reins de souris, seule l'absence de NLRP3 les protège contre ces lésions rénales. De plus, l'absence de Caspase-1, d'IL-1R ou d'IL-18 n'a aucun effet protecteur, soutenant l'idée que ce mécanisme impliquerait une fonction de NLRP3 indépendante de l'inflammasome. En outre, une greffe de moelle *Nlrp3*^{-/-} n'a pas non plus d'effet protecteur vis-à-vis de ces lésions rénales, excluant une implication des cellules immunitaires. Des précisions sur le mécanisme potentiellement impliqué dans ce phénomène sont venues d'une seconde étude, qui démontre que NLRP3 participe à l'activation de la voie R-Smad par le biais du TGF- β dans l'épithélium rénal³²⁹. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les cellules épithéliales *Nlrp3*^{-/-} perdent partiellement leur capacité à exprimer matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), MMP-9 et alpha smooth muscle actin (α SMA) et perdent également l'expression de E-cadhérine via la voie TGF- β /R-Smad, menant à une diminution de leur capacité de transition épithélio-mésenchymateuse (TME). Ils ont également utilisé des cellules 293T, qui n'expriment pas ASC ni NLRP3 et ont montré que la surexpression de l'une de ces deux protéines est suffisante pour induire l'activation de la voie R-Smad. Ce mécanisme a également été confirmé dans des cellules de cancer du côlon HCT116 et HT29, où NLRP3 est requis pour augmenter la régulation de la Vimentine, MMP9 et Snail1, et réduire celle de E-Cadhérine, permettant la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)³³⁰.

D'autres études ont montré que NLRP3 pouvait promouvoir la fibrose dans différents tissus via l'inflammasome, mais aussi de manière indépendante, comme dans les myofibroblastes cardiaques. Dans ces cellules l'absence de NLRP3 altère là aussi la voie de signalisation TGF- β / R-Smad, protégeant les souris contre la fibrose cardiaque induite par l'angiotensine II³³¹. Il semble que la fonction de liaison à l'ATP du domaine NACHT joue un rôle crucial dans l'activation de la voie R-Smad et dépende partiellement de l'induction de la production de ROS mitochondriaux (mROS) par NLRP3. En effet, NLRP3 peut être localisée à la surface de la mitochondrie des fibroblastes cardiaques humains et sa surexpression dans des cellules 293T conduit à l'augmentation de la production de mROS. Qui plus est alors que des fibroblastes WT et *Caspase-1*^{-/-} ont un taux de mROS similaire, celui-ci se trouve diminué dans des cellules *Nlrp3*^{-/-}, penchant pour une implication de NLRP3 indépendante de l'inflammasome.

En outre, NLRP3 semble aussi être impliquée dans les lésions mitochondriales induites par l'hypoxie dans les cellules épithéliales tubulaires rénales. Dans ces cellules, l'expression de NLRP3 augmente pendant l'hypoxie et se trouve relocalisée au niveau de la mitochondrie, même en l'absence de ASC ou Caspase-1, et sans augmentation d'IL-1 β ³³². NLRP3 est capable d'interagir avec des protéines signal antivirales mitochondriales (MAVS), et son absence protège des dommages mitochondriaux induits par l'hypoxie via une augmentation de la mitophagie. Ces effets sont cohérents avec une réduction de la fibrose rénale *in vivo*. De manière similaire, l'absence de NLRP3 protège les poumons de dommages induits par infection chez des souris *Nlrp3*^{-/-} contrairement à des souris *Asc*^{-/-} ou *Caspase-1/11*^{-/-}, où NLRP3 semble bloquer la réponse neutrophile précoce indépendamment de l'inflammasome³³³.

Introduction

ii. Fonctions dans les cellules immunitaires

Dans les cellules immunitaires elles-mêmes, plusieurs découvertes récentes font état de fonctions de NLRP3 indépendantes de l'inflammasome. A commencer par la découverte du rôle déjà évoqué de facteur de transcription que NLRP3 exerce dans les Th2. En effet, après activation du TCR et exposition à de l'IL-4, la boucle d'autostimulation par l'IL-2 induit la transcription de NLRP3 via pSTAT5³⁹. NLRP3 est ensuite capable de transloquer vers le noyau à l'aide de l'importine Karyopherin Subunit Alpha 2 (KPNA2). En se complexant avec IRF4 grâce à son domaine LRR, elle exerce des fonctions de facteur de transcription, se fixant entre autres au promoteur de l'*Il4* afin d'en induire la transcription, et favoriser la différenciation Th2.

Une autre étude a démontré récemment que NLRP3 est aussi capable de transloquer dans le noyau des T_{Reg} grâce à KPNA2, et que le domaine LRR semble requis dans ce mécanisme³³⁴. L'étude suggère également que NLRP3 réprime la différenciation T_{Reg}, sans cependant démontrer ni une augmentation importante, ni un réel gain de fonction des T_{Reg}, dans des modèles *Nlrp3*^{-/-}. L'interaction entre NLRP3 et IRF4 a également été décrite dans les macrophages, où elle participe à la polarisation des macrophages en M2 via l'augmentation de l'expression d'*Il-4*, de manière similaire aux Th2³³⁵. Plus récemment une seconde étude est venue confirmer ces observations tout en apportant plus de détails sur le mécanisme³³⁶. Les auteurs y démontrent que la protéine Ubiquitin Specific Peptidase 19 (USP19) préserve NLRP3 de la dégradation en clivant sa chaîne d'ubiquitine. Après une stimulation avec de l'IL-4, NLRP3 est capable de former un complexe avec IRF4 via son domaine de liaison à l'ADN. Cette interaction protège IRF4 de la dégradation par l'autophagie médiée par p62, permettant la polarisation M2 des macrophages. De manière opposée, une autre étude suggère quant à elle que l'expression de NLRP3 est requise dans les macrophages afin de stimuler la sécrétion d'IFN γ par les CD8, dans la réponse aux antigènes vacuolaires, tandis que l'absence d'autres membres de la voie de l'inflammasome tels que ASC, Caspase-1 ou 11 et la GSDMD diminue cette réponse sans l'inhiber totalement³³⁷.

Concernant les fonctions de NLRP3 dans les CD8, une étude récente est venue confirmer d'une part que l'expression de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺ humains est bien stimulée par le signal de costimulation CD3/CD28 et démontrer d'autre part que ce mécanisme a également lieu dans les lymphocytes T CD8⁺³³⁸. L'activité normale des lymphocytes T cytotoxiques ne requiert par ailleurs pas l'activation de l'inflammasome NLRP3. De plus, les auteurs démontrent qu'une costimulation CD3/CD46 induit une expression plus importante de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, et que NLRP3 est également capable de transloquer vers le noyau dans les lymphocytes T CD8⁺. De manière intrigante, dans ce contexte, la sécrétion d'IFN γ par les Th1 dépend de l'inflammasome NLRP3, tandis qu'elle en est indépendante dans les lymphocytes T CD8⁺. De plus l'inhibition de NLRP3 par le MCC950, connu pour inhiber l'inflammasome, ne diminue pas l'activation de la caspase-1 ou la sécrétion d'IFN γ de Granzyme B ou d'IL-1 β par les lymphocytes T CD8⁺. Enfin, l'activité incontrôlée de NLRP3 dans les CD8 chez des patients ne conduit pas à une modification de la sécrétion de ces trois cytokines. Si ces données ne permettent pas de dégager un schéma clair de la fonction de NLRP3 dans les lymphocytes T CD8⁺, elles suggèrent cependant fortement que NLRP3 y exerce des fonctions indépendantes de l'inflammasome, et qui comme dans les lymphocytes T CD4⁺, pourraient nécessiter sa translocation dans le noyau des cellules.

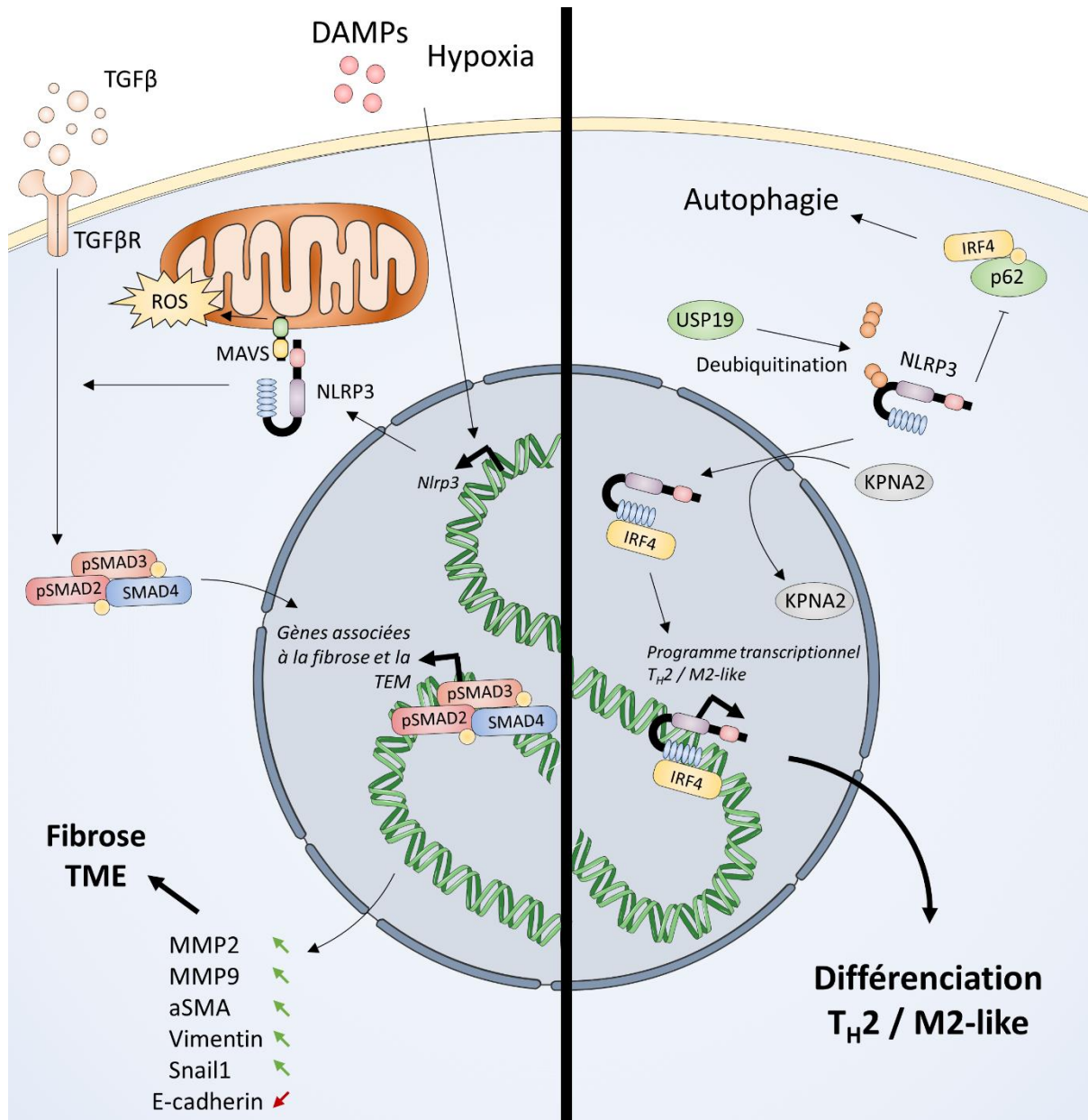


Figure 10 : Fonctions de NLRP3 indépendantes de l'inflammasome. NLRP3 est nécessaire à la phosphorylation et la fonction de Smad3 dans les cellules épithéliales, dans une voie qui permet aux cellules de surexprimer des facteurs induisant la fibrose et la transition mésoenchymo-épithéliale. Dans les lymphocytes Th2, NLRP3 joue avec IRF4 un rôle de facteur de transcription qui promeut la différenciation des cellules. Il occupe les mêmes fonctions dans les macrophages M2, dans lesquels il prévient la dégradation de IRF4.

En accord avec les découvertes déjà faites sur les Th2, une étude récente sur un modèle d'EAE a pu démontrer qu'un gain de fonction de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺ menait à une production accrue d'IL-4, mais également d'IL-10³³⁹. Les auteurs montrent également que ce phénomène s'accompagne d'une réduction de la glycolyse dans les lymphocytes T CD4⁺ associée à une diminution de la production d'IFN γ et une augmentation de celle d'IL-10 dans les tissus de la moelle épinière de souris déficientes pour le recombination-activating genes (Rag^{-/-}) souffrant d'EAE et ayant subi un transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺. Ceci rejoint le fait que la glycolyse aérobie favorise la production d'IFN γ par des régulations post-transcriptionnelles qui augmentent la fixation du ribosome

Introduction

complet aux ARN messagers codant pour l'IFN γ ³⁴⁰. Cela pose la question d'une éventuelle régulation de la glycolyse par NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺.

Enfin, une étude récente démontre que NLRP3 joue également un rôle sur la différenciation des DCs, en favorisant la population CD11b⁺ qui permet la prolifération des T_{Reg} dans l'intestin, installant un environnement immunosuppresseur³⁴¹. En effet, dans des souris *Nlrp3*^{-/-}, la différenciation de DC CD11b⁺ et CD103⁺ CD11b⁺, qui expriment fortement IRF4, semble altérée tandis qu'elle n'a pas d'impact sur les DC CD103⁺ qui n'expriment que peu IRF4. De plus, ce phénomène est absent dans des souris *Caspase-1*^{-/-}, *Asc*^{-/-} ou *Il18r1*^{-/-} suggérant une fonction de NLRP3 indépendante de l'inflammasome et associée à IRF4. Cependant, les expériences de co-immunoprécipitation réalisées par les auteurs n'ont pas révélé d'interaction entre NLRP3 et IRF4 dans les DCs.

C. Rôles dans diverses pathologies

NLRP3 est impliquée dans diverses pathologies chez l'humain comme chez la souris, d'abord de par ses fonctions au sein de l'inflammasome mais également de par ses fonctions indépendantes de ce dernier.

i. Pathologies associées à l'inflammasome NLRP3

L'activation de l'inflammasome NLRP3 ayant pour conséquence la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, il est logique que ce dernier ait été associé à des maladies auto-immunes. L'augmentation de l'activité de l'inflammasome a notamment été constatée dans les monocytes, macrophages et cellules dendritiques de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde³⁴². De la même manière, dans divers modèles animaux et chez des patients souffrant de lupus systémique érythémateux, ou de sclérose systémique, une hyperactivation de l'inflammasome NLRP3 dans les macrophages a été observée^{343,344}. Il semble également que cet inflammasome soit impliqué dans la spondylarthrite ankylosante et dans le syndrome de Sjögren's³⁴⁵. Enfin, des données tendent à montrer que l'inflammasome NLRP3 joue un rôle important dans la survenue et le développement de l'EAE et de la sclérose en plaque³⁴⁶. Bien qu'aucun ne soit encore approuvé pour l'utilisation clinique, plusieurs inhibiteurs de NLRP3, tels que le MCC950 ou le CY-09, ont montré une efficacité pour atténuer les symptômes de plusieurs de ces pathologies chez la souris³⁴⁷. Le VX-740, un inhibiteur de la Caspase-1, a également prouvé son efficacité sur des modèles d'arthrite rhumatoïde chez la souris, mais sa toxicité hépatique limite son utilisation clinique³⁴⁵. A l'inverse, l'inhibition de l'IL-1 β s'est avérée plus fructueuse, notamment avec l'anakinra, dont la demi-vie dans le plasma nécessite toutefois des injections quotidiennes et ont poussé à chercher d'autres traitements, tels que le canakimumab, un anticorps bloquant l'IL-1 β ³⁴⁵. D'autres pistes sont explorées afin d'inhiber des voies impliquées dans la signalisation de l'inflammasome, notamment l'activation de l'autophagie qui semble inhiber l'activité de l'inflammasome NLRP3, mais des études complémentaires restent à mener pour déterminer le vrai potentiel de ces cibles thérapeutiques.

Toutefois, les premières maladies auto-inflammatoires ayant été associées à NLRP3 sont regroupées sous le nom de syndromes périodiques associés à la cryopyrine (CAPs), qui comptent trois syndromes, du plus modéré au plus sévère ; l'urticaire familiale au froid, le syndrome de Muckle-Wells et le syndrome CINCA. Bien qu'impliquant une réponse auto-inflammatoire, ces maladies sont caractérisées par le fait qu'elles surviennent en l'absence d'infection ou d'auto-immunité. Elles sont cependant toutes associées à des mutations de NLRP3, majoritairement dans l'exon 3 du gène, codant pour le domaine NACHT^{348,349}. Ces mutations provoquent un gain de fonction de NLRP3 et une activation anormale de l'inflammasome résultant en une inflammation systémique chronique. En conséquence,

Introduction

ces syndromes sont associés à de forts taux d'IL-1 β chez les patients et des traitements visant à bloquer son activité, par le biais d'inhibition compétitive (anakinra), d'antagoniste de l'IL1R ou encore d'anticorps α IL-1 β , s'avèrent efficaces³⁵⁰⁻³⁵².

ii. Pathologies et fonctions de NLRP3 indépendantes de l'inflammasome

Concernant ses fonctions indépendantes de l'inflammasome, nous avons déjà mentionné que NLRP3 est associée à des lésions tissulaires et des fibroses. Elle est impliquée dans l'apparition de lésions rénales aiguës et les maladies rénales chroniques. Plusieurs études ont attribué un rôle à NLRP3 dans la pathogénèse, de manière indépendante de l'inflammasome^{328,331,353}, impliquant la génération de ROS via des fonctions exercées par NLRP3 dans la membrane des mitochondries, et l'induction de la voie de signalisation des SMADs.

Le rôle de NLRP3 dans le développement des Th2 et des macrophages M2 via l'axe NLRP3-IRF4 l'implique également indirectement dans différentes pathologies. Ainsi NLRP3 peut être impliqué dans des modèles d'asthme allergique, dans lequel ces deux populations sont connues pour intervenir^{42,354}. Mais également dans le cancer, où ces deux populations peuvent avoir des rôles délétères en favorisant l'immunosuppression. De plus, NLRP3 semble également favoriser un environnement immunosuppresseur dans l'intestin via son implication dans le développement des DCs CD11b⁺, capables de recruter des T_{Reg} afin d'éviter un emballement de l'inflammation³⁴¹. Ceci pourrait lui attribuer un rôle délétère dans les cancers, dans lesquels les DCs CD11b⁺ peuvent être de mauvais pronostic³⁵⁵.

De manière plus étonnante encore, NLRP3 possède une fonction indépendante qui semble opposée à celle de l'inflammasome dans le contexte de l'EAE. En effet, s'il a déjà été mentionné qu'une expression accrue de NLRP3 est associée au développement d'EAE, de manière surprenante, son hyperactivité dévoile un rôle tout à fait inverse lorsqu'elle est conditionnée aux lymphocytes T CD4⁺. Tout comme des souris *NLRP3*^{-/-}, des souris ayant une mutation activatrice de NLRP3 conditionnelle aux lymphocytes T CD4⁺ ont des formes atténuées d'EAE³³⁹. Ces souris présentent une diminution de la proportion de lymphocytes T CD4⁺ producteur d'IL-17 et d'IFN γ , et une diminution de la quantité de ces cytokines dans leur SNC. De plus des souris RAG1^{-/-} auxquelles ont été transférés des lymphocytes T CD4⁺ avec une mutation activatrice de NLRP3 sont moins sujettes à l'EAE. De manière tout aussi intrigante, une étude a montré qu'ASC et NLRP3 étaient cependant requises pour induire une neuroinflammation dépendante des Th17 via l'axe Caspase-8 / IL-1 β ³⁵⁶. A noter que cela n'impacte pas la neuroinflammation dépendante des Th1, et que l'absence de NLRP3 ne suffit pas à inhiber totalement la production d'IL-1 β , soulignant le fait que NLRP3 semble avoir différentes fonctions dans les lymphocytes T CD4⁺, dépendantes de la population considérée. En outre, la vitesse de dégradation de IRF4 est un facteur déterminant la pathogénicité des Th17 dans l'EAE²³³, et son interaction avec NLRP3 dans les Th2 pose la question d'un potentiel mécanisme impliquant une telle interaction dans les Th17.

Toutes ces données pointent vers une fonction relativement complexe de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺, qui pourrait participer à promouvoir certaines populations de lymphocytes T auxiliaires, tandis qu'elle inhiberait la fonction de certaines autres de ces populations. Son rôle déjà identifié dans les Th2 en fait un très bon candidat à des modulations de fonctions qui participeraient à la plasticité des lymphocytes T CD4⁺. Au vu de son potentiel rôle, qui semble pour le moins ambigu, dans la polarisation de Th17 pathogéniques (Th17i) ou non (Th17r) dans le contexte de l'EAE, NLRP3 pourrait être un facteur occupant une place importante dans le sort de la balance Th17i/Th17r.

But de la thèse

Les lymphocytes T CD4⁺ sont une composante essentielle de la réponse immunitaire antitumorale, sur lesquels le laboratoire travaille de longue date afin de mieux en comprendre les implications. Parmi eux, les Th17 représentent une population de lymphocytes T CD4⁺ dont le rôle dans la réponse immunitaire antitumorale reste encore obscur, mais néanmoins important dans ce contexte. Les découvertes récentes faites sur leur plasticité, et leur capacité à acquérir des fonctions pro ou anti-inflammatoires, viennent apporter des réponses sur ce rôle ambivalent. Les études récentes sur les mécanismes intracellulaires régulant les Th17 révèlent peu à peu un réseau de régulations complexes et impliquant un nombre important de facteurs. Ces facteurs permettent de réguler finement la réponse dépendante des Th17, et les influencer est souvent proposé comme une cible thérapeutique pour différentes maladies auto-immunes. En outre, l'impact de NLRP3 dans la régulation transcriptionnelle des Th2, aux côtés de IRF4, indique que cette protéine joue un rôle important dans la polarisation des lymphocytes T CD4⁺. Dans les Th17, IRF4 joue un rôle important dans la différenciation qu'il permet d'initier, mais également dans la polarisation, qu'il influence en faveur d'un sous-type non-inflammatoire lorsqu'il est protégé de la dégradation. La question du rôle possible de NLRP3 dans l'acquisition de caractéristiques pro ou antitumorales des Th17 se pose donc au travers de ses fonctions associées à IRF4. De plus, NLRP3 est associé, dans les cellules épithéliales de reins, à la voie TGF- β / R-Smad. Cette voie est dépendante de la signalisation par le TGF- β , qui se trouve justement être l'une des cytokines permettant la différenciation des Th17. Qui plus est, dans ce contexte le TGF- β est justement associé à la polarisation de Th17 immunosuppresseurs. Il est possible que NLRP3 puisse participer au développement de ces fonctions au travers de la voie TGF- β / R-Smad.

D'une part, le but de ce travail a donc été dans une première partie de déterminer dans quelle mesure NLRP3 pourrait participer à la modulation des fonctions protumorales des Th17. Puis dans une seconde partie, d'identifier les modifications induites par la déficience en NLRP3 sur le phénotype des Th17, et par implication le rôle de cette protéine dans la modulation de leur différenciation.

La troisième partie de notre travail a consisté à déterminer si ces modifications phénotypiques pouvaient avoir un impact sur d'autres cellules du microenvironnement tumoral impliquées dans la réponse immunitaire anti-tumorale. Nous avons également tenté de déterminer si la plasticité des Th17 était altérée par la déficience en NLRP3.

Enfin nous avons cherché à identifier par quels mécanismes intracellulaires NLRP3 interviendrait dans la modulation du phénotype et des fonctions des Th17. Et nous avons cherché à déterminer si l'utilisation en thérapie cellulaire de Th17 déficients pour NLRP3 pouvait avoir un impact sur la croissance tumorale chez des souris.

La finalité de ce travail est donc de comprendre si et comment NLRP3 pourrait être impliquée dans la régulation de la balance Th17i/Th17r au niveau des points de bascule intracellulaire entre les deux phénotypes, et d'évaluer les conséquences de ces implications de NLRP3 sur la réponse immunitaire antitumorale.

Matériel et Méthodes

I. Souris

Tous les animaux ont été maintenus dans des installations exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) au centre de zootechnie de Dijon. L'utilisation et l'entretien des animaux ont été approuvés par le Comité d'éthique des expériences animales de l'Université de Bourgogne (protocole n°25111), conformément à la Fédération des associations de laboratoires de sciences animales. Des souris mâles et femelles ont été utilisées pour les expériences. Les souris C57Bl/6J ont été achetées chez Charles River Laboratories (Saint-Germain-Nuelles, 69210, France). Les souris OT-I, OT-II, *Nlrp3*^{-/-}, OT-II *Nlrp3*^{-/-}, *Nlrp3*^{fllox}*Cd4*^{cre}, ont été fournies par le Département de Cryopréservation, Distribution, Typage et Archivage animal (CDTA) d'Orléans. Les souris *Rorc*^{-/-} ont été fournies par le Pr. Bernhard Ryffel et mises en reproduction au centre de zootechnie de Dijon.

II. Différenciation de lymphocytes T CD4⁺ in vitro

Les cellules CD4⁺ CD44⁻ naïves ont été obtenues à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris. Les rates et les ganglions ont été prélevés et rassemblés avant d'être dissociés mécaniquement et filtrés sur un filtre de 70 µm (Pre-Separation Filters 70 µm, #130-095-823, Miltenyi Biotec), les cellules ont ensuite été incubées avec une solution de lyse des globules rouges (Red Blood Cell Lysis Solution 10×, 130-094-183, Miltenyi Biotec). Les cellules ont été marquées avec un cocktail d'anticorps biotinylés (anti-CD8a, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-CD19, anti-CD25, anti-CD45R, anti-CD49b, anti-CD105, anti-MHC class II, Ter-119 et anti-TCRγ/δ) durant 5min, puis incubées 10min supplémentaire après l'ajout de billes magnétiques couplées à la streptavidine et à un anti-CD44. Les cellules ont ensuite été filtrées sur un filtre de 30 µm puis séparées par tri magnétique sur colonne (LS Columns, 130-042-401, Miltenyi Biotec). Les lymphocytes T CD4⁺ CD44⁻ récupérés dans la fraction négative ont ensuite étéensemencés à raison de 5x10⁵ ou 2x10⁵ cellules par puits en plaque 96 puits (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, #161093, Thermo Scientific™) et 3x10⁶ ou 1x10⁶ cellules par puits en plaque 24 puits (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, #142475, Thermo Scientific™), en présence d'anticorps anti-CD3 (InVivoMAb anti-mouse CD3, #BE0002, BioXCell) et anti-CD28 (InVivoMAb anti-mouse CD28, clone D665, #BE0328, BioXCell) à 2 µg/mL, dans du milieu RPMI 1640 additionné avec de la L-Glutamine 2 mM, du pyruvate de sodium 1 mM, de pénicilline (100 unités/mL), streptomycine (100 µg/mL), amphotéricine B (250 ng/mL) et 4 mM d'HEPES (Gibco). Les cytokines et anticorps nécessaires à la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ ont également été ajoutés en fonction du sous-type désiré (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Concentration des anticorps et cytokines utilisées pour les différenciations lymphocytes T CD4⁺ in vitro

	Anti-IFN γ	Anti-IL-4	Anti-IL-6	IL-12	IL-4	IL-6	IL-1 β	IL-23	TGF- β
Th0	10 μ g/mL	10 μ g/mL	10 μ g/mL						
Th1		10 μ g/mL	10 μ g/mL	10 ng/mL					
Th2	10 μ g/mL		10 μ g/mL		20 ng/mL				
Th17i		10 μ g/mL				20 ng/mL	20 ng/mL	25 ng/mL	
Th17r		10 μ g/mL				20 ng/mL			2 ng/mL
Treg	10 μ g/mL	10 μ g/mL	10 μ g/mL						4 ng/mL

Les anticorps anti IFN γ (clone XMG1.2, #BE0055), anti IL-4 (clone 11B11, #BE0045) et anti IL-6 (clone MP5-20F3, #BE0046) ont été obtenus chez BioXcell et les cytokines IL-12 (Mouse IL-12 Research Grade, #130-096-707), IL-4 (Mouse IL-4 Research Grade, #130-094-061), IL-6 (Mouse IL-6 Research Grade, #130-094-065), IL-1 β (Mouse IL-1 β Research Grade, #130-094-053), IL-23 (Mouse IL-23 Research Grade, #0130-096-676) et TGF- β (Human TGF- β 1 Research Grade, #130-095-067) ont été obtenues chez Miltenyi Biotec.

Les cellules ont été incubées durant 24h à 72h et jusqu'à 6 jours en remplaçant le milieu à 72h par du milieu frais additionné de cytokines, tel que décrit précédemment (**Tableau 3**).

Les traitements par des inhibiteurs ont été administrés en pré-traitement, soit avant d'initier la différenciation des cellules par stimulation et exposition aux cytokines. Les traitements suivants ont été utilisés sur les cellules en pré-traitements durant 1h :

Tableau 4 : Inhibiteurs utilisés en prétraitement lors de différenciations lymphocytes T CD4⁺ in vitro

Molécule	Concentration finale	Cible	Référence
Z-VAD	50 μ M	Pan Caspase	# S7023, Selleckchem
Z-IETD-FMK	50 μ M	Caspase-8	# S7314, Selleckchem
MCC950	10 μ M	NLRP3	# 5381200001, Merck
Anakinra	300 nM	Antagoniste IL-1 β R	# HY-108841, MedChemExpress
SIS3	10 μ M	pSmad3	# 566405, Merck
LY294002	325 nM	PI3K	# S1105, Selleckchem
SB203580	10 μ M	p38 α / β	# S1076, Selleckchem
Y27632	10 μ M	ROCK	# S1049, Selleckchem
JNK inhibitor II	10 μ M	JNK	# 420119, Merck

III. Microscopie à immunofluorescence

Après isolation 1×10^6 cellules CD4⁺ naïves différenciées durant des temps variables ont été récoltées et fixées 15min à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde 4 %. Les cellules ont ensuite été perméabilisées à l'aide de méthanol glacial (-20°C) 100 % durant 20 min sur glace, puis incubées 1h dans une solution de PBS 5 % SVF et 0,3 % Triton™ X100 afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques et perméabiliser les membranes des cellules. Les cellules ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C dans une solution de PBS 1 % BSA et 0,3 % Triton™ X100 contenant des anticorps primaires (anti-NLRP3/NALP3, mAb (Cryo-2) (1:100), #AG-20B-0014-C100, Adipogen ; Smad3 Antibody (1:50), #9513, Cell Signaling Technology ; Phospho-Smad3 (Ser423/425) (1:100), #9520, Cell Signaling Technology ; Mouse IgG Isotype Control, #31903, ThermoFisher Scientific ; Rabbit IgG Isotype Control, #31235, ThermoFisher Scientific).

Les cellules ont ensuite été incubées durant 1h à température ambiante dans une solution de PBS 1 % BSA et 0,3 % Triton™ X100 contenant des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires et couplés à des fluorochromes (AF488 goat anti-mouse IgG, #A11029, Invitrogen ; AF568 goat anti-rabbit, #A11011, Invitrogen). Les cellules ont ensuite été déposées sur lame et recouvertes d'une goutte de milieu de montage contenant du DAPI (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI, #P36935, ThermoFisher Scientific) puis incubées 24h à 4°C. Les cellules ont ensuite été photographiées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axio Imager.M2, ZEISS) avec objectif 40x/0.75 ou 63x/1.40, équipé d'une caméra AxioCam MRm monochrome (ZEISS) et piloté par le module d'acquisition du logiciel ZEN (ZEISS). Puis les clichés ont été analysés à l'aide du module d'analyse du logiciel ZEN.

IV. Extraction ARNm

L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide de TRizol (Invitrogen). Les cellules ont été incubées 5 min dans un volume de Trizol avant d'y ajouter un volume de Chloroforme (TRizol 5:1 Chloroforme) et incubé 3 min. Les cellules ont été centrifugées 15 min à 12 000 g puis la phase aqueuse a été prélevée, additionnée d'un volume d'Isopropanol (Chloroforme 1:2,5 Isopropanol) et incubée 10 min à température ambiante. Les ARN précipités ont ensuite été lavés deux fois avec de l'éthanol 75 % avant d'être séchés et réhydratés dans de l'eau ultra pure (sans RNase ni DNase). La quantité d'ARN extrait a ensuite été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

V. Rétro-transcription et PCR quantitative en temps réel (RTqPCR)

Les ARN isolés ont été rétrotranscrits en ADN à l'aide d'une enzyme iScript (iScript cDNA Synthesis Kit, #1708891, BioRad). La rétrotranscription a été réalisée à partir de 250 ng d'ARN additionnés d'un mix de réaction contenant des oligo-dT, des hexonucléotides aléatoires et de l'enzyme iScript, sur un thermocycleur MiniAmp ou SimpliAmp (ThermoFisher Scientific) suivant ces étapes : 5 min d'Amorçage à 25°C, 20 min de rétrotranscription à 46°C et 1 min d'inactivation à 95°C.

La quantité d'ADNc générée après rétrotranscription a été mesurée par RTqPCR à l'aide d'un kit PowerUp SYBR Green PCR Master Mix (#A25741, ThermoFisher Scientific). La PCR quantitative a été réalisée à partir d'un mix comprenant du produit de rétrotranscription, du mix SYBR Green au 1X et des amorces spécifiques de gènes cibles (**Tableau 6**), sur un thermocycleur ViiA 7 Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) suivant un protocole de réaction rapide (**Tableau 5**).

Tableau 5 : Programme RTqPCR PowerUp SYBR Green Master Mix en cycle rapide sur ViiA7

Etape	Température	Durée	Cycles
Activation UDG	50°C	2 min	-
Dual-Lock DNA polymerase	95°C	2 min	-
Dénaturation	95°C	1 sec	40
Elongation	60°C	30 sec	

Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées pour les réactions de RTqPCR

Gène cible	Amorce sens 5' → 3'	Amorce anti-sens 5' → 3'
<i>Actine-β</i>	ATGGAGGGGAATACAGCCC	TTCTTTGCAGCTCCTTCGTT
<i>Casp1</i>	CGTACACGTCTTGCCCTCAT	ACTCCTTGTTTCTCTCCACGG
<i>Ccl3</i>	CCAGCCAGGTGTCATTTTCC	CTCAAGCCCCTGCTCTACAC
<i>Ccl4</i>	CTGTGCAAACCTAACCCCGA	AGGGTCAGAGCCCATTGGT
<i>Ccl9</i>	ACTCTTCAGATTGCTGCCTGT	CCTVTTGCTGATAAAGATGATGCC
<i>Ccl20</i>	GGAAGGAAGAGGGCTGTGTA	ACTCCTGGAGCTGAGAATGG
<i>Ccl22</i>	GACGGTTATCAAACAACGCC	GACGGTTATCAAACAACGCC
<i>Ccr6</i>	TGGGCCATGCTCCCTAGAA	GGTGAGGACAAAGAGTATGTCTG
<i>Cdc37</i>	ATGGCTTTAGCAAGGCCCG	CCATCCTGTCCACATCGGAG
<i>Cd160</i>	AGGTGTGAGCTAAGCCAGTG	GGATGCTGAGCTGGTGACAT
<i>Csf2</i>	TGCCTGTACGTTGAATGAAG	GAAATTGCCCCGTAGACCCT
<i>Ctps</i>	TCTCAGAAAGACGGCTGGC	CTTCATTTTTCTTTAACCTGAGGC
<i>Cxcl3</i>	CCCAGACAGAAGTCATAGCCAC	CAGACACCGTTGGGATGGAT
<i>Cxcl10</i>	CCTATGGCCCTCATTCTCAC	CTCATCCTGCTGGGTCTGAG
<i>Cxcl13</i>	AGTTGAACTCCACCTCCAG	TTGTGTAATGGGCTTCCAGA
<i>Cxcr3</i>	GGTTAGTGAACGTCAAGTGCT	CCCCATAATCGTAGGGAGAGGT
<i>Dpp4</i>	ACCTTGACCATTACAGGAACTCA	CTAGCGATCCCGTGGTCTTC
<i>Egr2</i>	GCCAAGGCCGTAGACAAAATC	CAATGTTGATCATGCCATCTCCC
<i>Entpd1</i>	GCCAAGATAGAGGTGAAACCA	AGCTGCCCTTATGGAAGAT
<i>Foxp3</i>	CTCGTCTGAAGGCAGAGTCA	TGGCAGAGAGGTATTGAGGG
<i>Fus</i>	TTCAATAAATTTGGTGGTCTCGG	GGCCTTGCACGAAGATGGTA
<i>Gzmb</i>	ACAAGGCAGGGGAGATCAT	GCCCCAAAGTGACATTTAT
<i>Hlx</i>	ATAGACTGGACCGAGGGCAT	CAACCCTCGCCACCAACTTA
<i>Ifng</i>	TGAGCTCATTGAATGCTTGG	ACAGCAAGGGCGAAAAAGGAT
<i>Ikzf3</i>	CGGAATCTCCGCCAGC	CCACAGTCGGTTGTATATCTTCCAT
<i>Il2</i>	CGCAGAGGTCCAAGTTCATC	AACTCCCCAGGATGCTCAC
<i>Il3</i>	GAAGAACCCTCTCTGAGGAATAAG	AGCGCAGAGTCATTTCGAG
<i>Il4</i>	CGAGCTCACTCTGTGGTG	TGAACGAGGTCACAGGAGAA
<i>Il17a</i>	TGAGCTTCCCAGATCACAGA	TCCAGAAGGCCCTCAGACTA
<i>Il21</i>	AAAACAGGCCAAAAGCTGCAT	TGACATTGTTGAACAGCTGAAA
<i>Il22</i>	TCGCCTTGATCTCTCCACTC	GCTCAGCTCCTGTACATCA
<i>Il33</i>	CCAGCCAGGTGTCATTTTCC	TGGTCTTCTGTTGGGATCTTCTTA
<i>Irf1</i>	AGGCATCCTTGTTGATGTCC	AATTCCAACCAAATCCCAGG
<i>Irf4</i>	CAAAGCACAGAGTCACCTGG	TGCAAGCTCTTTGACACACA
<i>Irf8</i>	AATGATGAGAAGACCATGTTCCGT	CCAGCTTGCATTTTTGTTCTTCTT
<i>Lgals3</i>	TAATCAGGTGAGCGGCACAG	TGAGGGTTTGGGTTTCCAGAG
<i>Lrmp</i>	CTGTGCATATGGGTCAGGGG	CGTCAAGACACAGGCATACTGA
<i>Lyar</i>	GATTGAGTTCTGCGGGGG	TGAACTCTTGCCTGTGACG
<i>Malt1</i>	AGGGAAGCCCAAGTTTGTGT	CAGTGATCTTTAATCTGGGGG
<i>Nop16</i>	TTACCCAACGGAGTGGCAAG	GCACGTAAGACCCGATTCCA
<i>Nt5e</i>	AACGTTTCTGAGGAGGGGAT	CTTCATGAACATCCTGGGCT
<i>Rorc</i>	GGTGATAACCCCGTAGTGGA	GGTGATAACCCCGTAGTGGA
<i>Tbx21</i>	ATCCTGTAATGGCTTGTGGG	TCAACCAGCACCAGACAGAG
<i>Tnf</i>	AGGGTCTGGGCCATAGAACT	CCACCACGCTCTTCTGTCTAC
<i>Tnfsf14</i>	GCAGCACATCTTACAGGAGCC	GCCAAGTCGTGTCTCCCAT
<i>Uchl3</i>	GAGACGTTGTTAGAGGATGCCA	TGTCAAGATGCTATGCCGCT

VI. ELISA

Après 72h de culture les surnageants de culture cellulaire ont été testés par ELISA pour détecter de l'IFN γ (#555138, BD Biosciences), du TNF α (#88-7324-88), du Granzyme B (DY1865-05, R&D Systems) et de l'IL-21 (#DY594-05, R&D Systems) murins selon le protocole du fabricant. Communément, une couche d'anticorps monoclonaux de capture est déposée sur la nuit à 4°C au fond des puits d'une plaque 96 puits (Nunc MaxiSorp™ flat-bottom, #44-2404-21, ThermoFisher Scientific). Les sites aspécifiques sont ensuite bloqués à l'aide d'une solution de PBS contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF) durant 1h à température ambiante. Les surnageants et la gamme étalon sont ensuite incubés dans les puits sur la nuit à 4°C. Une solution d'anticorps monoclonaux couplés à la biotine et une enzyme HRP couplée à l'avidine sont par la suite incubés 1h dans les puits à température ambiante. L'ajout de substrat de l'HRP permet une réaction colorant la solution et dont l'intensité de la coloration est proportionnelle à la quantité de cytokines capturées. L'ajout d'H₂SO₄ permet d'arrêter la réaction avant la mesure de l'absorbance à 450 nm et 570 nm. La concentration en cytokine est ensuite déterminée grâce à la mesure corrigée d'absorbance à 450nm-570nm à l'aide de la gamme étalon.

VII. Suivi de croissance tumorale

Des cellules de mélanomes murins B16-F10 et B16-F10_{OVA}, de poumons LLC1 et de colon MC38 ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du DMEM complété avec 10% de sérum de veau foetal, 1% de L-glutamine (Gibco), 1% pénicilline, streptomycine, amphotéricine B (Gibco), 4 mM d'HEPES (Gibco) et 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco). Les cellules B16-F10 (CRL-6475™ ATCC), TC1 (CRL-2785™ ATCC) et LLC1 (CRL-1642™ ATCC) ont été obtenues auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection). Les cellules ont été injectées aux souris à raison de 3x10⁵ en injection sous-cutanée. Les tumeurs ont été mesurées avec un pied à coulisse électronique 3 fois par semaine à partir du septième jour après injection. Les animaux ont été sacrifiés par dislocation cervicale après anesthésie lorsque les points limites ont été atteints, ou lorsque les tumeurs ont atteint une taille estimée à 500 mm³ afin d'analyser l'infiltrat immunitaire. Pour certaines expérimentations, les souris ont été traitées trois fois par semaine par injection intrapéritonéale avec des anticorps bloquants anti-IL-4 (200 µg/souris) (clone 11B11, #BE0045, Bioxcell), anti-CD8 (200 µg/souris) (clone YTS 169.4, #BE0117, Bioxcell), anti-NK1.1 (200 µg/souris) (clone PK136, #BE0036, Bioxcell), anti-CD25 (200 µg/souris) (clone PC-61.5.3, #BE0012, Bioxcell) ou IgG1 (200 µg/souris) (clone MOPC-21, #BE0083, Bioxcell). Pour d'autres expérimentations, les souris ont été traitées deux fois par semaine avec un inhibiteur de macrophages, le liposome chlodronate (1 mg/souris) (#CP-005-005, Liposoma), ou tous les jours avec un inhibiteur de ROR γ t, la digoxine (20 µg/souris) (#4583, Tocris), ou tous les jours durant cinq jours puis tous les deux jours avec un inhibiteur de NLRP3, le MCC950 (30 µg/souris) (#5381200001, Merck).

VIII. Isolation des cellules immunitaires infiltrant les tumeurs

Les tumeurs sous-cutanées de souris ont été prélevées. Les tumeurs ont été dissociées mécaniquement et par réaction enzymatique avec un kit de dissociation de tumeur (Tumor Dissociation Kit, mouse, #130-096-730, Miltenyi Biotec) et un instrument de dissociation de tissus (gentleMACS™ Octo Dissociator, Miltenyi Biotec). Les suspensions cellulaires ont été filtrées sur des filtres de 70 µm (Pre-Separation Filters 70 µm, #130-095-823, Miltenyi Biotec) puis centrifugées 5min à 300g. Les surnageants ont été prélevés et les suspensions cellulaires ont été incubées 1min avec une solution de lyse des globules rouges (Red Blood Cell Lysis Solution 10x, #130-094-183, Miltenyi Biotec).

Les suspensions cellulaires ont ensuite été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des billes magnétiques (CD45 (TIL) MicroBeads mouse, #130-110-618, Miltenyi Biotec), filtrées sur des filtres de 30 µm (Pre-Separation Filters 30 µm, #130-041-407, Miltenyi Biotec) et les cellules CD45⁺ ont été isolées par un tri positif sur colonnes magnétiques (LS Columns, 130-042-401, Miltenyi Biotec). Les cellules ont été ensemencées à raison de 5x10⁵ cellules par puits dans des plaques 96 puits (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, #161093, Thermo Scientific™) enduites avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 à 2 ng/mL et incubées sur la nuit à 37°C sous 5 % de CO₂.

IX. Cytométrie en flux

Dans le cas d'analyse de cytokines, les cellules ont été incubées 3h à 37°C sous 5 % de CO₂ dans du RPMI additionné de 0,2 % d'un cocktail stimulant la production de cytokines et forçant leur accumulation dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (Cell Stimulation Cocktail plus protein transport inhibitors 500X, #00-4975-93, eBioscience). Puis les cellules ont été marquées avec différents anticorps ciblant des protéines membranaires, dans une solution de marquage (Flow Cytometry Staining Buffer, #00-4222-26, eBioscience) durant 20 minutes à température ambiante. Les cellules ont ensuite été fixées 15min dans du Formaldéhyde 1%, puis fixées et perméabilisées avec un kit de fixation/perméabilisation (FoxP3 Staining Buffer Set, #130-093-142, Miltenyi Biotec) durant 30min à température ambiante. Les cellules ont ensuite été marquées avec différents anticorps ciblant des protéines intracellulaires, dans une solution de perméabilisation (FoxP3 Staining Buffer Set, #130-093-142, Miltenyi Biotec) durant 1h à température ambiante.

Tableau 7 : Anticorps utilisés en cytométrie en flux

Cible	Fluorochrome	Clone	Fournisseur	Référence
IFNγ	BV421	XMG1.2	Biologend	505829
CD4	V500	RM4-5	BD Biosciences	15840489
CD4	BUV395	GK1.5	BD Biosciences	565974
CD45	BUV395	30-F11	BD Biosciences	564279
CD45	Viogreen	REA737	Miltenyi	130-110-803
CD8a	PerCP Cyanine 5.5	53-6.7	BD Biosciences	553036
CD8a	BUV805	53-6.7	BD Biosciences	612898
CXCR3	APC	REA724	Miltenyi	130-110-971
CCR4	PE	2G12	Biologend	131203
CCR6	BV605	29-2L17	Biologend	129819
CD25	AF700	PC61	Biologend	102024
Foxp3	PerCP Cyanine 5.5	FJK-16s	eBioscience	45-5773-82
RoRyt	APC	AFKJS-9	eBioscience	17-6988-80
Ki67	BV605	16A8	Biologend	652413
CD39	PE-Cyanine7	24DMS1	eBioscience	25-0391-82
CD73	PE	TY/11.8	Biologend	127206
Granzyme B	FITC	REA226	Miltenyi	130-118-341
TNFα	BV510	MP6-XT22	Biologend	506339
CD45.2	FITC	104	BD Biosciences	561874
STAT1 pY701	PE	REA159	Miltenyi	130-105-471

Matériel & Méthodes

Les cellules ont ensuite été analysées à l'aide d'un cytomètre BD LSRFortessa™ (BD Biosciences) piloté par le logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences) puis les données ont été analysées avec le logiciel Flowlogic (Miltenyi Biotec).

X. Séquençage ARN

L'ARN total des cellules a été extrait à l'aide de TRizol (Invitrogen). Les ARNr ont été éliminés à l'aide de Ribo-zero rRNA removal Kit (Illumina). 100 ng d'ARN ont été utilisés pour préparer la librairie à l'aide de TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit (Illumina) en respectant les consignes du fabricant. Le séquençage ARN a été réalisé sur une machine NextSeq (Illumina). Les librairies ont été séquencées avec des lectures de 75 bp en paired-end. Les fichiers FASTQ ont été cartographiés en utilisant BWA (version mm10 du génome de *Mus Musculus*) pour Illumina. L'analyse a été réalisée en utilisant TopHat pour Illumina. Les fichiers générés ont été traités avec le logiciel Cufflinks afin d'obtenir l'expression des gènes annotée pour chaque sous-type étudié. Ensuite, l'expression différentielle entre les échantillons a été analysée avec Cuffdiff.

XI. Test de taux de glycolyse par Seahorse®

Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés à partir de souris WT ou *Nlrp3*^{-/-} puis différenciés durant 72h. Les cellules ont ensuite été placées dans du milieu RPMI de test : RPMI sans rouge phénol (Seahorse XF RPMI medium, pH 7.4, #103576-100, Agilent), additionné de Glucose à 10 mM (Seahorse XF Glucose, #103577-100, Agilent), de Pyruvate à 1 mM (Seahorse XF Pyruvate, #103578-100, Agilent) et de L-Glutamine à 2 mM (Seahorse XF L-Glutamine, #103579-100, Agilent). Les cellules ont ensuite été ensemencées en octuplicats à raison de 3x10⁵ cellules dans 50 µl par puits, dans une cartouche de test 96 puits (Seahorse XFp sensor cartridge, #103022-100, Agilent). La cartouche a été centrifugée 5min à 200g et incubée 30min à 37°C. Le port A de la cartouche a ensuite été chargé avec un mix Roténone / Antimycine A à 5 µM et le port B avec du 2-DG à 500 mM, dans du milieu RPMI de test, pour des injections avec une concentration finale de 0,5 µM de Roténone / Antimycine A et 50 mM de 2-DG. La cartouche a été chargée dans un analyseur Seahorse XFe96 (Agilent), et l'expérience a été lancée via le fichier de protocole « Seahorse Glycolytic Rate Assay ». Les résultats ont été analysés par la machine et les données présentées sous forme de rapports d'expérience dans des fichiers .xlsm et .pzfx.

XII. Co-cultures de cellules CD4⁺, CD8⁺ et B16-F10

Les lymphocytes T CD8⁺ totaux ont été obtenus à partir de rates et de ganglions lymphatiques de souris OT-I. Les rates et les ganglions ont été prélevés et rassemblés avant d'être dissociés mécaniquement et filtrés sur un filtre de 70 µm (Pre-Separation Filters 70 µm, #130-095-823, Miltenyi Biotec), les cellules ont ensuite été incubées avec une solution de lyse des globules rouges (Red Blood Cell Lysis Solution 10x, 130-094-183, Miltenyi Biotec). Les cellules ont ensuite été marquées avec un anticorps anti-CD8a (Ly-2) couplé à des billes magnétiques (CD8a (Ly-2) Microbeads, #130-117-044) durant 10min. Les cellules ont ensuite été filtrées sur un filtre de 30 µm puis séparées par tri magnétique sur colonne (LS Columns, 130-042-401, Miltenyi Biotec). Pour les co-cultures T CD8⁺ - T CD4⁺, les lymphocytes T CD8⁺ OT-I totaux récupérés dans la fraction positive ont ensuite été ensemencés à raison de 5x10⁴ cellules par puits en plaque 96 puits (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, #161093, Thermo Scientific™), dans du milieu RPMI 1640 additionné

Matériel & Méthodes

avec du peptide SIINFEKL (2 µg/mL), de la L-Glutamine 2 mM, du pyruvate de sodium 1 mM, de pénicilline (100 unités/mL), streptomycine (100 µg/mL), amphotéricine B (250 ng/mL) et 4 mM d'HEPES (Gibco). Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs différenciés durant 72h ont ensuite été ajoutés selon des ratio T CD8⁺:T CD4⁺ de 1:1, 2:1, 10:1. Les cellules ont été co-cultivées 24h puis récoltées pour analyse.

Pour les co-cultures T CD4⁺:B16-F10_{OVA}, des lymphocytes T CD4⁺ ont été isolés et différenciés durant 72h, puis ajoutés sur des cellules B16-F10_{OVA} ensemencées 3h au préalable dans des plaques 24 puits (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, #142475, Thermo Scientific™), au ratio 1:1. Les cellules ont été co-cultivées 24h puis récoltées pour analyse. Les cellules B16-F10_{OVA} ont été obtenues auprès de Merck (B16-OVA MO4 Mouse Melanoma Cell Line, # SCC420, Sigma Aldrich)

Pour les co-cultures T CD8⁺:B16-F10_{OVA}, les lymphocytes T CD8⁺ OT-I ou les lymphocytes T CD8⁺ TILs ont été isolés puis ajoutés sur des cellules B16-F10_{OVA} ensemencées 3h au préalable dans des plaques 24 puits (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, #142475, Thermo Scientific™), au ratio 1:1. Les cellules ont été co-cultivées 24h puis récoltées pour analyse.

XIII. Modèles de transfert adoptif de cellules T

Des cellules de mélanome murin B16-F10_{OVA} ont été cultivées à 37°C sous 5% de CO₂ dans du DMEM complété avec 10% de sérum de veau foetal, 1% de L-glutamine (Gibco), 1% pénicilline, streptomycine, amphotéricine B (Gibco), 4 mM d'HEPES (Gibco) et 1 mM de pyruvate de sodium (Gibco). En parallèle, des lymphocytes T CD4⁺ naïfs OT-II WT ou OT-II *Nlrp3*^{-/-} ont été différenciés 72h et injectés à raison de 2x10⁶ cellules par souris, par voie intraveineuse, simultanément à 3x10⁵ cellules B16-F10_{OVA} par voie intraveineuse également. Les poumons des souris ont été prélevés 12 jours après injection, anonymisés, et les *foci* tumoraux à leur surface ont été comptés. Les poumons ont ensuite été dissociés mécaniquement et par réaction enzymatique avec un kit de dissociation de tumeurs (Tumor Dissociation Kit, mouse, #130-096-730, Miltenyi Biotec) et un instrument de dissociation de tissus (gentleMACS™ Octo Dissociator, Miltenyi Biotec). Les suspensions cellulaires ont été filtrées sur des filtres de 70 µm (Pre-Separation Filters 70 µm, #130-095-823, Miltenyi Biotec) puis centrifugées 5min à 300g. Les surnageants ont été prélevés et les suspensions cellulaires ont été incubées 1min avec une solution de lyse des globules rouges (Red Blood Cell Lysis Solution 10x, #130-094-183, Miltenyi Biotec). Les suspensions cellulaires ont ensuite été marquées avec des anticorps anti-CD45 couplés à des billes magnétiques (CD45 (TIL) MicroBeads mouse, #130-110-618, Miltenyi Biotec), filtrées sur des filtres de 30 µm (Pre-Separation Filters 30 µm, #130-041-407, Miltenyi Biotec) et les cellules CD45⁺ ont été isolées par un tri positif sur colonnes magnétiques (LS Columns, 130-042-401, Miltenyi Biotec). Les cellules ont été ensemencées à raison de 5x10⁵ cellules par puits dans des plaques 96 puits (Nunc™ MicroWell™ 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplate, #161093, Thermo Scientific™) enduites avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 à 2 ng/mL et incubées sur la nuit à 37°C sous 5 % de CO₂.

XIV. Test de ligature de proximité, Duolink®

Après isolation 1x10⁶ cellules CD4⁺ naïves différenciées durant des temps variables ont été récoltées et fixées 15min à 4°C dans une solution de paraformaldéhyde 4 %. Les cellules ont ensuite été perméabilisées à l'aide de méthanol glacial (-20°C) 100 % durant 20 min sur glace, puis incubées 1h

dans une solution de PBS 5 % SVF et 0,3 % Triton™ X100 afin de bloquer les sites de fixation aspécifiques et perméabiliser les membranes des cellules. Les cellules ont ensuite été incubées sur la nuit à 4°C dans une solution de PBS 1 % BSA et 0,3 % Triton™ X100 contenant des anticorps primaires (anti-NLRP3/NALP3, mAb (Cryo-2) (1:100), #AG-20B-0014-C100, Adipogen ; IRF-4 (D9P5H) Rabbit mAb, #15106, Cell Signaling Technology ; Smad3 Antibody (1:50), #9513, Cell Signaling Technology ; Anti-TGF-beta Receptor Antibody type I, #ABF17-I, Sigma Aldrich).

Les cellules ont ensuite été incubées 1h à 37°C avec des sondes appropriées (Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Mouse MINUS, # DUO92004 et Duolink® In Situ PLA® Probe Anti-Rabbit PLUS, # DUO92002, Sigma-Aldrich), puis incubées 30 min à 37°C dans une solution contenant une ligase (Duolink® In Situ Detection Reagents Red, # DUO92008 ou Duolink® In Situ Detection Reagents Green, # DUO92014, Sigma Aldrich), avant d'être incubées 1h40 à 37°C dans une solution contenant une polymérase (Duolink® In Situ Detection Reagents Red, # DUO92008 ou Duolink® In Situ Detection Reagents Green, # DUO92014, Sigma Aldrich). Les cellules ont ensuite été déposées sur lame et recouvertes d'une goutte de milieu de montage contenant du DAPI (ProLong™ Gold Antifade Mountant with DAPI, # P36935, ThermoFisher Scientific) puis incubées 24h à 4°C. Les cellules ont ensuite été photographiées à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axio Imager.M2, ZEISS) avec objectif 40x/0.75 ou 63x/1.40, équipé d'une caméra AxioCam MRm monochrome (ZEISS) et piloté par le module d'acquisition du logiciel ZEN (ZEISS). Puis les clichés ont été analysés à l'aide du module d'analyse du logiciel ZEN.

XV. Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)

Après isolation, 1×10^7 cellules CD4⁺ naïves ont été différenciées durant 1h puis récoltées. Les cellules ont été fixées dans du Fixing Buffer A (truChIP Chromatin Shearing Kit with Formaldehyde, #520155, Covaris) additionné de formaldéhyde au 1,11% final, durant 5min sous agitation à température ambiante. Les cellules ont ensuite été *quenchées* à l'aide de Quenching Buffer E (truChIP Chromatin Shearing Kit with Formaldehyde, #520155, Covaris) durant 5 min sous agitation à RT. Puis les cellules ont été lysées avec du Lysis Buffer B (truChIP Chromatin Shearing Kit with Formaldehyde, #520155, Covaris) durant 10 min sous agitation à 4°C et rincées deux fois dans du Shearing Buffer D3 (truChIP Chromatin Shearing Kit with Formaldehyde, #520155, Covaris), puis reprises dans 130 µL de ce même tampon et transférées dans des tubes de sonication (microTUBE AFA Fiber Pre-Slit Snap-Cap 6x16mm, #520045, Covaris). La chromatine a ensuite été fragmentée à l'aide d'un ultra sonicateur (M220 Focused-ultrasonicator, Covaris) avec le programme suivant (**Tableau 8**):

Tableau 8 : Programme de fragmentation de chromatine sur appareil Covaris M220

Protocole de fragmentation pour grande quantité de cellules	
Taille Cible	200 pb
Peak Incident Power	75
Duty Factor	10 %
Cycle per Burst	200
Temps de Traitement	12 min
Température	7°C
Min/Max Température	4/10°C
Nombre Max de Cellules	30 Millions
Niveau d'eau	Complet
Volume d'échantillon	130 µL

Ensuite, 10 µL d'échantillon ont été prélevés afin de constituer l'*input DNA* et ont été repris dans 88 µL de ChIP Buffer 2 (ChIP-IT® Express Enzymatic, #53009, Active Motif) avec 0,1 M de NaCl. En parallèle, 50 µg de chromatine ont été précipités dans le mix suivant, dans des tubes 2 mL :

Tableau 9 : Récapitulatif des réactifs du mix de précipitation de la chromatine

Réactifs	Quantité
Billes magnétiques protéine G (ChIP-IT® Express Enzymatic, #53009, Active Motif)	25 µL
ChIP Buffer 1 (ChIP-IT® Express Enzymatic, #53009, Active Motif)	10 µL
Chromatine Fragmentée	20 – 60 µL
Protease Inhibitor Cocktail (ChIP-IT® Express Enzymatic, #53009, Active Motif)	1 µL
Eau distillée	Qsp 100 µL
Anticorps	1 – 3 µg

Les anticorps Phospho-Smad3 (Ser423/425) (C25A9) (#9520, Cell Signaling Technology) ou Rabbit IgG Isotype Control (#31235, ThermoFisher Scientific) ont été utilisés dans le mix.

Puis la chromatine a été incubée sur rotateur à 4°C sur la nuit. Les billes magnétiques ont ensuite été lavées à l'aide d'un portoir magnétique, avec 800 µL de ChIP Buffer 1 puis deux fois avec 800 µL de ChIP Buffer 2. Puis les billes ont été resuspendues dans 50 µL d'Elution Buffer AM2 (ChIP-IT® Express Enzymatic, #53009, Active Motif) et incubées 15min sous rotation à RT. La chromatine a été détachée des billes à l'aide de 50 µL de Reverse Cross-linking Buffer (ChIP-IT® Express Enzymatic, #53009, Active Motif), avant d'être prélevée. Les échantillons de ChIP et les *input DNA* ont été incubés 15min à 95°C, puis incubés 1h à 37°C avec de la protéinase K (ChIP-IT® Express Enzymatic, #53009, Active Motif), avant que la réaction ne soit stoppée à l'aide de Proteinase K Stop Solution (ChIP-IT® Express Enzymatic, #53009, Active Motif). Les échantillons ont ensuite été analysés par RT-qPCR, et les

Matériel & Méthodes

quantités précipitées de séquences cibles de chaque couple d'amorce ont été calculées à partir d'une gamme réalisée grâce aux *input DNA*, puis le taux d'enrichissement a été déterminé par le ratio suivant : $\frac{\text{quantité d'ADN précipitée avec l'anticorps spécifique}}{\text{quantité d'ADN précipitée avec l'IgG contrôle}} = \text{Taux d'enrichissement}$

Cible	Amorce sens 5' → 3'	Amorce anti-sens 5' → 3'
ChIP pSMAD3 <i>Csf2</i>	GGCTACTCCCATTGACTGC	CAGCCTCAGAGACCCAGGTA
ChIP pSMAD3 <i>Ifng</i>	CCTTGGGTGTGTTGAGTGAA	AAAAAGCCAATGTGGTGAGG
ChIP pSMAD3 <i>Ii21</i>	GCCAACAGAAAACAGTGCAA	AAGTGTGCGCTTGCTTA

XVI. Analyses statistiques

Les résultats sont présentés en moyennes ± l'erreur standard de la moyenne (SEM), et les groupes ont été comparés en utilisant des test t non appariés ou ANOVA à deux facteurs lorsqu'approprié. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec GraphPad Prism 7.05, toutes les *p-values* ont été calculées avec des tests bilatéraux. Le seuil de significativité a été défini à $p < 0,05$ pour toutes les expériences.

ns, non significatif ; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0.001$

Résultats

I. La déficience en NLRP3 modifie les fonctions des Th17 dans le cancer

Dans cette première partie nous avons cherché à évaluer l'impact de NLRP3 sur les fonctions des Th17 et leurs conséquences sur la croissance tumorale, à l'aide de modèles de souris spécifiquement déficientes pour NLRP3 dans les CD4.

Nous avons généré des souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{flox}$ nous permettant d'étudier le rôle de NLRP3 dans les lymphocytes T $CD4^+$. Nous avons validé dans un premier temps la déficience en NLRP3 par un marquage par immunofluorescence en isolant les cellules $CD4^+$ naïves et les différenciant *in vitro* en Th2. Nous avons non seulement observé que les cellules n'exprimaient pas NLRP3 (**Figure 11, a**) mais également une diminution de leur expression de *Gata3* et *Il4* (**Figure 11, b**).

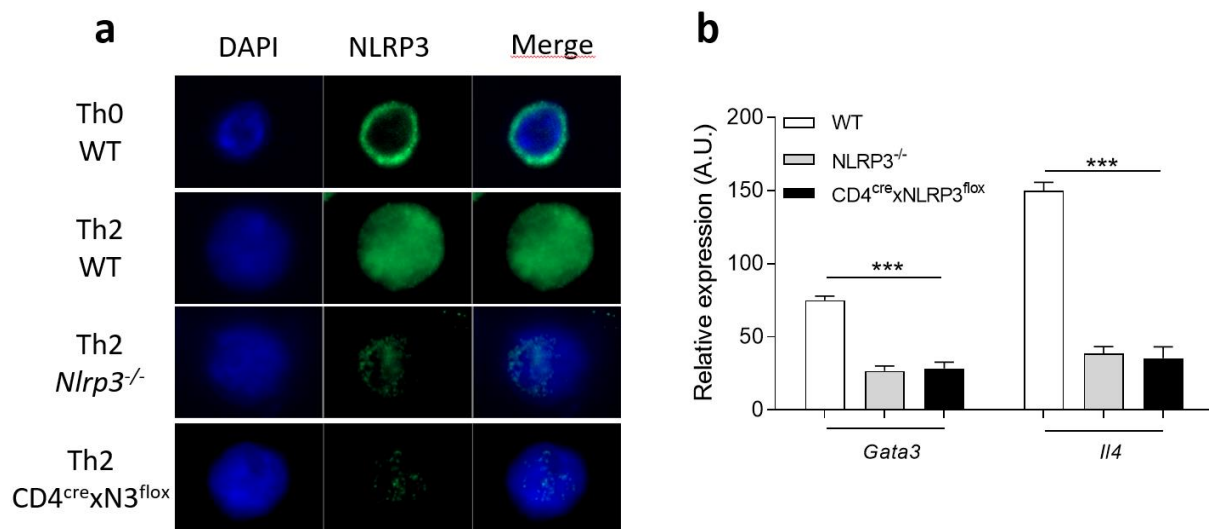


Figure 11 : Validation de la déficience en NLRP3 dans des cellules $CD4^+$ de souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{flox}$. Les cellules $CD4^+$ naïves isolées à partir de rates et ganglions de souris WT, *Nlrp3*^{-/-} et $CD4_{cre} \times NLRP3^{flox}$ ont été différenciées *in vitro* en Th2 durant 24h. **a**. La présence et la localisation de NLRP3 ont été observées par microscopie à immunofluorescence, et **b**. l'expression de *Gata3* et *Il4* a été mesurée par RT-qPCR. Résultats représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes. Différence significative en test U de Mann-Whitney, *** $p < 0,005$.

En comparant la croissance de différentes lignées tumorales (B16-F10, LLC1 et TC1), implantées en sous-cutanée à des souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{flox}$ et leurs contrôles, à l'effet d'un anticorps bloquant l'IL-4 chez des souris WT, nous avons observé un ralentissement de la croissance des tumeurs B16-F10 et LLC1 dans les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{flox}$. L'anticorps bloquant l'IL-4 n'a qu'un effet partiel sur la croissance B16-F10 (**Figure 12, a**) et aucun sur la croissance LLC1 (**Figure 12, b**) en comparaison au KO conditionnel $CD4_{cre} \times NLRP3^{flox}$. Aucun n'impact n'est observé sur la croissance TC1 (**Figure 12, c**). Il semble ainsi que le ralentissement de la croissance des tumeurs chez les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{flox}$ ne soit que partiellement imputable à la déficience en NLRP3 dans les Th2.

Résultats

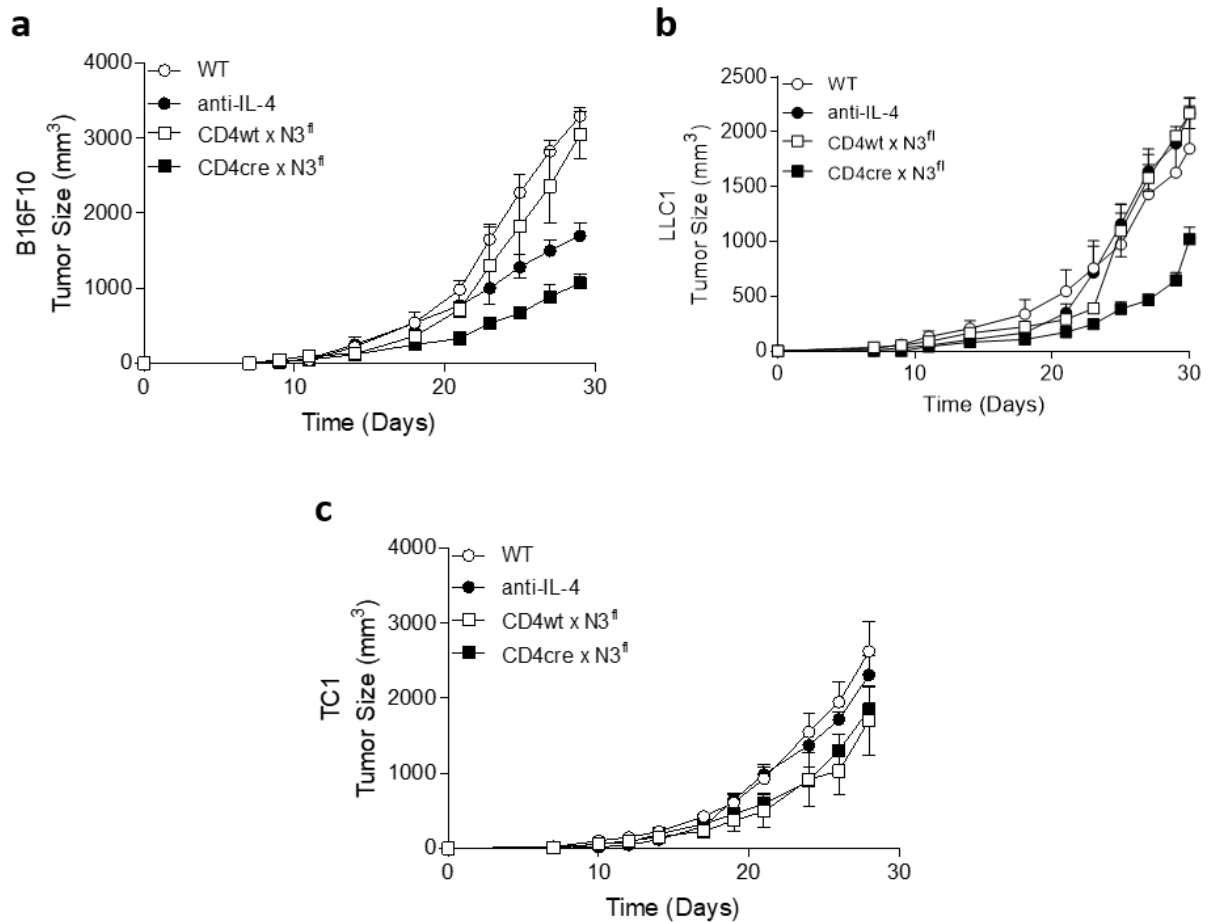


Figure 12 : La croissance tumorale est ralentie de manière plus importante chez les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fl}$ qu'avec un anti-IL-4. Les cellules tumorales ont été injectées en sous-cutanée dans le flanc à raison de 3×10^6 cellules par souris. La croissance des tumeurs **a.** B16-F10, **b.** LLC1 et **c.** TC1 a été mesurée et la moyenne de l'évolution de la taille des tumeurs de chaque groupe a été représentée au cours du temps. Résultats représentatifs d'au moins deux expériences indépendantes, avec 5 animaux par groupe.

Bien que le rôle majoritairement étudié de NLRP3 soit son implication dans l'inflammasome, aboutissant à la production d'IL-1 β , aucune différence notable de production d'IL-1 β n'a été observée dans les tumeurs B16-F10 de souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fl}$ en comparaison aux souris $CD4_{wt} \times NLRP3^{fl}$, tandis qu'elle est abolie dans les tumeurs B16-F10 de souris $Nlrp3^{-/-}$ (Figure 13, a). De plus le traitement de souris WT par le MCC950, un inhibiteur spécifique des fonctions de NLRP3 liées à l'inflammasome, n'a pas d'impact sur la croissance tumorale des lignées B16-F10, LLC1 et TC1 (Figure 13, b-d).

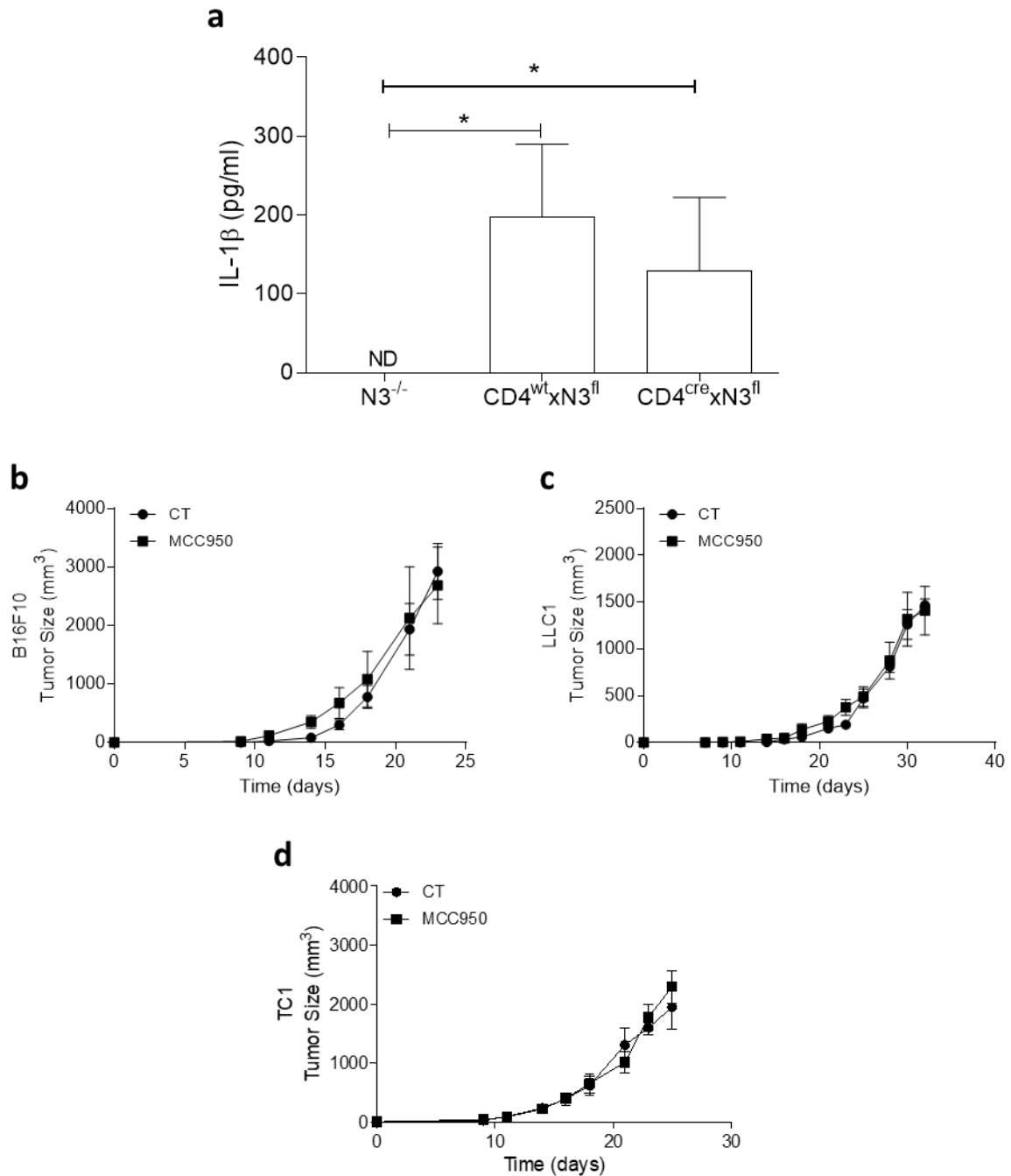


Figure 13 : L'impact de NLRP3 sur la croissance tumorale est indépendant de la sécrétion d'IL-1β et de fonctions liées à l'inflammasome. a. Des cellules tumorales B16-F10 ont été injectées en sous-cutanée à raison de 3×10^6 cellules par souris et les tumeurs ont été prélevées et dissociées. Le surnageant a été analysé par ELISA ciblant l'IL-1β. Des cellules tumorales **b.** B16-F10, **c.** LLC1 et **d.** TC1 ont été injectées en sous cutanée à des souris WT à raison de 3×10^6 cellules par souris avec ou sans traitement MCC950 (30 μg/souris, tous les jours durant 5 jours, puis tous les 2 jours). La croissance a été mesurée et la moyenne de l'évolution de la taille des tumeurs de chaque groupe a été représentée au cours du temps. Résultats représentatifs d'au moins deux expériences, avec 10 animaux par groupe. Différence significative en test U de Mann-Withney, * $p < 0,05$.

Résultats

L'analyse des lymphocytes T CD4⁺ infiltrants les tumeurs (T CD4⁺ TILs) a révélé que ceux issus de tumeurs de souris CD4^{cre}xNLRP3^{flox} expriment plus le gène *Ifng* (Figure 14, a), et produisent plus d'IFN γ (Figure 14, b, c).

L'analyse par cytométrie en flux des lymphocytes T CD4⁺ TILs de tumeurs B16-F10 dont les populations ont été caractérisées par l'expression de marqueurs membranaires ainsi que par l'expression de FOXP3 a également révélé une diminution de la proportion des T_{Reg} infiltrants les tumeurs des souris CD4^{cre}xNLRP3^{flox}, sans modifier la proportion des autres populations de lymphocytes T CD4⁺ caractérisées (Figure 15).

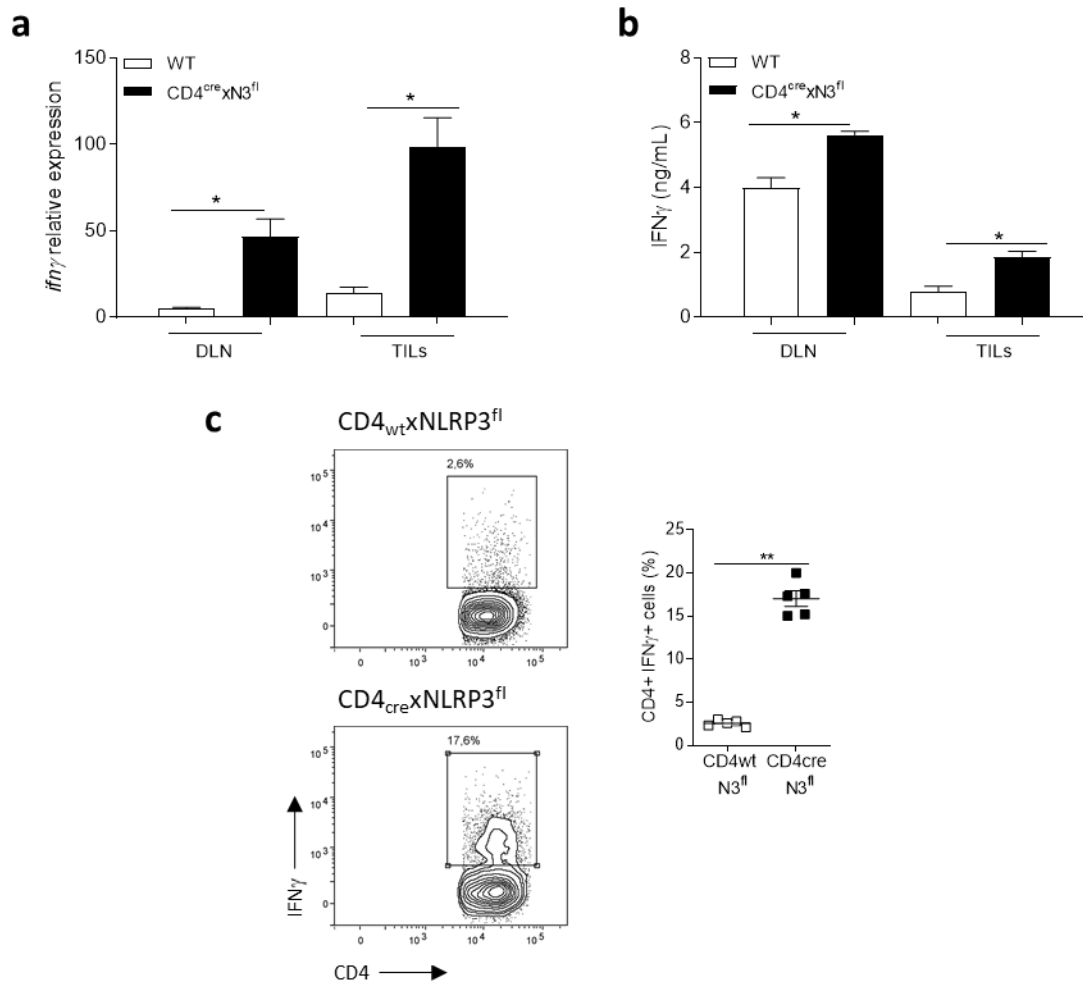


Figure 14 : Les lymphocytes T CD4⁺ TILs issus de tumeurs de souris CD4^{cre}NLRP3^{flox} produisent plus d'IFN γ . Les tumeurs B16-F10 et les ganglions drainant (DLN) de souris CD4_{wt}xNLRP3^{flox} et CD4_{cre}xNLRP3^{flox} ont été prélevés et dissociés. Les cellules CD4⁺ ont été triées et **a.** l'expression de *Ifng* a été analysée par RT-qPCR, **b.** la sécrétion d'IFN γ a été analysée par ELISA et **c.** sa production par les cellules par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 5 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

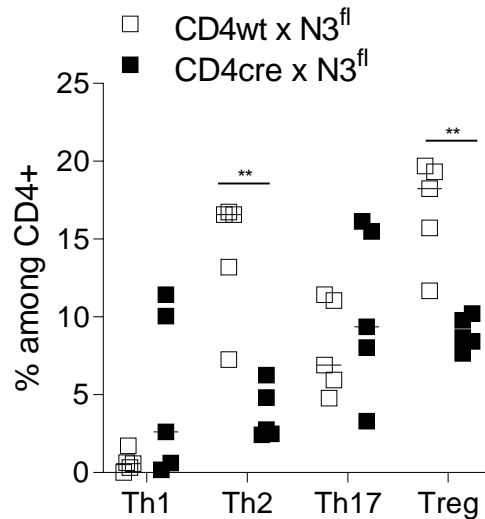


Figure 15 : Caractérisation des populations de lymphocytes T CD4⁺ TILs issus de tumeurs B16-F10. Les tumeurs B16-F10 de souris CD4^{wt}xNLRP3^{fllox} et CD4^{cre}xNLRP3^{fllox} ont été prélevées et dissociées. Les cellules CD4⁺ triées ont été analysées par cytométrie en flux afin de caractériser les populations CD4⁺ Th1 (CXCR3⁺), Th2 (CCR4⁺), Th17 (CCR6⁺) et T_{Reg} (CD25^{hi} FOXP3^{hi}). Résultats représentatifs d'au moins 2 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, ** p < 0,01.

Pour évaluer l'impact de NLRP3 sur la biologie des T_{Reg} nous avons différencié des lymphocytes T CD4⁺ naïfs *in vitro* en Th1, Th2, Th17 et T_{Reg} et nous avons analysé l'expression de leurs facteurs de transcription et cytokines clés par RT-qPCR. Si nous avons bien confirmé une diminution de l'expression de *Gata3* et *Il4* dans les Th2 *Nlrp3*^{-/-} (Figure 16, b, c), nous n'avons cependant pas observé d'impact sur l'expression de *Foxp3* et *Il10* dans les T_{Reg} (Figure 16, f, g). De plus nous n'avons pas constaté de diminution de l'expression de FOXP3 par les T_{Reg} (Figure 17).

Résultats

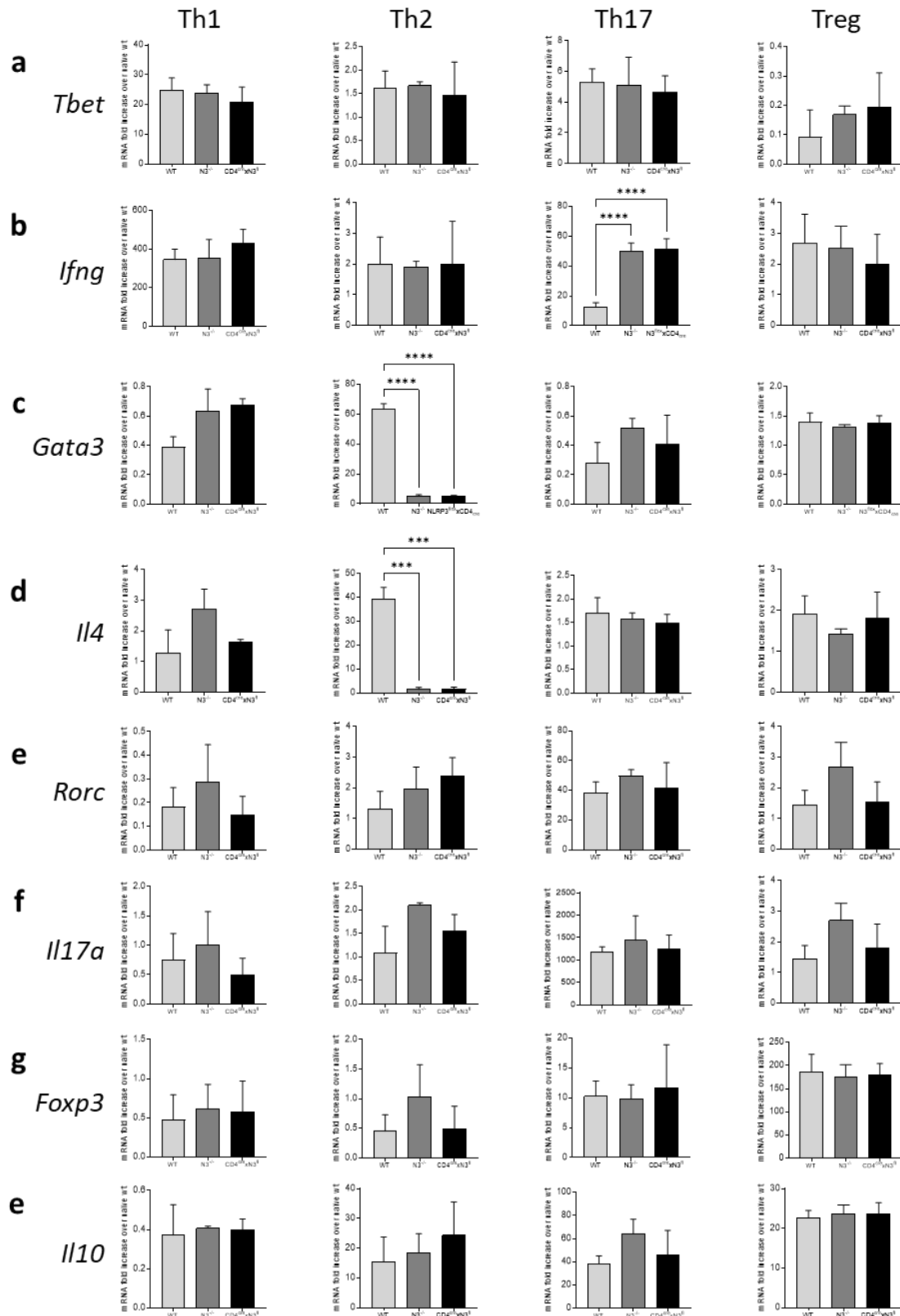


Figure 16 : Impact de la déficience en NLRP3 sur l'expression des gènes codants pour les facteurs de transcription et les cytokines clés des populations de lymphocytes T CD4⁺. Les cellules ont été différenciées en Th1, Th2, Th17 et T_{Reg} in vitro durant 24h à partir de lymphocytes T CD4⁺ naïfs isolés de souris WT, *Nlrp3*^{-/-} ou *CD4_{cre}NLRP3^{flox}*. L'expression des ARNm des gènes **a. Tbx21**, **b. Ifng**, **c. Gata3**, **d. Il4**, **e. Rorc**, **f. Il17a**, **g. Foxp3**, **e. Il10** a ensuite été mesurée par RT-qPCR. Résultats représentatifs de 5 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, *** p < 0,005 ; **** p < 0,001.

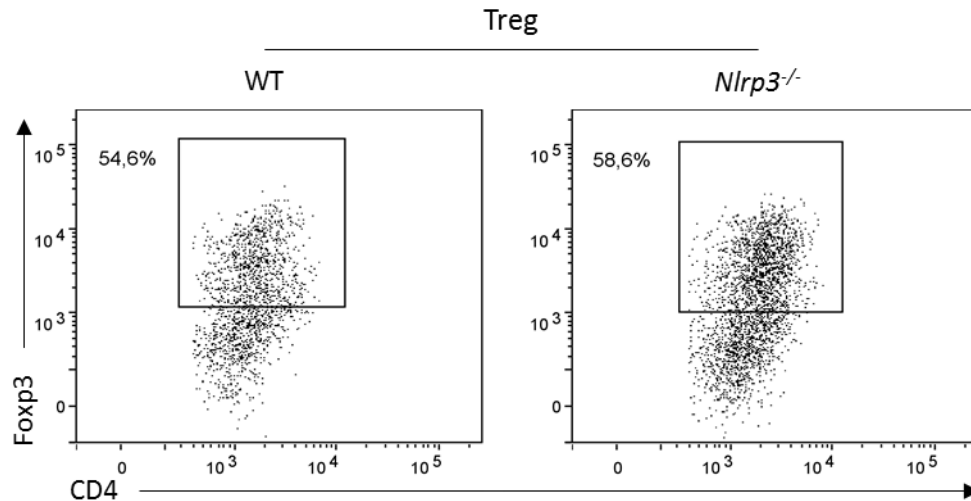


Figure 17 : Impact de la déficience en NLRP3 sur l'expression de FOXP3 par les T_{Reg}. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris WT ou *Nlrp3*^{-/-} et différenciés *in vitro* en présence d'un milieu polarisant T_{Reg} durant 72h, puis l'expression de FOXP3 a été analysée par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 3 expériences.

Les résultats révèlent en revanche que la déficience en NLRP3 impacte les Th17. En effet, l'expression du gène *Ifng* (Figure 18, b) ainsi que la production d'IFN γ (Figure 18, b) par des Th17 différenciés *in vitro* est augmentée en l'absence de NLRP3, sans pour autant impacter leur prolifération (Figure 18, c).

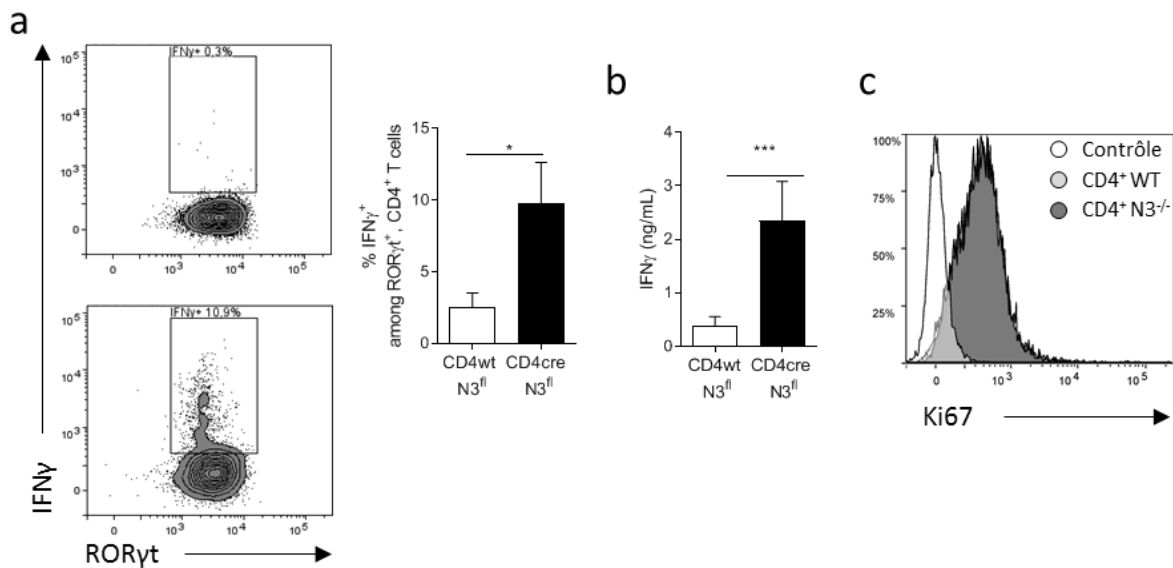


Figure 18 : La déficience en NLRP3 dans les Th17 induit une production accrue d'IFN γ . Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris CD4^{wt}NLRP3^{fllox} ou CD4^{cre}NLRP3^{fllox} et les cellules ont été différenciées *in vitro* en présence d'un milieu polarisant Th17 durant 72h. **a.** L'expression de ROR γ t et l'IFN γ ainsi que celle **c.** du Ki67 ont été analysées par cytométrie en flux et **b.** la quantité d'IFN γ présente dans le milieu de culture des cellules a été dosée par ELISA. Résultats représentatifs de 3 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, * $p < 0,05$; *** $p < 0,005$.

Résultats

Parmi les lymphocytes T CD4⁺ TILs de B16-F10 nous avons également observé que les cellules RORγt⁺ produisent plus d'IFNγ chez les souris CD4^{cre}xNLRP3^{flox}, en accord avec une augmentation de l'expression du gène *Ifng* que nous avons pu observer par RT-qPCR en triant les lymphocytes T CD4⁺ CCR6⁺ issus de tumeurs B16-F10 de souris CD4^{wt}xNLRP3^{flox} ou CD4^{cre}xNLRP3^{flox} (Figure 19, a, b).

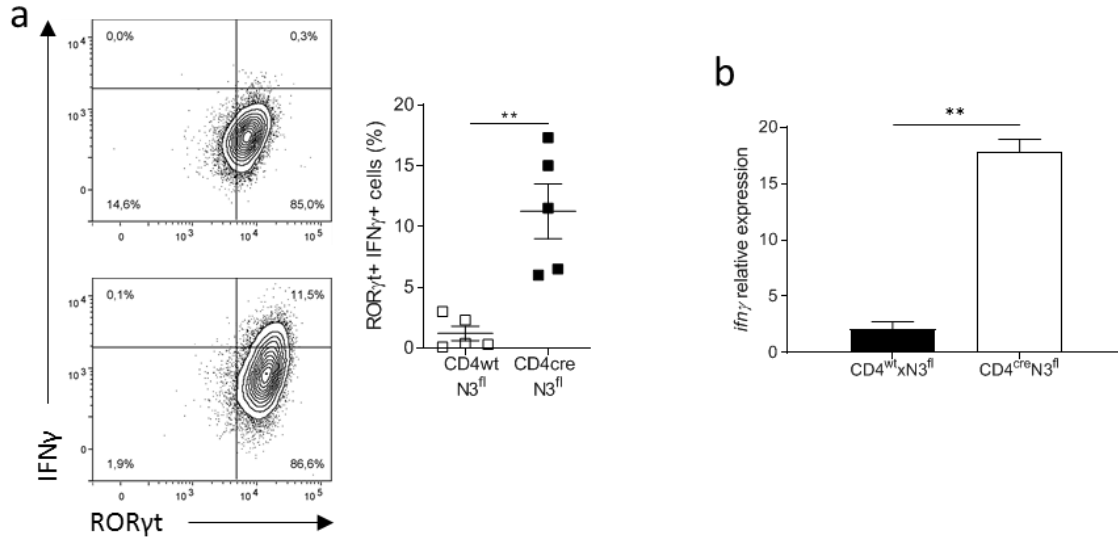


Figure 19 : Les Th17 TILs de souris CD4^{cre}xNLRP3^{flox} porteuses de tumeurs B16-F10 produisent de l'IFNγ. **a.** Les tumeurs B16-F10 de souris CD4^{wt}xNLRP3^{flox} et CD4^{cre}xNLRP3^{flox} ont été prélevées et dissociées. Les cellules CD4⁺ triées ont été analysées par cytométrie en flux afin de déterminer la proportion de Th17 producteurs d'IFNγ (CD4⁺ RORγt⁺ IFNγ⁺). **b.** Les tumeurs B16-F10 de souris CD4^{wt}xNLRP3^{fl} et CD4^{cre}xNLRP3^{fl} ont été prélevées et dissociées. Les cellules Th17 (CD4⁺ CCR6⁺) triées et le taux d'expression du gène *Ifng* a été mesuré par RT-qPCR. Résultats représentatifs de 5 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, ** $p < 0,01$.

Afin de mieux caractériser l'impact de nos Th17 dans des modèles de croissance tumorale, nous avons utilisé de la digoxine, un inhibiteur de RORγt conduisant à une déplétion des Th17. Nous avons ainsi pu observer que la croissance de tumeurs B16-F10 et LLC1 était ralentie de manière équivalente par la digoxine et la déficience en NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺ (Figure 20, a, b). Données qui ont pu être confirmées dans des souris *Rorc*^{-/-} (Figure 20, d, e) mais qui ne le sont pas dans un modèle de tumeur TC1 (Figure 20, c, f).

Résultats

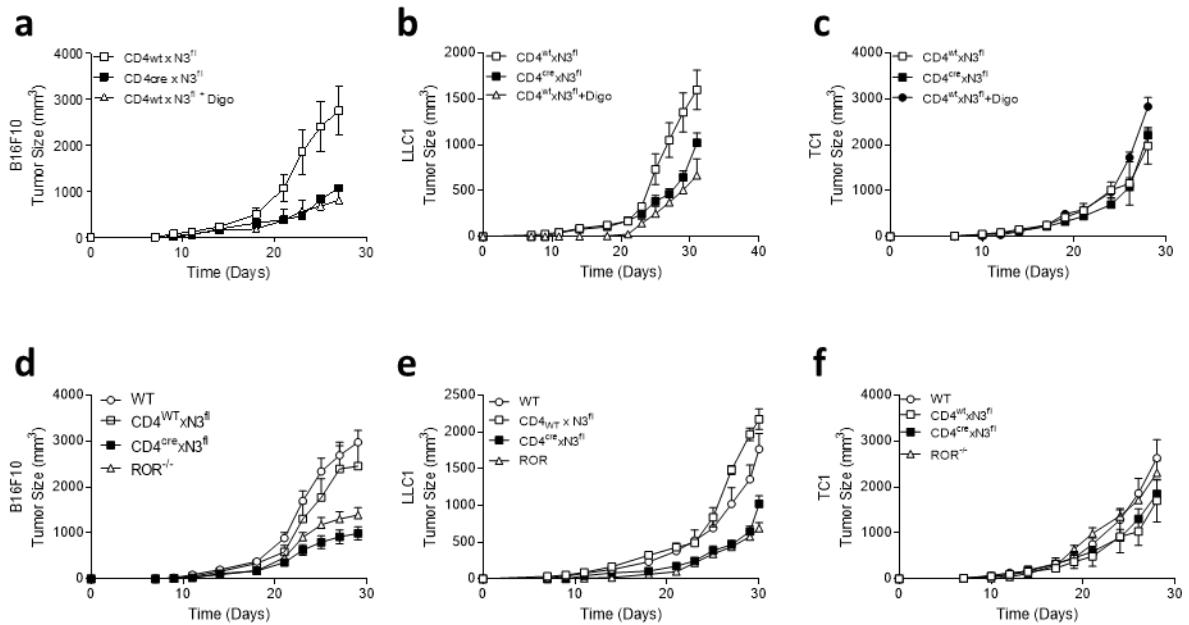


Figure 20 : L'absence de cellules ROR γ t ralentit la croissance de tumeurs B16-F10 et LLC1. Des cellules tumorales **a.** B16-F10, **b.** LLC1 et **c.** TC1 ont été injectées en sous cutanée à des souris, $CD4_{WT} \times NLRP3^{fllox}$ avec ou sans traitement digoxine ou $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$, et **d.** B16-F10, **e.** LLC1 et **f.** TC1 à des souris WT, $CD4_{WT} \times NLRP3^{fllox}$, $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$ ou $Rorc^{-/-}$ à raison de 3×10^6 cellules par souris. La croissance a été mesurée et la moyenne de l'évolution de la taille des tumeurs de chaque groupe a été représentée au cours du temps. Résultats représentatifs d'au moins deux expériences avec 5 animaux par groupe.

Nous avons également pu observer que le traitement à la digoxine induit au contraire une accélération de la croissance tumorale dans les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$, et donc la perte du bénéfice lié à la déficience en NLRP3 dans les lymphocytes T $CD4^+$ (**Figure 21**).

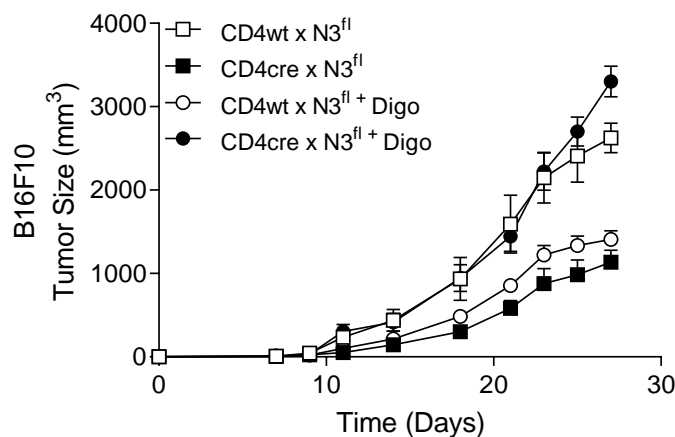


Figure 21 : La déplétion des cellules ROR γ t des souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$ accélère la croissance de tumeurs B16-F10. Des cellules tumorales B16-F10 ont été injectées en sous cutanée à des souris, $CD4_{WT} \times NLRP3^{fllox}$ ou $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$ avec ou sans traitement digoxine. La croissance a été mesurée et la moyenne de l'évolution de la taille des tumeurs de chaque groupe a été représentée au cours du temps. Résultats représentatifs de 2 expériences avec 5 animaux par groupe.

Toutes ces données indiquent que la déficience en NLRP3 pourrait avoir un impact sur l'activité des Th17 dans des modèles de cancer, en favorisant un phénotype anti-tumoral.

II. La déficience en NLRP3 favorise le phénotype Th17 inflammatoire

Dans cette seconde partie, nous avons cherché à déterminer l'impact de la déficience en NLRP3 sur le profil des Th17, afin d'évaluer dans quelle mesure l'absence de NLRP3 pouvait favoriser ou non l'orientation des Th17 vers un profil inflammatoire, qui expliquerait les propriétés anti-tumorales des Th17 chez les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$.

Nos résultats ont montré qu'en l'absence de NLRP3, les Th17 produisent de l'IFN γ , un marqueur du phénotype Th17i. Pour caractériser l'état des Th17 en fonction de la présence de NLRP3, nous avons étudié, par RNAseq, le profil transcriptomique de Th17 différenciés *in vitro* durant 72h. Nous avons ainsi comparé le profil d'expression génique de Th17 déficients pour NLRP3 à celui de Th17 WT mais également de Th17 inflammatoires et de Th1. Les résultats indiquent que les Th17 déficients pour NLRP3 ont un profil transcriptionnel différent des Th17 WT. En effet la déficience en NLRP3 induit la modification de l'expression de 759 gènes ($FDR \leq 0,05$) dont 463 sont surexprimés et 296 sont sous-exprimés. NLRP3 possède donc probablement des fonctions d'activation et d'inhibition de la transcription de certains gènes dans les Th17. En outre, cette signature moléculaire révèle que les Th17 déficients pour NLRP3 acquièrent un profil transcriptomique qui se rapproche de celui des Th17 inflammatoires (**Figure 22, a et b**).

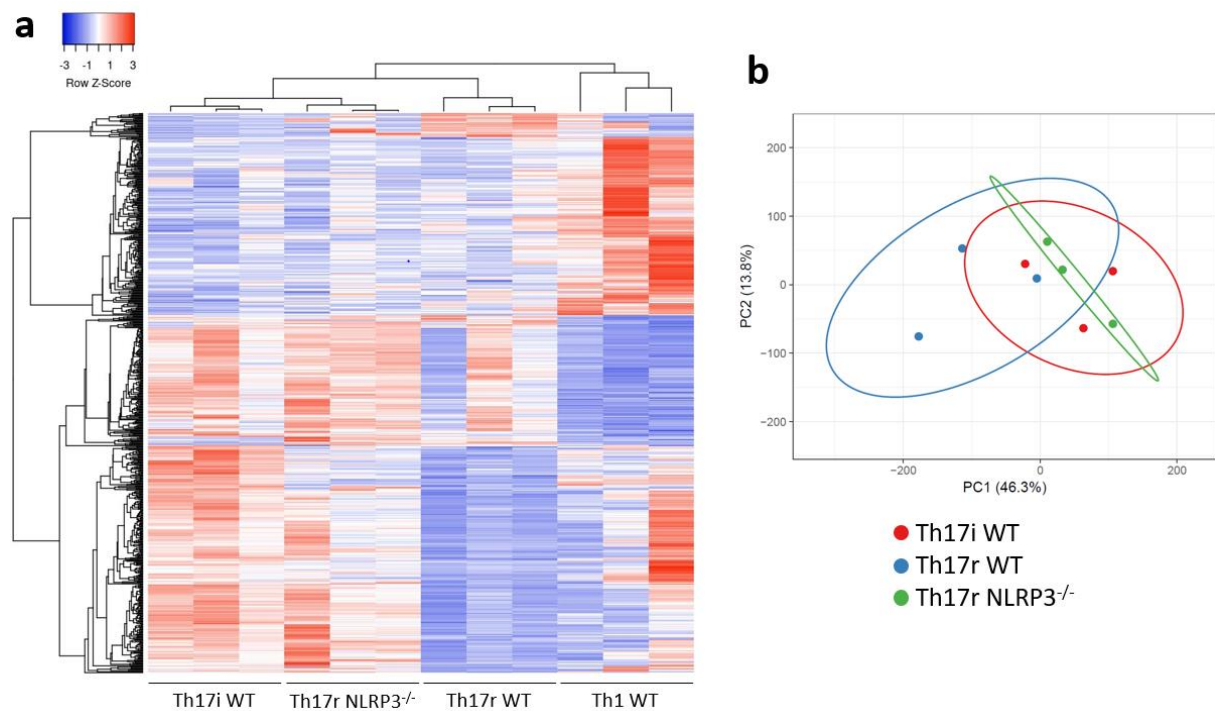


Figure 22 : Les Th17 déficients pour NLRP3 s'apparentent à des Th17i. Les lymphocytes T $CD4^+$ naïfs isolés de souris WT ont été différenciés en Th1, Th17i ou Th17 durant 72h et ceux provenant de souris $Nlrp3^{-/-}$ ont été différenciés en Th17 durant 72h. Les cellules ont été prélevées et analysées par RNAseq, les données d'expression des gènes sont représentées sous forme **a.** de heatmap et ont été utilisées dans **b.** une analyse en composante principale. Résultats représentatifs de 3 expériences.

En se basant sur différentes publications ultérieures^{218,239-241}, nous avons retenu une liste de 31 gènes signant le profil inflammatoire des Th17. Parmi ces 31 gènes, 17 sont surexprimés dans les Th17 déficients pour NLRP3 après 72h de différenciation. (**Figure 23**).

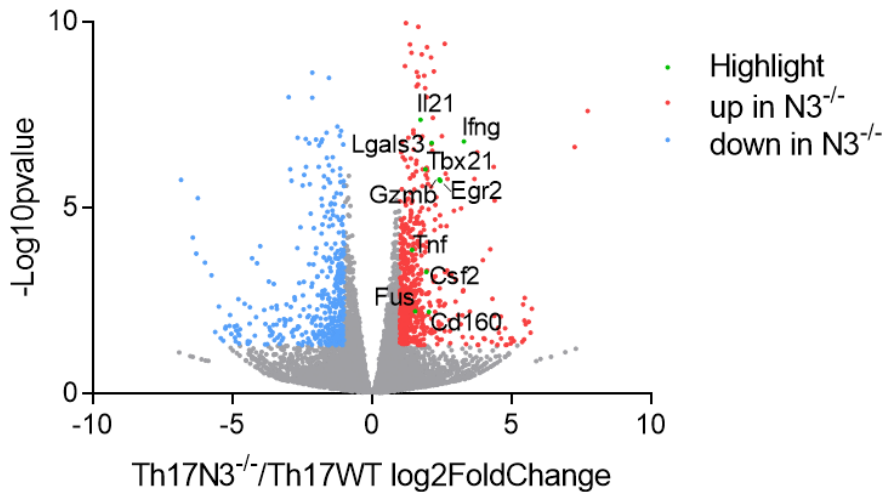


Figure 23 : Les Th17 *Nlrp3*^{-/-} surexpriment des gènes signatures du profil Th17 inflammatoire. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} ont été différenciés en Th17 in vitro durant 72h. Les données de RNAseq sont présentées sous forme de volcano plot de l'expression différentielle des gènes des Th17 *NLRP3*^{-/-} / Th17 WT. Résultats représentatifs de 3 expériences. P-values calculées via Cuffdiff.

Nous avons reproduit l'analyse RNAseq à 24h et observé que le profil Th17i s'acquiert progressivement dans les cellules Th17 *Nlrp3*^{-/-} (Figure 24, a, b). Ce que nous avons confirmé par des analyses d'expression des gènes par PCR sur des cellules Th17 WT et *Nlrp3*^{-/-} au cours d'une cinétique à 24h, 48h et 72h. Les résultats indiquent bien que le profil Th17i acquis par les Th17 *Nlrp3*^{-/-} se stabilise au cours du temps (Figure 24, c).

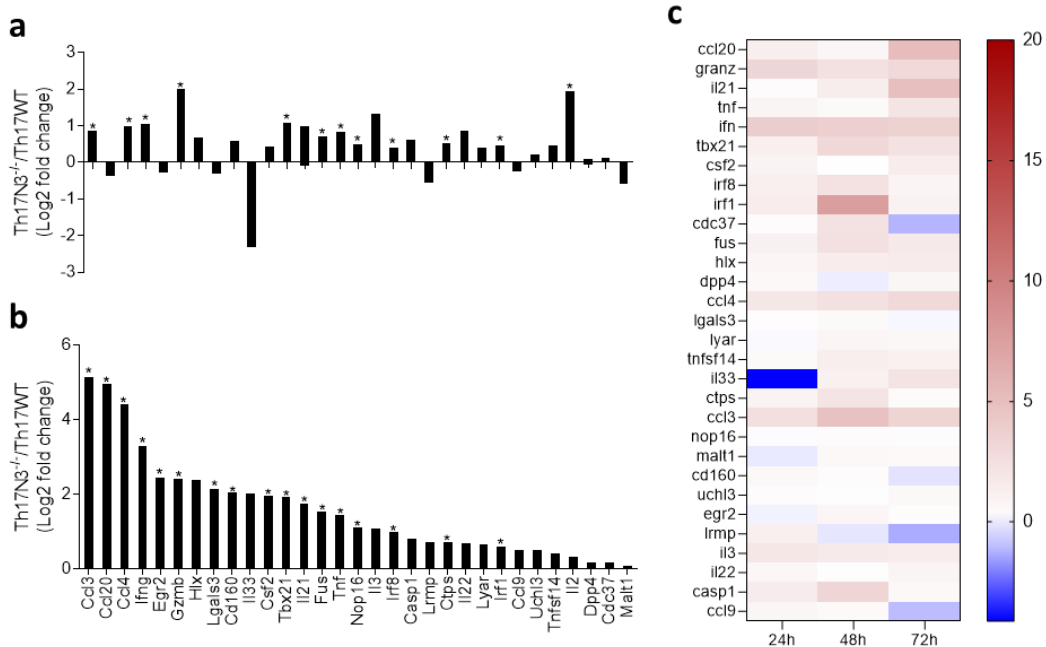


Figure 24 : Les Th17 *Nlrp3*^{-/-} acquièrent un profil Th17i au cours du temps. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} ont été différenciés en Th17 in vitro durant 24h et 72h. Les données de RNAseq sont présentées sous forme d'expression différentielle des gènes des Th17 *Nlrp3*^{-/-} / Th17 WT a. à 24h et b. à 72h. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} ont été différenciés en Th17 in vitro durant 24h, 48h et 72h. c. Les données sont représentées sous forme de heatmap de l'expression différentielle des gènes des Th17 *Nlrp3*^{-/-} / Th17 WT. Résultats représentatifs de 3 expériences.

Résultats

Cependant, si l'expression de CXCR3 est une caractéristique des Th17i, et qu'elle semble induite au niveau transcriptionnel dans les Th17 *Nlrp3*^{-/-} (Figure 25, a), nous n'avons pas observé d'augmentation de son expression à la surface des cellules par cytométrie en flux (Figure 25, b).

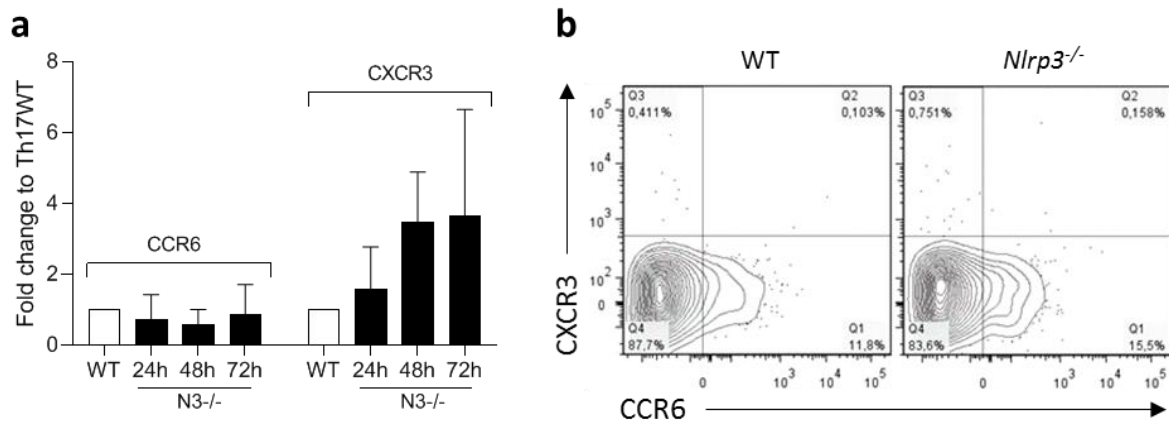


Figure 25 : Les Th17 *Nlrp3*^{-/-} ne surexpriment pas le marqueur CXCR3. Les cellules CD4⁺ naïves isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} ont été différenciées en Th17 in vitro durant 24h, 48h et 72h. **a.** L'expression des gènes codant pour CCR6 et CXCR3 a été mesurée par RT-qPCR et **b.** l'expression des protéines CCR6 et CXCR3 à la surface des cellules a été mesurée à 72h par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 3 expériences.

En revanche nous avons effectivement validé au niveau protéique la surexpression des cytokines inflammatoires IFN γ (Figure 18), TNF α , Granzyme B et GM-CSF (Figure 26).

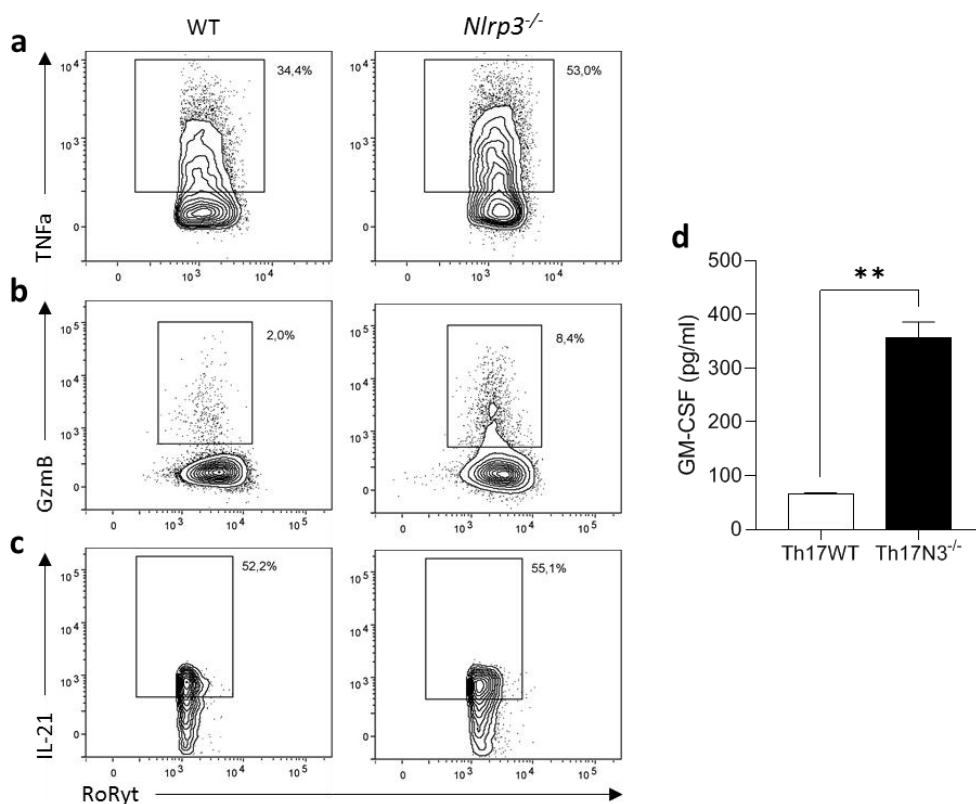


Figure 26 : Les Th17r *Nlrp3*^{-/-} sécrètent plus de TNF α , de Granzyme B et de GM-CSF. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris WT ou *Nlrp3*^{-/-} et différenciés en Th17r durant 72h. La production **a.** de TNF α , **b.** de Granzyme B et **c.** d'IL21 a été analysée par cytométrie en flux et **d.** de GM-CSF par ELISA. Résultats représentatifs de 3 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, ** $p < 0,01$.

Résultats

Pour vérifier la validité de nos observations *in vivo*, nous avons isolé des lymphocytes T CD4⁺ CCR6⁺ FOXP3⁻ de tumeurs B16-F10 injectées à des souris CD4^{cre}XNLRP3^{fllox} et leurs contrôles, afin d'évaluer la signature inflammatoire de ces cellules en mesurant l'expression des 15 gènes les plus pertinents dans notre modèle. Nous avons ainsi observé que le profil inflammatoire des Th17 *Nlrp3*^{-/-} est également retrouvé *in vivo* (Figure 27).

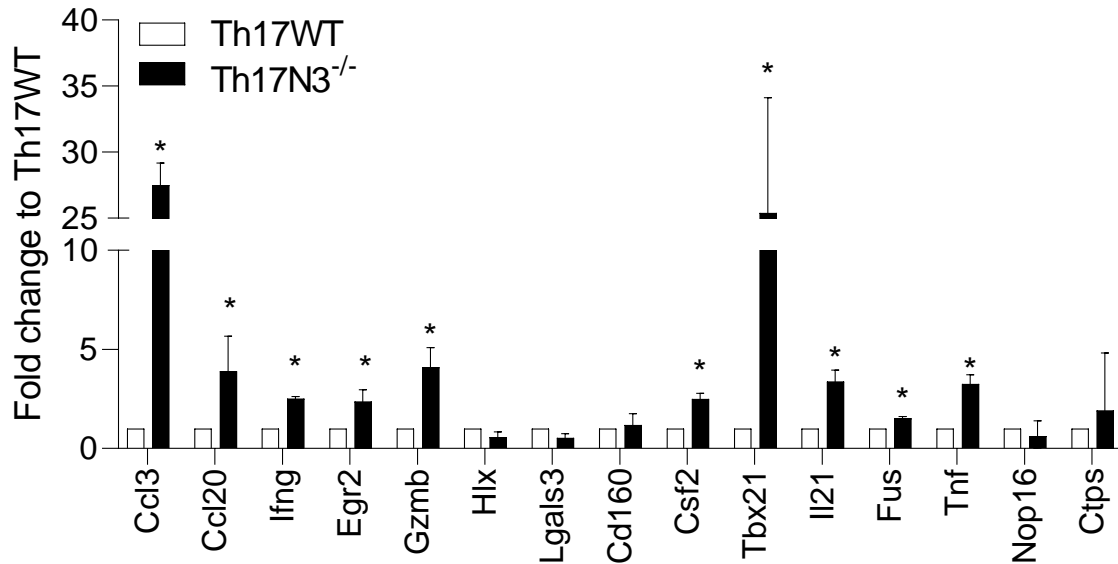


Figure 27 : Les Th17 *Nlrp3*^{-/-} présentent un profil inflammatoire *in vivo*. Des cellules CD4⁺ CCR6⁺ FOXP3⁻ ont été triées à partir de souris CD4^{wit}XNLRP3^{fllox} et CD4^{cre}XNLRP3^{fllox} et analysées par RT-qPCR. Résultats représentatifs de 3 expériences. Différence significative en test U de Mann-Whitney, * $p < 0,05$.

Notre équipe ayant démontré que l'expression membranaire des ectonucléotidases CD39 et CD73 participe à l'immunosuppression médiée par les Th17, via la conversion d'ATP en Adénosine⁵¹, nous avons cherché à déterminer si la déficience en NLRP3 impactait l'expression de ces deux protéines. Nous avons donc analysé l'expression ARN des gènes *Entpd1* et *Nt5e* codant respectivement pour CD39 et CD73 (Figure 28, a), et nous avons évalué leur expression à la surface des Th17 WT et *Nlrp3*^{-/-} par cytométrie en flux (Figure 28, b). Nous n'avons pas constaté de différence dans l'expression de ces deux protéines, ni dans leur fonction, que nous avons évaluée en dosant l'ATP et l'AMP présents dans le milieu des Th17 *in vitro* (Figure 28, c).

Résultats

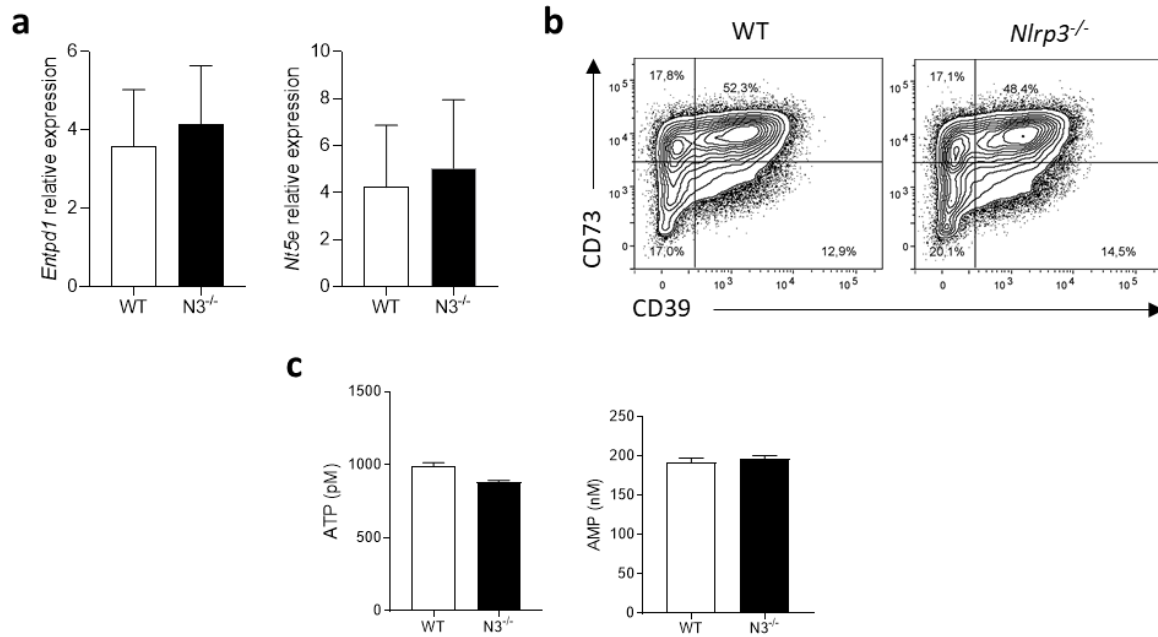


Figure 28 : La déficience en NLRP3 n'impacte pas l'expression ni la fonction des ectonucléotidases. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} ont été différenciés en Th17 in vitro durant 72h et l'expression de CD39 et CD73 a été mesurée **a.** au niveau transcriptionnel par RT-qPCR et **b.** au niveau protéique par cytométrie en flux. Les cellules ont également été cultivées en présence d'ATP (2 pM) et **c.** les quantités d'ATP et d'AMP ont été dosées à 72h. Résultats représentatifs de 3 expériences.

Les cellules Th17i étant également caractérisées par une activité glycolytique accrue^{234,235,238}, nous avons comparé l'activité glycolytique des Th17 *Nlrp3*^{-/-} par rapport aux Th17i et Th17r WT. Nous n'avons pas mis en évidence de différences d'activité métabolique liées à la glycolyse dans les Th17 *Nlrp3*^{-/-} par rapport aux Th17 WT (Figure 29, a, b, c).

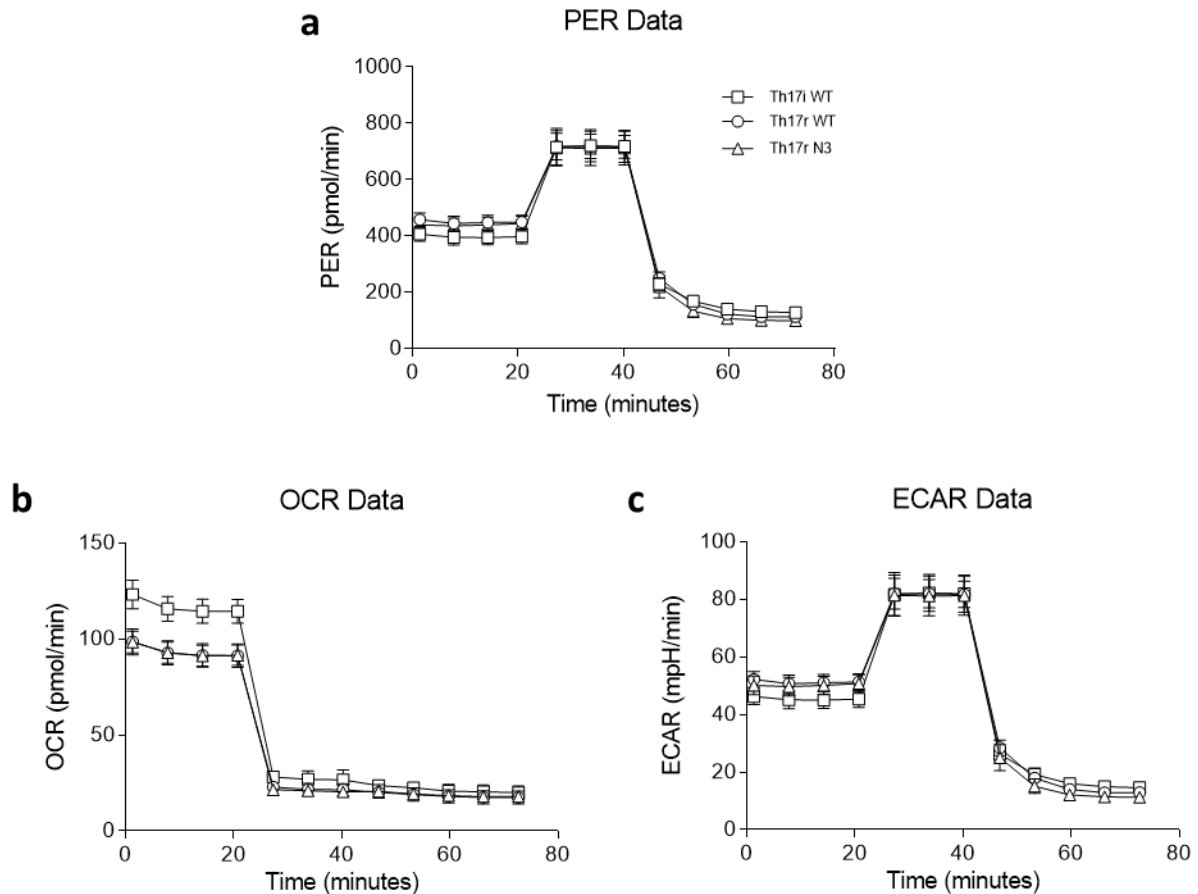


Figure 29 : Les Th17 *Nlrp3*^{-/-} ont une activité glycolytique normale. Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} ont été différenciés en Th17 in vitro durant 72h puis le taux de glycolyse des cellules a été analysé par Seahorse. Les données représentent **a.** le taux d'efflux de proton (PER), **b.** le taux de consommation d'oxygène (OCR) et **c.** le taux d'acidification extracellulaire (ECAR) au cours du temps, avec ajout de Roténone et d'antimycine A à t = 22 min et de 2-DG à t = 42 min. Résultats représentatifs de 2 expériences.

Ces résultats semblent donc indiquer que le changement phénotypique régulateur vers inflammatoire induit dans les Th17 par la déficience en NLRP3 n'est que partiel.

III. Les Th17 déficients pour NLRP3 perdent leur activité immunosuppressive

Dans cette troisième partie, nous avons cherché à évaluer dans quelle mesure les modifications du profil transcriptionnel des Th17 déficients pour NLRP3 pouvaient impacter les propriétés immunosuppressives de ces cellules.

La croissance des tumeurs B16-F10 et LLC1 étant ralentie dans les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$, et le phénotype des Th17 tendant vers un phénotype Th17i dans ces souris, nous avons cherché à déterminer si ces cellules acquièrent un potentiel cytotoxique. Pour cela nous avons croisé des souris OT-II, qui possèdent un TCR reconnaissant spécifiquement les acides aminés 323 à 339 de l'ovalbumine, avec des souris $Nlrp3^{-/-}$ pour générer des souris $OT-II \times Nlrp3^{-/-}$. Nous avons ensuite isolé les lymphocytes T $CD4^{+}$ naïfs de ces souris et nous les avons différenciés en Th17 avant de les co-cultiver avec des $B16-F10_{OVA}$ afin d'en évaluer le potentiel cytotoxique. Les données que nous avons obtenues démontrent que la déficience en $Nlrp3^{-/-}$ ne fait pas acquérir de fonctions cytotoxiques aux Th17 (**Figure 30**).

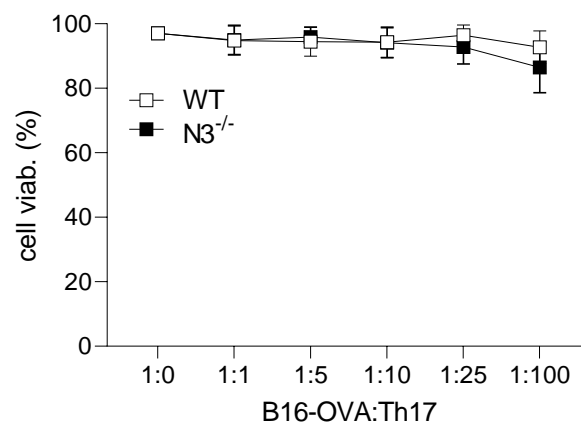


Figure 30 : Les Th17 $Nlrp3^{-/-}$ ne sont pas cytotoxiques. Des lymphocytes T $CD4^{+}$ naïfs ont été isolés de souris $OT-II \times WT$ ou $OT-II \times Nlrp3^{-/-}$ et différenciés en Th17 durant 72h, puis co-cultivés avec des cellules $B16-F10_{OVA}$ durant 24h. La cytotoxicité des Th17 sur les $B16-F10_{OVA}$ a été mesurée par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 3 expériences.

Ces résultats suggèrent un effet indirect des Th17 sur la croissance tumorale. Nous avons donc cherché à déterminer quelles cellules sont impliquées dans la réponse anti-tumorale médiée par les Th17. Dans ce but nous avons déplété les cellules NK, les lymphocytes T $CD8^{+}$ et les macrophages avec respectivement de l'anti-NK1.1, de l'anti-CD8a et du liposome chlodronate. Les résultats de ces expériences indiquent que ni le blocage des NK ni celui des macrophages n'impacte la croissance de tumeurs B16-F10 chez les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$ (**Figure 31, a, b**). En revanche, l'anticorps bloquant les lymphocytes T $CD8$ aboli le ralentissement de la croissance chez les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$ (**Figure 31, c**).

Résultats

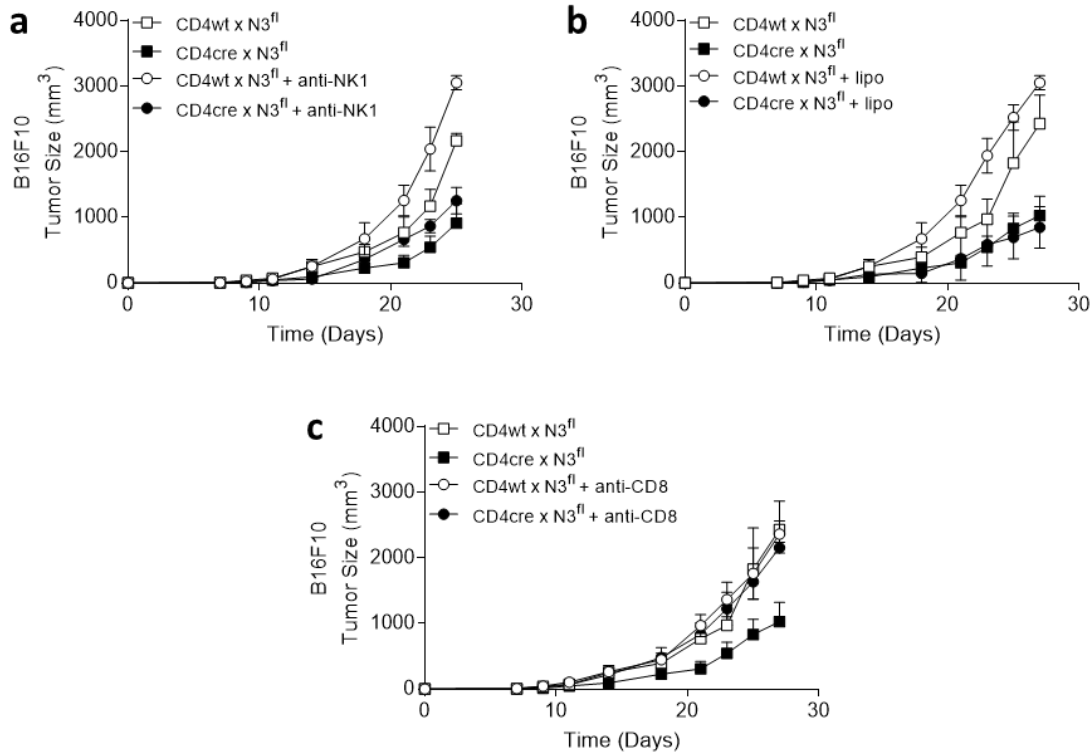


Figure 31 : Les lymphocytes T CD8⁺ participent au ralentissement de la croissance tumorale des souris CD4_{cre}xNLRP3^{fl}ox. Des cellules tumorales B16-F10 ont été injectées en sous cutanée à des souris, CD4_{WT}xNLRP3^{fl}ox ou CD4_{cre}xNLRP3^{fl}ox avec ou sans traitement **a.** anti-NK1.1, **b.** liposome chlodronate, **c.** anti-CD8a. La croissance a été mesurée et la moyenne de l'évolution de la taille des tumeurs de chaque groupe a été représentée au cours du temps. Résultats représentatifs de 2 expériences avec 5 souris par groupe.

Nous avons ensuite cherché à déterminer par quel biais les lymphocytes T CD8⁺ ralentissent la croissance tumorale chez les souris CD4_{cre}xNLRP3^{fl}ox, en analysant les lymphocytes T CD8⁺ TILs. Les résultats que nous avons obtenus indiquent que la proportion de lymphocytes T CD8⁺ est plus élevée dans les tumeurs de souris CD4_{cre}xNLRP3^{fl}ox (**Figure 32, a**) et qu'un plus grand nombre de ces cellules produisent de l'IFN γ et du Granzyme B (**Figure 32, b, c**). Leur niveau d'expression plus élevé de Ki67 indique également que ces cellules ont une prolifération accrue (**Figure 32, d**).

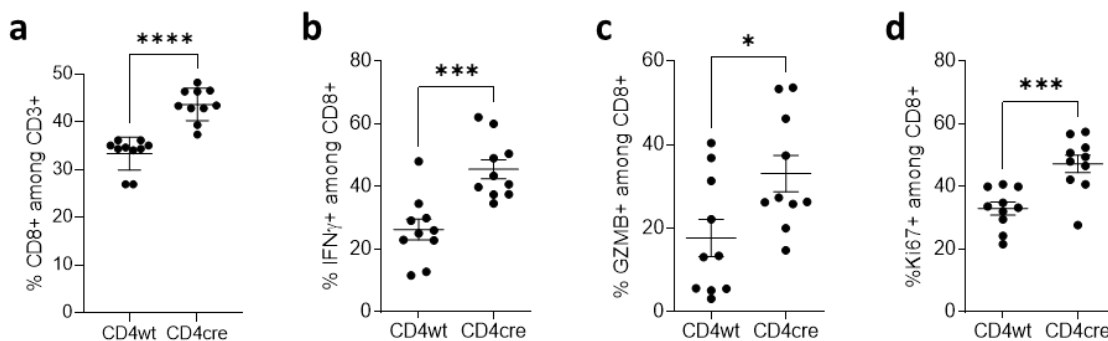


Figure 32 : Les lymphocytes T CD8⁺ TILs de souris CD4_{cre}xNLRP3^{fl}ox ont une activité accrue. Des cellules tumorales B16-F10 ont été injectées en sous cutanée à des souris, CD4_{WT}xNLRP3^{fl}ox ou CD4_{cre}xNLRP3^{fl}ox, les tumeurs ont été prélevées et dissociées et les CD45⁺ triés. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux pour déterminer la proportion **a.** de CD8⁺ et parmi elles **b.** d'IFN γ ⁺, **c.** de Granzyme B⁺ et **d.** de Ki67⁺. Résultats représentatifs de 2 expériences avec 5 souris par groupe. Différence significative en test U de Mann-Withney, * p < 0,05 ; *** p < 0,005 ; **** p < 0,001.

Résultats

Bien que les cellules Th17r possèdent une activité immunosuppressive, les Th17r *Nlrp3*^{-/-} semblent cependant acquérir un phénotype plus inflammatoire. Nous avons donc testé l'activité immunosuppressive des Th17 *Nlrp3*^{-/-} sur les lymphocytes T CD8⁺. Les résultats indiquent que les Th17 *Nlrp3*^{-/-} ont une activité immunosuppressive réduite par rapport aux Th17 WT, ne permettant plus une inhibition aussi importante de la sécrétion d'IFN γ , de Granzyme B ou de TNF α (Figure 33, a, b, c) ni de leur prolifération, comme l'indique le niveau d'expression de Ki67 (Figure 33, d).

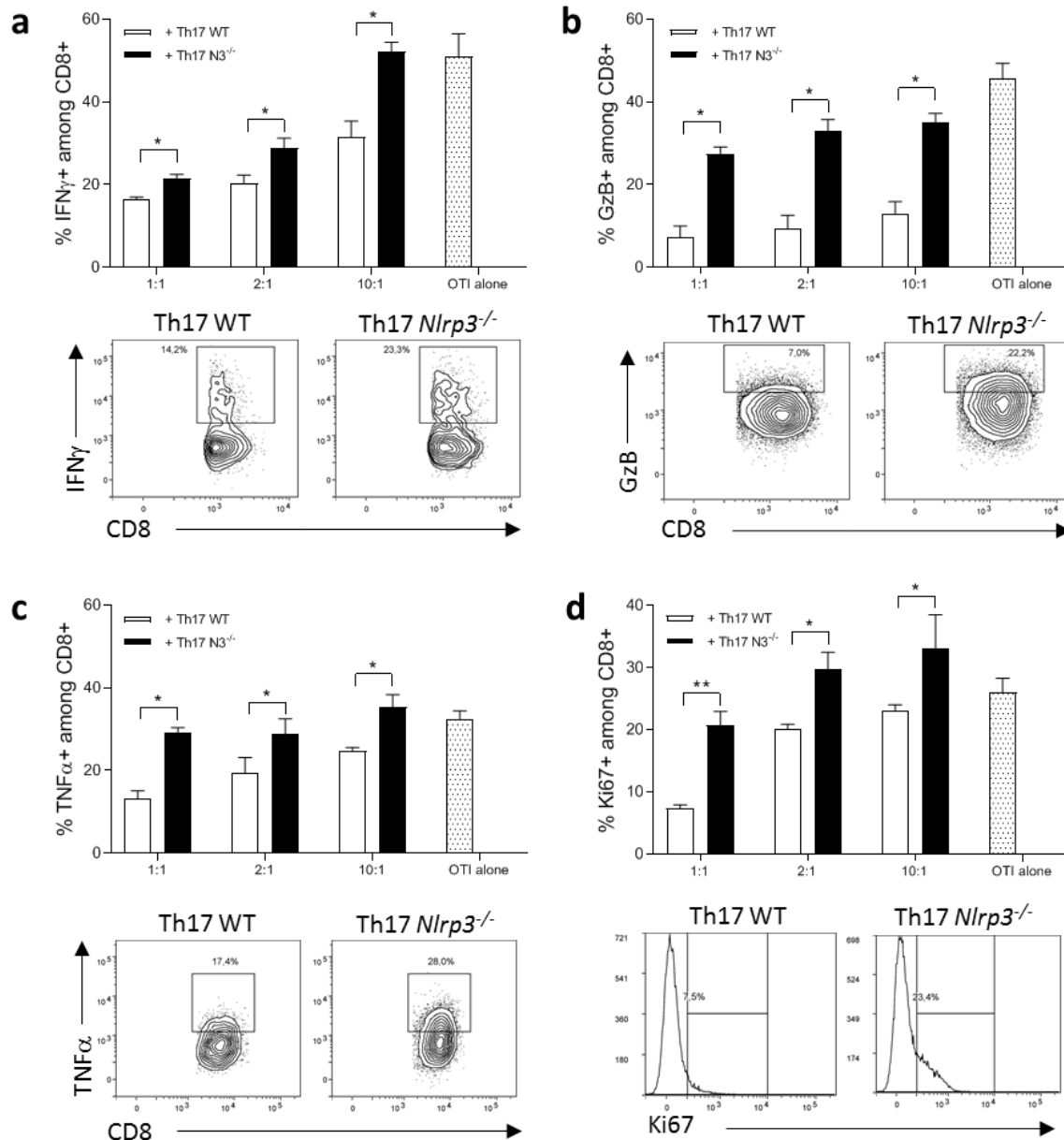


Figure 33 : Les Th17 *Nlrp3*^{-/-} sont moins immunosuppresseurs. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris WT ou *Nlrp3*^{-/-} et différenciés en Th17r durant 72h. Des lymphocytes T CD8⁺ ont été isolés de souris OT-I et cultivés seuls ou avec des Th17r WT ou *Nlrp3*^{-/-} durant 48h selon un ratio T CD8⁺:Th17r croissant (1:1 ; 2:1 ; 10:1). L'expression **a.** d'IFN γ , **b.** de Granzyme B, **c.** de TNF α et **d.** de Ki67 ont été analysées par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 3 expériences. Différence significative en test U de Mann-Whitney, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Résultats

Afin de tester si les Th17r *Nlrp3*^{-/-} modulent l'activité des lymphocytes T CD8⁺, nous avons isolé des lymphocytes T CD8⁺ TILs de souris CD4_{wt}xNLRP3^{flox} et CD4_{cre}xNLRP3^{flox} porteuses de tumeurs B16-F10. Les lymphocytes T CD8⁺ ont ensuite été mis en co-culture avec des cellules B16-F10 durant 24h. Nous avons ainsi pu montrer que les lymphocytes T CD8⁺ issus des souris CD4_{cre}NLRP3^{flox} sont plus cytotoxiques envers les cellules B16-F10, induisant plus de mort cellulaire (**Figure 34**).

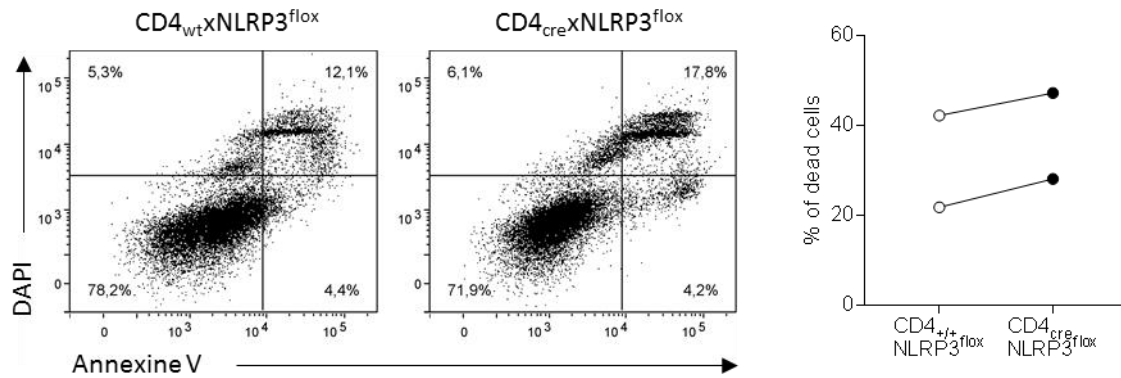


Figure 34 : Les lymphocytes T CD8⁺ TILs de souris CD4_{cre}xNLRP3^{flox} sont plus cytotoxiques. Des lymphocytes T CD8⁺ ont été isolés de tumeurs B16-F10 de souris CD4_{wt}xNLRP3^{flox} et CD4_{cre}xNLRP3^{flox} puis co-cultivés avec des cellules B16-F10 durant 24h. Les cellules ont été récoltées et le taux de mortalité des cellules a été évalué par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 2 expériences.

IV. La déficience en NLRP3 inhibe la plasticité Th17 vers T_{Reg}

Compte tenu du changement de phénotype des Th17, lié à l'expression de NLRP3, nous avons cherché à déterminer si leur plasticité pouvait être altérée par la déficience en NLRP3, et plus particulièrement, si cette déficience pouvait avoir un impact sur la capacité des Th17r à transdifférencier en T_{Reg}.

L'analyse des populations de lymphocytes T CD4⁺ TILs de tumeurs B16-F10 (**Figure 15**) et LLC1 (**Figure 35**) de souris CD4_{cre}xNLRP3^{flox} et leurs contrôles par cytométrie en flux, a en effet montré que la fréquence des CD4⁺ FOXP3^{hi} identifiés comme des T_{Reg} diminue dans des souris CD4_{cre}xNLRP3^{flox}. Nous n'avons cependant pas observé d'impact de la déficience en NLRP3 sur des T_{Reg} différenciés *in vitro* (**Figure 17**).

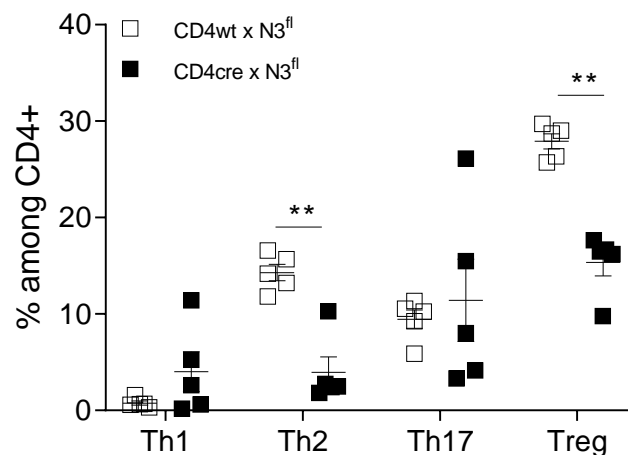


Figure 35 : Caractérisation des populations de lymphocytes T CD4⁺ TILs issus de tumeurs LLC1. Les tumeurs LLC1 de souris CD4_{wt}xNLRP3^{flox} et CD4_{cre}xNLRP3^{flox} ont été prélevées et dissociées. Les cellules CD4⁺ triées ont été analysées par cytométrie en flux afin de caractériser les populations CD4⁺ Th1 (CXCR3⁺), Th2 (CCR4⁺), Th17 (CCR6⁺) et T_{Reg} (CD25^{hi} FOXP3^{hi}). Résultats représentatifs de 2 expériences avec 5 souris par groupe. Différence significative en test U de Mann-Whitney, ** p < 0,01.

C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer si cette diminution pouvait être due à une modification de la plasticité des Th17 et de leur capacité à se transdifférencier vers un phénotype T_{Reg}. Nous avons pour cela différencié des lymphocytes T CD4⁺ naïfs de souris CD4_{wt}xNLRP3^{flox} et CD4_{cre}xNLRP3^{flox} en Th17r durant trois jours et l'expression de FOXP3 a été analysée par cytométrie en flux. Les résultats indiquent que les cellules Th17 WT expriment significativement plus de FOXP3 que les Th17 *Nlrp3*^{-/-} après 72h de différenciation (**Figure 36**).

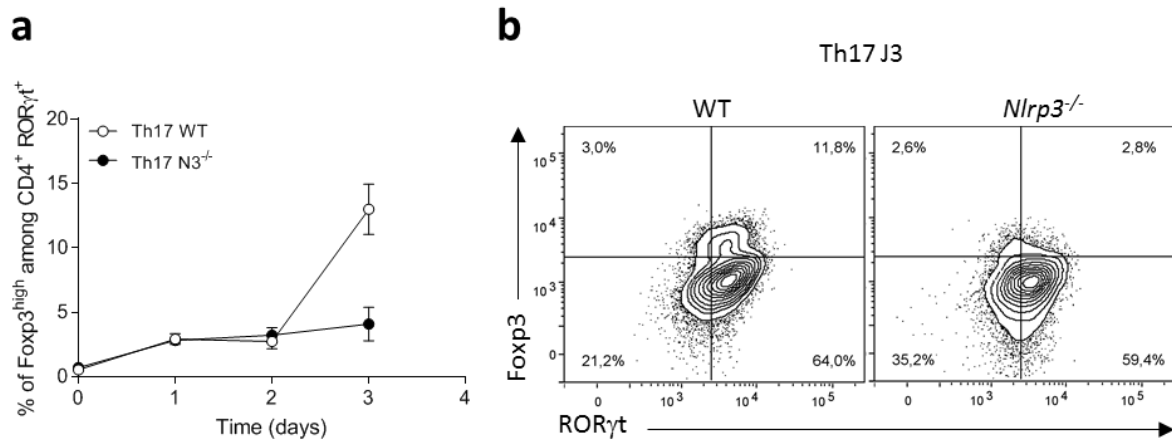


Figure 36 : La déficience en NLRP3 diminue l'expression de FOXP3 dans les Th17. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris CD4^{wt}NLRP3^{fllox} ou CD4^{cre}NLRP3^{fllox} et différenciés *in vitro* durant 24h, 48h, et 72h. **a.** & **b.** L'expression de FOXP3 a été analysée par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 3 expériences.

Compte tenu de ces résultats, nous avons cherché à savoir si les Th17 WT se transdiffénciaient dans des modèles *in vivo* et si les Th17 *Nlrp3*^{-/-} subissaient toujours cette éventuelle transdifférenciation. Nous avons pour cela utilisé des modèles de transfert de lymphocytes T CD4⁺ OT-II et OT-IIx*Nlrp3*^{-/-} exprimant l'allèle CD45.2, que nous avons différenciés en Th17 *in vitro* puis injectés à des souris WT exprimant l'allèle CD45.1 et porteuses de tumeurs B16-F10_{OVA} au niveau pulmonaire. Cette utilisation des modèles congéniques nous a permis de suivre le devenir des Th17 une fois transférés grâce à l'expression de l'allèle CD45.2. Les résultats indiquent que si les Th17 WT transférés semblent pour partie conserver une expression plus forte de FOXP3^{hi} *in vivo* dès le deuxième jour après transfert, ce n'est pas le cas des Th17 *Nlrp3*^{-/-} (**Figure 37**). En revanche, aucune modification sur l'infiltrat des T_{Reg} de la souris hôte n'a été observé, comme l'indique la proportion de cellules CD45⁺ CD45.2⁻ FOXP3^{hi} (**Figure 37**).

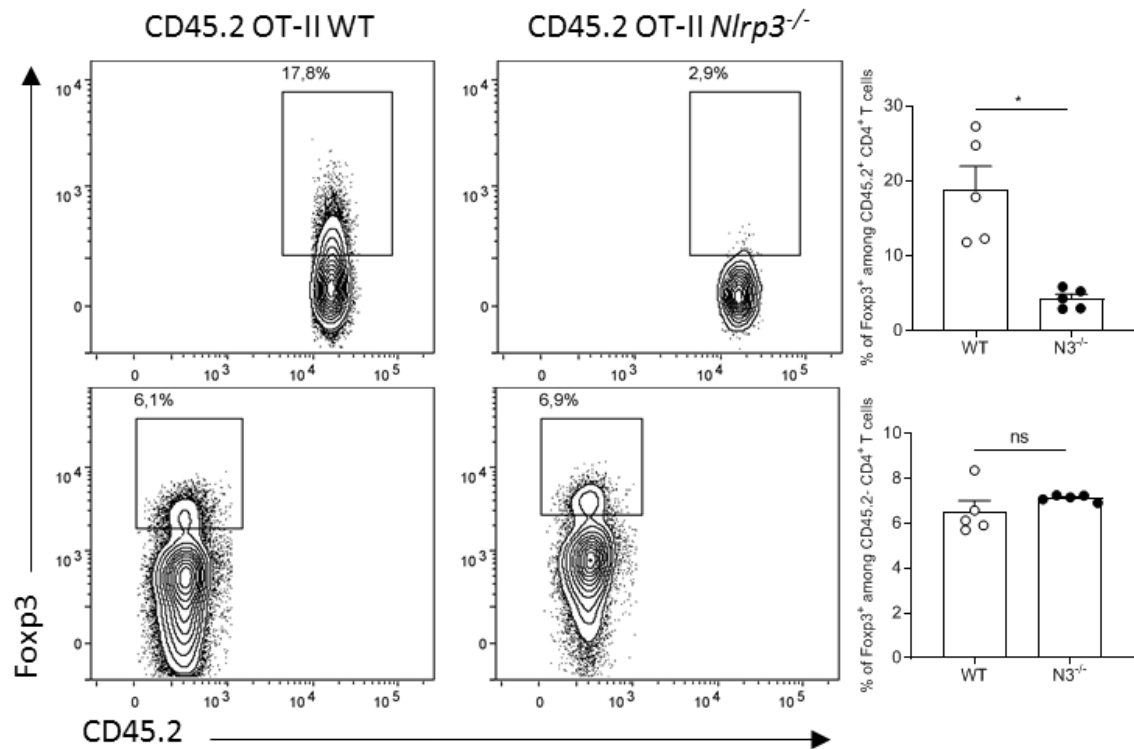


Figure 37 : La déficience en NLRP3 abroge la transdifférenciation des Th17 dans les poumons. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris OT-II WT ou OT-II Nlrp3^{-/-} et différenciés in vitro durant 72h. Les cellules ont été injectées à des souris exprimant l'allèle CD45.1 et porteuses de tumeurs B16-F10 pulmonaires. Les poumons ont été prélevés 48h après transfert et dissociés, et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 2 expériences avec 5 souris par groupe. Différence significative en test U de Mann-Withney, ns non significatif ; * p < 0,05.

Des différences similaires ont également été observées dans les ganglions drainants et la rate (**Figure 38**).

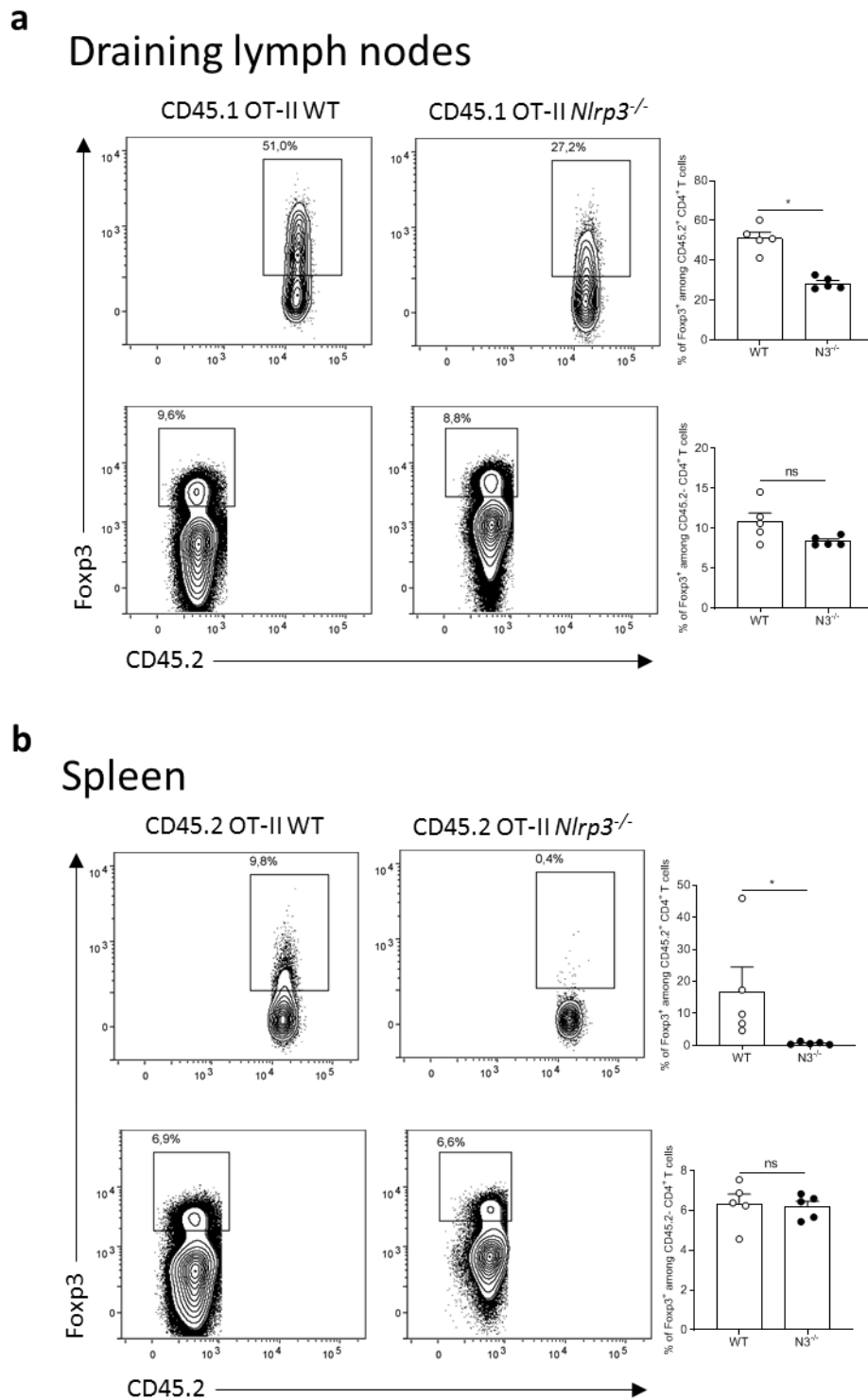


Figure 38 : La déficience en NLRP3 abroge la transdifférenciation des Th17 dans les DLN et la rate. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris OT-II WT ou OT-II *Nlrp3*^{-/-} et différenciés in vitro durant 72h. Les cellules ont été injectées à des souris exprimant l'allèle CD45.1 et porteuses de tumeurs B16-F10 pulmonaires. Les poumons ont été prélevés 48h après transfert et dissociés, et les cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Résultats représentatifs de 2 expériences avec 5 souris par groupe. Différence significative en test U de Mann-Whitney, ns non significatif ; * $p < 0,05$.

Résultats

Enfin, nous avons utilisé un anticorps anti-CD25 *in vivo* afin de dépléter les T_{Reg} durant des croissances tumorales B16-F10 dans des souris $CD4_{wt} \times NLRP3^{fllox}$ et $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$. Chez les souris $CD4_{wt} \times NLRP3^{fllox}$, l'utilisation de l'anti-CD25 provoque un ralentissement drastique de la croissance tumorale (**Figure 39, a**), tandis que les bénéfices du traitement sont beaucoup moins marqués chez les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$ (**Figure 39, b**).

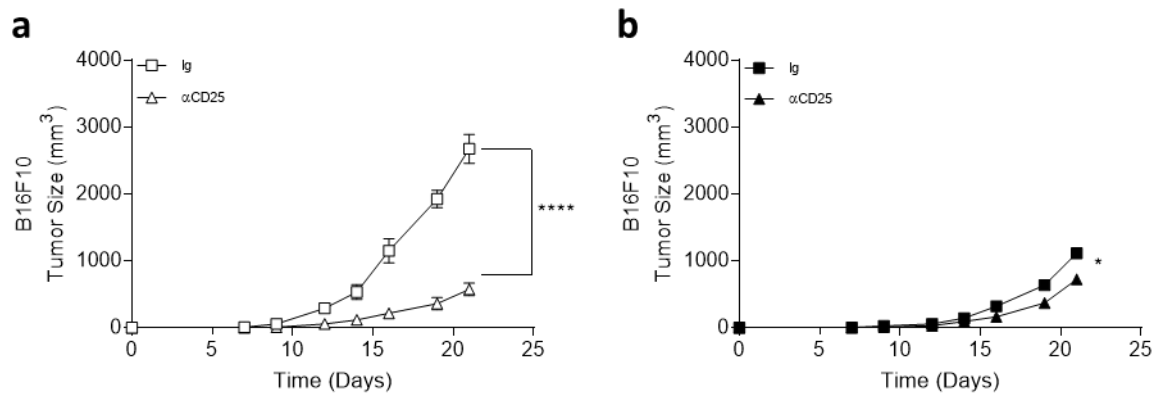


Figure 39 : La déplétion T_{Reg} ralentit peu la croissance de tumeurs chez des souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$. Des cellules tumorales B16-F10 ont été injectées en sous cutanée à des souris **a.** $CD4_{wt} \times NLRP3^{fllox}$ ou **b.** $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$ avec ou sans traitement anti-CD25. La croissance a été mesurée et la moyenne de l'évolution de la taille des tumeurs de chaque groupe a été représentée au cours du temps. Résultats représentatifs de 2 expériences avec 5 souris par groupe. Différence significative en test de comparaison multiple de Sidak. * $p < 0,05$; **** $p < 0.001$.

V. Des fonctions de NLRP3 indépendantes de l'inflammasome sont impliquées dans la régulation des Th17

Etant donné l'impact de NLRP3 sur le profil transcriptionnel et les fonctions des Th17, nous avons cherché à évaluer de quelle manière NLRP3 prenait part à la modulation de ces fonctions au sein des Th17.

La protéine NLRP3 est impliquée avec ASC et Caspase-1 dans la formation d'un inflammasome. Il a été montré que cet inflammasome pouvait participer à la différenciation des lymphocytes T CD4⁺, c'est pourquoi nous avons évalué la capacité de production d'IL-1 β et d'IL-18 des Th17 dans nos conditions de différenciation, en présence d'activateurs de l'inflammasome NLRP3 (LPS+ATP). Nos résultats indiquent que l'inflammasome ne semble pas fonctionnel, les cellules ne produisant pas de quantités détectables d'IL-1 β ou d'IL-18 (**Figure 40, a**). Nous avons également mesuré la production d'IFN γ par les Th17 différenciés en présence d'un inhibiteur de l'inflammasome NLRP3 (MCC950) ou d'un antagoniste de l'IL-1R (Anakinra). De manière surprenante, là où des Th17 *Nlrp3*^{-/-} sécrètent plus d'IFN γ , aucune de ces inhibitions n'a permis d'induire la production d'IFN γ par les Th17 WT. Nous avons également cherché à déterminer si l'inhibition des Caspases (Z-VAD) ou celle de la Caspase-8 (Z-IETD) pouvaient être à l'origine de la sécrétion d'IFN γ . Mais là encore les résultats indiquent qu'aucun de ces deux n'inhibiteurs n'induit la sécrétion d'IFN γ par les Th17 WT (**Figure 40, b**). En accord avec ces résultats, ni la déficience pour ASC, ni pour la Caspase-1, l'IL-1 β ou l'IL-18 n'induisent la sécrétion d'IFN γ par les Th17 différenciés *in vitro* (**Figure 40, c**).

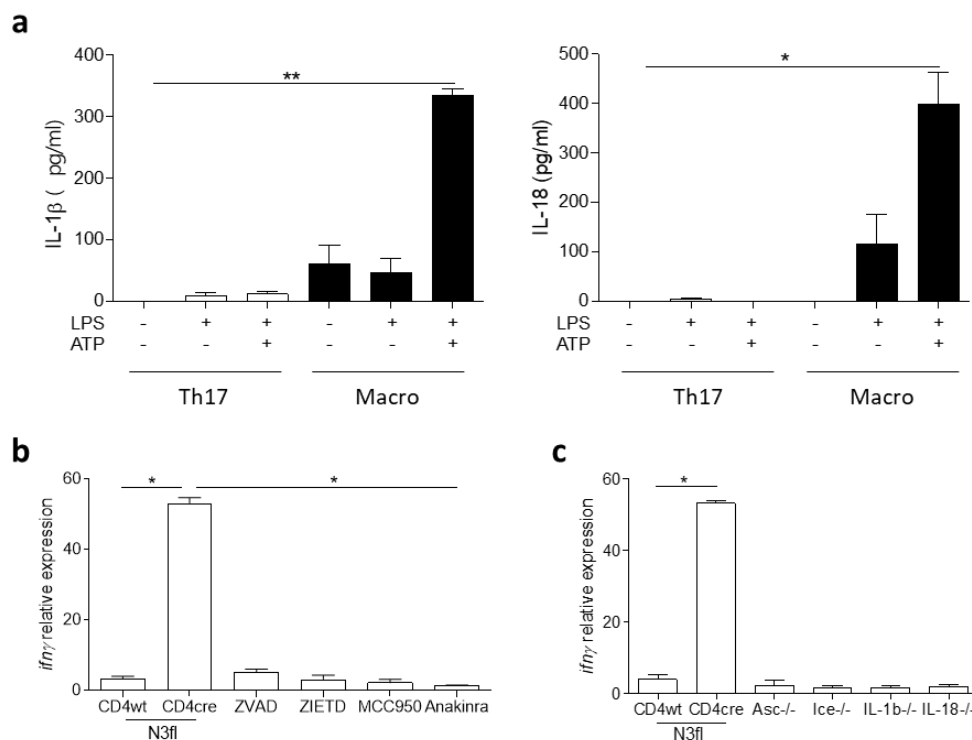


Figure 40 : NLRP3 possède des fonctions indépendantes de l'inflammasome dans les Th17. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés et différenciés *in vitro* en Th17, **a.** en présence de LPS et d'ATP et la production d'IL-1 β et d'IL-18 ont été dosées par ELISA ou **b.** en présence de Z-VAD, Z-IETD, MCC950 ou Anakinra et la production d'IFN γ a été dosée par ELISA. **c.** Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs WT ou déficients pour un des constituants de l'inflammasome ont été isolés et différenciés *in vitro* en Th17, puis la production d'IFN γ a été dosée par ELISA. Résultats représentatifs de 3 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, ns non significatif ; * p < 0,05 ; ** p < 0.01.

Résultats

Notre équipe ayant démontré que NLRP3 transloquait dans le noyau des Th2³⁹, une analyse par microscopie à immunofluorescence nous a permis d'observer que NLRP3 semble avoir une localisation ubiquitaire dans les Th17 (**Figure 41, a**). Dans les cellules Th2, NLRP3 s'associe à IRF4 afin d'induire l'expression d'IL-4 via des fonctions de régulation de la transcription d'*Il4*. Nous avons donc cherché à déterminer si cette interaction existait également dans les Th17 grâce à une expérience de Proximity Ligation Assay (PLA). Les résultats confirment l'existence de cette interaction dans les Th17 (**Figure 41, b**).

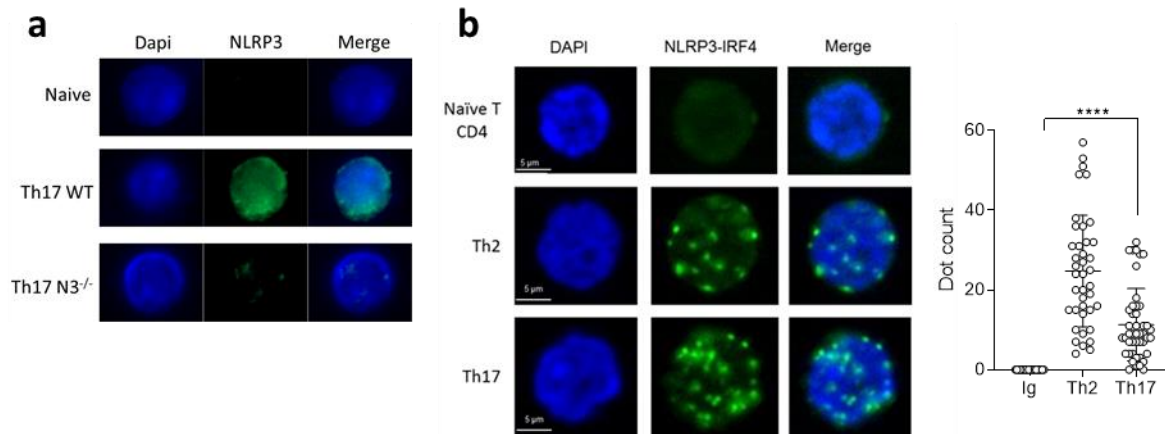


Figure 41 : NLRP3 transloque dans le noyau et interagit avec IRF4 dans les Th17. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés et différenciés *in vitro* en Th17r durant 24h. Les cellules ont été analysées par microscopie à immunofluorescence avec **a.** un anticorps ciblant NLRP3 (vert) et **b.** une expérience de Proximity Ligation Assay avec un anticorps ciblant NLRP3 et un anticorps ciblant IRF4 révélant la proximité entre ces deux protéines (vert). Résultats représentatifs de 3 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney. **** $p < 0,001$.

Nous avons également testé l'effet d'un petit ARN interférant (siRNA) anti IRF4 sur l'expression du gène *Ifng* dans les Th17. Les résultats indiquent que le siRNA IRF4 ne promeut pas l'induction de la transcription du gène *Ifng* dans les Th17 (**Figure 42**).

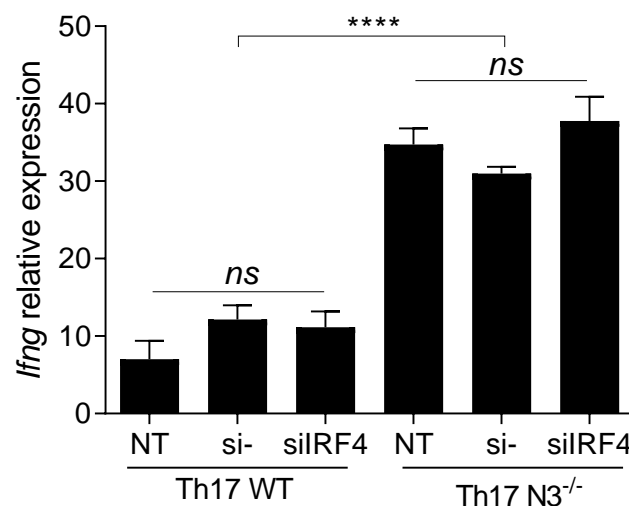


Figure 42 : L'inhibition d'IRF4 n'impact pas l'expression du gène *Ifng*. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs WT ou *Nlrp3*^{-/-} ont été isolés et prétraités 1h avec un siRNA IRF4 puis différenciés *in vitro* en Th17 durant 24h. L'expression du gène *Ifng* a été mesurée par RTq-PCR. Résultats représentatifs de 3 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney. ns non significatif ; **** $p < 0,001$.

Résultats

Dans les lymphocytes T CD4⁺, l'expression du gène *Ifng* est induite par un certain nombre de facteurs, dont les plus impactant sont T-bet, IRF1 ou encore Eomes. Nous avons donc comparé la cinétique d'expression du gène *Ifng* et de ces trois facteurs de transcription entre des Th17 WT et des Th17 *Nlrp3*^{-/-}. Les résultats indiquent que l'augmentation de l'expression de *Ifng* est plus précoce que celle de *Tbx21* (codant pour T-bet), de *Irf1* ou de *Eomes* (**Figure 43, a, b, c, d**). Ceci impliquant une régulation rapide par un autre facteur, nous avons comparé l'activation de STAT1 par phosphorylation dans les Th17, mais aucune différence n'a été observée entre les Th17 WT et *Nlrp3*^{-/-} (**Figure 43, e**).

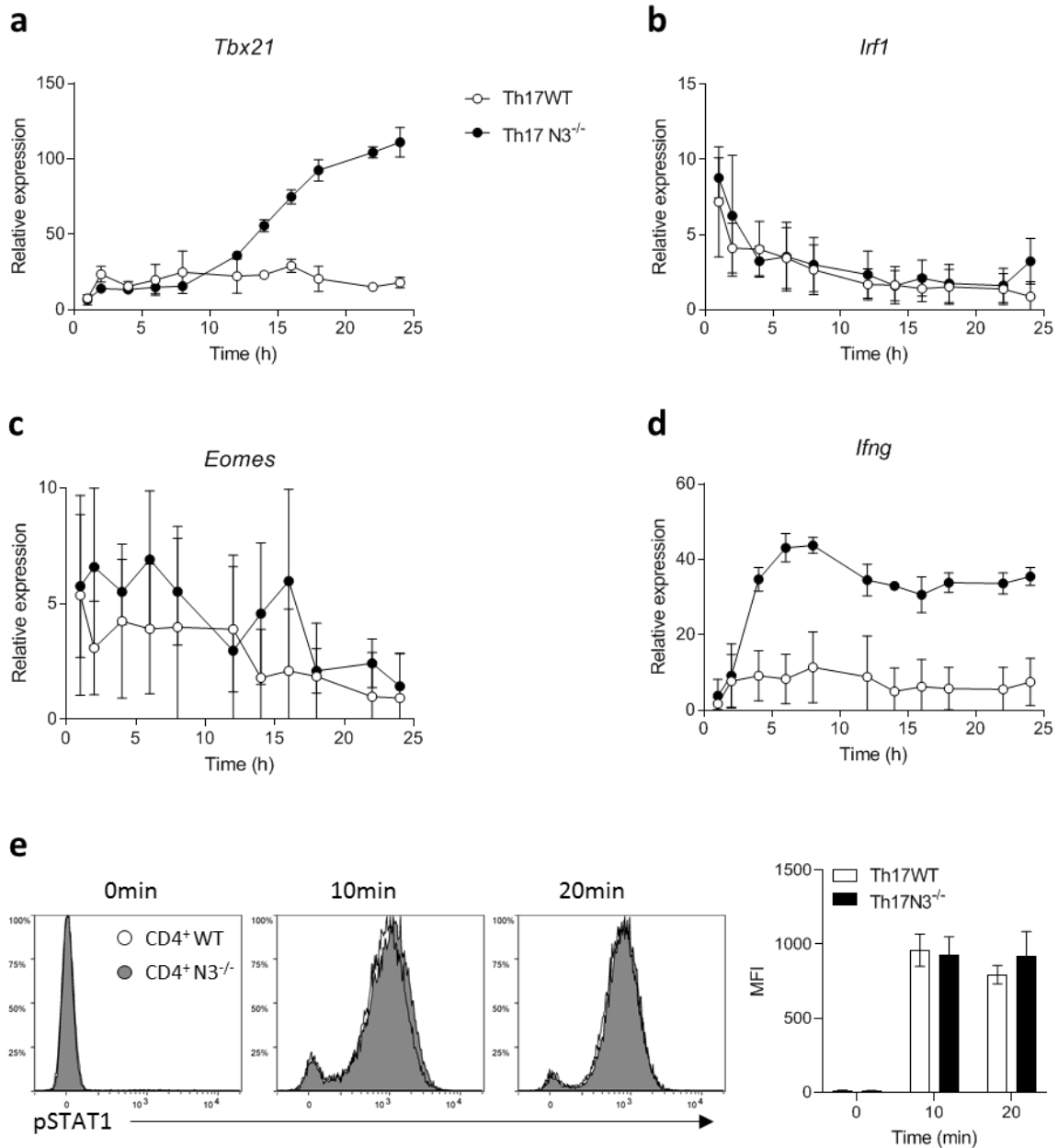


Figure 43 : L'augmentation de l'expression de l'*Ifng* dans les Th17 ne dépend pas de T-bet, EOMES, IRF1 ou pSTAT1. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} et différenciés en Th17r. Les cellules ont été récupérées à différents temps et l'expression des gènes **a.** *Tbx21* **b.** *Irf1* **c.** *Eomes* **d.** *Ifng* par RT-qPCR. **e.** Les cellules ont été différenciées et la présence de la protéine pSTAT1 dans les cellules a été mesurée par cytométrie en flux aux temps indiqués. Résultats représentatifs de 3 expériences.

Résultats

Les Th17 étant différenciés en présence de TGF- β , NLRP3 pourrait jouer un rôle dans sa voie de signalisation au sein des Th17, d'autant qu'il est connu que cette cytokine inhibe les fonctions effectrices des cellules immunitaires et par conséquent la production de cytokines inflammatoires³⁵⁷. Afin de déterminer si la signalisation médiée par NLRP3 dans les Th17 est liée à la voie de signalisation du TGF- β , nous avons dans un premier temps utilisé des inhibiteurs pharmacologiques bloquant différentes voies de signalisation en aval du récepteur au TGF- β . Les résultats indiquent que seul l'inhibiteur de SMAD3 induit l'expression d'*Ifng* dans les Th17r WT (**Figure 44, a**) sans pour autant impacter son expression dans les Th17r *Nlrp3*^{-/-} (**Figure 44, b**). Lorsque le TGF- β se lie à son récepteur, il induit l'activation de SMAD3 par phosphorylation. Nous avons pu déterminer par microscopie à immunofluorescence que la phosphorylation de SMAD3 était abolie dans les Th17r *Nlrp3*^{-/-} (**Figure 44, c**), bien que la protéine en elle-même y soit exprimée de manière équivalente aux Th17r WT (**Figure 44, d**).

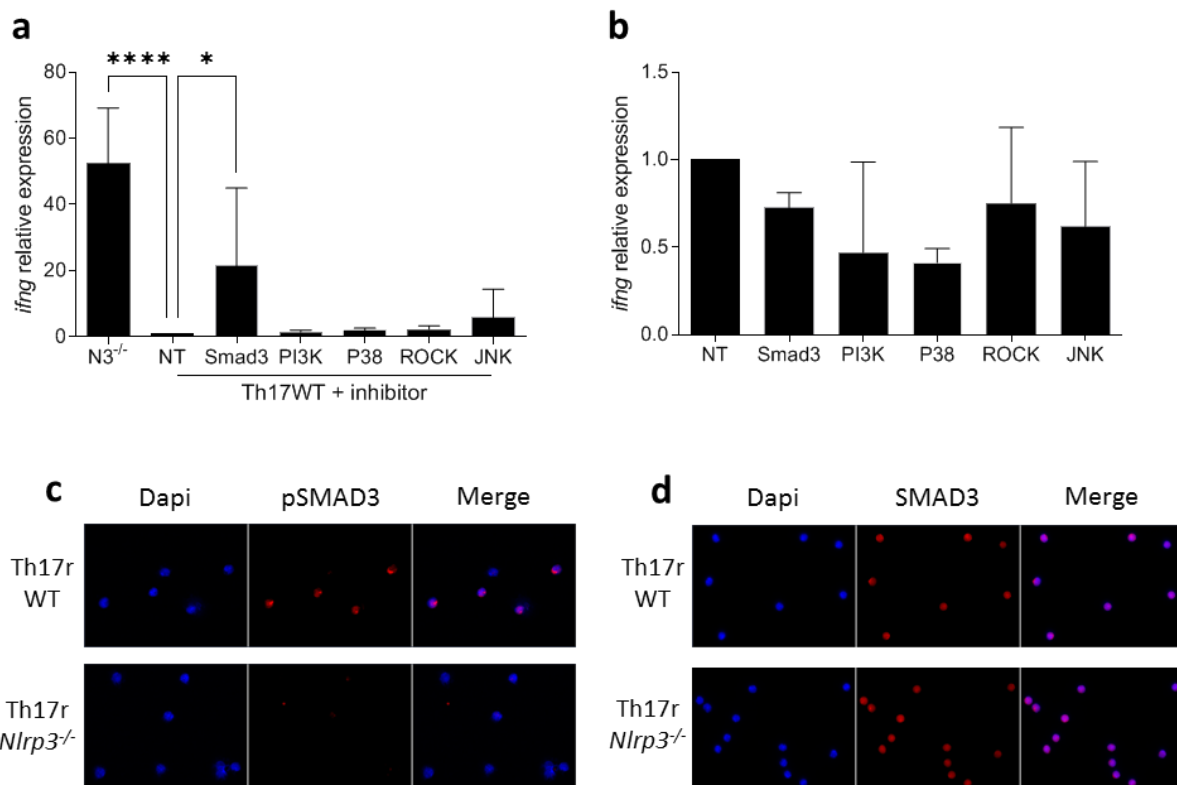


Figure 44 : pSMAD3 est impliquée dans la signalisation médiée par NLRP3. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} et différenciés en Th17r. **a.** & **b.** Différents inhibiteurs de voies de signalisation du TGF- β ont été utilisés pour traiter les lymphocytes T CD4⁺ naïfs avant différenciation et l'expression de l'*Ifng* a été mesurée par RT-qPCR après 24h de différenciation. Les lymphocytes T CD4⁺ ont été analysés par microscopie à immunofluorescence avec des anticorps ciblant **c.** pSMAD3 ou **d.** SMAD3 après 1h de différenciation. Résultats représentatifs de 3 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney. * $p < 0,05$; **** $p < 0,001$.

Dans le but de déterminer si NLRP3 est capable d'interagir avec SMAD3 afin de participer à sa phosphorylation, nous avons réalisé une expérience de PLA. Les données que nous avons obtenues indiquent que ces deux protéines n'interagissent pas directement l'une avec l'autre (**Figure 45, a**), c'est pourquoi nous avons cherché à déterminer par PLA si NLRP3 pouvait interagir avec le récepteur au TGF- β (TGBR) et les données obtenues ont indiqués que les protéines sont co-localisées (**Figure 45, b**).

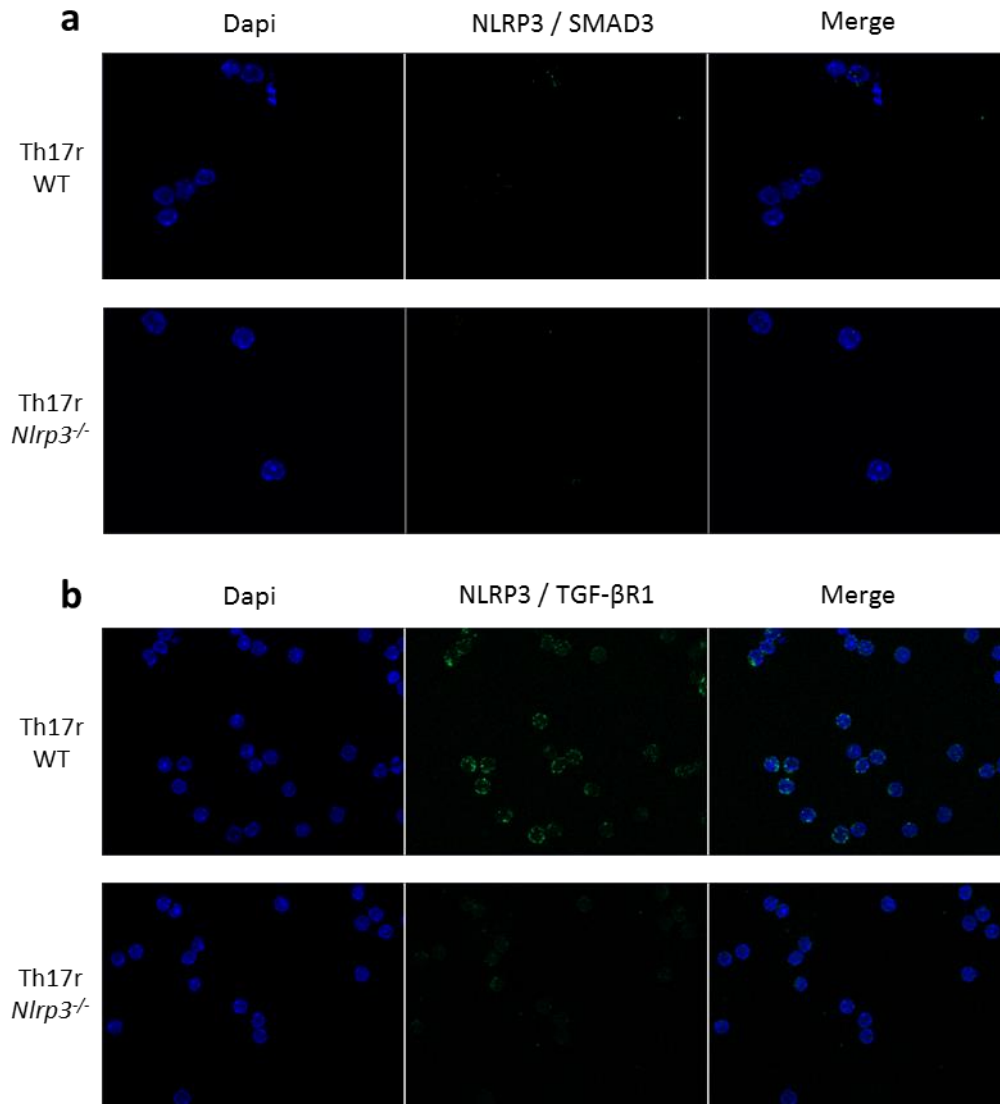


Figure 45 : NLRP3 est co-localisé avec le TGFBR1. Des lymphocytes $T CD4^+$ naïfs ont été isolés de souris WT et $Nlrp3^{-/-}$ et différenciés en Th17r durant 1h. Les cellules ont été analysées par microscopie à immunofluorescence après une PLA avec un anticorps ciblant NLRP3 et **a.** un anticorps ciblant SMAD3 ou **b.** un anticorps ciblant TGFBR1. Résultats représentatifs de 2 expériences.

Afin de valider que SMAD3 est capable d'inhiber la transcription de *l'Ifng*, nous avons réalisé une analyse du promoteur du gène à l'aide de MatInspector et nous avons identifié un site putatif d'interaction de pSMAD3 de -561 à -551 paires de bases du promoteur de *l'Ifng*. Des expériences de CHIP-PCR sur pSMAD3 dans des Th17 WT et $Nlrp3^{-/-}$ ont révélé un enrichissement de la précipitation du promoteur de *l'Ifng* dans les Th17 WT, absent des Th17r $Nlrp3^{-/-}$ (**Figure 46**).

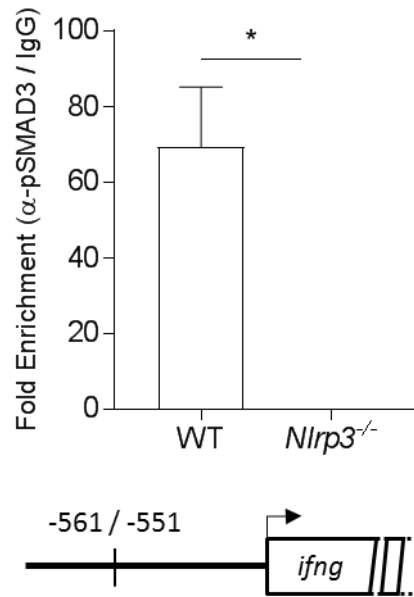


Figure 46 : pSMAD3 interagit avec le promoteur de l'*Ifng*. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} et différenciés en Th17r durant 1h. La chromatine des cellules a été isolée, fragmentée puis une partie a été précipitée avec un anticorps anti-pSMAD3 ou IgG. La chromatine précipitée a ensuite été analysée par RT-qPCR avec un couple d'amorces ciblant une région du promoteur de l'*Ifng*. Résultats représentatifs de 2 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, * $p < 0,05$.

D'autres gènes codant pour des cytokines voient leur expression régulée à la hausse dans les Th17 *Nlrp3*^{-/-}, c'est le cas des gènes *Gzmb*, *Tnf*, *Csf2* et *Il21*, qui codent respectivement pour le Granzyme B, le TNF α , le GM-CSF et l'IL-21. Or, il est connu que l'IFN γ est associé à l'expression de ces cytokines³⁵⁸⁻³⁶¹. Afin de déterminer si l'expression des gènes codant pour ces cytokines par les Th17r *Nlrp3*^{-/-} est dépendante de leur production d'IFN γ ou directement lié à la déficience en NLRP3 et l'absence de SMAD3, nous avons en premier lieu évalué l'effet l'IFN γ sur des Th17r WT. Les résultats indiquent que seule la transcription du *Gzmb* semble être induite par l'IFN γ présent dans le milieu des cellules (**Figure 47, e**), ce que nous avons confirmé en traitant des Th17r *Nlrp3*^{-/-} avec un anticorps bloquant l'IFN γ (**Figure 47, f**). A l'inverse, l'expression d'*Il21*, *Csf2* et *Tnf* semble dépendre d'un facteur différent lié à la déficience en NLRP3 (**Figure 47, a-d, g, h**).

Résultats

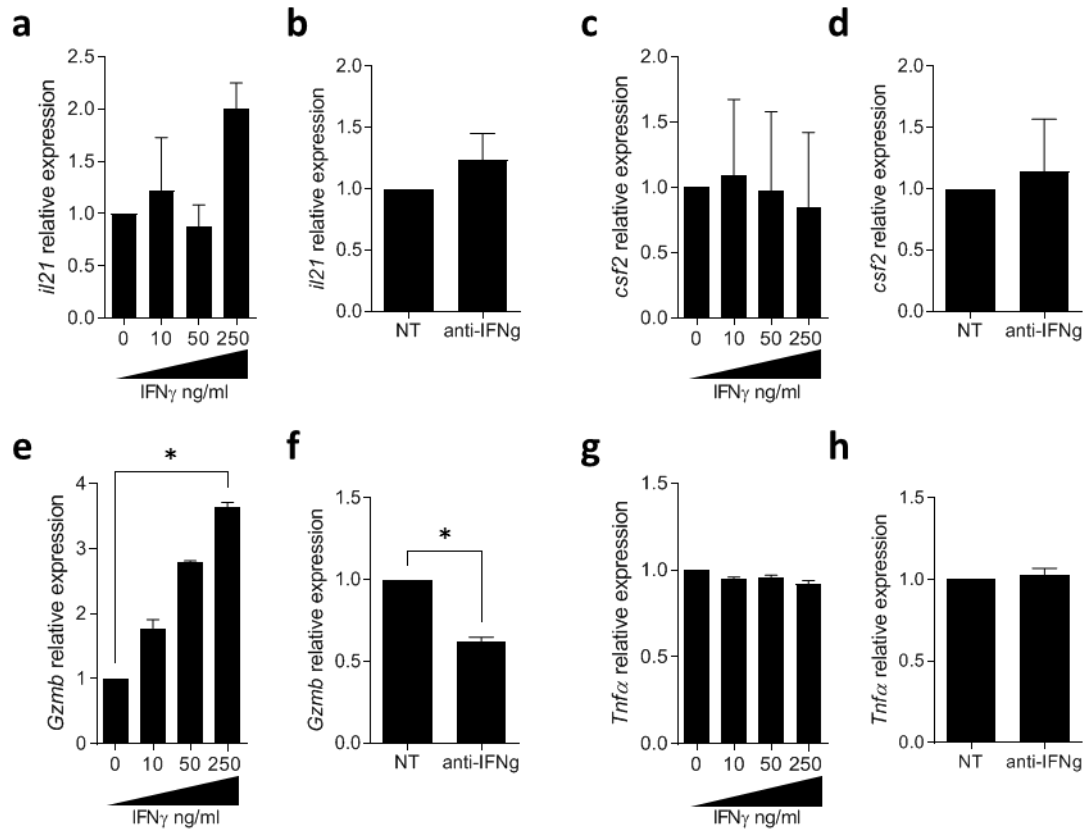


Figure 47 : L'expression de *Gzmb* est dépendante de l'IFN γ . a., c., e., h. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris WT et différenciés en Th17r durant 24h en présence de quantités croissantes d'IFN γ . b., d., e., g. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris *Nlrp3*^{-/-} et différenciés en Th17r durant 24h en présence d'anti-IFN γ (10 μ g/mL). L'expression des gènes a., b. *Il21*, c., d. *Csf2*, e., f. *Gzmb*, g., h. *Tnf* ont été analysées par RT-qPCR. Résultats représentatifs de 3 expériences. Différences significatives en test U de Mann-Withney ; * $p < 0,05$

Afin de déterminer si l'axe NLRP3/pSMAD3 est également responsable de la modulation de l'expression de *Csf2*, *Tnfa* et *Il21*, nous avons analysé les promoteurs de ces gènes via MatInspector et identifié des sites potentiels de fixation en amont du site d'initiation de la transcription, de -792 à -782 pb pour *Csf2*, -323 à -313 pb pour *Tnfa* et -1650 à -1640 pb pour *Il21*. Des expériences de CHIP sur pSMAD3 dans des Th17 WT et *Nlrp3*^{-/-} ont révélé que pSMAD3 interagit bien avec le promoteur de *Csf2* (Figure 48, a) dans les Th17r WT, interaction significativement réduite en l'absence de NLRP3.

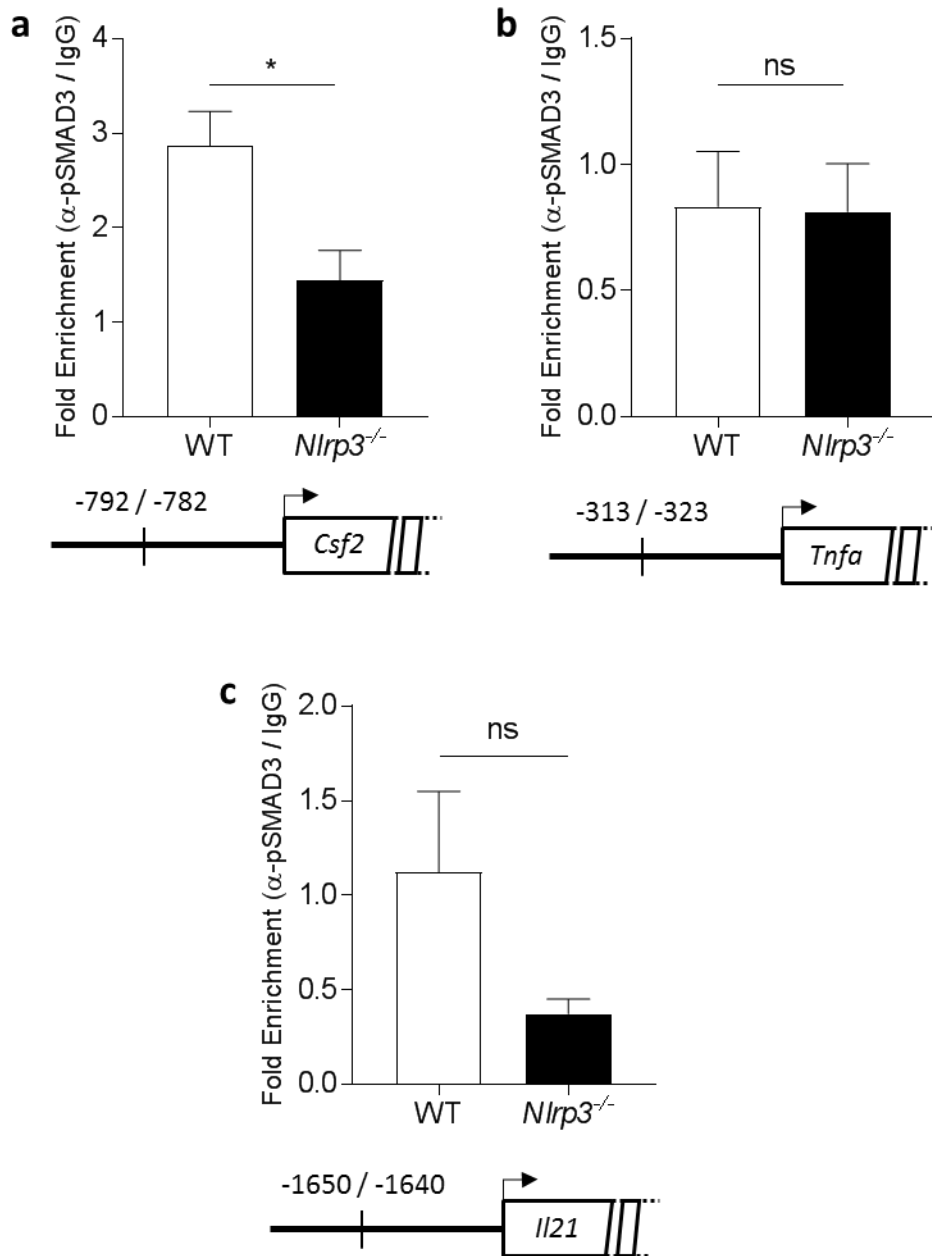


Figure 48 : pSMAD3 interagit avec le promoteur de *Csf2* mais pas de *Tnfa* et *Il21*. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs ont été isolés de souris WT et *Nlrp3*^{-/-} et différenciés en Th17r durant 1h. La chromatine des cellules a été isolée et fragmentée, puis une partie a été précipitée avec un anticorps anti-pSMAD3 ou IgG. La chromatine précipitée a ensuite été analysée par RT-qPCR avec un couple d'amorces ciblant une région des promoteurs de **a.** *Csf2*, **b.** *Tnfa*, **c.** *Il21*. Résultats représentatifs de 2 expériences. Différence significative en test U de Mann-Withney, ns : non significatif, * $p < 0,05$.

VI. Les Th17 $Nlrp3^{-/-}$ sont efficaces en thérapie cellulaire

Dans cette dernière partie, nous avons cherché à évaluer si les modifications apportées par la déficience en NLRP3 sur les Th17 pouvaient avoir un impact sur la croissance tumorale en utilisant les Th17 $Nlrp3^{-/-}$ en thérapie cellulaire.

La différenciation de Th17r en présence d'IL-6 et de TGF- β génère des cellules qui ne présentent habituellement pas de fonctions anti-tumorales, mais le profil sécrétoire des Th17r $Nlrp3^{-/-}$ indique qu'ils pourraient être dotés de telles propriétés. En utilisant une expérience de transfert adoptif de lymphocytes T $CD4^+$ OT-II, nous avons pu observer que le nombre de foyer tumoraux pulmonaires de cellules B16-F10_{OVA} était réduit chez des souris ayant reçu un transfert de Th17r OT-II $Nlrp3^{-/-}$, alors que les Th17 OT-II WT restent sans effet particulier (**Figure 49, a**).

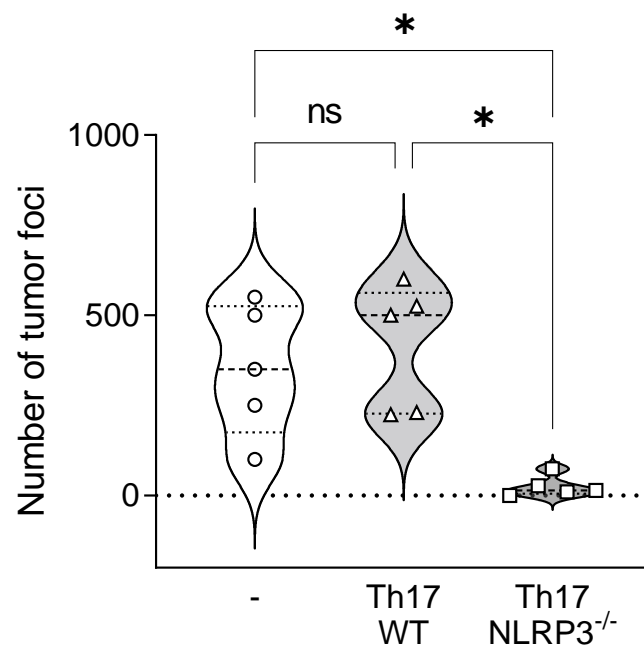


Figure 49 : Les Th17r $Nlrp3^{-/-}$ réduisent le nombre de foci tumoraux pulmonaires. Des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs OT-II WT ou OT-II $Nlrp3^{-/-}$ ont été isolés et différenciés en Th17r durant 72h. Les Th17r ont été injectés en intraveineuse (IV) avec 3×10^6 cellules B16-F10_{OVA} à des souris WT. Les poumons des souris ont été prélevés 12 jours après injection et anonymisés, et les foci tumoraux pulmonaires ont été comptés. Résultats représentatifs de 2 expériences avec 5 souris par groupe. Différence significative en test Kruskal-Wallis. ns : non significatif ; * $p < 0,05$.

Nos données indiquent que les Th17 $Nlrp3^{-/-}$ sont moins sujets à la transdifférenciation en T_{Reg} que les Th17 WT, en accord avec la différence en infiltrat T_{Reg} observé chez les souris $CD4_{cre} \times NLRP3^{fllox}$. Nous avons analysé ce dernier dans les modèles de transfert adoptif et confirmé que l'infiltrat T_{Reg} y est également diminué dans les souris transférées avec des Th17 $Nlrp3^{-/-}$ (**Figure 50**)

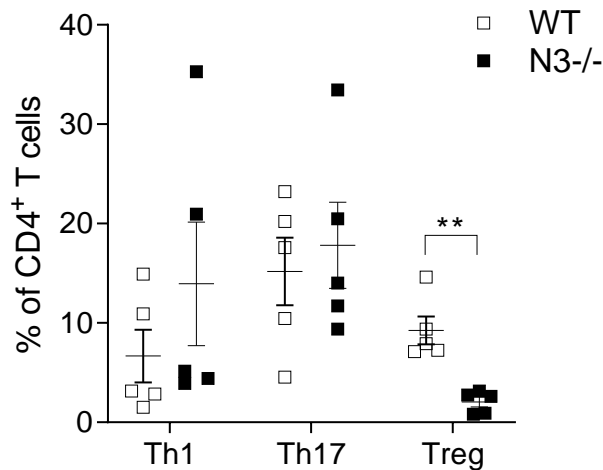


Figure 50 : L'infiltrat T_{Reg} est diminué lorsque les Th17 sont déficients pour NLRP3. Des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs OT-II WT ou OT-II $Nlrp3^{-/-}$ ont été isolés et différenciés en Th17r durant 72h. Les Th17r ont été injectés en IV avec 3×10^6 cellules B16-F10_{OVA} à des souris WT. Les poumons des souris ont été prélevés 12 jours après injection et les infiltrats immunitaires de populations Th1, Th17 et T_{Reg} ont été analysés par cytométrie en flux.

Nos données indiquant une transdifférenciation réduite dans les Th17 $Nlrp3^{-/-}$ et une diminution de l'infiltrat T_{Reg} , nous avons évalué l'effet d'un anti-CD25 chez des souris porteuses de tumeurs B16-F10_{OVA} pulmonaires après transfert adoptif de Th17r OT-II. Les données indiquent que l'anti-CD25 n'a pas d'effet dans les souris ayant reçu un transfert de Th17r OT-II $Nlrp3^{-/-}$ (Figure 51).

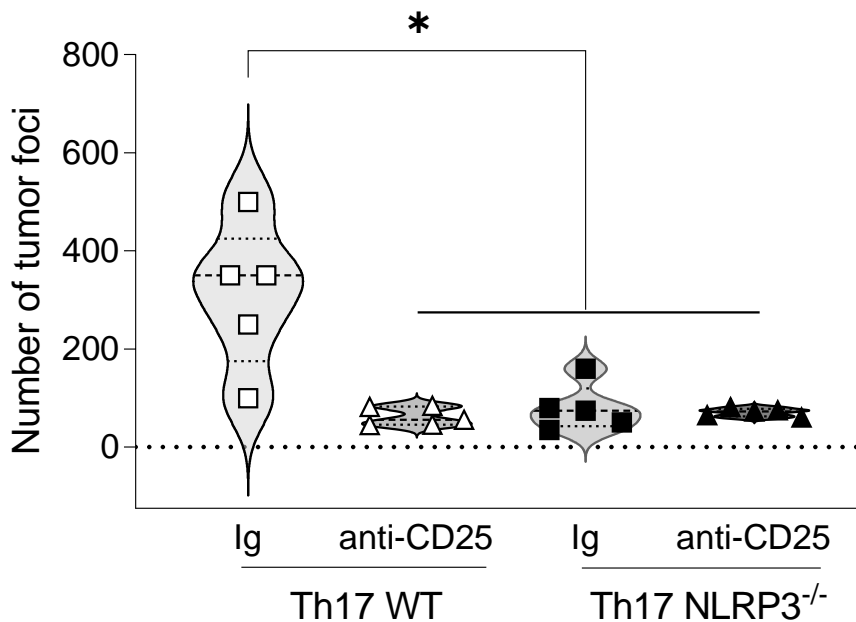


Figure 51 : Les T_{Reg} sont responsables de l'immunosuppression médiée par les Th17. Des lymphocytes T $CD4^+$ naïfs isolés de souris OT-II WT ou OT-II $Nlrp3^{-/-}$ ont été différenciés en Th17r durant 72h. Les Th17r ont été injectés en IV avec 3×10^6 cellules B16-F10_{OVA} à des souris WT, traitées ou non avec un anticorps anti-CD25. Les poumons des souris ont été prélevés 12 jours après injection et anonymisés, et les foci tumoraux pulmonaires ont été comptés. Résultats représentatifs d'une expérience avec 5 souris par groupe. Différence significative en test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$.

Résultats

Nous avons précédemment démontré que les cellules Th17 déficientes pour NLRP3 perdent leur capacité à inhiber les fonctions des lymphocytes T CD8⁺. C'est pourquoi nous avons cherché à déterminer si ces cellules avaient un rôle à jouer dans l'effet anti-tumoral médié par le transfert adoptif de Th17 *Nlrp3*^{-/-} aux souris. Nous avons donc utilisé un anticorps bloquant anti-CD8a afin de dépléter les lymphocytes T CD8⁺ chez des souris porteuses de tumeurs pulmonaires B16-F10_{OVA} après un transfert adoptif de Th17r OT-II. Les données indiquent que la déplétion des lymphocytes T CD8⁺ abroge l'effet anti-tumoral médié par les Th17r OT-II *Nlrp3*^{-/-} sans avoir d'impact sur le développement de foci tumoraux chez des souris ayant reçu un transfert de Th17r OT-II WT ou sans transfert (**Figure 52**).

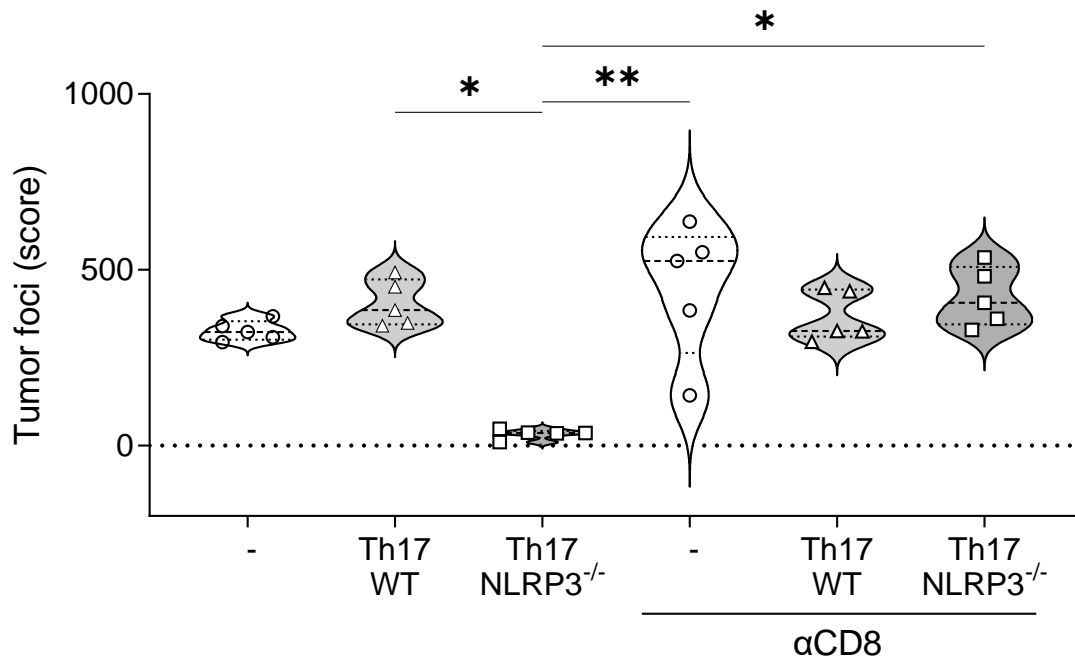


Figure 52 : Les lymphocytes T CD8⁺ sont responsables de l'effet anti-tumoral médié par les Th17r *Nlrp3*^{-/-}. Des lymphocytes T CD4⁺ naïfs isolés de souris OT-II WT ou OT-II *Nlrp3*^{-/-} ont été différenciés en Th17r durant 72h. Les Th17r ont été injectés en IV avec 3x10⁶ cellules B16-F10_{OVA} à des souris WT, traitées ou non avec un anticorps anti-CD8a. Les poumons des souris ont été prélevés 12 jours après injection et anonymisés et les foci tumoraux pulmonaires ont été comptés. Résultats représentatifs d'une expérience avec 5 souris par groupe. Différence significative en test Kruskal-Wallis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Discussion

Discussion

Ce travail nous a permis de démontrer que NLRP3 joue un rôle crucial dans la stabilisation du phénotype régulateur des Th17. Son inhibition dans les lymphocytes T CD4⁺ permet de diminuer la croissance tumorale dans des modèles de tumeurs B16-F10 et LLC1, par des fonctions indépendantes de l'inflammasome et de la sécrétion d'IL-1 β ou d'IL-18. Nous avons montré que cet effet est associé à une production accrue d'IFN γ par les Th17 ainsi qu'une diminution de la proportion de T_{Reg} infiltrants les tumeurs. Nous avons également démontré que la diminution de la croissance tumorale dans les souris CD4_{cre}XNLRP3^{flox} est bien dépendante des Th17 *Nlrp3*^{-/-}.

Plusieurs études ont précédemment montré que NLRP3 pouvait jouer un rôle majeur dans la polarisation de certaines cellules immunitaires, indépendamment de ses fonctions au sein de l'inflammasome^{335,336,341}, qui plus est dans des cellules CD4⁺ (Th2 et T_{Reg})^{39,334}. En parallèle, l'une de ces études a montré que l'augmentation de l'activité de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺, indépendamment de ses fonctions au sein de l'inflammasome, pouvait diminuer la sévérité de l'EAE induite chez des souris, et la proportion de lymphocytes T CD4⁺ sécréteurs d'IFN γ et d'IL-17 dans le CNS, tout comme elle altère l'expression de l'IFN γ et de T-bet dans des Th1 différenciés *in vitro*³³⁹. Nos résultats viennent quant à eux appuyer ces premières observations en démontrant que l'absence de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺ améliore la réponse immunitaire antitumorale. Ceci par le biais d'une augmentation de la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ et une modification de la réponse des Th17 dans ce contexte, en association avec une diminution de la proportion de Th2 et de T_{Reg} infiltrants les tumeurs. Si les Th2 peuvent être partiellement responsables de cet effet antitumoral lié à la déficience en NLRP3, l'inhibition des Th17 dans les modèles de croissance révèle qu'il est surtout dépendant des Th17. Nos données montrent en effet que l'absence de Th17 dans des souris WT aboutit à une réduction de la croissance tumorale comparable à celle observée dans les souris CD4_{cre}XNLRP3^{flox}, mais surtout, que l'inhibition des Th17 à l'aide de Digoxine dans ces souris déficientes pour NLRP3 aggrave la rapidité de la croissance tumorale. Nos résultats indiquent également que ces effets ne semblent pas liés à des fonctions de NLRP3 qui seraient associées à la sécrétion d'IL-1 β ou d'IL-18 ni à l'inflammasome, mais plutôt à un effet indépendant de l'inflammasome, lié à l'augmentation de la sécrétion d'IFN γ par les lymphocytes T CD4⁺ et plus particulièrement les Th17. Contrairement à Su-Ho Park et son équipe, qui démontrent que NLRP3 régule négativement les T_{Reg}³³⁴, nous n'avons pas observé d'impact direct de NLRP3 sur les T_{Reg}, et leur diminution dans les tumeurs de souris CD4_{cre}XNLRP3^{flox} entrerait plutôt en contradiction avec leurs découvertes. Il serait néanmoins intéressant d'analyser le potentiel immunosuppresseur des T_{Reg} encore présents dans les tumeurs. Toutefois, nous avons également montré que la déplétion en T_{Reg} dans les souris CD4_{cre}XNLRP3^{flox} n'améliore que très peu l'effet antitumoral déjà dû à la déficience en NLRP3, ce qui exclut dans ce contexte un contre effet des T_{Reg} qui gagneraient en fonction, et suggère que la modification des Th17 y joue un rôle plus important.

Nos données suggèrent donc que les Th17 sont effectivement responsables d'un effet antitumoral, lié à la sécrétion d'IFN γ , lorsque NLRP3 y est déficiente. De manière cohérente, nous avons montré par une analyse de séquençage ARN que la déficience en NLRP3 altère effectivement la différenciation Th17r et conduit les Th17 à exprimer un profil transcriptionnel plus proche d'un profil de Th17 inflammatoire, précédemment décrits et nommés « pathogéniques » dans le contexte de l'EAE^{239,240}. Nous avons montré que les Th17 *Nlrp3*^{-/-} surexpriment en conséquence les cytokines inflammatoires Granzyme B et TNF α en plus de l'IFN γ . Mais nos données montrent que NLRP3 n'est cependant pas indispensable à la différenciation des Th17 et que son activité n'influence pas de manière significative l'expression ou la fonction de certains marqueurs clés, comme les ectonucléotidases CD39 et CD73 ou le récepteur aux chemokines CXCR3. NLRP3 ne semble également pas liée à des changements métaboliques tels que le taux de glycolyse, connu pour être associé aux capacités effectrices des

Discussion

lymphocytes T CD4⁺ 340. L'activité de NLRP3 module cependant la polarisation des Th17, ce qui la place dans la liste des facteurs modulateurs du profil transcriptionnel et du phénotype de ces cellules.

Des études précédentes suggèrent que les fonctions antitumorales des Th17i reposent entre autres sur leurs capacités à stimuler l'immunité médiée par les cellules NK, les lymphocytes T CD8⁺ et les macrophages^{279,292,296}. Nos données indiquent que les fonctions antitumorales imputées aux Th17r *Nlrp3*^{-/-} dans les modèles B16-F10 sont liées à la réponse des lymphocytes T CD8⁺. En effet l'administration d'un inhibiteur des lymphocytes T CD8⁺ a pour effet d'abolir le ralentissement de la croissance tumorale chez les souris CD4_{cre}xNLRP3^{flox}. A l'inverse l'administration d'un inhibiteur des macrophages reste sans effet sur la croissance, aussi bien chez les souris WT que CD4_{cre}xNLRP3^{flox}, tandis que l'inhibition des cellules NK augmente la croissance tumorale indépendamment de la déficience en NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺. De plus, l'analyse des lymphocytes T CD8⁺ infiltrants les tumeurs a montré que ceux-ci sécrètent plus d'IFN γ et de Granzyme B chez les souris CD4_{cre}xNLRP3^{flox}. Les lymphocytes T CD4⁺ *Nlrp3*^{-/-} favorisent donc une réponse immunitaire antitumorale médiée par les lymphocytes T CD8⁺. Une étude précédente réalisée dans l'équipe avait déjà mis en évidence les capacités des Th17 à inhiber la fonction des lymphocytes T CD8⁺ par le biais des ectonucléotidases⁵¹, mais nous avons montré ici que NLRP3 ne semble pas impacter la fonction de ces dernières. Les Th17r *Nlrp3*^{-/-} produisent plus d'IFN γ dont il a déjà été suggéré qu'il pouvait directement stimuler les lymphocytes T CD8⁺³⁶². Ils produisent également plus de GM-CSF, qui pourrait indirectement stimuler les lymphocytes T CD8⁺ via l'activation de cellules dendritiques³⁶³, et plus de TNF α qui semble être important pour stimuler, via le TNFR2, l'activation, la prolifération et le recrutement des lymphocytes T spécifiques de la tumeur³⁶⁴. Des expériences sont donc en cours au laboratoire afin de mettre en évidence un potentiel effet de l'une de ces cytokines sur les lymphocytes T CD8⁺. Cet effet pourrait être le responsable de la réponse anti-tumorale observée via l'axe Th17 *Nlrp3*^{-/-} / T CD8⁺.

Ces effets constatés *in vivo* et *in vitro* sur les lymphocytes T CD8⁺ sont cohérents avec l'altération partielle du profil Th17r observée en séquençage ARN. En outre, des études ont déjà démontré que les Th17 peuvent changer de phénotype pour se transdifférencier en T_{Reg} en présence de TGF- β ^{97,252}. Ces cellules sont notamment caractérisées par des niveaux d'expression élevés de FOXP3. Nos données suggèrent que les Th17 *Nlrp3*^{-/-} sont beaucoup moins sujets à cette transdifférenciation, en limitant leur expression de FOXP3 au cours du temps *in vitro*. Nous avons également montré, grâce à des modèles de transfert adoptif que les Th17 *Nlrp3*^{-/-} conservent cette propriété *in vivo* et que la déplétion de T_{Reg} dans les souris n'améliore pas l'effet antitumoral lié à la déficience en NLRP3. Ceci vient renforcer l'idée que l'effet des T_{Reg} eux-mêmes semble relativement peu important, et que ce sont les Th17 transdifférenciés en T_{Reg} qui sont responsables de la majorité des effets pro-tumoraux inhibés en présence d'anti-CD25.

L'expression du gène *Foxp3* semble toutefois suivre une cinétique relativement tardive par rapport à l'expression du gène *Ifng*, dont nous avons montré une augmentation de la transcription dès 4h de différenciation. La régulation du gène *Ifng* est sujette à un nombre important d'études, qui ont montré qu'il est régulé à plusieurs niveaux au sein de différentes cellules. Cette régulation peut avoir lieu au niveau épigénétique¹²⁶, comme sous l'influence de facteurs de transcription activateurs, les plus connus étant probablement T-bet³⁶⁵ et Eomes³⁶⁶. Nos données ont démontré que dans le cas des Th17 *Nlrp3*^{-/-} la surexpression du gène *Ifng* n'était pas dépendante d'une surexpression de T-bet ou d'Eomes, ni d'une augmentation du taux de phosphorylation de STAT1, un inducteur de T-bet. Nos données suggèrent au contraire que la surexpression de *Tbx21*, codant pour T-bet, est consécutive à celle de l'*Ifng*, en accord avec des données déjà publiées dans le contexte de l'EAE. Ces études indiquent que la production d'IFN γ par les Th17 pathogénique y est indépendante de T-bet. Nous avons également

Discussion

montré que la déficience en NLRP3 n'entraîne pas d'augmentation de la transcription d'*Irf1*, qui pourrait entrer en compétition avec d'autres IRFs et déstabiliser précocement la différenciation Th17. La production accrue d'IFN γ par les Th17r *Nlrp3*^{-/-} ne semble donc pas dépendante de phénomènes activateurs.

En parallèle, d'autres voies régulent l'expression du gène *Ifng* mais de manière négative, notamment via des facteurs de transcription répresseurs. L'interaction entre NLRP3 et IRF4, confère au complexe la capacité d'agir comme un facteur de transcription, capable d'induire l'expression d'*Ii4*^{329,335}. En outre, une étude a montré que IRF4 est indispensable au maintien d'un phénotype non-pathogénique des Th17²³³, et sa dégradation entraîne une levée de l'inhibition du profil transcriptionnel et des fonctions Th17 pathogéniques. Cela suggère que IRF4 pourrait agir comme un facteur réprimant le profil inflammatoire des Th17. En outre, une autre étude a mis en évidence dans les macrophages que la formation du complexe NLRP3-IRF4 prévient la dégradation de IRF4 et permet la polarisation M2³³⁶. Nous avons donc émis l'hypothèse que le complexe NLRP3-IRF4 pouvait également se former dans les Th17, et favoriser le maintien de IRF4 afin de réprimer l'expression du gène *Ifng*. De manière cohérente, nos données ont confirmé que NLRP3 est capable d'interagir avec IRF4 et de transloquer dans le noyau des Th17. Cependant, l'inhibition de IRF4 par siRNA dans des Th17 WT a échoué à lever l'inhibition exercée sur la transcription de *Ifng*, infirmant l'hypothèse d'une régulation par IRF4. En parallèle, parmi les voies de régulation de l'expression de l'IFN γ , la voie TGF- β / R-Smad est connue pour sa capacité à en réprimer l'expression, notamment via l'activité de Smad3³⁶⁷. Mais de manière plus intéressante encore, des études dans des cellules épithéliales ont également montré que NLRP3 intervient dans cette voie, et semble nécessaire à la phosphorylation de Smad3, participant ainsi à l'induction de la fibrose^{329,353}. Nous avons donc émis l'hypothèse que NLRP3 pouvait participer à réprimer l'expression de l'IFN γ dans les Th17 par le biais de pSMAD3. Nous avons montré que Smad3 est rapidement phosphorylée lors de la différenciation Th17, mais également que la déficience en NLRP3 entraîne l'absence de phosphorylation de Smad3 dans ces cellules, bien que la protéine y soit présente. De plus pSMAD3 est capable d'interagir avec le promoteur des gènes *Ifng* et *Csf2*. Ceci vient donc appuyer les données pointant vers une fonction indispensable de NLRP3, qui interviendrait entre le récepteur au TGF- β et pSmad3. L'absence de NLRP3 empêchant la phosphorylation de SMAD3, pourrait lever l'inhibition potentiellement exercée par pSMAD3 sur la transcription des gènes *Ifng* et *Csf2*. Il est possible que ce mécanisme implique également une absence d'inhibition et de compétition avec STAT4³⁶⁷, et qu'il entraîne ensuite une boucle de rétrocontrôle positive de l'IFN γ sur l'expression de T-bet²⁶, venant déstabiliser progressivement le phénotype Th17r au profit d'un phénotype Th17i dans les Th17r *Nlrp3*^{-/-}.

Nos données viennent en outre préciser le mécanisme, qui semble être dépendant d'une potentielle interaction entre NLRP3 et le récepteur au TGF- β , néanmoins d'autres expérimentations sont nécessaires afin d'élucider complètement le mécanisme. De plus, au regard des découvertes déjà faites sur le rôle du complexe NLRP3-IRF4 dans les Th2 et les macrophages, il serait intéressant d'évaluer dans quelle mesure cette voie peut avoir un impact sur la transcription de certains gènes clés dans la modification du phénotype Th17. Cependant, ces données semblent entrer en contradiction avec l'absence d'effets sur les T_{reg} *Nlrp3*^{-/-}, dont la différenciation est également induite par la voie du TGF- β . Mais d'autres études ont déjà démontré que si Smad3 est requis pour une différenciation T_{Reg} optimale, son absence n'empêche pas l'expression de FOXP3 par les lymphocytes T CD4⁺ et la présence de iT_{Reg} chez des souris *Smad3*^{-/-}. Smad2 permet notamment de maintenir une signalisation suffisante pour la différenciation T_{Reg}³⁶⁸, ce qui supposerait que l'interaction de NLRP3 avec le TGF- β RI ne soit essentielle que pour l'activation de Smad3. Des expériences visant à évaluer la phosphorylation de Smad2 dans les lymphocytes T CD4⁺ *Nlrp3*^{-/-} seraient donc intéressantes dans ce contexte et permettraient également de préciser encore le mécanisme impliquant NLRP3 dans la voie TGF- β / R-

Discussion

Smad. En outre, il est également possible que l'absence de NLRP3 inhibe pSmad2 et pSmad3, mais elle ne semble pas impacter les autres voies induites par le TGF- β , et il a déjà été démontré que l'inhibition simultanée de Smad2 et Smad3 n'empêche pas la différenciation T_{reg}³⁶⁹. Ceci suggère que les voies de signalisation du TGF- β indépendante de R-Smad sont suffisantes pour la différenciation T_{reg} et indépendantes de l'interaction entre le TGF β RI et NLRP3. Cela suggère également que l'inhibition de l'interaction TGF β RI-NLRP3 est à l'inverse suffisante pour empêcher la transdifférenciation T_{Reg} par un double effet ; en altérant la voie TGF- β / R-Smad et en induisant la production de cytokines pro-inflammatoires exerçant une boucle de rétrocontrôle négative sur la transdifférenciation T_{Reg}.

En effet, au vu de l'augmentation de la sécrétion de l'IFN γ , consécutive à l'absence de pSMAD3, et les potentiels effets de rétrocontrôles positifs de celui-ci sur l'orientation du phénotype Th17i, bloquer la signalisation autocrine et paracrine de l'IFN γ pourrait inhiber cette polarisation. Et nos données montrent en effet que l'IFN γ présent en grandes quantités promeut la transcription de *GzmB* par les Th17, et l'inhibition de la signalisation par l'IFN γ diminue à l'inverse la transcription de *GzmB* dans les Th17r *Nlrp3*^{-/-}. Cependant, l'IFN γ ne semble pas impacter la transcription de *Il21*, *Csf2* ou *Tnf* à 24h. Ceci suggère que la signalisation autocrine par l'IFN γ dans les Th17r *Nlrp3*^{-/-} pourrait également renforcer la fragilisation du phénotype régulateur des Th17r et participer à empêcher leur transdifférenciation en T_{Reg}, mais que toutes les modifications phénotypiques observées n'en sont probablement pas dépendantes. Nos données sont toutefois cohérentes avec des données qui ont déjà montré que l'IFN γ participe à la conversion des Th17 en Th17 inflammatoire³⁷⁰, ce qui suggère qu'un mécanisme similaire pourrait avoir lieu de manière autocrine en l'absence de NLRP3.

Toutes ces caractéristiques font des Th17 *Nlrp3*^{-/-} des candidats potentiels à la thérapie cellulaire. Et nous avons pu confirmer par des transferts adoptifs que les Th17 *Nlrp3*^{-/-} sont bel et bien efficaces en thérapie cellulaire, permettant de diminuer le nombre de *foci* tumoraux qui se développent sur les poumons de souris WT porteuses de tumeurs B16-F10_{OVA}. Nous avons également montré, en accord avec les données précédemment obtenues, que la déplétion en lymphocytes T CD8⁺ abolit cet effet, confirmant que le bénéfice thérapeutique obtenu par le transfert adoptif de Th17 *Nlrp3*^{-/-} est dépendant de la mobilisation des lymphocytes T CD8⁺.

Ensemble, nos résultats mettent en évidence un nouveau rôle de la protéine NLRP3 dans la modulation du phénotype Th17, via la voie TGF- β / R-smad, qui permet de maintenir l'inhibition de la production d'IFN γ et de GM-CSF par les Th17, de stabiliser le phénotype Th17r dans le temps et de prédisposer les cellules à la transdifférenciation des Th17 en T_{Reg}. Ces données démontrent également le bénéfice thérapeutique de l'inhibition spécifique de NLRP3 dans les lymphocytes T CD4⁺, qui induit une réduction de l'immunosuppression exercée par les Th17. La sécrétion de cytokines inflammatoires par les Th17 déficients pour NLRP3 permet une augmentation de la réponse antitumorale dépendante des lymphocytes T CD8⁺ et une réduction de la croissance tumorale. Nos résultats suggèrent également fortement que NLRP3 est au cœur de la régulation de la différenciation des Th17, par le biais d'un jeu complexe d'activation et de maintien des fonctions de protéines aussi diverses que Smad3 et IRF4, et la régulation des boucles de rétrocontrôle consécutives qui permettent une modulation fine des fonctions des Th17.

Des points restent cependant à éclaircir ou à confirmer et nous travaillons encore à étoffer notre compréhension des mécanismes mis en jeu. En premier lieu, nous ne savons pas pour l'heure si des modifications post-traductionnelles de NLRP3 jouent un rôle dans la régulation de son activité au sein des Th17. Ensuite, comme évoqué précédemment, des expériences sont en cours afin de déterminer par quelles cytokines les Th17 *Nlrp3*^{-/-} permettent de stimuler la réponse des lymphocytes T CD8⁺. Nous travaillons également à étoffer nos données concernant les modèles de transfert adoptif, dans lesquels nous souhaiterions mieux caractériser l'impact des transferts sur les lymphocytes T CD8⁺ des souris

Discussion

hôte, ainsi que suivre l'évolution au cours du temps des Th17 une fois injectés. Ces expériences ont malheureusement été retardées par des difficultés techniques liées à la crise du Covid, qui aura eu un impact non négligeable et relativement long dans le temps sur les élevages de nos modèles de souris. C'est pourquoi ces expériences seront faites prochainement afin de pouvoir soumettre ces découvertes à publication dans une revue scientifique.

Les données obtenues durant ce travail permettent également de mettre en avant un nouvel axe en tant que cible thérapeutique dans le cancer. Inhiber la signalisation du TGF- β en tant que traitement contre le cancer est une stratégie qui a déjà été envisagée, mais qui se heurte cependant à des effets secondaires pouvant aller de la fatigue aux thrombocytopénies en passant par des démangeaisons et lésions cutanées ou encore des saignements gingivaux³⁷¹. Ces effets secondaires rendent l'inhibition de la signalisation du TGF- β complexe et nécessitent un dosage des traitements qui permette une balance bénéfiques/risques favorable. De nouvelles stratégies sont toutefois à l'étude afin de rendre le traitement ciblé, l'une d'elles consiste en un piège au TGF- β fusionné à un anticorps anti-CD4 non-immunosuppresseur, permettant ainsi de capturer le TGF- β autour des lymphocytes T CD4⁺¹⁶¹. Ceci permettrait d'inhiber spécifiquement la signalisation du TGF- β dans ces cellules. Dans le même ordre d'idée, il pourrait être intéressant d'utiliser des immunocytokines, qui consistent en la fusion d'un anticorps avec une cytokine, afin de ne délivrer celle-ci qu'à un sous-type de cellules cibles³⁷². On peut imaginer synergiser ces deux traitements afin d'inhiber d'une part la signalisation TGF- β dans les lymphocytes T CD4⁺ en piégeant la cytokine, tout en activant la signalisation induite par l'IFN γ grâce au système de livraison ciblée, basé sur une immunocytokine IFN γ ciblant le CD4. Ceci dans le but de moduler la population de lymphocytes T CD4⁺ infiltrants la tumeur vers un phénotype qui soutiendrait la réponse immunitaire anti-tumorale des lymphocytes T CD8⁺, voire favoriserait une réponse des lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques.

Il est également envisageable de tenter d'identifier une molécule qui pourrait inhiber spécifiquement les fonctions de liaison de NLRP3 au récepteur du TGF- β RI afin d'empêcher la signalisation qui en découle. Ce genre de thérapies se heurte cependant à la pharmacocinétique de ce type de molécules, qui nécessitent souvent une optimisation afin que le traitement soit délivré correctement dans les cellules cibles. Des stratégies visant à inhiber l'activité de SMAD3, à l'étude dans le cadre du cancer, rencontrent ces difficultés, avec notamment la molécule SIS3, et le développement d'une nouvelle molécule, 16d, visant à contourner les problèmes rencontrés avec SIS3³⁷³. De manière similaire, il pourrait également être intéressant d'identifier les potentiels mécanismes de modifications post-traductionnelles de NLRP3 dans les Th17, afin de les altérer pour moduler l'activité de la protéine.

En outre, ces découvertes pourraient trouver une application en thérapie cellulaire via les cellules CAR-T. Des études récentes démontrent que les cellules CD4⁺ CAR-T peuvent avoir un intérêt thérapeutique notable^{374,375} et l'on pourrait dans ces conditions imaginer bloquer l'activité de NLRP3 afin de rendre les cellules insensibles à la transdifférenciation T_{reg} qui pourrait être induite par le TGF- β présent dans le microenvironnement tumoral.

Toutes ces perspectives thérapeutiques restent pour autant des perspectives à plus ou moins longs termes qui nécessitent encore un travail important afin de tester leur efficacité et d'évaluer leur pertinence en tant que traitements de certains cancers. Ce travail permet toutefois d'apporter un élément de compréhension supplémentaire quant à des mécanismes de modulation des fonctions des lymphocytes T CD4⁺ dans le cancer, sur lesquels des recherches de traitements contre le cancer pourront s'appuyer dans le futur.

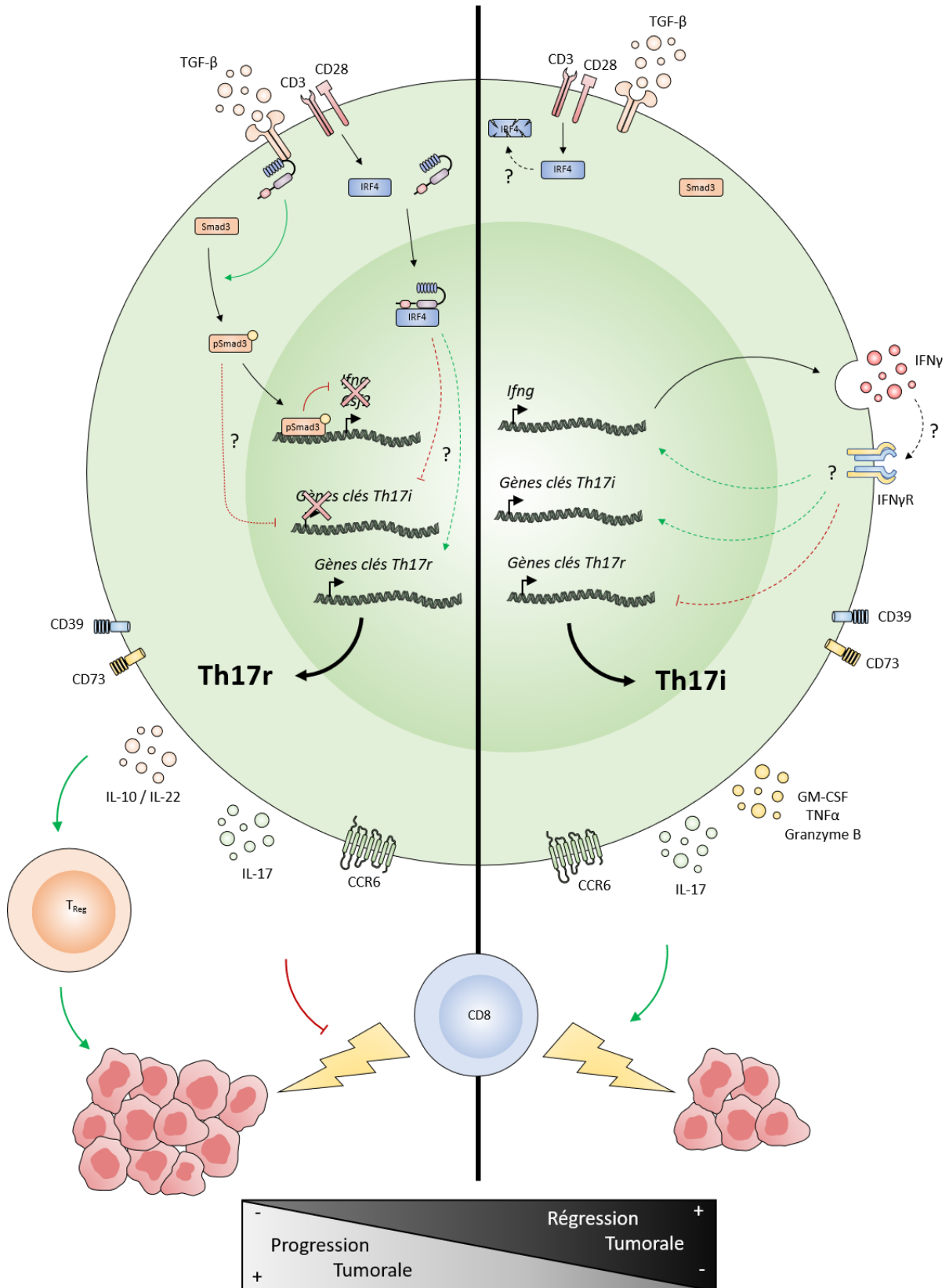


Figure 53 : Résumé graphique. NLRP3 permet la phosphorylation de Smad3, capable de se fixer au promoteur des *Ifng* et *Csf2* et d'en réprimer l'expression. NLRP3 est également capable de se complexer avec IRF4. En sa présence les Th17r peuvent transdifférencier en T_{Reg} et favoriser la croissance tumorale. L'absence de NLRP3 permet d'orienter les Th17 vers un phénotype inflammatoire et d'empêcher la transdifférenciation T_{Reg} . En son absence, les Th17r stimulent la réponse immunitaire antitumorale $CD8^+$.

Références Bibliographiques

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Quail, D. F. & Dannenberg, A. J. The obese adipose tissue microenvironment in cancer development and progression. *Nat Rev Endocrinol* **15**, 139–154 (2019).
4. Kadariya, Y. *et al.* Inflammation-Related IL1 β /IL1R Signaling Promotes the Development of Asbestos-Induced Malignant Mesothelioma. *Cancer Prev Res (Phila)* **9**, 406–414 (2016).
5. Takahashi, H., Ogata, H., Nishigaki, R., Broide, D. H. & Karin, M. Tobacco Smoke Promotes Lung Tumorigenesis by Triggering IKK β - and JNK1-Dependent Inflammation. *Cancer Cell* **17**, 89–97 (2010).
6. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* **13**, 1–27 (1970).
7. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* **3**, 991–998 (2002).
8. Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* **410**, 1107–1111 (2001).
9. Rosenthal, R. *et al.* Neoantigen-directed immune escape in lung cancer evolution. *Nature* **567**, 479–485 (2019).
10. Almand, B. *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol* **166**, 678–689 (2001).
11. Casbon, A.-J. *et al.* Invasive breast cancer reprograms early myeloid differentiation in the bone marrow to generate immunosuppressive neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, E566–575 (2015).
12. Mastelic-Gavillet, B. *et al.* Quantitative and qualitative impairments in dendritic cell subsets of patients with ovarian or prostate cancer. *Eur J Cancer* **135**, 173–182 (2020).

Références Bibliographiques

13. Della Bella, S. *et al.* Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer* **89**, 1463–1472 (2003).
14. Tabarkiewicz, J., Rybojad, P., Jablonka, A. & Rolinski, J. CD1c+ and CD303+ dendritic cells in peripheral blood, lymph nodes and tumor tissue of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* **19**, 237–243 (2008).
15. van Cruijssen, H. *et al.* Sunitinib-induced myeloid lineage redistribution in renal cell cancer patients: CD1c+ dendritic cell frequency predicts progression-free survival. *Clin Cancer Res* **14**, 5884–5892 (2008).
16. Almand, B. *et al.* Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* **6**, 1755–1766 (2000).
17. Yuen, G. J., Demissie, E. & Pillai, S. B lymphocytes and cancer: a love-hate relationship. *Trends Cancer* **2**, 747–757 (2016).
18. Wang, W. W. *et al.* CD19+CD24hiCD38hiBregs involved in downregulate helper T cells and upregulate regulatory T cells in gastric cancer. *Oncotarget* **6**, 33486–33499 (2015).
19. Togashi, Y., Shitara, K. & Nishikawa, H. Regulatory T cells in cancer immunosuppression — implications for anticancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* **16**, 356–371 (2019).
20. Khazen, R. *et al.* Melanoma cell lysosome secretory burst neutralizes the CTL-mediated cytotoxicity at the lytic synapse. *Nat Commun* **7**, (2016).
21. Davis, M. M. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu Rev Biochem* **59**, 475–496 (1990).
22. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* **136**, 2348–2357 (1986).
23. Higashi, T. *et al.* Constitutive tyrosine and serine phosphorylation of STAT4 in T-cells transformed with HTLV-I. *Genes Cells* **10**, 1153–1162 (2005).
24. Lund, R. J., Chen, Z., Scheinin, J. & Lahesmaa, R. Early target genes of IL-12 and STAT4 signaling in th cells. *J Immunol* **172**, 6775–6782 (2004).

Références Bibliographiques

25. Hoey, T. *et al.* Distinct requirements for the naturally occurring splice forms Stat4alpha and Stat4beta in IL-12 responses. *EMBO J* **22**, 4237–4248 (2003).
26. Zhu, J. *et al.* The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. *Immunity* **37**, 660–673 (2012).
27. Lighvani, A. A. *et al.* T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15137–15142 (2001).
28. Darnell, J. E., Kerr, I. M. & Stark, G. R. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**, 1415–1421 (1994).
29. Shi, M., Lin, T. H., Appell, K. C. & Berg, L. J. Janus-kinase-3-dependent signals induce chromatin remodeling at the *Ifng* locus during T helper 1 cell differentiation. *Immunity* **28**, 763–773 (2008).
30. Liao, W., Lin, J.-X., Wang, L., Li, P. & Leonard, W. J. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat Immunol* **12**, 551–559 (2011).
31. Pereira, C. A., Modolell, M., Frey, J. R. & Lefkovits, I. Gene expression in IFN-gamma-activated murine macrophages. *Braz J Med Biol Res* **37**, 1795–1809 (2004).
32. Pan, J. *et al.* Interferon-gamma is an autocrine mediator for dendritic cell maturation. *Immunol Lett* **94**, 141–151 (2004).
33. Chiang, E. Y. *et al.* Targeted depletion of lymphotoxin-alpha-expressing TH1 and TH17 cells inhibits autoimmune disease. *Nat Med* **15**, 766–773 (2009).
34. Zhu, J., Yamane, H. & Paul, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* **28**, 445–489 (2010).
35. Janssen, E. M. *et al.* CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852–856 (2003).
36. Sherman, M. A., Powell, D. R. & Brown, M. A. IL-4 induces the proteolytic processing of mast cell STAT6. *J Immunol* **169**, 3811–3818 (2002).
37. Zhu, J., Guo, L., Watson, C. J., Hu-Li, J. & Paul, W. E. Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol* **166**, 7276–7281 (2001).

Références Bibliographiques

38. Liao, W. *et al.* Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat Immunol* **9**, 1288–1296 (2008).
39. Bruchard, M. *et al.* The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of TH2 differentiation. *Nat Immunol* **16**, 859–870 (2015).
40. Kurup, V. P. *et al.* Anti-interleukin (IL)-4 and -IL-5 antibodies downregulate IgE and eosinophilia in mice exposed to *Aspergillus* antigens. *Allergy* **52**, 1215–1221 (1997).
41. Purkerson, J. M. & Isakson, P. C. Interleukin 5 (IL-5) provides a signal that is required in addition to IL-4 for isotype switching to immunoglobulin (Ig) G1 and IgE. *J Exp Med* **175**, 973–982 (1992).
42. Steinke, J. W. & Borish, L. Th2 cytokines and asthma. Interleukin-4: its role in the pathogenesis of asthma, and targeting it for asthma treatment with interleukin-4 receptor antagonists. *Respir Res* **2**, 66–70 (2001).
43. Li, Z., Zhang, Y. & Sun, B. Current understanding of Th2 cell differentiation and function. *Protein Cell* **2**, 604–611 (2011).
44. Zhou, L., Chong, M. M. W. & Littman, D. R. Plasticity of CD4+ T Cell Lineage Differentiation. *Immunity* **30**, 646–655 (2009).
45. Zhou, L. *et al.* IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* **8**, 967–974 (2007).
46. Korn, T. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* **448**, 484–487 (2007).
47. Nurieva, R. *et al.* Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells. *Nature* **448**, 480–483 (2007).
48. Yang, X. O. *et al.* STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *J Biol Chem* **282**, 9358–9363 (2007).
49. Durant, L. *et al.* Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. *Immunity* **32**, 605–615 (2010).

Références Bibliographiques

50. Laurence, A. *et al.* STAT3 transcription factor promotes instability of nTreg cells and limits generation of iTreg cells during acute murine graft-versus-host disease. *Immunity* **37**, 209–222 (2012).
51. Chalmin, F. *et al.* Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **36**, 362–373 (2012).
52. Puel, A. *et al.* Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* **332**, 65–68 (2011).
53. Weaver, C. T., Hatton, R. D., Mangan, P. R. & Harrington, L. E. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. *Annu Rev Immunol* **25**, 821–852 (2007).
54. Park, H. *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* **6**, 1133–1141 (2005).
55. Aujla, S. J. *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med* **14**, 275–281 (2008).
56. Spolski, R. & Leonard, W. J. Interleukin-21: a double-edged sword with therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 379–395 (2014).
57. Martin-Orozco, N. *et al.* T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity. *Immunity* **31**, 787–798 (2009).
58. McGeachy, M. J. *et al.* TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* **8**, 1390–1397 (2007).
59. Burchill, M. A., Yang, J., Vogtenhuber, C., Blazar, B. R. & Farrar, M. A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3+ regulatory T cells. *J Immunol* **178**, 280–290 (2007).
60. Lal, G. *et al.* Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. *J Immunol* **182**, 259–273 (2009).

Références Bibliographiques

61. Powrie, F., Carlino, J., Leach, M. W., Mauze, S. & Coffman, R. L. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med* **183**, 2669–2674 (1996).
62. Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. & Powrie, F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* **190**, 995–1004 (1999).
63. Collison, L. W. *et al.* The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* **450**, 566–569 (2007).
64. Cao, X. *et al.* Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity* **27**, 635–646 (2007).
65. Magnani, C. F. *et al.* Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur J Immunol* **41**, 1652–1662 (2011).
66. Pandiyan, P., Zheng, L., Ishihara, S., Reed, J. & Lenardo, M. J. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* **8**, 1353–1362 (2007).
67. Létourneau, S., Krieg, C., Pantaleo, G. & Boyman, O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J Allergy Clin Immunol* **123**, 758–762 (2009).
68. Shi, L. *et al.* Adenosine Generated by Regulatory T Cells Induces CD8+ T Cell Exhaustion in Gastric Cancer through A2aR Pathway. *Biomed Res Int* **2019**, 4093214 (2019).
69. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**, 1206–1212 (2003).
70. Read, S. *et al.* Blockade of CTLA-4 on CD4+CD25+ regulatory T cells abrogates their function in vivo. *J Immunol* **177**, 4376–4383 (2006).
71. Huang, C.-T. *et al.* Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* **21**, 503–513 (2004).
72. Wing, J. B., Tanaka, A. & Sakaguchi, S. Human FOXP3+ Regulatory T Cell Heterogeneity and Function in Autoimmunity and Cancer. *Immunity* **50**, 302–316 (2019).

Références Bibliographiques

73. Ray, J. P. *et al.* Transcription factor STAT3 and type I interferons are corepressive insulators for differentiation of follicular helper and T helper 1 cells. *Immunity* **40**, 367–377 (2014).
74. Choi, Y. S., Yang, J. A. & Crotty, S. Dynamic regulation of Bcl6 in follicular helper CD4 T (Tfh) cells. *Curr Opin Immunol* **25**, 366–372 (2013).
75. Liu, X., Nurieva, R. I. & Dong, C. Transcriptional regulation of follicular T-helper (Tfh) cells. *Immunol Rev* **252**, 139–145 (2013).
76. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132–1148 (2019).
77. Reinhardt, R. L., Liang, H.-E. & Locksley, R. M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nat Immunol* **10**, 385–393 (2009).
78. Kaplan, M. H. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol Rev* **252**, 104–115 (2013).
79. Liao, W. *et al.* Opposing actions of IL-2 and IL-21 on Th9 differentiation correlate with their differential regulation of BCL6 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 3508–3513 (2014).
80. Bassil, R. *et al.* BCL6 controls Th9 cell development by repressing Il9 transcription. *J Immunol* **193**, 198–207 (2014).
81. Elyaman, W. *et al.* IL-9 induces differentiation of TH17 cells and enhances function of FoxP3+ natural regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 12885–12890 (2009).
82. Nowak, E. C. *et al.* IL-9 as a mediator of Th17-driven inflammatory disease. *J Exp Med* **206**, 1653–1660 (2009).
83. Wiener, Z., Falus, A. & Toth, S. IL-9 increases the expression of several cytokines in activated mast cells, while the IL-9-induced IL-9 production is inhibited in mast cells of histamine-free transgenic mice. *Cytokine* **26**, 122–130 (2004).
84. Gaublomme, J. T. *et al.* Single-Cell Genomics Unveils Critical Regulators of Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* **163**, 1400–1412 (2015).
85. Wang, C. *et al.* CD5L/AIM Regulates Lipid Biosynthesis and Restrains Th17 Cell Pathogenicity. *Cell* **163**, 1413–1427 (2015).

Références Bibliographiques

86. Becattini, S. *et al.* T cell immunity. Functional heterogeneity of human memory CD4⁺ T cell clones primed by pathogens or vaccines. *Science* **347**, 400–406 (2015).
87. Han, A., Glanville, J., Hansmann, L. & Davis, M. M. Linking T-cell receptor sequence to functional phenotype at the single-cell level. *Nat Biotechnol* **32**, 684–692 (2014).
88. Perez, V. L., Lederer, J. A., Lichtman, A. H. & Abbas, A. K. Stability of Th1 and Th2 populations. *Int Immunol* **7**, 869–875 (1995).
89. Hegazy, A. N. *et al.* Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity* **32**, 116–128 (2010).
90. Veldhoen, M. *et al.* Transforming growth factor-beta ‘reprograms’ the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat Immunol* **9**, 1341–1346 (2008).
91. Lu, K. T. *et al.* Functional and epigenetic studies reveal multistep differentiation and plasticity of in vitro-generated and in vivo-derived follicular T helper cells. *Immunity* **35**, 622–632 (2011).
92. Koenen, H. J. P. M. *et al.* Human CD25^{high}Foxp3^{pos} regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood* **112**, 2340–2352 (2008).
93. Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C. M. & Hafler, D. A. Identification of T helper type 1-like, Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune disease. *Nat Med* **17**, 673–675 (2011).
94. Lee, Y. K. *et al.* Late developmental plasticity in the T helper 17 lineage. *Immunity* **30**, 92–107 (2009).
95. Bending, D. *et al.* Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice. *J Clin Invest* **119**, 565–572 (2009).
96. Zhou, L. *et al.* TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* **453**, 236–240 (2008).
97. Gagliani, N. *et al.* Th17 cells transdifferentiate into regulatory T cells during resolution of inflammation. *Nature* **523**, 221–225 (2015).
98. Buckler, J. L., Liu, X. & Turka, L. A. Regulation of T-cell responses by PTEN. *Immunol Rev* **224**, 239–248 (2008).

Références Bibliographiques

99. Bensinger, S. J. *et al.* Distinct IL-2 receptor signaling pattern in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **172**, 5287–5296 (2004).
100. Lee, K. *et al.* Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity* **32**, 743–753 (2010).
101. Kurebayashi, Y. *et al.* PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi1 expression and nuclear translocation of ROR γ . *Cell Rep* **1**, 360–373 (2012).
102. Yurchenko, E. *et al.* Inflammation-driven reprogramming of CD4+ Foxp3+ regulatory T cells into pathogenic Th1/Th17 T effectors is abrogated by mTOR inhibition in vivo. *PLoS One* **7**, e35572 (2012).
103. Zeng, H. *et al.* mTORC1 couples immune signals and metabolic programming to establish T(reg)-cell function. *Nature* **499**, 485–490 (2013).
104. Sun, I.-H. *et al.* mTORC1 signaling regulates the generation and function of central and effector FoxP3+ regulatory T cells. *J Immunol* **201**, 481–492 (2018).
105. Frauwirth, K. A. *et al.* The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* **16**, 769–777 (2002).
106. Macintyre, A. N. *et al.* The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab* **20**, 61–72 (2014).
107. Shrestha, S. *et al.* Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses. *Nat Immunol* **16**, 178–187 (2015).
108. Patsoukis, N. *et al.* PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat Commun* **6**, 6692 (2015).
109. Bettonville, M. *et al.* Long-term antigen exposure irreversibly modifies metabolic requirements for T cell function. *Elife* **7**, (2018).
110. de Kivit, S. *et al.* Stable human regulatory T cells switch to glycolysis following TNF receptor 2 costimulation. *Nat Metab* **2**, 1046–1061 (2020).

Références Bibliographiques

111. Klysz, D. *et al.* Glutamine-dependent α -ketoglutarate production regulates the balance between T helper 1 cell and regulatory T cell generation. *Sci Signal* **8**, ra97 (2015).
112. Hsu, F.-C. *et al.* An Essential Role for the Transcription Factor Runx1 in T Cell Maturation. *Sci Rep* **6**, 23533 (2016).
113. Wang, Y. *et al.* The Transcription Factors T-bet and Runx Are Required for the Ontogeny of Pathogenic Interferon- γ -Producing T Helper 17 Cells. *Immunity* **40**, 355–366 (2014).
114. Lohoff, M. & Mak, T. W. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **5**, 125–135 (2005).
115. Dawson, H. D., Collins, G., Pyle, R., Key, M. & Taub, D. D. The Retinoic Acid Receptor- α mediates human T-cell activation and Th2 cytokine and chemokine production. *BMC Immunology* **9**, 16 (2008).
116. Schambach, F., Schupp, M., Lazar, M. A. & Reiner, S. L. Activation of retinoic acid receptor-alpha favours regulatory T cell induction at the expense of IL-17-secreting T helper cell differentiation. *Eur J Immunol* **37**, 2396–2399 (2007).
117. Imbratta, C. *et al.* Maf deficiency in T cells dysregulates T reg - T H 17 balance leading to spontaneous colitis. *Sci Rep* **9**, 6135 (2019).
118. Andris, F. *et al.* The Transcription Factor c-Maf Promotes the Differentiation of Follicular Helper T Cells. *Front Immunol* **8**, 480 (2017).
119. Kroenke, M. A. *et al.* Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J Immunol* **188**, 3734–3744 (2012).
120. Liu, X. *et al.* The role of STAT3 and AhR in the differentiation of CD4+ T cells into Th17 and Treg cells. *Medicine (Baltimore)* **96**, e6615 (2017).
121. Zhou, L. Ahr function in lymphocytes: emerging concepts. *Trends Immunol* **37**, 17–31 (2016).
122. Ouyang, W. *et al.* Foxo proteins cooperatively control the differentiation of Foxp3+ regulatory T cells. *Nat Immunol* **11**, 618–627 (2010).

Références Bibliographiques

123. Qi, H. *et al.* Foxo3 Promotes the Differentiation and Function of Follicular Helper T Cells. *Cell Reports* **31**, 107621 (2020).
124. Stienne, C. *et al.* Foxo3 Transcription Factor Drives Pathogenic T Helper 1 Differentiation by Inducing the Expression of Eomes. *Immunity* **45**, 774–787 (2016).
125. Bernard, A. *et al.* The Tumor Microenvironment Impairs Th1 IFN γ Secretion through Alternative Splicing Modifications of Irf1 Pre-mRNA. *Cancer Immunol Res* **9**, 324–336 (2021).
126. Tumes, D. J. *et al.* The polycomb protein Ezh2 regulates differentiation and plasticity of CD4(+) T helper type 1 and type 2 cells. *Immunity* **39**, 819–832 (2013).
127. Zhang, Y. *et al.* The polycomb repressive complex 2 governs life and death of peripheral T cells. *Blood* **124**, 737–749 (2014).
128. DuPage, M. *et al.* The Chromatin-Modifying Enzyme Ezh2 Is Critical for the Maintenance of Regulatory T Cell Identity after Activation. *Immunity* **42**, 227–238 (2015).
129. Ichiyama, K. *et al.* The methylcytosine dioxygenase Tet2 promotes DNA demethylation and activation of cytokine gene expression in T cells. *Immunity* **42**, 613–626 (2015).
130. Miller, S. A., Huang, A. C., Miazgowicz, M. M., Brassil, M. M. & Weinmann, A. S. Coordinated but physically separable interaction with H3K27-demethylase and H3K4-methyltransferase activities are required for T-box protein-mediated activation of developmental gene expression. *Genes Dev* **22**, 2980–2993 (2008).
131. Wang, L. *et al.* Mbd2 promotes foxp3 demethylation and T-regulatory-cell function. *Mol Cell Biol* **33**, 4106–4115 (2013).
132. Gohil, M., Jordan, M. S. & Carty, S. A. TET2 Regulates CD4+ T Follicular Helper Differentiation. *Blood* **130**, 3578–3578 (2017).
133. Chatterjee, S. *et al.* Increasing Th1 phenotype in Th17 cells improves anti-tumor T cells function (VAC7P.1032). *The Journal of Immunology* **194**, 143.2-143.2 (2015).
134. Laheurte, C. *et al.* Distinct prognostic value of circulating anti-telomerase CD4 + Th1 immunity and exhausted PD-1 + /TIM-3 + T cells in lung cancer. *Br J Cancer* **121**, 405–416 (2019).

Références Bibliographiques

135. Nakamori, M. *et al.* Intensification of Antitumor Effect by T Helper 1-dominant Adoptive Immunogene Therapy for Advanced Orthotopic Colon Cancer. *Clin Cancer Res* **9**, 2357–2365 (2003).
136. Tian, L. *et al.* Mutual regulation of tumour vessel normalization and immunostimulatory reprogramming. *Nature* **544**, 250–254 (2017).
137. Preston, C. C. *et al.* The Ratios of CD8+ T Cells to CD4+CD25+ FOXP3+ and FOXP3- T Cells Correlate with Poor Clinical Outcome in Human Serous Ovarian Cancer. *PLOS ONE* **8**, e80063 (2013).
138. Sisirak, V. *et al.* Impaired IFN- α Production by Plasmacytoid Dendritic Cells Favors Regulatory T-cell Expansion That May Contribute to Breast Cancer Progression. *Cancer Res* **72**, 5188–5197 (2012).
139. Valzasina, B., Piconese, S., Guiducci, C. & Colombo, M. P. Tumor-Induced Expansion of Regulatory T Cells by Conversion of CD4⁺ CD25⁻ Lymphocytes Is Thymus and Proliferation Independent. *Cancer Res* **66**, 4488–4495 (2006).
140. Liu, V. C. *et al.* Tumor Evasion of the Immune System by Converting CD4⁺CD25⁻ T Cells into CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF- β . *The Journal of Immunology* **178**, 2883–2892 (2007).
141. Matoba, T. *et al.* Regulatory T cells expressing abundant CTLA-4 on the cell surface with a proliferative gene profile are key features of human head and neck cancer. *Int J Cancer* **144**, 2811–2822 (2019).
142. Camisaschi, C. *et al.* LAG-3 Expression Defines a Subset of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ Regulatory T Cells That Are Expanded at Tumor Sites. *The Journal of Immunology* **184**, 6545–6551 (2010).
143. Kim, I.-K. *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* **21**, 1010–1017 (2015).

Références Bibliographiques

144. Humblin, E. *et al.* IRF8-dependent molecular complexes control the Th9 transcriptional program. *Nat Commun* **8**, 2085 (2017).
145. Purwar, R. *et al.* Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. *Nat Med* **18**, 1248–1253 (2012).
146. Végran, F. *et al.* The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat Immunol* **15**, 758–766 (2014).
147. Lorvik, K. B. *et al.* Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response. *Cancer Res* **76**, 6864–6876 (2016).
148. Tokumaru, Y. *et al.* Association of Th2 high tumors with aggressive features of breast cancer. *JCO* **38**, e12584–e12584 (2020).
149. Lin, W. *et al.* The disease stage-associated imbalance of Th1/Th2 and Th17/Treg in uterine cervical cancer patients and their recovery with the reduction of tumor burden. *BMC Women's Health* **20**, 126 (2020).
150. Singh, D. *et al.* CD4+ follicular helper-like T cells are key players in anti-tumor immunity. *bioRxiv* 2020.01.08.898346 (2020) doi:10.1101/2020.01.08.898346.
151. Shi, W. *et al.* Follicular helper T cells promote the effector functions of CD8+ T cells via the provision of IL-21, which is downregulated due to PD-1/PD-L1-mediated suppression in colorectal cancer. *Exp Cell Res* **372**, 35–42 (2018).
152. Ma, Q.-Y. *et al.* Function of follicular helper T cell is impaired and correlates with survival time in non-small cell lung cancer. *Int Immunopharmacol* **41**, 1–7 (2016).
153. Amicarella, F. *et al.* Dual role of tumour-infiltrating T helper 17 cells in human colorectal cancer. *Gut* **66**, 692–704 (2017).
154. Bowers, J. S. *et al.* Th17 cells are refractory to senescence and retain robust antitumor activity after long-term ex vivo expansion. *JCI Insight* **2**, e90772.
155. Majchrzak, K. *et al.* β -catenin and PI3K δ inhibition expands precursor Th17 cells with heightened stemness and antitumor activity. *JCI Insight* **2**, e90547.

Références Bibliographiques

156. Grivennikov, S. I. *et al.* Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **491**, 254–258 (2012).
157. Śledzińska, A. *et al.* Regulatory T Cells Restrain Interleukin-2- and Blimp-1-Dependent Acquisition of Cytotoxic Function by CD4+ T Cells. *Immunity* **52**, 151-166.e6 (2020).
158. Cachot, A. *et al.* Tumor-specific cytolytic CD4 T cells mediate immunity against human cancer. *Science Advances* **7**, eabe3348 (2021).
159. Gorelik, L., Constant, S. & Flavell, R. A. Mechanism of Transforming Growth Factor β -induced Inhibition of T Helper Type 1 Differentiation. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 1499–1505 (2002).
160. Gorelik, L., Fields, P. E. & Flavell, R. A. Cutting Edge: TGF- β Inhibits Th Type 2 Development Through Inhibition of GATA-3 Expression. *The Journal of Immunology* **165**, 4773–4777 (2000).
161. Li, S. *et al.* Cancer immunotherapy via targeted TGF- β signalling blockade in TH cells. *Nature* **587**, 121–125 (2020).
162. Korn, T. *et al.* IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3 regulatory T cells. *PNAS* **105**, 18460–18465 (2008).
163. Malek, T. R. The Biology of Interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* **26**, 453–479 (2008).
164. Rosenberg, S. A. IL-2: The First Effective Immunotherapy for Human Cancer. *The Journal of Immunology* **192**, 5451–5458 (2014).
165. Rickert, M., Wang, X., Boulanger, M. J., Goriatcheva, N. & Garcia, K. C. The Structure of Interleukin-2 Complexed with Its Alpha Receptor. *Science* **308**, 1477–1480 (2005).
166. Banchereau, J., Pascual, V. & O'Garra, A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol* **13**, 925–931 (2012).
167. Sun, Z. *et al.* A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8 + T-cell response and effective tumor control. *Nat Commun* **10**, 3874 (2019).
168. Zhao, J., Chen, X., Herjan, T. & Li, X. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *Journal of Experimental Medicine* **217**, (2019).

Références Bibliographiques

169. Vitiello, G. A. & Miller, G. Targeting the interleukin-17 immune axis for cancer immunotherapy. *Journal of Experimental Medicine* **217**, (2019).
170. Berger, H. *et al.* SOCS3 Transactivation by PPAR γ Prevents IL-17–Driven Cancer Growth. *Cancer Res* **73**, 3578–3590 (2013).
171. Bruchard, M. *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat Med* **19**, 57–64 (2013).
172. Haabeth, O. A. W. *et al.* Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat Commun* **2**, 240 (2011).
173. Haabeth, O. A. W., Lørvik, K. B., Yagita, H., Bogen, B. & Corthay, A. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. *Oncot Immunology* **5**, e1039763 (2016).
174. Lu, Y. *et al.* Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4⁺ T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* **33**, 1048-1060.e7 (2018).
175. Xue, G., Jin, G., Fang, J. & Lu, Y. IL-4 together with IL-1 β induces antitumor Th9 cell differentiation in the absence of TGF- β signaling. *Nat Commun* **10**, 1376 (2019).
176. Veltri, S. & Smith, J. W. Interleukin 1 Trials in Cancer Patients: A Review of the Toxicity, Antitumor and Hematopoietic Effects. *STEM CELLS* **14**, 164–176 (1996).
177. Carswell, E. A. *et al.* An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *PNAS* **72**, 3666–3670 (1975).
178. Kearney, C. J. *et al.* Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Science Immunology* **3**, (2018).
179. Habtetsion, T. *et al.* Alteration of Tumor Metabolism by CD4⁺ T Cells Leads to TNF- α -Dependent Intensification of Oxidative Stress and Tumor Cell Death. *Cell Metabolism* **28**, 228-242.e6 (2018).
180. Chen, X., Bäümel, M., Männel, D. N., Howard, O. M. Z. & Oppenheim, J. J. Interaction of TNF with TNF Receptor Type 2 Promotes Expansion and Function of Mouse CD4⁺CD25⁺ T Regulatory Cells. *The Journal of Immunology* **179**, 154–161 (2007).

Références Bibliographiques

181. Chen, X. *et al.* TNFR2 Is Critical for the Stabilization of the CD4+Foxp3+ Regulatory T Cell Phenotype in the Inflammatory Environment. *The Journal of Immunology* **190**, 1076–1084 (2013).
182. Hamano, R., Huang, J., Yoshimura, T., Oppenheim, J. J. & Chen, X. TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *European Journal of Immunology* **41**, 2010–2020 (2011).
183. Chen, X. *et al.* Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *European Journal of Immunology* **40**, 1099–1106 (2010).
184. Mierlo, G. J. D. van *et al.* Cutting Edge: TNFR-Shedding by CD4+CD25+ Regulatory T Cells Inhibits the Induction of Inflammatory Mediators. *The Journal of Immunology* **180**, 2747–2751 (2008).
185. Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J. & Kroemer, G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol* **15**, 405–414 (2015).
186. Lu, C. *et al.* Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *J Immunother Cancer* **7**, 157 (2019).
187. Kurche, J. S., Haluszczak, C., McWilliams, J. A., Sanchez, P. J. & Kedl, R. M. Type I IFN-Dependent T Cell Activation Is Mediated by IFN-Dependent Dendritic Cell OX40 Ligand Expression and Is Independent of T Cell IFNR Expression. *The Journal of Immunology* **188**, 585–593 (2012).
188. Hashimoto, H. *et al.* Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. *Cancer Gene Ther* **21**, 532–541 (2014).
189. Martini, M. *et al.* IFN- γ -mediated upmodulation of MHC class I expression activates tumor-specific immune response in a mouse model of prostate cancer. *Vaccine* **28**, 3548–3557 (2010).
190. Street, D. *et al.* Interferon- γ Enhances Susceptibility of Cervical Cancer Cells to Lysis by Tumor-Specific Cytotoxic T Cells. *Gynecologic Oncology* **65**, 265–272 (1997).

Références Bibliographiques

191. Relation, T. *et al.* Intratumoral Delivery of Interferon- γ -Secreting Mesenchymal Stromal Cells Repolarizes Tumor-Associated Macrophages and Suppresses Neuroblastoma Proliferation In Vivo. *STEM CELLS* **36**, 915–924 (2018).
192. Chin, Y. E. *et al.* Cell Growth Arrest and Induction of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/CIP1 Mediated by STAT1. *Science* **272**, 719–722 (1996).
193. Harvat, B. L., Seth, P. & Jetten, A. M. The role of p27 Kip1 in gamma interferon-mediated growth arrest of mammary epithelial cells and related defects in mammary carcinoma cells. *Oncogene* **14**, 2111–2122 (1997).
194. Chawla-Sarkar, M. *et al.* Apoptosis and interferons: Role of interferon-stimulated genes as mediators of apoptosis. *Apoptosis* **8**, 237–249 (2003).
195. Qin, Z. *et al.* A Critical Requirement of Interferon γ -mediated Angiostasis for Tumor Rejection by CD8 T Cells. *Cancer Res* **63**, 4095–4100 (2003).
196. Coughlin, C. M. *et al.* Tumor Cell Responses to IFN γ Affect Tumorigenicity and Response to IL-12 Therapy and Antiangiogenesis. *Immunity* **9**, 25–34 (1998).
197. Zaidi, M. R. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **39**, 30–38 (2019).
198. Tugues, S. *et al.* New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ* **22**, 237–246 (2015).
199. Coussens, L. M., Zitvogel, L. & Palucka, A. K. Neutralizing Tumor-Promoting Chronic Inflammation: A Magic Bullet? *Science* **339**, 286–291 (2013).
200. Gabitass, R. F., Anells, N. E., Stocken, D. D., Pandha, H. A. & Middleton, G. W. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol Immunother* **60**, 1419 (2011).
201. Liu, M. *et al.* TGF- β suppresses type 2 immunity to cancer. *Nature* **587**, 115–120 (2020).

Références Bibliographiques

202. Accogli, T., Bruchard, M. & Végran, F. Modulation of CD4 T Cell Response According to Tumor Cytokine Microenvironment. *Cancers* **13**, 373 (2021).
203. Krakowski, M. & Owens, T. Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis. *Eur J Immunol* **26**, 1641–1646 (1996).
204. Gran, B. *et al.* IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* **169**, 7104–7110 (2002).
205. Zhang, G.-X. *et al.* Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in IL-12 receptor-beta 2-deficient mice: IL-12 responsiveness is not required in the pathogenesis of inflammatory demyelination in the central nervous system. *J Immunol* **170**, 2153–2160 (2003).
206. Oppmann, B. *et al.* Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* **13**, 715–725 (2000).
207. Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744–748 (2003).
208. Langrish, C. L. *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* **201**, 233–240 (2005).
209. Harrington, L. E. *et al.* Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* **6**, 1123–1132 (2005).
210. Bettelli, E. *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **441**, 235–238 (2006).
211. Veldhoen, M., Hocking, R. J., Atkins, C. J., Locksley, R. M. & Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **24**, 179–189 (2006).
212. Mangan, P. R. *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231–234 (2006).

Références Bibliographiques

213. Coquet, J. M., Chakravarti, S., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. Cutting edge: IL-21 is not essential for Th17 differentiation or experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **180**, 7097–7101 (2008).
214. Zhang, S., Zhang, G. & Wan, Y. Y. SKI and SMAD4 are essential for IL-21-induced Th17 differentiation. *Mol Immunol* **114**, 260–268 (2019).
215. Choi, Y. S., Eto, D., Yang, J. A., Lao, C. & Crotty, S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *J Immunol* **190**, 3049–3053 (2013).
216. Fielding, C. A. *et al.* Interleukin-6 signaling drives fibrosis in unresolved inflammation. *Immunity* **40**, 40–50 (2014).
217. Mukasa, R. *et al.* Epigenetic instability of cytokine and transcription factor gene loci underlies plasticity of the T helper 17 cell lineage. *Immunity* **32**, 616–627 (2010).
218. Ghoreschi, K. *et al.* Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF- β signalling. *Nature* **467**, 967–971 (2010).
219. Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M.-H., de Sauvage, F. J. & Gurney, A. L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* **278**, 1910–1914 (2003).
220. Hirota, K. *et al.* Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* **12**, 255–263 (2011).
221. Veldhoen, M. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* **453**, 106–109 (2008).
222. Bhaumik, S. & Basu, R. Cellular and Molecular Dynamics of Th17 Differentiation and its Developmental Plasticity in the Intestinal Immune Response. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
223. Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G. & Lavelle, E. C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* **203**, 1685–1691 (2006).

Références Bibliographiques

224. Kryczek, I. *et al.* Cutting edge: opposite effects of IL-1 and IL-2 on the regulation of IL-17+ T cell pool IL-1 subverts IL-2-mediated suppression. *J Immunol* **179**, 1423–1426 (2007).
225. Basu, R. *et al.* IL-1 signaling modulates activation of STAT transcription factors to antagonize retinoic acid signaling and control the TH17 cell-iTreg cell balance. *Nat Immunol* **16**, 286–295 (2015).
226. Rizzo, A. *et al.* Smad7 induces plasticity in tumor-infiltrating Th17 cells and enables TNF-alpha-mediated killing of colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **35**, 1536–1546 (2014).
227. Nistala, K. *et al.* Th17 plasticity in human autoimmune arthritis is driven by the inflammatory environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14751–14756 (2010).
228. Liu, H.-P. *et al.* TGF- β converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression. *Eur J Immunol* **45**, 1010–1018 (2015).
229. Yoon, J.-H. *et al.* Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2/Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nature Communications* **6**, (2015).
230. Brüstle, A. *et al.* The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4. *Nat Immunol* **8**, 958–966 (2007).
231. Schraml, B. U. *et al.* The AP-1 transcription factor Batf controls T(H)17 differentiation. *Nature* **460**, 405–409 (2009).
232. Ciofani, M. *et al.* A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* **151**, 289–303 (2012).
233. Wu, B. *et al.* RAS P21 Protein Activator 3 (RASA3) Specifically Promotes Pathogenic T Helper 17 Cell Generation by Repressing T-Helper-2-Cell-Biased Programs. *Immunity* **49**, 886-898.e5 (2018).
234. Qiu, R. *et al.* Inhibition of Glycolysis in Pathogenic TH17 Cells through Targeting a miR-21–Peli1–c-Rel Pathway Prevents Autoimmunity. *The Journal of Immunology* **204**, 3160–3170 (2020).
235. Wu, L. *et al.* Niche-Selective Inhibition of Pathogenic Th17 Cells by Targeting Metabolic Redundancy. *Cell* **182**, 641-654.e20 (2020).

Références Bibliographiques

236. Kahlfuss, S. *et al.* STIM1-mediated calcium influx controls antifungal immunity and the metabolic function of non-pathogenic Th17 cells. *EMBO Molecular Medicine* **12**, e11592 (2020).
237. Kaufmann, U. *et al.* Calcium Signaling Controls Pathogenic Th17 Cell-Mediated Inflammation by Regulating Mitochondrial Function. *Cell Metab* **29**, 1104-1118.e6 (2019).
238. Kalim, K. W. *et al.* Reciprocal regulation of glycolysis-driven Th17 pathogenicity and Treg stability by Cdc42. *J Immunol* **200**, 2313–2326 (2018).
239. Lee, Y. *et al.* Induction and molecular signature of pathogenic T H 17 cells. *Nat Immunol* **13**, 991–999 (2012).
240. Hu, D. *et al.* Transcriptional signature of human pro-inflammatory T H 17 cells identifies reduced IL10 gene expression in multiple sclerosis. *Nat Commun* **8**, 1600 (2017).
241. Ramesh, R. *et al.* Pro-inflammatory human Th17 cells selectively express P-glycoprotein and are refractory to glucocorticoids. *J Exp Med* **211**, 89–104 (2014).
242. Tanaka, K. *et al.* Regulation of Pathogenic T Helper 17 Cell Differentiation by Steroid Receptor Coactivator-3. *Cell Reports* **23**, 2318–2329 (2018).
243. Krausgruber, T. *et al.* T-bet is a key modulator of IL-23-driven pathogenic CD4 + T cell responses in the intestine. *Nat Commun* **7**, 11627 (2016).
244. Lee, J.-Y. *et al.* ROR α enforces stability of the T-helper-17 cell effector program. *bioRxiv* 2020.12.15.422921 (2020) doi:10.1101/2020.12.15.422921.
245. Lainé, A. *et al.* Foxo1 Is a T Cell–Intrinsic Inhibitor of the ROR γ t-Th17 Program. *The Journal of Immunology* **195**, 1791–1803 (2015).
246. Wang, Y. *et al.* The transcription factors T-bet and Runx are required for the ontogeny of pathogenic interferon- γ -producing T helper 17 cells. *Immunity* **40**, 355–366 (2014).
247. Meyer Zu Horste, G. *et al.* RBPJ Controls Development of Pathogenic Th17 Cells by Regulating IL-23 Receptor Expression. *Cell Rep* **16**, 392–404 (2016).
248. Hasan, Z. *et al.* JunB is essential for IL-23-dependent pathogenicity of Th17 cells. *Nat Commun* **8**, 15628 (2017).

Références Bibliographiques

249. Ogawa, C. *et al.* Blimp-1 Functions as a Molecular Switch to Prevent Inflammatory Activity in Foxp3+ROR γ t+ Regulatory T Cells. *Cell Rep* **25**, 19-28.e5 (2018).
250. Jain, R. *et al.* Interleukin-23-Induced Transcription Factor Blimp-1 Promotes Pathogenicity of T Helper 17 Cells. *Immunity* **44**, 131–142 (2016).
251. An, J. *et al.* Krüppel-like factor 4 (KLF4) directly regulates proliferation in thymocyte development and IL-17 expression during Th17 differentiation. *FASEB J* **25**, 3634–3645 (2011).
252. Du, R., Zhao, H., Yan, F. & Li, H. IL-17+Foxp3+ T cells: an intermediate differentiation stage between Th17 cells and regulatory T cells. *J Leukoc Biol* **96**, 39–48 (2014).
253. Mudter, J. *et al.* IRF4 regulates IL-17A promoter activity and controls ROR γ t-dependent Th17 colitis in vivo. *Inflamm Bowel Dis* **17**, 1343–1358 (2011).
254. Dang, E. V. *et al.* Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-inducible Factor 1. *Cell* **146**, 772–784 (2011).
255. Volchenkov, R., Nygaard, V., Sener, Z. & Skålhegg, B. S. Th17 Polarization under Hypoxia Results in Increased IL-10 Production in a Pathogen-Independent Manner. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
256. Morianos, I. *et al.* Activin-A limits Th17 pathogenicity and autoimmune neuroinflammation via CD39 and CD73 ectonucleotidases and Hif1- α -dependent pathways. *PNAS* **117**, 12269–12280 (2020).
257. Xu, J. *et al.* c-Maf Regulates IL-10 Expression during Th17 Polarization. *J Immunol* **182**, 6226–6236 (2009).
258. Chang, K.-K. *et al.* IL-27 triggers IL-10 production in Th17 cells via a c-Maf/ROR γ t/Blimp-1 signal to promote the progression of endometriosis. *Cell Death Dis* **8**, e2666–e2666 (2017).
259. Ridley, M. L. *et al.* IKZF3/Aiolos Is Associated with but Not Sufficient for the Expression of IL-10 by CD4+ T Cells. *J Immunol* **204**, 2940–2948 (2020).
260. Shin, B. *et al.* Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Regulates the Fate Decision between Pathogenic Th17 and Regulatory T Cells. *Cell Reports* **30**, 1898-1909.e4 (2020).

Références Bibliographiques

261. Zhang, D. *et al.* High Glucose Intake Exacerbates Autoimmunity through Reactive-Oxygen-Species-Mediated TGF- β Cytokine Activation. *Immunity* **51**, 671-681.e5 (2019).
262. Wu, L. *et al.* Selective metabolic redundancy of Gpi1 allows for specific inhibition of inflammatory Th17 cells. *bioRxiv* 857961 (2019) doi:10.1101/857961.
263. Wacleche, V. S. *et al.* New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy. *Retrovirology* **13**, 59 (2016).
264. van Hamburg, J. P. & Tas, S. W. Molecular mechanisms underpinning T helper 17 cell heterogeneity and functions in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* **87**, 69–81 (2018).
265. Honda, K. & Littman, D. R. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* **535**, 75–84 (2016).
266. Kirchner, F. R. & LeibundGut-Landmann, S. Tissue-resident memory Th17 cells maintain stable fungal commensalism in the oral mucosa. *Mucosal Immunol* **14**, 455–467 (2021).
267. Hashimoto, M. Th17 in Animal Models of Rheumatoid Arthritis. *J Clin Med* **6**, 73 (2017).
268. Li, B. *et al.* The role of Th17 cells in psoriasis. *Immunol Res* **68**, 296–309 (2020).
269. Martin, J. C., Baeten, D. L. & Josien, R. Emerging role of IL-17 and Th17 cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* **154**, 1–12 (2014).
270. Bacher, P. *et al.* Human Anti-fungal Th17 Immunity and Pathology Rely on Cross-Reactivity against *Candida albicans*. *Cell* **176**, 1340-1355.e15 (2019).
271. Sonderegger, I. *et al.* GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival. *J Exp Med* **205**, 2281–2294 (2008).
272. Montes, M. *et al.* Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clinical Immunology* **130**, 133–144 (2009).
273. Tzartos, J. S. *et al.* Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *The American Journal of Pathology* **172**, 146–155 (2008).

Références Bibliographiques

274. Rasouli, J. *et al.* Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN- β Therapy. *J Immunol* **194**, 5085–5093 (2015).
275. Galand, C. *et al.* Th17 Cells Are Involved in the Local Control of Tumor Progression in Primary Intraocular Lymphoma. *PLOS ONE* **6**, e24622 (2011).
276. Noonan, K. *et al.* A novel role of IL-17-producing lymphocytes in mediating lytic bone disease in multiple myeloma. *Blood* **116**, 3554–3563 (2010).
277. Maruyama, T. *et al.* Distribution of Th17 cells and FoxP3(+) regulatory T cells in tumor-infiltrating lymphocytes, tumor-draining lymph nodes and peripheral blood lymphocytes in patients with gastric cancer. *Cancer Science* **101**, 1947–1954 (2010).
278. Tosolini, M. *et al.* Clinical impact of different classes of infiltrating T cytotoxic and helper cells (Th1, th2, treg, th17) in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* **71**, 1263–1271 (2011).
279. Kryczek, I. *et al.* Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* **114**, 1141–1149 (2009).
280. Derhovanessian, E. *et al.* Pretreatment frequency of circulating IL-17+CD4+ T-cells, but not Tregs, correlates with clinical response to whole-cell vaccination in prostate cancer patients. *International Journal of Cancer* **125**, 1372–1379 (2009).
281. Takahashi, H., Numasaki, M., Lotze, M. T. & Sasaki, H. Interleukin-17 enhances bFGF-, HGF- and VEGF-induced growth of vascular endothelial cells. *Immunol Lett* **98**, 189–193 (2005).
282. Benevides, L. *et al.* IL17 Promotes Mammary Tumor Progression by Changing the Behavior of Tumor Cells and Eliciting Tumorigenic Neutrophils Recruitment. *Cancer Res* **75**, 3788–3799 (2015).
283. He, D. *et al.* IL-17 Promotes Tumor Development through the Induction of Tumor Promoting Microenvironments at Tumor Sites and Myeloid-Derived Suppressor Cells. *The Journal of Immunology* **184**, 2281–2288 (2010).
284. Van Anh, D. T., Park, S. M., Lee, H. & Kim, Y. S. The Membrane-Bound Form of IL-17A Promotes the Growth and Tumorigenicity of Colon Cancer Cells. *Mol Cells* **39**, 536–542 (2016).

Références Bibliographiques

285. Tartour, E. *et al.* Interleukin 17, a T-cell-derived Cytokine, Promotes Tumorigenicity of Human Cervical Tumors in Nude Mice. *Cancer Res* **59**, 3698–3704 (1999).
286. Wang, L. *et al.* IL-17 can promote tumor growth through an IL-6-Stat3 signaling pathway. *J Exp Med* **206**, 1457–1464 (2009).
287. Iida, T. *et al.* Tumor-infiltrating CD4⁺ Th17 cells produce IL-17 in tumor microenvironment and promote tumor progression in human gastric cancer. *Oncol Rep* **25**, 1271–1277 (2011).
288. Perez, L. G. *et al.* TGF- β signaling in Th17 cells promotes IL-22 production and colitis-associated colon cancer. *Nat Commun* **11**, 2608 (2020).
289. Yang, S. *et al.* Foxp3+IL-17⁺ T cells promote development of cancer-initiating cells in colorectal cancer. *Journal of Leukocyte Biology* **89**, 85–91 (2011).
290. Ma, C. & Dong, X. Colorectal Cancer–Derived Foxp3+IL-17⁺ T Cells Suppress Tumour-Specific CD8⁺ T Cells. *Scandinavian Journal of Immunology* **74**, 47–51 (2011).
291. Qian, X. *et al.* Interleukin-17 acts as double-edged sword in anti-tumor immunity and tumorigenesis. *Cytokine* **89**, 34–44 (2017).
292. Benchetrit, F. *et al.* Interleukin-17 inhibits tumor cell growth by means of a T-cell–dependent mechanism. *Blood* **99**, 2114–2121 (2002).
293. Haghshenas, M. R., Khademi, B., Faghih, Z., Ghaderi, A. & Erfani, N. Immune regulatory cells and IL17-producing lymphocytes in patients with benign and malignant salivary gland tumors. *Immunology Letters* **164**, 109–116 (2015).
294. Lv, L. *et al.* The Accumulation and Prognosis Value of Tumor Infiltrating IL-17 Producing Cells in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLOS ONE* **6**, e18219 (2011).
295. Muranski, P. *et al.* Tumor-specific Th17-polarized cells eradicate large established melanoma. *Blood* **112**, 362–373 (2008).
296. Guéry, L. *et al.* Ag-Presenting CpG-Activated pDCs Prime Th17 Cells That Induce Tumor Regression. *Cancer Res* **74**, 6430–6440 (2014).

Références Bibliographiques

297. Kryczek, I., Wei, S., Szeliga, W., Vatan, L. & Zou, W. Endogenous IL-17 contributes to reduced tumor growth and metastasis. *Blood* **114**, 357–359 (2009).
298. Hamaï, A. *et al.* Human TH17 Immune Cells Specific for the Tumor Antigen MAGE-A3 Convert to IFN- γ -Secreting Cells as They Differentiate into Effector T Cells In Vivo. *Cancer Res* **72**, 1059–1063 (2012).
299. Lawson, V. J., Maurice, D., Silk, J. D., Cerundolo, V. & Weston, K. Aberrant Selection and Function of Invariant NKT Cells in the Absence of AP-1 Transcription Factor Fra-2. *The Journal of Immunology* **183**, 2575–2584 (2009).
300. Carriere, J., Dorfleutner, A. & Stehlik, C. NLRP7: From inflammasome regulation to human disease. *Immunology* **163**, 363–376 (2021).
301. Eisenbarth, S. C. *et al.* NLRP10 is a NOD-like receptor essential to initiate adaptive immunity by dendritic cells. *Nature* **484**, 510–513 (2012).
302. Mirza, N., Sowa, A. S., Lautz, K. & Kufer, T. A. NLRP10 Affects the Stability of Abin-1 To Control Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology* **202**, 218–227 (2019).
303. Cho, S. X. *et al.* MHC class I transactivator NLRC5 in host immunity, cancer and beyond. *Immunology* **162**, 252–261 (2021).
304. Kobayashi, K. S. & van den Elsen, P. J. NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nat Rev Immunol* **12**, 813–820 (2012).
305. Muñoz-Wolf, N. & Lavelle, E. C. A Guide to IL-1 family cytokines in adjuvanticity. *The FEBS Journal* **285**, 2377–2401 (2018).
306. Poznanski, S. M. *et al.* Combined Stimulation with Interleukin-18 and Interleukin-12 Potently Induces Interleukin-8 Production by Natural Killer Cells. *JIN* **9**, 511–525 (2017).
307. Franchi, L., Eigenbrod, T. & Núñez, G. Cutting edge: TNF- α mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* **183**, 792–796 (2009).

Références Bibliographiques

308. Perregaux, D. & Gabel, C. A. Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. *J Biol Chem* **269**, 15195–15203 (1994).
309. Mariathasan, S. *et al.* Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature* **440**, 228–232 (2006).
310. Swanson, K. V., Deng, M. & Ting, J. P.-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* **19**, 477–489 (2019).
311. Chevriaux, A. *et al.* Cathepsin B Is Required for NLRP3 Inflammasome Activation in Macrophages, Through NLRP3 Interaction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, 167 (2020).
312. Martinon, F., Pétrilli, V., Mayor, A., Tardivel, A. & Tschopp, J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* **440**, 237–241 (2006).
313. Seok, J. K., Kang, H. C., Cho, Y.-Y., Lee, H. S. & Lee, J. Y. Regulation of the NLRP3 Inflammasome by Post-Translational Modifications and Small Molecules. *Frontiers in Immunology* **11**, 3877 (2021).
314. Ding, J. *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* **535**, 111–116 (2016).
315. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
316. Liu, X. *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* **535**, 153–158 (2016).
317. Gross, O. *et al.* Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1. *Immunity* **36**, 388–400 (2012).

Références Bibliographiques

318. Antonopoulos, C., El Sanadi, C., Kaiser, W. J., Mocarski, E. S. & Dubyak, G. R. Proapoptotic chemotherapeutic drugs induce noncanonical processing and release of IL-1 β via caspase-8 in dendritic cells. *J Immunol* **191**, 4789–4803 (2013).
319. Bossaller, L. *et al.* Cutting edge: FAS (CD95) mediates noncanonical IL-1 β and IL-18 maturation via caspase-8 in an RIP3-independent manner. *J Immunol* **189**, 5508–5512 (2012).
320. Shi, J. *et al.* Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature* **514**, 187–192 (2014).
321. Kayagaki, N. *et al.* Non-canonical inflammasome activation targets caspase-11. *Nature* **479**, 117–121 (2011).
322. Gaidt, M. M. *et al.* Human Monocytes Engage an Alternative Inflammasome Pathway. *Immunity* **44**, 833–846 (2016).
323. Ali, M. F., Dasari, H., Van Keulen, V. P. & Carmona, E. M. Canonical Stimulation of the NLRP3 Inflammasome by Fungal Antigens Links Innate and Adaptive B-Lymphocyte Responses by Modulating IL-1 β and IgM Production. *Front Immunol* **8**, 1504 (2017).
324. Ali, M. F., Dasari, H. & Carmona, E. M. NLRP3 Inflammasome Is Expressed in Human B Lymphocytes and Essential for Both Humoral and Innate Functions. in *B65. HOST-PATHOGEN INTERACTIONS* A4028–A4028 (American Thoracic Society, 2017). doi:10.1164/ajrccm-conference.2017.195.1_MeetingAbstracts.A4028.
325. Leal, V. N. C., Reis, E. C., Fernandes, F. P. & Pontillo, A. NLRP3 inflammasome activation profile in CD4 $^+$ T and CD19 $^+$ B lymphocytes from HIV-infected patients. *The Journal of Immunology* **204**, 225.8-225.8 (2020).
326. Zhang, C. *et al.* NLRP3 inflammasome induces CD4 $^+$ T cell loss in chronically HIV-1–infected patients. *J Clin Invest* **131**, (2021).
327. Arbore, G. *et al.* T helper 1 immunity requires complement-driven NLRP3 inflammasome activity in CD4 $^+$ T cells. *Science* **352**, (2016).

Références Bibliographiques

328. Shigeoka, A. A. *et al.* An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury. *J Immunol* **185**, 6277–6285 (2010).
329. Wang, W. *et al.* Inflammasome-Independent NLRP3 Augments TGF- β Signaling in Kidney Epithelium. *The Journal of Immunology* **190**, 1239–1249 (2013).
330. Wang, H. *et al.* Inflammasome-independent NLRP3 is required for epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Experimental Cell Research* **342**, 184–192 (2016).
331. Bracey, N. A. *et al.* Mitochondrial NLRP3 Protein Induces Reactive Oxygen Species to Promote Smad Protein Signaling and Fibrosis Independent from the Inflammasome. *J Biol Chem* **289**, 19571–19584 (2014).
332. Kim, S.-M. *et al.* Inflammasome-Independent Role of NLRP3 Mediates Mitochondrial Regulation in Renal Injury. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
333. Periasamy, S., Le, H. T., Duffy, E. B., Chin, H. & Harton, J. A. Inflammasome-Independent NLRP3 Restriction of a Protective Early Neutrophil Response to Pulmonary Tularemia. *PLOS Pathogens* **12**, e1006059 (2016).
334. Park, S.-H., Ham, S., Lee, A., Möller, A. & Kim, T. S. NLRP3 negatively regulates Treg differentiation through Kpna2-mediated nuclear translocation. *Journal of Biological Chemistry* **294**, 17951–17961 (2019).
335. Liu, Y. *et al.* NLRP3 regulates macrophage M2 polarization through up-regulation of IL-4 in asthma. *Biochem J* **475**, 1995–2008 (2018).
336. Liu, T. *et al.* USP19 suppresses inflammation and promotes M2-like macrophage polarization by manipulating NLRP3 function via autophagy. *Cell Mol Immunol* 1–12 (2020) doi:10.1038/s41423-020-00567-7.
337. Kongsomboonvech, A. K. *et al.* Naïve CD8 T cell IFN γ responses to a vacuolar antigen are regulated by an inflammasome-independent NLRP3 pathway and *Toxoplasma gondii* ROP5. *PLOS Pathogens* **16**, e1008327 (2020).

Références Bibliographiques

338. Arbore, G. *et al.* Complement receptor CD46 co-stimulates optimal human CD8+ T cell effector function via fatty acid metabolism. *Nat Commun* **9**, 4186 (2018).
339. Braga, T. T. *et al.* NLRP3 gain-of-function in CD4+ T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Sci (Lond)* **133**, 1901–1916 (2019).
340. Chang, C.-H. *et al.* Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. *Cell* **153**, 1239–1251 (2013).
341. Arnold, I. C. *et al.* NLRP3 Controls the Development of Gastrointestinal CD11b+ Dendritic Cells in the Steady State and during Chronic Bacterial Infection. *Cell Reports* **21**, 3860–3872 (2017).
342. Guo, C. *et al.* NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clinical & Experimental Immunology* **194**, 231–243 (2018).
343. Yang, C.-A., Huang, S.-T. & Chiang, B.-L. Sex-dependent differential activation of NLRP3 and AIM2 inflammasomes in SLE macrophages. *Rheumatology* **54**, 324–331 (2015).
344. Martínez-Godínez, M. A. *et al.* Expression of NLRP3 inflammasome, cytokines and vascular mediators in the skin of systemic sclerosis patients. *Isr Med Assoc J* **17**, 5–10 (2015).
345. Li, Z., Guo, J. & Bi, L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **130**, 110542 (2020).
346. Barclay, W. & Shinohara, M. L. Inflammasome activation in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Brain Pathol* **27**, 213–219 (2017).
347. Zahid, A., Li, B., Kombe, A. J. K., Jin, T. & Tao, J. Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
348. Hoffman, H. M., Mueller, J. L., Broide, D. H., Wanderer, A. A. & Kolodner, R. D. Mutation of a new gene encoding a putative pyrin-like protein causes familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome. *Nat Genet* **29**, 301–305 (2001).
349. Kuemmerle-Deschner, J. B. *et al.* NLRP3 E311K mutation in a large family with Muckle-Wells syndrome - description of a heterogeneous phenotype and response to treatment. *Arthritis Res Ther* **13**, R196 (2011).

Références Bibliographiques

350. Kuemmerle-Deschner, J. B. *et al.* Treatment of Muckle-Wells syndrome: analysis of two IL-1-blocking regimens. *Arthritis Res Ther* **15**, R64 (2013).
351. Kuemmerle-Deschner, J. B. *et al.* Efficacy and safety of anakinra therapy in pediatric and adult patients with the autoinflammatory Muckle-Wells syndrome. *Arthritis Rheum* **63**, 840–849 (2011).
352. Alexander, T. *et al.* Successful treatment of acute visual loss in Muckle-Wells syndrome with interleukin 1 receptor antagonist. *Annals of the Rheumatic Diseases* **64**, 1245–1246 (2005).
353. Kim, S.-M. *et al.* Inflammasome-Independent Role of NLRP3 Mediates Mitochondrial Regulation in Renal Injury. *Front Immunol* **9**, 2563 (2018).
354. Saradna, A., Do, D. C., Kumar, S., Fu, Q.-L. & Gao, P. Macrophage Polarization and Allergic Asthma. *Transl Res* **191**, 1–14 (2018).
355. Okita, Y. *et al.* Role of tumor-infiltrating CD11b+ antigen-presenting cells in the progression of gastric cancer. *J Surg Res* **186**, 192–200 (2014).
356. Martin, B. N. *et al.* T cell-intrinsic ASC critically promotes TH17-mediated experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Immunol* **17**, 583–592 (2016).
357. Yoshimura, A., Wakabayashi, Y. & Mori, T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF- β . *The Journal of Biochemistry* **147**, 781–792 (2010).
358. Vila-del Sol, V., Punzón, C. & Fresno, M. IFN-gamma-induced TNF-alpha expression is regulated by interferon regulatory factors 1 and 8 in mouse macrophages. *J Immunol* **181**, 4461–4470 (2008).
359. Solaymani-Mohammadi, S. & Berzofsky, J. A. Interleukin 21 collaborates with interferon- γ for the optimal expression of interferon-stimulated genes and enhances protection against enteric microbial infection. *PLoS Pathogens* **15**, e1007614 (2019).
360. Delneste, Y. *et al.* Interferon- γ switches monocyte differentiation from dendritic cells to macrophages. *Blood* **101**, 143–150 (2003).
361. Zhao, Q. *et al.* IFN- γ mediates graft-versus-breast cancer effects via enhancing cytotoxic T lymphocyte activity. *Experimental and Therapeutic Medicine* **8**, 347–354 (2014).

Références Bibliographiques

362. Whitmire, J. K., Tan, J. T. & Whitton, J. L. Interferon- γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *Journal of Experimental Medicine* **201**, 1053–1059 (2005).
363. Becher, B., Tugues, S. & Greter, M. GM-CSF: From Growth Factor to Central Mediator of Tissue Inflammation. *Immunity* **45**, 963–973 (2016).
364. Calzascia, T. *et al.* TNF-alpha is critical for antitumor but not antiviral T cell immunity in mice. *J Clin Invest* **117**, 3833–3845 (2007).
365. Lord, G. M. *et al.* T-bet is required for optimal proinflammatory CD4+ T-cell trafficking. *Blood* **106**, 3432–3439 (2005).
366. Fukuoka, N. *et al.* Eomesodermin promotes interferon- γ expression and binds to multiple conserved noncoding sequences across the *Ifng* locus in mouse thymoma cell lines. *Genes Cells* **21**, 146–162 (2016).
367. Lin, J. T., Martin, S. L., Xia, L. & Gorham, J. D. TGF- β 1 Uses Distinct Mechanisms to Inhibit IFN- γ Expression in CD4+ T Cells at Priming and at Recall: Differential Involvement of Stat4 and T-bet. *The Journal of Immunology* **174**, 5950–5958 (2005).
368. Takimoto, T. *et al.* Smad2 and Smad3 Are Redundantly Essential for the TGF- β -Mediated Regulation of Regulatory T Plasticity and Th1 Development. *The Journal of Immunology* **185**, 842–855 (2010).
369. Gu, A.-D., Wang, Y., Lin, L., Zhang, S. S. & Wan, Y. Y. Requirements of transcription factor Smad-dependent and -independent TGF- β signaling to control discrete T-cell functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 905–910 (2012).
370. Mh, L. *et al.* IFN- γ and IL-12 synergize to convert in vivo generated Th17 into Th1/Th17 cells. *European journal of immunology* **40**, (2010).
371. Connolly, E. C., Freimuth, J. & Akhurst, R. J. Complexities of TGF- β Targeted Cancer Therapy. *Int J Biol Sci* **8**, 964–978 (2012).
372. Neri, D. & Sondel, P. M. Immunocytokines for cancer treatment: past, present and future. *Curr Opin Immunol* **40**, 96–102 (2016).

Références Bibliographiques

373. Wu, N. *et al.* Discovery of a novel selective water-soluble SMAD3 inhibitor as an antitumor agent. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **30**, 127396 (2020).
374. Wang, D. *et al.* Glioblastoma-targeted CD4⁺ CAR T cells mediate superior antitumor activity. *JCI Insight* **3**, (2018).
375. Zhang, H. *et al.* First-in-Human CD4 CAR Clinical Trial on Peripheral T-Cell Lymphoma. *Blood* **134**, 2881 (2019).

Publications scientifiques

I. Articles et revues

“Modulation of CD4 T Cell Response According to Tumor Cytokine Microenvironment”, **T. Accogli**, M. Bruchard, F. Végran, 2021, *Cancers (Basel)*.

“The Tumor Microenvironment Impairs Th1 IFN γ Secretion through Alternative Splicing Modifications of Irf1 Pre-mRNA”, A. Bernard, C. Hibos, C. Richard, E. Viltard, S. Chevrier, S. Lemoine, J. Melin, E. Humblin, R. Mary, **T. Accogli**, F. Chalmin, M. Bruchard, P. Peixoto, E. Hervouet, L. Apetoh, F. Ghiringhelli, F. Végran, R. Boidot, 2021, *Cancer Immunol. Res.*

“Saracatinib impairs maintenance of human T-ALL by targeting the LCK tyrosine kinase in cells displaying high level of lipid rafts”, A. Buffière, **T. Accogli**, L. Saint-Paul, G. Lucchi, B. Uzan, P. Ballerini, JN. Bastie, L. Delva, F. Pflumio, R. Quéré, 2018, *Leukemia*.

“Follicular helper-T cells restore CD8 + -dependent antitumor immunity and anti-PD-L1/PD-1 efficacy”, J. Niogret, H. Berger, C. Rebe, R. Mary, E. Ballot, C. Truntzer, M. Thibaudin, V. Derangère, C. Hibos, L. Hampe, D. Rageot, **T. Accogli**, P. Joubert, B. Routy, J. Harker, F. Vegran, F. Ghiringhelli, F. Chalmin, 2021, *J Immunother Cancer*.

II. Présentations orales ou posters

Forum des Jeunes Chercheurs 25ème édition, 13 Juin 2019. Communication orale : “ Targeting the transcriptional functions of NLRP3 to promote Th17 CD4 antitumor response in situ ”, **T. Accogli**, E. Humblin, F. Chalmin, J. Melin, R. Mary, A. Bernard, M. Bruchard, R. Boidot, F. Ghiringhelli, F. Végran.

Journée scientifique interrégionale GIRCI Est – Cancéropôle Est Infectiologie et cancérologie, 19 Novembre 2019. Poster: “ Induction of Treg plasticity through Oxaliplatin treatment. ”, **T. Accogli**, M. Caillaud, F. Végran.

Forum des Jeunes Chercheurs 24ème édition, 14 Juin 2018. Communication Orale: “ Targeting the transcriptional functions of NLRP3 to promote Th17 CD4 antitumor response in situ ”, **T. Accogli**, E. Humblin, F. Chalmin, J. Melin, R. Mary, A. Bernard, M. Bruchard, R. Boidot, F. Ghiringhelli, F. Végran.

III. Vulgarisation scientifique


28 Janvier 2021, 15 Février 2020, 5/6/14 Novembre 2019. Ateliers: “Les lymphocytes Th17 peuvent-ils lutter contre le cancer ?” **T.Accogli**.

27 Novembre 2020. Nuit Européenne des Chercheurs, Atelier *Speed-Searching*

5 Avril 2020. Live YouTube: “Les lymphocytes Th17 peuvent-ils lutter contre le cancer ?” **T.Accogli**.

Review

Modulation of CD4 T Cell Response According to Tumor Cytokine Microenvironment

Théo Accogli^{1,2,3}, Mélanie Bruchard^{1,2,3,4} and Frédérique Végran^{1,2,3,4,*} 

¹ Faculté des Sciences de Santé, Université Bourgogne Franche-Comté, 21000 Dijon, France; theo.accogli@inserm.fr (T.A.); melanie.bruchard@u-bourgogne.fr (M.B.)

² CRI INSERM UMR1231 “Lipids, Nutrition and Cancer”, Team “CAAdIR”, 21000 Dijon, France

³ LipSTIC LabEx, 21000 Dijon, France

⁴ Centre Georges François Leclerc, 21000 Dijon, France

* Correspondence: frederique.vegran@inserm.fr

Simple Summary: It is now accepted that CD4 T lymphocytes play an essential role in the anti-tumor response. CD4 T lymphocytes can activate and regulate several aspects of innate and adaptive immunity and participate in the rejection of tumors. Understanding the impact of the tumor, through cytokines present in the microenvironment, but also the effect of anti-cancer therapies are critical aspects of immunotherapy research aiming at improving the anti-tumor response dependent on CD4 T lymphocytes.

Abstract: The advancement of knowledge on tumor biology over the past decades has demonstrated a close link between tumor cells and cells of the immune system. In this context, cytokines have a major role because they act as intermediaries in the communication into the tumor bed. Cytokines play an important role in the homeostasis of innate and adaptive immunity. In particular, they participate in the differentiation of CD4 T lymphocytes. These cells play essential functions in the anti-tumor immune response but can also be corrupted by tumors. The differentiation of naïve CD4 T cells depends on the cytokine environment in which they are activated. Additionally, at the tumor site, their activity can also be modulated according to the cytokines of the tumor microenvironment. Thus, polarized CD4 T lymphocytes can see their phenotype evolve, demonstrating functional plasticity. Knowledge of the impact of these cytokines on the functions of CD4 T cells is currently a source of innovation, for therapeutic purposes. In this review, we discuss the impact of the major cytokines present in tumors on CD4 T cells. In addition, we summarize the main therapeutic strategies that can modulate the CD4 response through their impact on cytokine production.

Keywords: CD4; cytokines; cancer; immunotherapy



Citation: Accogli, T.; Bruchard, M.; Végran, F. Modulation of CD4 T Cell Response According to Tumor Cytokine Microenvironment. *Cancers* **2021**, *13*, 373. <https://doi.org/10.3390/cancers13030373>

Academic Editor: Karen E. Pollok

Received: 15 December 2020

Accepted: 18 January 2021

Published: 20 January 2021

Publisher’s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

CD4 T cells are key components of the immune system that shape the anticancer immune response in animal models but also in humans. Studies have shown that CD8 response requires CD4 “helper” functions [1–3]. At the same time, CD4 T cells can have cytotoxic activity and during adoptive transfer experiments in mice, they can induce an anti-tumor response [4]. Another study revealed that CD4 T cells can recognize neoantigens in melanoma [5]. In addition, patients who have received neoantigenic vaccines show induction of an antigen-specific CD4 T response [6,7]. The biology of CD4 T cells is complex because naïve T cells can differentiate into various subpopulations with different functions. Since the original classification by Mosmann and Coffman of CD4 T lymphocytes into Th1 (Thelper 1) and Th2 subsets [8], the repertoire of CD4 T cell subsets has expanded to include additional effector T cell subsets like Th17 cells [9–11], Follicular helper T cells (Tfh) [12] and Foxp3 (Forkhead box P3) regulatory T cells (Tregs) [13]. The relevance of these CD4 T

cell subtypes has been documented in various immunopathological conditions such as inflammatory diseases and cancer [14–16]. In 2008, IL (Interleukin)-9-producing CD4 T helper cells (Th9) were identified as a new subset of CD4 T helper cells that are proinflammatory *in vivo* [17,18]. IL-2 and IFN γ (Interferon) producing CD4 T cells such as Th1 have been shown to play an essential role in the induction and persistence of anti-tumor CD8 T cells. Conversely, Tregs have a pro-tumor role through their immunosuppressive activity. Th2 and Th17 are thought to have pro-tumor functions due to the cytokines they produce [19,20] but their roles are still controversial. Understanding the differentiation mechanisms of these cells, but also the impact of the tumor environment on their differentiation and activity could allow the development of innovative therapeutic strategies.

2. Cytokine Environment of Tumors

Cytokines are chemical mediators synthesized by different cells in an organism. They have been grouped into subsets according to the cells that produce them (monokines produced by myeloid cells, lymphokines produced by lymphocytes, interleukins produced by leukocytes, and chemokines responsible for the migration of leukocytes). They can also be classified according to their predominant role: interleukins, interferons, TNFs (Tumor Necrosis Factor), growth factors, and chemokines. Interleukins are cytokines that serve as a messenger between different immune cells. They are mainly produced during inflammatory reactions. Tumors are indeed composed of multiple cell types, including innate and adaptive immune cells that have a profound impact on tumor progression [21]. However, immune activation during tumor progression can lead to contrasting outcomes. Chronic activation of immune effector cells by tumor cells triggers the release of pro-inflammatory cytokines, chemokines, and other bioactive mediators, thereby creating an inflammatory milieu. This chronic inflammation, which has been observed in cases of obesity or smoking, leads to high risks of cancer [22]. In addition, recent studies show that unresolved inflammation promotes tumor progression, for example by promoting the stability of p53 mutants [23]. In contrast, the immuno-surveillance concept, initially brought up by Burnet in 1957 and later substantiated by mouse and human findings, states the immune system is capable of limiting tumor development [24]. In this context, there is a balance shift from inhibitory to activating cytokines to generate a protective anti-cancer response.

TGF β (Transforming Growth Factor) is frequently present in the tumor microenvironment. It was initially described as a signal to prevent premalignant progression but became a factor that malignant cells use to their own advantage. The presence of these immune-infiltrating cells, known for their capacity to produce TGF β coincides with the amount of TGF β [25] providing additional complexity in the regulation of this cytokine.

Tissue damage occurring during tumor development and the release of alarm cytokines such as IL-1 α , IL-1 β , and TNF α induce the production of IL-6, IL-10, IL-11, and IL-23 by tissues and myeloid cells. These cytokines, which allow an autoregulation loop under homeostatic conditions, will promote the proliferation of tumor cells, the healing of damaged tissues but also angiogenesis and tumor vascularization by induction of VEGF (Vascular Endothelial Growth factor) [26].

The inflammasome is a protein complex originally described in innate immune cells such as macrophages. The inflammasome sets up after the detection of so-called danger signals. A first signal (priming), generally dependent on TLR (Toll-Like Receptor) will allow the induction of NLRP3 (NOD-Like Receptor family Pyrin domain containing 3) and IL-1 β gene expression [27]. A second signal, such as efflux of potassium following an alteration of the cell membrane, lysosomal destabilization, or even mitochondrial damage, activates the inflammasome and induces its formation. The composition of the inflammasome varies depending on the activator. The NLRP3 inflammasome is the best described. It is made up of the NLRP3 protein, ASC (Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD) adapter, and Caspase-1, which is activated when the inflammasome sets in. The Caspase-1 once activated can participate in the maturation of

the pro-inflammatory cytokines IL-1 β and IL-18 [28]. Some cancer, including advanced melanoma, spontaneously release IL-1 β [29]. IL-33 is a member of the IL-1 superfamily [30]. It is now well known to have an important role in innate and adaptive immunity through its contribution to tissue homeostasis and to stress responses such as tumor development. IL-33 is constitutively expressed at high levels in the nucleus of human and murine tissue mucosa and in various cell types, such as endothelial cells [31,32] and barrier tissue epithelial cells [32,33]. Fibroblast reticular cells of lymphoid tissues and cells of the central nervous systems represent a major source of IL-33 [32,34].

Immune cells are the main cytokine producers in tumors. IL-2 is produced mainly by CD4 T cells simulated by an antigen, but also by NK (Natural Killer) and activated dendritic cells [35,36]. TNF α is produced primarily by activated macrophages, but can also be produced by many other immune cells. IL-4, the most important Th2 cytokine, is mainly produced by activated T cells, mast cells, basophils, and eosinophils. IFN γ is predominantly produced by NK cells in the innate arm of the immune system, as well as by effector T cells like CD4 and CD8 T cells in the adaptive arm of the immune system and could be regulated by miRNA [37,38]. Innate lymphoid cells have also been shown to produce IFN γ [39,40]. Varying degrees of IFN γ are also secreted by mucosal epithelial cells and macrophages [41]. Regarding the cell source of IL-27, this cytokine is mainly produced by cells of myeloid origin such as monocytes, macrophages, dendritic cells, and microglial cells, in response to stimuli acting through Toll-like receptors [42] or TNF-R-family members, for example, CD40L [43]. Finally, IL-12 was originally identified as an NK cell-stimulatory factor with multiple biologic effects on lymphocytes [44]. It is mainly produced by APCs (Antigen Presenting Cells) and B cells upon TLR engagement [45].

3. Impact of Cytokines from the Tumor Microenvironment on CD4 T Cells

3.1. Protumor Effects

3.1.1. TGF β

TGF β is a pleiotropic cytokine that acts by the engagement of a tetrameric receptor composed of the TGF β I and II receptors. The binding of TGF β to its receptor triggers serine/threonine kinase receptor activity, allows phosphorylation of downstream signaling targets. TGF β signaling is primarily mediated by the SMAD family transcription factors but is also known to initiate Smad-independent pathways. The induction of Tregs peripheral differentiation is directed, among other things, by environmental stimuli such as the presence of TGF β [46]. The key role of TGF β in inducing Foxp3 expression in Tregs was identified by studies showing that deletion of CNS1 (Conserved Non-coding Sequence) region of Foxp3 (which contains the conserved Smad3 binding sequence) or the Smad binding site itself, results in a reduction of Tregs [47]. Moreover, the TGF β present in the tumor microenvironment can interfere with conventional T cell activation by inhibiting TCR (T Cell Receptor) signaling [48,49]. It is also able to inhibit T helper subtypes by suppressing the expression of the transcription factors defining their profile, such as Tbet (T-box transcription factor) and Gata3, which are essential for Th1 and Th2 respectively [50,51]. Several works have demonstrated the redundant roles of the Smad2 and Smad3 transcription factors in the inhibition of Th1 differentiation by TGF β [52]. The Smad signaling pathway has also been shown to induce the transcription factor SOX4 (SRY-Box Transcription Factor) which interferes with Gata3 activity during Th2 differentiation [53]. A recent study showed that the specific targeting of TGF β signaling in CD4 T cells, via a TGFBR2 coupled to a CD4 antibody induces an anti-tumor response mediated by IL-4 in a mouse breast cancer model [54]. Finally, Th17 cells harbor ambivalent effect on cancer [55] but it seems that TGF β could be responsible for immunosuppressive and pro-tumor functions of Th17 cells [56] (Table 1).

Table 1. Effects of cytokines present in the tumor microenvironment on the immune response, CD4 T cells, and tumor growth.

Cytokines	Effect on Immune Response	Associated CD4 T Cell Subsets	Effect on Tumor Growth	References
TGF β	Immunosuppressive	Treg, Th9	Promotion	[47,50,51,56]
IL-6	Inflammatory	Th17	Promotion	[57,58]
IL-2	Inflammatory	All	Ambivalent	[59–68]
IL-1	Inflammatory	Th17, Th9	Ambivalent	[69–74]
TNF α	Inflammatory	Th1, Th17	Ambivalent	[75–78]
IL-23	Inflammatory	Th17	Ambivalent	[79]
IL-17	Inflammatory	Th17	Promotion	[80]
IL-4	Immunosuppressive	Th2, Th9	Ambivalent	[54,81,82]
IL-13	Immunosuppressive	Th2	Promotion	[83]
IL-33	Immunosuppressive	Th2	Promotion	[84,85]
IFNs type I	Inflammatory	Th1	Inhibition	[86–88]
IFN type II	Inflammatory	Th1	Inhibition	[89]
IFN type III	Inflammatory	Th1	Inhibition	[90–93]
IL-12	Inflammatory	Th1	Inhibition	[94–96]
IL-15	Immunosuppressive	Th1	Promotion	[95]
IL-18	Inflammatory	Th1	Inhibition	[95]

3.1.2. IL-6

Canonical IL-6 signaling pathway depends on its IL-6R membrane receptor, which is a common receptor for IL-6, IL-11, LIF (Leukemia Inhibitory Factor), Oncostatin, caryotrophine-1, and IL-35. The homodimerization of this receptor during IL-6 binding leads to the activation of Tyrosine Kinases associated with IL-6R, JAK1 (Janus Kinase), JAK2, and TYK2 (Tyrosine Kinase) and to the phosphorylation, translocation, and activation of STAT1 (Signal Transducer and Activator of Transcription) and STAT3 [97,98]. Induction of this pathway is responsible for T cell proliferation and commitment to the Th17 and Tfh subtypes [99,100]. IL-6 blocks Foxp3 activity, limiting the ability of TGF β to promote the development of Tregs. Thus, by participating in the Th17 differentiation, IL-6 amplifies the pro-inflammatory response [57,58,101] (Figure 1 and Table 1).

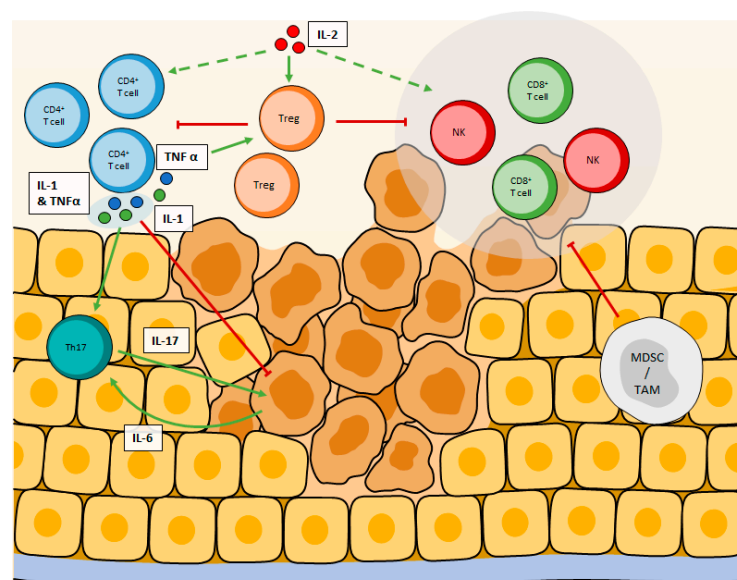


Figure 1. Ambivalent cytokines modulating CD4⁺ T cell responses in the tumor microenvironment. IL-2 stimulates both CD4⁺, CD8⁺, and NK cells but has a greater affinity for the IL2R $\alpha\beta\gamma$ expressed by Tregs. High doses of IL-2 enhance anti-tumor immune response while low doses preferentially stimulate Tregs proliferation, leading to immune suppression. Similarly, while high doses of TNF α and IL-1 have anti-tumor effects, in the lower amount, they both stimulate Th17 cells, plus Tregs for TNF α , leading to angiogenesis and immunosuppression, which favor tumor growth.

3.1.3. IL-2

IL-2 is a key regulator of T cell survival, differentiation, and proliferation [102]. It is the most studied cytokine in the field of cancer immunotherapy [103]. Activation of the CD25 receptor (or IL-2R) by IL-2 will lead to cytosolic signaling pathways dependent on serine/threonine kinases which make it possible to initiate the activity of mTORC1 (Target Of Rapamycin Complex), which in turn modulates cell metabolism [104]. However, STAT5 is the critical mediator of IL-2 signals [105–107]. Analysis of STAT5 binding sites using Chromatin Immunoprecipitation in CD4 T cells have shown that a number of essential transcription factors defining CD4 T cells are direct STAT5 target genes. These include Foxp3 [59,60], Tbet21 [61], Maf [62], and Gata3 [63]. However, not all STAT5 binding sites are associated with increases in gene expression: binding of STAT5 to the *il17a* locus is repressive, thus inhibiting STAT3-mediated transcription of the *il17* gene and suppressing the differentiation into Th17 cells [64]. Likewise, STAT5 has been shown to bind to the *bcl6* promoter in CD4 T cells [65,108], correlating with repressed expression of the gene and thus limiting the differentiation of TFh [65]. The IL-2 receptor (IL-2R) is made up of 3 subunits α, β, γ . IL-2 has a better binding affinity with the IL-2R $\alpha\beta\gamma$ complex than with the other combinations and in particular the simple or heterodimeric IL-2R [109]. Tregs have the greatest affinity for IL-2 among T cells [102]. These cells, which prevent the development of autoimmunity under homeostatic conditions [110] have immunosuppressive and pro-tumor effects. CD4 T lymphocytes evolving in a tumor environment rich in IL-2 (in association with TGF β) express the transcription factor Foxp3, which impairs the differentiation of Tregs and the production of IL-10, that participate in an immunosuppressive microenvironment [66–68]. In this context, Tregs are capable of suppressing the anti-tumor functions of CD4, CD8, and NK cells, leading to an absence of effective anti-tumor immune response (Figure 1 and Table 1).

3.1.4. IL-1

IL-1 β is undoubtedly a cytokine with an ambivalent role. Indeed, the IL-1 β secreted in the tumor microenvironment induces the secretion of IL-17 through its effect on CD4 T cells, by driving the differentiation and expansion of Th17 cells, which promote angiogenesis and tumor growth via the STAT3 signaling pathway [69,80]. IL-17 also recruits MDSCs, exhibiting major immunosuppressive activity [70,71]. Conversely, for several years, studies have shown that IL-1 β can participate in the eradication of tumors. Indeed, it is one of the cytokines constantly associated with the effective eradication of cancer by a Th1 response, in particular in myeloma and B lymphoma [72]. In this study, the authors propose that IL-1 α and β could promote tumor progression, but in association with other cytokines, in particular, those signaling a Th1 response and their effects on macrophages, they rather promote an anti-tumor immune response. In another study, a team confirmed that IL-1 α and β are essential for a complete Th1- induced anti-tumor response in melanoma [73]. Th9 cells are closely related to the Th2 lineage, which generally antagonizes Th1 responses. However, Th9 cells and their anti-tumor cytokine IL-9 are powerful anti-tumor agents, which can be exploited in cell therapy [111]. Typically induced by IL-4 and TGF β , the absence of the latter could be replaced by IL-1 β to promote Th9 cells [112]. Moreover, Th9 cells differentiated in presence of TGF β and IL-4 harbor higher anti-tumor activity when IL-1 β is present [74] (Table 1). In short, it seems that the concentration of IL-1 is the key to understand its effects on tumor growth. While a low concentration would trigger pro-tumor events in the tumor microenvironment and stimulate tumor growth, metastasis, and angiogenesis, high doses of IL-1 promote anti-tumor responses. However, it is necessary to keep in mind that high concentrations of IL-1 can have serious toxic effects [113] (Figure 1).

3.1.5. TNF α

TNF α is a powerful anti-tumor cytokine. TNF α was identified in 1975 and named after its ability to induce necrosis of mice sarcomas when injected at high concentrations [75]. Signaling cascades induced by its binding to one of its receptors (TNFR1, TNFR2) induce

cell death by necrosis or apoptosis. This is why $\text{TNF}\alpha$ was one of the first cytokines clinically used for the treatment of cancer [114]. Concerning T cells, $\text{TNF}\alpha$ appears to be one of the weapons of antigen-specific CD8 T cells to eradicate tumor cells [76]. To focus on CD4, a recent study used CD4 T cell-based adoptive immunotherapy to treat CT26 colorectal tumors. The authors show that antigen-specific CD4 T cells can eradicate established CT26 tumors when injected after cyclophosphamide treatment. This is achieved through cytokine-mediated CD4 response, and mostly via $\text{TNF}\alpha$, which synergize with chemotherapy to induce ROS (Reactive Oxygen Species) in CT26 cells [115]. The authors also mention that $\text{IFN}\gamma$ may be necessary and that the efficacy of T cells to achieve a complete eradication may rely on the concomitant secretion of both $\text{IFN}\gamma$ and $\text{TNF}\alpha$. Still, the anti-tumor effects of $\text{TNF}\alpha$ require greater concentrations than cells can physiologically produce within the tumor. Unexpectedly from a cytokine called after its ability to induce cancer cell death, pro-tumor effects of $\text{TNF}\alpha$ have also been reported. Indeed, $\text{TNF}\alpha$ deficient mice as well as TNFR1 or TNFR2 deficient mice are resistant to skin tumor development [116]. The mechanisms underlying this may imply CD4 T cells. Indeed, although considered to be an anti-tumor factor at high concentrations [117], $\text{TNF}\alpha$ exhibits a deleterious effect due to its ability to stimulate regulatory CD4 T cells. Several studies carried out in vitro using mouse material show an increase in the proliferation, survival, stability, expression of CD25 and Foxp3, as well as an increase in the immunosuppressive functions of Tregs, treated with $\text{TNF}\alpha$ [77,78,118,119] (Table 1). Tregs from human blood all express high levels of TNFR2 while other CD4 T cells express lower levels of this receptor [120]. Likewise, in mice, more than 90% of Foxp3+ cells present in peripheral lymphoid organs express TNFR2 [77]. Indeed, to secrete IL-17A and recruit myeloid cells into the tumor in a mouse ovarian cancer model, CD4 T cells need the expression of TNFR1 [121]. In addition, TNFR2 seems to be upstream of a pathway that favors Tregs proliferation within the tumor [122] leading again to promote tumor growth. If stromal cells are the main source of $\text{TNF}\alpha$ within the tumor, CD4 T cells also produce $\text{TNF}\alpha$ in sufficient amount to inhibit CD8 T cells anti-tumor response but insufficient to impact tumor cells proliferation or viability [123]. Here again, the tipping point between pro and anti-tumor $\text{TNF}\alpha$ effects relies on its concentration. While high concentrations will trigger tumor cell death mechanisms, low doses activate pathways that sustain tumor growth (Figure 1).

3.1.6. Other Cytokines with Immunosuppressive Effect

IL-23 is a cytokine of the IL-12 family. It is an interleukin produced in response to DAMPS (Damage Associated Molecular Pattern) at the level of epithelial barriers [124]. IL-23 is present in the tumor microenvironment and triggers the production of IL-17 during Th17 differentiation in synergy with IL-6. It also contributes to the amplification of inflammation [124,125] and could be used in therapeutic strategies [79] (Figure 1 and Table 1).

Tumor cells may secrete factors to promote Th2 and TAM2 (Tumor-Associated Macrophage) polarization, which in turn amplify this type of inflammation via IL-4, IL-5 and IL-13, suppress anti-tumor Th1 polarization and responses [126], and correlate with MDSC infiltrates [83]. Nevertheless, IL-4 was recently described to have anti-tumor functions through angiogenic-dependent properties [54,81]. Besides its role in creating a macrophage-dependent tumorigenic niche, IL-33 may directly promote $\text{TGF}\beta$ elicited Tregs differentiation, suppress $\text{IFN}\gamma$, and promote Tregs stability in the tumor [84,85] (Table 1).

3.2. Antitumor Effects

IFNs are classified into three different types, numbered from I to III. The type I family consists of 18 members that all bind to the same heterodimer receptor composed of $\text{IFN-}\alpha/\beta$ receptor 1 and 2. $\text{IFN-}\alpha$ and $\text{IFN-}\beta$ are the most studied type I interferons and some anticancer treatment efficacy depends on their effects on the tumor microenvironment [86]. Mainly produced by DCs within the tumor and the tumor-draining lymph nodes, these cytokines can modulate lymphocyte responses. They are notably associated with tumor-specific CD8 T cell activation [127–129]. Regarding CD4 T cells, $\text{IFN-}\alpha$ is associated with

enhanced activation of CD4⁺ T cells [87] as well as a reduced frequency of Tregs within the tumor microenvironment [88] (Table 1). On the other hand, recent studies demonstrate that type I IFNs could protect cancer cells from CTLs (Cytotoxic T lymphocytes) [130]. They could be deleterious for CD4 and CD8 CAR-T (Chimeric Antigen Receptor) cells viability and it was proposed to render CAR-T insensitive to IFN I to avoid this inhibitory effect [131]. The type II family only consists of IFN- γ , which is also well studied in a cancer context [89]. Type III interferons, or interferons lambda, are the most recently discovered IFN. Structurally similar to type II IFN, their activity resembles the one of type I IFN [90]. Type III IFN are typically produced in response to viruses or bacteria and type 2 myeloid dendritic cells that have been described to be the main producer of IFN- λ [132]. IFN- λ inhibits growth and induces apoptosis of cancer cells in models of lung, liver, prostate, and breast cancer [90–93] (Table 1). T cells and NK display increased anti-tumor responses against various cancer models including melanoma, breast, and lung in the presence of IFN- λ [90]. However, this effect is most likely indirect as T cells express an extremely low amount of its receptor [133]. Its receptor, IFNLR1, is indeed expressed by few cell types and since IFN- λ has shown anti-tumor properties, it represents a great potential as an anti-cancer therapy with diminished side effects, compared to other IFN.

IL-12, derived from dendritic cells, provides an essential signal, which drives the expression of Tbet, and therefore the differentiation of Th1 effector cells [94–96] (Table 1). In addition, IL-2, IL-15, and IL-18 synergize with IL-12 to trigger the production of IFN γ and direct cytotoxicity of Th1 cells [67,95] (Table 1).

4. Effects of Diverse Treatments on CD4 T Cell Response

4.1. Cytokine Based Therapies

The first tests using recombinant interleukins have encountered severe toxicities problems, even leading to the death of patients. Nevertheless, many of these trials have shown immune responses during treatment, providing a proof of concept for interleukins therapy in cancer.

The first cytokine-based therapy against cancer ever administered used IL-2 but its use involves security concerns [103]. IL-2 is a pleiotropic cytokine produced mainly by T lymphocytes. It is essential for the survival of lymphocytes and plays an important role in the initiation and maintenance of antigen-specific immune responses. Promising pre-clinical evidence were obtained in several models using IL-2 based therapy with their efficacy being a consequence of T lymphocytes expansion and increase in effector functions. The high dose IL-2 regimens are very toxic and recent advances focus on modifying it to reduce toxicity and could help overcome this problem. On the other hand, low dose IL-2 regimens have been evaluated in several trials. However, in low abundance, IL-2 binds preferably to its high-affinity IL-2R $\alpha\beta\gamma$ receptor expressed on Tregs leading to their induction, thus preserving an immunosuppressive milieu in tumors [134]. Thus, a major concern about IL-2 therapy is the induction of Tregs via IL-2Ra (CD25). Several variants of IL-2 with an affinity towards the other IL-2R complex expressed by cytotoxic T cells are under development [135–137]. Some of these have an altered IL-2R α binding domain, to alter the induction of Tregs immunosuppressive responses while maintaining effector T cells and NK cells immune responses, like the F42A mutant [138], but it may also affect CTLs. A next-generation IL-2 is now studied to overcome all IL-2 defects: tumor targeting, toxicity, half-life, and CTLs preferential binding but not Tregs. In a recent study, Zinchen Sun and colleagues have shown the efficacy in mice of an IL-2 with several mutations to favor its affinity to CD122 and fusion with an IgG1 Fc fragment to increase its half-life and an anti-EGFR (Epidermal Growth factor-Receptor) to preferentially target the tumor [139]. This next-generation may be a new hope for IL-2 based treatments.

Years later, IL-21 became the new focus of cytokine-based therapy. IL-21 is a cytokine produced by activated CD4 T lymphocytes and its receptor is found on many populations of lymphocytes. It is known to stimulate Tfh, cytotoxic T lymphocytes, and NK cell proliferation and functions. IL-21 is essential for the differentiation of Tfh through its

clinical trials in pancreas carcinomas, triple-negative breast cancers, colorectal cancers, and melanoma. A phase 2 clinical study shows that the use of Anakinra restored the antitumor efficacy of 5-FU (5-FluoroUracil) in patients. Of the 32 patients enrolled, 5 presented a response (CHOI criteria) and 22 patients had a stable disease [146]. Another possible candidate is Rilonacept, the extracellular domain of IL-1RAcP (Interleukin-1 Receptor Accessory Protein) and IL-1R1 fused to the Fc part of human IgG1. It has a strong affinity with IL-1 β and IL-1 α , and strongly inhibits the activity of IL-1 [147]. However, these blockers inhibit both IL-1 β and IL-1 α , but IL-1 α may have synergistic or antagonistic effects, depending on the context.

Another interleukin associated with tumorigenesis, and therefore an attractive target for immunotherapy, is IL-6. The anti-IL-6 antibody Siltuximab has been studied in cancer patients. Although it has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for Unicentric Castleman's disease in 2014, its efficacy has not been proven in solid tumors. In prostate cancer and treatment of colorectal cancer, the best outcome was stable disease [148,149]. In combination with chemotherapy, the anti-IL-6R antibody Tocilizumab gave the first positive results in epithelial ovarian cancer and immunological response such as an increase in T lymphocyte activation has been observed [150] (Figure 2).

4.3. Treatments Targeting Regulatory T Lymphocytes

Regulatory T lymphocytes (Tregs) are an important immunosuppressive population, commonly found in tumors. One strategy to restore immune responses against a tumor is to get rid of these immunosuppressive cells. The study of the impact of chemotherapies on the immune system showed that several molecules were capable of targeting Tregs, like Cyclophosphamide [151], Paclitaxel [152], Temozolomide [153], and Imatinib [154].

Cyclophosphamide is a chemotherapy commonly used against neuroblastoma, sarcoma, and ovarian cancer amongst others. A low dose of cyclophosphamide (<300 mg/m²) is responsible for a decline in Tregs as observed in both humans and mice. The specificity of cyclophosphamide for Tregs is thought to be due to lower levels of ATP present in Tregs as compared with other T cells. This low level of ATP results in low levels of glutathione in Tregs that are consequently less efficient in detoxifying Cyclophosphamide [155]. However, this antitumor effect of Cyclophosphamide against Tregs is to be balanced by its capacity in mice and cancer patients to promote the differentiation of Th17 [156]. The role of Th17 is ambiguous, mainly depending on the cytokines present in the tumor alongside the Th17 so the promotion of its differentiation can have both positive and negative effects depending on the context [56].

Imatinib mesylate is a tyrosine kinase inhibitor of the oncogenic BCR-ABL protein (found in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia), KIT and platelets derived growth factor receptor- α . Imatinib has been described to inhibit Tregs activity by reducing FoxP3 expression [154]. In a model of the gastrointestinal stromal tumor, Imatinib induced Tregs apoptosis in the tumor bed by reducing the tumor expression of the immunosuppressive enzyme Indoleamine 2,3-DiOxygenase (IDO). Association with immunotherapy further improved imatinib efficiency against the tumor [157]. In patients with chronic myelogenous leukemia, imatinib-treated patients exhibited selective depletion of Tregs and a significant increase in effector/memory CD8 T cells [158].

Paclitaxel is a chemotherapeutic agent used in the treatment of various tumors like breast cancer, ovarian cancer, or lung cancer. Paclitaxel can reduce the expression of FoxP3, a master regulator of Tregs, associated with reduced inhibitory functions of these cells [159]. In patients with cervical cancer, paclitaxel was shown to induce a significant decrease in Tregs associated with increased rates of cytotoxic CD8 T cells in the tumor stroma [160].

Temozolomide is an alkylating agent known to prolong survival in patients with high-grade glioma, glioblastoma, and melanoma [161]. Temozolomide is responsible for a profound lymphopenia, including Tregs in humans but seems more specific to Tregs in mice [162] (Figure 2).

4.4. Immune Checkpoint Inhibitors

The identification of immune checkpoints blocking lymphocyte functions has led to the emergence of new strategies aiming at the reactivation of those lymphocytes. Immune checkpoints can be expressed by lymphocytes (PD-1, CTLA-4, TIGIT, TIM-3 . . .) with their ligands found on tumor cells, DCs (Dendritic Cell), and APCs. Lymphocyte populations found within the tumor bed harbor higher levels of immune checkpoint expression than in their healthy counterparts and are thus less active against the tumor. Lifting the immune checkpoints dependent immunosuppression allows the return of an anti-tumor immune response. Immune checkpoint inhibitors (ICIs), consisting of blocking antibodies targeting PD-1, PD-L1, and CTLA-4, have been the first ones to be authorized as anti-cancer therapies. Pembrolizumab and Nivolumab (anti-PD-1) showed promising results in melanoma patients as well as in non-small cell lung carcinoma patients with an objective response rate of about 45% [163–165]. Ipilimumab (anti-CTLA-4) is used against advanced melanoma but is often responsible for immune-related side effects [166]. It is now more commonly found associated with other treatments. Atezolizumab, Durvalumab, and Avelumab are antibodies targeting PD-L1. Anti-PD-L1 antibodies are used against urothelial cancers [167], NSCLC [168], small cell lung cancer [169], kidney cancer [170], or triple-negative breast cancer [171] and show promising results, often associated with other molecules. The percentage of patients responding to ICIs varies considerably between cancers. For instance, only 19% of triple-negative breast cancer patients responded to anti-PD-1 [172] when 87% of patients with relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma presented an objective response to anti-PD-1 [173]. The Association of Ipilimumab and Nivolumab in treating patients is rising as observed by the many ongoing phase II and III clinical trials. These trials concern patients with advanced kidney cancer (NCT03793166, NCT04510597), advanced melanoma (NCT02339571, NCT04511013), Hodgkin lymphoma (NCT01896999, NCT02408861), glioblastoma (NCT04396860, NCT04145115), and many other cancers. Association of Ipilimumab and nivolumab has been approved by the US FDA in NSCLC patients with a PD-L1 expression $\geq 1\%$ and seems to a higher survival rate in patients with PD-L1 $\geq 50\%$ when compared to platinum-based chemotherapy but its effects on progression-free survival or overall response remains to be determined [174]. On average, however, only about 20–25% of patients respond to ICIs alone. This can probably be explained by the weak infiltration of lymphocytes within the tumor in many cancers and is the reason why ICIs are often combined with other treatments [175]. Interestingly, the tumor mutation burden is a potential predictive biomarker regarding the likelihood of a tumor to respond to ICIs [176]. Checkpoint inhibitors are now used as single agents or combined with chemotherapies in about 50 cancer types. ICIs do not target one lymphocyte specifically but rather will affect all lymphocytes bearing its target (Figure 2).

4.5. Chemotherapy

Gemcitabine and 5-FU are two nucleoside analogs known to suppress MDSCs in several murine tumor models [177,178]. This suppression of MDSCs results in a reduced tumor growth dependent on T cells. These effects are however transient as dying MDSCs release IL-1 β that increase IL-17 producing CD4 T cells, establishing another form of immunosuppression [69]. The association of anti-IL-1 β with a 5-FU treatment was able to lead to full recovery in about 40% of mice. A phase 3 clinical trial is currently ongoing in colorectal cancer patients [146]. Doxorubicin can also target MDSC [179]. In a murine mammary cancer model, doxorubicin led to the reduction of MDSC frequencies in the spleen. This depletion allowed an increase in Granzyme B and IFN- γ production by effector T cells and NK cells.

Tumor-associated macrophages can be depleted using trabectedin [180], a treatment used in the treatment of advanced soft tissue sarcoma and ovarian cancer relapses. Trabectedin depletes TAM in a range from 30 to 77% observed in clinical studies through the induction of apoptosis. A molecule similar to Trabectedin, Lurbinectedin is also capable of reducing the TAM population in the treatment of small-cell lung cancer patients, alone or

in association with chemotherapies or CKI [181,182]. Other molecules, such as antibodies targeting CSF1R (Colony Stimulating Factor 1 Receptor) or liposome clodronate can also efficiently deplete TAM [183,184]. Polarizing TAM into the anti-tumor M1 phenotype is another strategy. Paclitaxel [185], Docetaxel [186], or a combination of chemotherapies (cyclophosphamide, doxorubicin, Vincristine) favor the polarization of TAM into the M1 phenotype, resulting in an increased lymphocyte response against the tumor as observed by delayed tumor growth kinetics [187].

Cytokines such as IFN γ or TNF α play crucial roles in the anti-tumor immune response. While some cancer treatments cause apoptotic cell death that is a silent cell death that does not induce an immune response, others such as anthracyclines can affect the death of cancer cells and activate the immune system. This type of cell death is called ICD (Immunogenic Cell Death). Cytokines produced during ICD may be pro-inflammatory such as TNF, IL-6, IL-8, or IL-1 β . They will induce the expression of Class I MHC (Major Histocompatibility Complex) on APCs and promote T cell differentiation [188–191]. The cytokinic response induced by ICD is essential for promoting anticancer immunity involving CD4 T cells and an increase in IFN γ production by Th1 and IL-17 produced by Th17 is observed [192] (Figure 2).

4.6. Radiotherapy

If radiotherapy is commonly used in association with other treatments (surgery, chemotherapy, or immunotherapy more recently), it also influences the immune response on its own in tumors. Radiotherapy is responsible for an increase in Tregs [193] and it was later suggested that Tregs were more resistant to radiotherapy than other lymphocytes [194]. Radiotherapy increases tumor-infiltrated Tregs that express higher levels of CTLA-4 compared to Tregs from non-irradiated tumors [195], setting an immunosuppressive environment. The TGF β production driven by radiation sustains the expression of FoxP3 in Tregs [195] but the association of radiation and immunotherapy against CTLA-4 resulted in long-term survival in a murine glioma model [196].

Interestingly, decreased percentages of Tregs were found in the peripheral blood of patients and a murine lung cancer model after radiotherapy [197]. A consensus is yet to be reached regarding the impact of radiotherapy on Tregs. Radiation dose, the scheme of treatment, tumor types are all variables that can influence the effect of radiotherapy on Treg and need to be taken into account (Figure 2).

5. Conclusions

Cytokines are key elements that orchestrate the tumor microenvironment. With a growing understanding of cancer biology and infiltrating immune cells such as CD4 T cells, the relevance of these cytokines and their functions, additional roles are likely to emerge.

Data concerning the role of a particular cytokine on CD4 T cells must be put in context, regarding the development of the tumor. Indeed, a cytokine can have an anti-tumor role at the beginning of carcinogenesis and harbor pro-tumor activity later on with the adaptation of the tumor and the impact of intra-tumor cytokines on the activity of CD4 T lymphocytes. Likewise, several cytokines exhibit antagonistic effects depending on their concentration depending on their effect on CD4 T cells among other things. These different elements must be taken into consideration before developing therapeutic strategies.

Similarly, it is important to note that the tumor environment is complex and that cytokines never evolve alone but always in concert. Thus, the effect of a therapy that would induce or conversely inhibit the effect of a cytokine can be partially prevented or even reversed depending on the cytokine milieu in the tumor microenvironment.

Cancer treatments by strategies modulating interleukins are quite complicated and require improvement to increase efficacy and decrease side effects. Recent therapeutic developments have shown that the neutralization of key pathways may have therapeutic activity in cancer patients by restoring the anti-tumor activity of CD4 T cells. For several candidates mentioned in this overview, the ongoing trials will reveal their efficacy and safety in randomized controlled settings. In line with the importance of cytokines, it is

now clear that virtually all cancer treatments will modify the cytokine milieu, sometimes at the detriment of the treatment's efficacy against cancer. Moreover, these treatments are nowadays associated with other therapies to treat patients. In particular, associations with immunotherapies such as immune checkpoint inhibitors are currently under scrutiny in various cancers, both in mice and humans. A complete understanding of the consequences of treatment on the intra-tumor cytokines would allow the establishment of more precise and efficient combinations of treatments, allowing modulation of CD4 T cells activity and increasing their effectiveness.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Janssen, E.M.; Lemmens, E.E.; Wolfe, T.; Christen, U.; von Herrath, M.G.; Schoenberger, S.P. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **2003**, *421*, 852–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sun, J.C.; Bevan, M.J. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **2003**, *300*, 339–342. [[CrossRef](#)]
- Shedlock, D.J.; Shen, H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **2003**, *300*, 337–339. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Quezada, S.A.; Simpson, T.R.; Peggs, K.S.; Merghoub, T.; Vider, J.; Fan, X.; Blasberg, R.; Yagita, H.; Muranski, P.; Antony, P.A.; et al. Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **2010**, *207*, 637–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Linnemann, C.; van Buuren, M.M.; Bies, L.; Verdegaal, E.M.; Schotte, R.; Calis, J.J.; Behjati, S.; Velds, A.; Hilkmann, H.; Atmioui, D.E.; et al. High-throughput epitope discovery reveals frequent recognition of neo-antigens by CD4+ T cells in human melanoma. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 81–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Ott, P.A.; Hu, Z.; Keskin, D.B.; Shukla, S.A.; Sun, J.; Bozym, D.J.; Zhang, W.; Luoma, A.; Giobbie-Hurder, A.; Peter, L.; et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* **2017**, *547*, 217–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sahin, U.; Derhovanessian, E.; Miller, M.; Kloke, B.P.; Simon, P.; Lower, M.; Bukur, V.; Tadmor, A.D.; Luxemburger, U.; Schrors, B.; et al. Personalized RNA mutanome vaccines mobilize poly-specific therapeutic immunity against cancer. *Nature* **2017**, *547*, 222–226. [[CrossRef](#)]
- Mosmann, T.R.; Cherwinski, H.; Bond, M.W.; Giedlin, M.A.; Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* **1986**, *136*, 2348–2357.
- Veldhoen, M.; Hocking, R.J.; Atkins, C.J.; Locksley, R.M.; Stockinger, B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* **2006**, *24*, 179–189. [[CrossRef](#)]
- Mangan, P.R.; Harrington, L.E.; O'Quinn, D.B.; Helms, W.S.; Bullard, D.C.; Elson, C.O.; Hatton, R.D.; Wahl, S.M.; Schoeb, T.R.; Weaver, C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **2006**, *441*, 231–234. [[CrossRef](#)]
- Betelli, E.; Carrier, Y.; Gao, W.; Korn, T.; Strom, T.B.; Oukka, M.; Weiner, H.L.; Kuchroo, V.K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* **2006**, *441*, 235–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Schaerli, P.; Willimann, K.; Lang, A.B.; Lipp, M.; Loetscher, P.; Moser, B. CXC chemokine receptor 5 expression defines follicular homing T cells with B cell helper function. *J. Exp. Med.* **2000**, *192*, 1553–1562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kumar, V.; Stellrecht, K.; Sercarz, E. Inactivation of T cell receptor peptide-specific CD4 regulatory T cells induces chronic experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Exp. Med.* **1996**, *184*, 1609–1617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **2011**, *29*, 621–663. [[CrossRef](#)]
- Sakaguchi, S.; Miyara, M.; Costantino, C.M.; Hafler, D.A. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 490–500. [[CrossRef](#)]
- Korn, T.; Betelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* **2009**, *27*, 485–517. [[CrossRef](#)]
- Dardalhon, V.; Awasthi, A.; Kwon, H.; Galileos, G.; Gao, W.; Sobel, R.A.; Mitsdoerffer, M.; Strom, T.B.; Elyaman, W.; Ho, I.C.; et al. 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*, 1347–1355. [[CrossRef](#)]
- Veldhoen, M.; Uytendhoeve, C.; van Snick, J.; Helmby, H.; Westendorf, A.; Buer, J.; Martin, B.; Wilhelm, C.; Stockinger, B. Transforming growth factor-beta 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1341–1346. [[CrossRef](#)]
- Bankaitis, K.V.; Fingleton, B. Targeting IL4/IL4R for the treatment of epithelial cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **2015**, *32*, 847–856. [[CrossRef](#)]
- Wang, K. Targeting IL-17 for cancer-associated inflammation and immunity. *J. Immunol.* **2017**, *198*, 66–5.

21. Gajewski, T.F.; Schreiber, H.; Fu, Y.X. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 1014–1022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Howe, L.R.; Subbaramaiah, K.; Hudis, C.A.; Dannenberg, A.J. Molecular pathways: Adipose inflammation as a mediator of obesity-associated cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6074–6083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. D’Orazi, G.; Cordani, M.; Cirone, M. Oncogenic pathways activated by pro-inflammatory cytokines promote mutant p53 stability: Clue for novel anticancer therapies. *Cell Mol. Life Sci.* **2020**, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Chang, R.B.; Beatty, G.L. The interplay between innate and adaptive immunity in cancer shapes the productivity of cancer immunosurveillance. *J. Leukoc. Biol.* **2020**, *108*, 363–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Massague, J. TGFbeta in Cancer. *Cell* **2008**, *134*, 215–230. [[CrossRef](#)]
26. Maloney, J.P.; Gao, L. Proinflammatory Cytokines Increase Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Alveolar Epithelial Cells. *Mediat. Inflamm.* **2015**, *2015*, 387842. [[CrossRef](#)]
27. Bauernfeind, F.G.; Horvath, G.; Stutz, A.; Alnemri, E.S.; MacDonald, K.; Speert, D.; Fernandes-Alnemri, T.; Wu, J.; Monks, B.G.; Fitzgerald, K.A.; et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J. Immunol.* **2009**, *183*, 787–791. [[CrossRef](#)]
28. Weber, A.N.R.; Bittner, Z.A.; Shankar, S.; Liu, X.; Chang, T.H.; Jin, T.; Tapia-Abellan, A. Recent insights into the regulatory networks of NLRP3 inflammasome activation. *J. Cell Sci.* **2020**, *133*, jcs248344. [[CrossRef](#)]
29. Okamoto, M.; Liu, W.; Luo, Y.; Tanaka, A.; Cai, X.; Norris, D.A.; Dinarello, C.A.; Fujita, M. Constitutively active inflammasome in human melanoma cells mediating autoinflammation via caspase-1 processing and secretion of interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 6477–6488. [[CrossRef](#)]
30. Schmitz, J.; Owyang, A.; Oldham, E.; Song, Y.; Murphy, E.; McClanahan, T.K.; Zurawski, G.; Moshrefi, M.; Qin, J.; Li, X.; et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* **2005**, *23*, 479–490. [[CrossRef](#)]
31. Baekkevold, E.S.; Roussigne, M.; Yamanaka, T.; Johansen, F.E.; Jahnsen, F.L.; Amalric, F.; Brandtzaeg, P.; Erard, M.; Haraldsen, G.; Girard, J.P. Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *Am. J. Pathol.* **2003**, *163*, 69–79. [[CrossRef](#)]
32. Moussion, C.; Ortega, N.; Girard, J.P. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: A novel ‘alarmin’? *PLoS ONE* **2008**, *3*, e3331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Hardman, C.S.; Panova, V.; McKenzie, A.N. IL-33 citrine reporter mice reveal the temporal and spatial expression of IL-33 during allergic lung inflammation. *Eur. J. Immunol.* **2013**, *43*, 488–498. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Pichery, M.; Mirey, E.; Mercier, P.; Lefrancais, E.; Dujardin, A.; Ortega, N.; Girard, J.P. Endogenous IL-33 is highly expressed in mouse epithelial barrier tissues, lymphoid organs, brain, embryos, and inflamed tissues: In situ analysis using a novel IL-33-LacZ gene trap reporter strain. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 3488–3495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Paliard, X.; de Waal Malefijt, R.; Yssel, H.; Blanchard, D.; Chretien, I.; Abrams, J.; de Vries, J.; Spits, H. Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J. Immunol.* **1988**, *141*, 849–855. [[PubMed](#)]
36. Granucci, F.; Feau, S.; Angeli, V.; Trottein, F.; Ricciardi-Castagnoli, P. Early IL-2 production by mouse dendritic cells is the result of microbial-induced priming. *J. Immunol.* **2003**, *170*, 5075–5081. [[CrossRef](#)]
37. Potzl, J.; Roser, D.; Bankel, L.; Homberg, N.; Geishauser, A.; Brenner, C.D.; Weigand, M.; Rocken, M.; Mocikat, R. Reversal of tumor acidosis by systemic buffering reactivates NK cells to express IFN-gamma and induces NK cell-dependent lymphoma control without other immunotherapies. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 2125–2133. [[CrossRef](#)]
38. Huffaker, T.B.; Hu, R.; Runtsch, M.C.; Bake, E.; Chen, X.; Zhao, J.; Round, J.L.; Baltimore, D.; O’Connell, R.M. Epistasis between microRNAs 155 and 146a during T cell-mediated antitumor immunity. *Cell Rep.* **2012**, *2*, 1697–1709. [[CrossRef](#)]
39. Klose, C.S.; Kiss, E.A.; Schwierzeck, V.; Ebert, K.; Hoyler, T.; d’Hargues, Y.; Goppert, N.; Croxford, A.L.; Waisman, A.; Tanriver, Y.; et al. A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-RORgammat+ innate lymphoid cells. *Nature* **2013**, *494*, 261–265. [[CrossRef](#)]
40. Rankin, L.C.; Groom, J.R.; Chopin, M.; Herold, M.J.; Walker, J.A.; Mielke, L.A.; McKenzie, A.N.; Carotta, S.; Nutt, S.L.; Belz, G.T. The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46+ innate lymphocytes via the Notch pathway. *Nat. Immunol.* **2013**, *14*, 389–395. [[CrossRef](#)]
41. Darwich, L.; Coma, G.; Pena, R.; Bellido, R.; Blanco, E.J.; Este, J.A.; Borrás, F.E.; Clotet, B.; Ruiz, L.; Rosell, A.; et al. Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunology* **2009**, *126*, 386–393. [[CrossRef](#)]
42. Molle, C.; Nguyen, M.; Flamand, V.; Renneson, J.; Trottein, F.; De Wit, D.; Willems, F.; Goldman, M.; Goriely, S. IL-27 synthesis induced by TLR ligation critically depends on IFN regulatory factor 3. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 7607–7615. [[CrossRef](#)]
43. Pennock, N.D.; Gapin, L.; Kedl, R.M. IL-27 is required for shaping the magnitude, affinity distribution, and memory of T cells responding to subunit immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 16472–16477. [[CrossRef](#)]
44. Kobayashi, M.; Fitz, L.; Ryan, M.; Hewick, R.M.; Clark, S.C.; Chan, S.; Loudon, R.; Sherman, F.; Perussia, B.; Trinchieri, G. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med.* **1989**, *170*, 827–845. [[CrossRef](#)]
45. Trinchieri, G.; Rengaraju, M.; D’Andrea, A.; Valiante, N.M.; Kubin, M.; Aste, M.; Chehimi, J. Producer cells of interleukin 12. *Parasitol. Today* **1993**, *9*, 97. [[CrossRef](#)]

46. Fantini, M.C.; Becker, C.; Monteleone, G.; Pallone, F.; Galle, P.R.; Neurath, M.F. Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7. *J. Immunol.* **2004**, *172*, 5149–5153. [[CrossRef](#)]
47. Schlenner, S.M.; Weigmann, B.; Ruan, Q.; Chen, Y.; von Boehmer, H. Smad3 binding to the foxp3 enhancer is dispensable for the development of regulatory T cells with the exception of the gut. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 1529–1535. [[CrossRef](#)]
48. Boussiotis, V.A.; Chen, Z.M.; Zeller, J.C.; Murphy, W.J.; Berezovskaya, A.; Narula, S.; Roncarolo, M.G.; Blazar, B.R. Altered T-cell receptor + CD28-mediated signaling and blocked cell cycle progression in interleukin 10 and transforming growth factor-beta-treated alloreactive T cells that do not induce graft-versus-host disease. *Blood* **2001**, *97*, 565–571. [[CrossRef](#)]
49. Chen, C.H.; Seguin-Devaux, C.; Burke, N.A.; Oriss, T.B.; Watkins, S.C.; Clipstone, N.; Ray, A. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J. Exp. Med.* **2003**, *197*, 1689–1699. [[CrossRef](#)]
50. Gorelik, L.; Constant, S.; Flavell, R.A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. *J. Exp. Med.* **2002**, *195*, 1499–1505. [[CrossRef](#)]
51. Gorelik, L.; Fields, P.E.; Flavell, R.A. Cutting edge: TGF-beta inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. *J. Immunol.* **2000**, *165*, 4773–4777. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Takimoto, T.; Wakabayashi, Y.; Sekiya, T.; Inoue, N.; Morita, R.; Ichiyama, K.; Takahashi, R.; Asakawa, M.; Muto, G.; Mori, T.; et al. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J. Immunol.* **2010**, *185*, 842–855. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Kuwahara, M.; Yamashita, M.; Shinoda, K.; Tofukuji, S.; Onodera, A.; Shinnakasu, R.; Motohashi, S.; Hosokawa, H.; Tumes, D.; Iwamura, C.; et al. The transcription factor Sox4 is a downstream target of signaling by the cytokine TGF-beta and suppresses T(H)2 differentiation. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 778–786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Li, S.; Liu, M.; Do, M.H.; Chou, C.; Stamatiades, E.G.; Nixon, B.G.; Shi, W.; Zhang, X.; Li, P.; Gao, S.; et al. Cancer immunotherapy via targeted TGF-beta signalling blockade in TH cells. *Nature* **2020**, *587*, 121–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Asadzadeh, Z.; Mohammadi, H.; Safarzadeh, E.; Hemmatzadeh, M.; Mahdian-Shakib, A.; Jadidi-Niaragh, F.; Azizi, G.; Baradaran, B. The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell Immunol.* **2017**, *322*, 15–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Chalmin, F.; Mignot, G.; Bruchard, M.; Chevriaux, A.; Vegran, F.; Hichami, A.; Ladoire, S.; Derangere, V.; Vincent, J.; Masson, D.; et al. Stat3 and Gfi-1 transcription factors control Th17 cell immunosuppressive activity via the regulation of ectonucleotidase expression. *Immunity* **2012**, *36*, 362–373. [[CrossRef](#)]
57. Korn, T.; Mitsdoerffer, M.; Croxford, A.L.; Awasthi, A.; Dardalhon, V.A.; Galileos, G.; Vollmar, P.; Stritesky, G.L.; Kaplan, M.H.; Waisman, A.; et al. IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 18460–18465. [[CrossRef](#)]
58. Sharma, M.D.; Huang, L.; Choi, J.H.; Lee, E.J.; Wilson, J.M.; Lemos, H.; Pan, F.; Blazar, B.R.; Pardoll, D.M.; Mellor, A.L.; et al. An inherently bifunctional subset of Foxp3+ T helper cells is controlled by the transcription factor eos. *Immunity* **2013**, *38*, 998–1012. [[CrossRef](#)]
59. Yao, Z.; Kanno, Y.; Kerényi, M.; Stephens, G.; Durant, L.; Watford, W.T.; Laurence, A.; Robinson, G.W.; Shevach, E.M.; Moriggl, R.; et al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. *Blood* **2007**, *109*, 4368–4375. [[CrossRef](#)]
60. Kanai, T.; Seki, S.; Jenks, J.A.; Kohli, A.; Kawli, T.; Martin, D.P.; Snyder, M.; Bacchetta, R.; Nadeau, K.C. Identification of STAT5A and STAT5B target genes in human T cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86790. [[CrossRef](#)]
61. Liao, W.; Lin, J.X.; Wang, L.; Li, P.; Leonard, W.J. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 551–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Rani, A.; Afzali, B.; Kelly, A.; Tewolde-Berhan, L.; Hackett, M.; Kanhere, A.S.; Pedroza-Pacheco, I.; Bowen, H.; Jurcevic, S.; Jenner, R.G.; et al. IL-2 regulates expression of C-MAF in human CD4 T cells. *J. Immunol.* **2011**, *187*, 3721–3729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Liao, W.; Schones, D.E.; Oh, J.; Cui, Y.; Cui, K.; Roh, T.Y.; Zhao, K.; Leonard, W.J. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor alpha-chain expression. *Nat. Immunol.* **2008**, *9*, 1288–1296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Yang, X.P.; Ghoreschi, K.; Steward-Tharp, S.M.; Rodriguez-Canales, J.; Zhu, J.; Grainger, J.R.; Hirahara, K.; Sun, H.W.; Wei, L.; Vahedi, G.; et al. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. *Nat. Immunol.* **2011**, *12*, 247–254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Oestreich, K.J.; Mohn, S.E.; Weinmann, A.S. Molecular mechanisms that control the expression and activity of Bcl-6 in TH1 cells to regulate flexibility with a TFH-like gene profile. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 405–411. [[CrossRef](#)]
66. Bruni, D.; Angell, H.K.; Galon, J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat. Rev. Cancer* **2020**, *20*, 662–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Waldmann, T.A. Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2018**, *10*, a028472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Taniguchi, S.; Elhance, A.; Van Duzer, A.; Kumar, S.; Leitenberger, J.J.; Oshimori, N. Tumor-initiating cells establish an IL-33-TGF-beta niche signaling loop to promote cancer progression. *Science* **2020**, *369*. [[CrossRef](#)]
69. Bruchard, M.; Mignot, G.; Derangere, V.; Chalmin, F.; Chevriaux, A.; Vegran, F.; Boireau, W.; Simon, B.; Ryffel, B.; Connat, J.L.; et al. Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloid-derived suppressor cells activates the Nlrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 57–64. [[CrossRef](#)]
70. Vitiello, G.A.; Miller, G. Targeting the interleukin-17 immune axis for cancer immunotherapy. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*. [[CrossRef](#)]

71. Zhao, J.; Chen, X.; Herjan, T.; Li, X. The role of interleukin-17 in tumor development and progression. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20190297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Haabeth, O.A.; Lorvik, K.B.; Hammarstrom, C.; Donaldson, I.M.; Haraldsen, G.; Bogen, B.; Corthay, A. Inflammation driven by tumour-specific Th1 cells protects against B-cell cancer. *Nat. Commun.* **2011**, *2*, 240. [[CrossRef](#)]
73. Haabeth, O.A.; Lorvik, K.B.; Yagita, H.; Bogen, B.; Corthay, A. Interleukin-1 is required for cancer eradication mediated by tumor-specific Th1 cells. *Oncoimmunology* **2016**, *5*, e1039763. [[CrossRef](#)]
74. Végran, F.; Berger, H.; Boidot, R.; Mignot, G.; Bruchard, M.; Dosset, M.; Chalmin, F.; Rébé, C.; Dérangère, V.; Ryffel, B.; et al. The transcription factor IRF1 dictates the IL-21-dependent anticancer functions of TH9 cells. *Nat. Immunol.* **2014**, *15*, 758–766. [[CrossRef](#)]
75. Carswell, E.A.; Old, L.J.; Kassel, R.L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1975**, *72*, 3666–3670. [[CrossRef](#)]
76. Kearney, C.J.; Vervoort, S.J.; Hogg, S.J.; Ramsbottom, K.M.; Freeman, A.J.; Lalaoui, N.; Pijpers, L.; Michie, J.; Brown, K.K.; Knight, D.A.; et al. Tumor immune evasion arises through loss of TNF sensitivity. *Sci. Immunol.* **2018**, *3*. [[CrossRef](#)]
77. Chen, X.; Baumel, M.; Mannel, D.N.; Howard, O.M.; Oppenheim, J.J. Interaction of TNF with TNF receptor type 2 promotes expansion and function of mouse CD4+CD25+ T regulatory cells. *J. Immunol.* **2007**, *179*, 154–161. [[CrossRef](#)]
78. Chen, X.; Wu, X.; Zhou, Q.; Howard, O.M.; Netea, M.G.; Oppenheim, J.J. TNFR2 is critical for the stabilization of the CD4+Foxp3+ regulatory T cell phenotype in the inflammatory environment. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 1076–1084. [[CrossRef](#)]
79. Wang, D.; Shao, Y.; Zhang, X.; Lu, G.; Liu, B. IL-23 and PSMA-targeted duo-CAR T cells in Prostate Cancer Eradication in a preclinical model. *J. Transl. Med.* **2020**, *18*, 23. [[CrossRef](#)]
80. Berger, H.; Vegran, F.; Chikh, M.; Gilardi, F.; Ladoire, S.; Bugaut, H.; Mignot, G.; Chalmin, F.; Bruchard, M.; Derangere, V.; et al. SOCS3 transactivation by PPARgamma prevents IL-17-driven cancer growth. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 3578–3590. [[CrossRef](#)]
81. Liu, M.; Kuo, F.; Capistrano, K.J.; Kang, D.; Nixon, B.G.; Shi, W.; Chou, C.; Do, M.H.; Stamatiades, E.G.; Gao, S.; et al. TGF-beta suppresses type 2 immunity to cancer. *Nature* **2020**, *587*, 115–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Zelba, H.; Weide, B.; Martens, A.; Derhovanessian, E.; Bailur, J.K.; Kyzirakos, C.; Pflugfelder, A.; Eigentler, T.K.; Di Giacomo, A.M.; Maio, M.; et al. Circulating CD4+ T cells that produce IL4 or IL17 when stimulated by melan-A but not by NY-ESO-1 have negative impacts on survival of patients with stage IV melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2014**, *20*, 4390–4399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Gabitass, R.F.; Annels, N.E.; Stocken, D.D.; Pandha, H.A.; Middleton, G.W. Elevated myeloid-derived suppressor cells in pancreatic, esophageal and gastric cancer are an independent prognostic factor and are associated with significant elevation of the Th2 cytokine interleukin-13. *Cancer Immunol. Immunother.* **2011**, *60*, 1419–1430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Hatzioannou, A.; Banos, A.; Sakelaropoulos, T.; Fedonidis, C.; Vidali, M.S.; Kohne, M.; Handler, K.; Boon, L.; Henriques, A.; Koliaraki, V.; et al. An intrinsic role of IL-33 in Treg cell-mediated tumor immunoevasion. *Nat. Immunol.* **2020**, *21*, 75–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Schiering, C.; Krausgruber, T.; Chomka, A.; Frohlich, A.; Adelman, K.; Wohlfert, E.A.; Pott, J.; Griseri, T.; Bollrath, J.; Hegazy, A.N.; et al. The alarmin IL-33 promotes regulatory T-cell function in the intestine. *Nature* **2014**, *513*, 564–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Zitvogel, L.; Galluzzi, L.; Kepp, O.; Smyth, M.J.; Kroemer, G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 405–414. [[CrossRef](#)]
87. Kurche, J.S.; Haluszczak, C.; McWilliams, J.A.; Sanchez, P.J.; Kedl, R.M. Type I IFN-dependent T cell activation is mediated by IFN-dependent dendritic cell OX40 ligand expression and is independent of T cell IFNR expression. *J. Immunol.* **2012**, *188*, 585–593. [[CrossRef](#)]
88. Hashimoto, H.; Ueda, R.; Narumi, K.; Heike, Y.; Yoshida, T.; Aoki, K. Type I IFN gene delivery suppresses regulatory T cells within tumors. *Cancer Gene* **2014**, *21*, 532–541. [[CrossRef](#)]
89. Zaidi, M.R. The Interferon-Gamma Paradox in Cancer. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **2019**, *39*, 30–38. [[CrossRef](#)]
90. Lasfar, A.; Gogas, H.; Zloza, A.; Kaufman, H.L.; Kirkwood, J.M. IFN-lambda cancer immunotherapy: New kid on the block. *Immunotherapy* **2016**, *8*, 877–888. [[CrossRef](#)]
91. Abushahba, W.; Balan, M.; Castaneda, I.; Yuan, Y.; Reuhl, K.; Raveche, E.; de la Torre, A.; Lasfar, A.; Kottenko, S.V. Antitumor activity of type I and type III interferons in BNL hepatoma model. *Cancer Immunol. Immunother.* **2010**, *59*, 1059–1071. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Sato, A.; Ohtsuki, M.; Hata, M.; Kobayashi, E.; Murakami, T. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models. *J. Immunol.* **2006**, *176*, 7686–7694. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Tezuka, Y.; Endo, S.; Matsui, A.; Sato, A.; Saito, K.; Semba, K.; Takahashi, M.; Murakami, T. Potential anti-tumor effect of IFN-lambda2 (IL-28A) against human lung cancer cells. *Lung Cancer* **2012**, *78*, 185–192. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Zhu, J.; Paul, W.E. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Res.* **2010**, *20*, 4–12. [[CrossRef](#)]
95. Tugues, S.; Burkhard, S.H.; Ohs, I.; Vrohling, M.; Nussbaum, K.; Vom Berg, J.; Kulig, P.; Becher, B. New insights into IL-12-mediated tumor suppression. *Cell Death Differ.* **2015**, *22*, 237–246. [[CrossRef](#)]
96. Tait Wojno, E.D.; Hunter, C.A.; Stumhofer, J.S. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity* **2019**, *50*, 851–870. [[CrossRef](#)]

97. Choi, Y.S.; Eto, D.; Yang, J.A.; Lao, C.; Crotty, S. Cutting edge: STAT1 is required for IL-6-mediated Bcl6 induction for early follicular helper cell differentiation. *J. Immunol.* **2013**, *190*, 3049–3053. [[CrossRef](#)]
98. Johnson, D.E.; O’Keefe, R.A.; Grandis, J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2018**, *15*, 234–248. [[CrossRef](#)]
99. Hunter, C.A.; Jones, S.A. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat. Immunol.* **2015**, *16*, 448–457. [[CrossRef](#)]
100. Atsumi, T.; Singh, R.; Sabharwal, L.; Bando, H.; Meng, J.; Arima, Y.; Yamada, M.; Harada, M.; Jiang, J.J.; Kamimura, D.; et al. Inflammation amplifier, a new paradigm in cancer biology. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 8–14. [[CrossRef](#)]
101. Yang, H.Y.; Barbi, J.; Wu, C.Y.; Zheng, Y.; Vignali, P.D.; Wu, X.; Tao, J.H.; Park, B.V.; Bandara, S.; Novack, L.; et al. MicroRNA-17 Modulates Regulatory T Cell Function by Targeting Co-regulators of the Foxp3 Transcription Factor. *Immunity* **2016**, *45*, 83–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
102. Malek, T.R. The biology of interleukin-2. *Annu. Rev. Immunol.* **2008**, *26*, 453–479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Rosenberg, S.A. IL-2: The first effective immunotherapy for human cancer. *J. Immunol.* **2014**, *192*, 5451–5458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Finlay, D.K.; Rosenzweig, E.; Sinclair, L.V.; Feijoo-Carnero, C.; Hukelmann, J.L.; Rolf, J.; Panteleyev, A.A.; Okkenhaug, K.; Cantrell, D.A. PDK1 regulation of mTOR and hypoxia-inducible factor 1 integrate metabolism and migration of CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* **2012**, *209*, 2441–2453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Beadling, C.; Guschin, D.; Witthuhn, B.A.; Ziemiecki, A.; Ihle, J.N.; Kerr, I.M.; Cantrell, D.A. Activation of JAK kinases and STAT proteins by interleukin-2 and interferon alpha, but not the T cell antigen receptor, in human T lymphocytes. *EMBO J.* **1994**, *13*, 5605–5615. [[CrossRef](#)]
106. Johnston, J.A.; Bacon, C.M.; Finbloom, D.S.; Rees, R.C.; Kaplan, D.; Shibuya, K.; Ortaldo, J.R.; Gupta, S.; Chen, Y.Q.; Giri, J.D.; et al. Tyrosine phosphorylation and activation of STAT5, STAT3, and Janus kinases by interleukins 2 and 15. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**, *92*, 8705–8709. [[CrossRef](#)]
107. Beadling, C.; Ng, J.; Babbage, J.W.; Cantrell, D.A. Interleukin-2 activation of STAT5 requires the convergent action of tyrosine kinases and a serine/threonine kinase pathway distinct from the Raf1/ERK2 MAP kinase pathway. *EMBO J.* **1996**, *15*, 1902–1913. [[CrossRef](#)]
108. Villarino, A.; Laurence, A.; Robinson, G.W.; Bonelli, M.; Dema, B.; Afzali, B.; Shih, H.Y.; Sun, H.W.; Brooks, S.R.; Hennighausen, L.; et al. Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) paralog dose governs T cell effector and regulatory functions. *Elife* **2016**, *5*, e08384. [[CrossRef](#)]
109. Rickert, M.; Wang, X.; Boulanger, M.J.; Goriatcheva, N.; Garcia, K.C. The structure of interleukin-2 complexed with its alpha receptor. *Science* **2005**, *308*, 1477–1480. [[CrossRef](#)]
110. Banchereau, J.; Pascual, V.; O’Garra, A. From IL-2 to IL-37: The expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat. Immunol.* **2012**, *13*, 925–931. [[CrossRef](#)]
111. Lu, Y.; Wang, Q.; Xue, G.; Bi, E.; Ma, X.; Wang, A.; Qian, J.; Dong, C.; Yi, Q. Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4(+) T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* **2018**, *33*, 1048–1060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
112. Xue, G.; Jin, G.; Fang, J.; Lu, Y. IL-4 together with IL-1beta induces antitumor Th9 cell differentiation in the absence of TGF-beta signaling. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 1376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Veltri, S.; Smith, J.W., 2nd. Interleukin 1 trials in cancer patients: A review of the toxicity, antitumor and hematopoietic effects. *Stem Cells* **1996**, *14*, 164–176. [[CrossRef](#)]
114. Mortara, L.; Balza, E.; Sassi, F.; Castellani, P.; Carnemolla, B.; De Lerma Barbaro, A.; Fossati, S.; Tosi, G.; Accolla, R.S.; Borsi, L. Therapy-induced antitumor vaccination by targeting tumor necrosis factor alpha to tumor vessels in combination with melphalan. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 3381–3392. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Habetsion, T.; Ding, Z.C.; Pi, W.; Li, T.; Lu, C.; Chen, T.; Xi, C.; Spartz, H.; Liu, K.; Hao, Z.; et al. Alteration of Tumor Metabolism by CD4+ T Cells Leads to TNF-alpha-Dependent Intensification of Oxidative Stress and Tumor Cell Death. *Cell Metab.* **2018**, *28*, 228–242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Moore, R.J.; Owens, D.M.; Stamp, G.; Arnott, C.; Burke, F.; East, N.; Holdsworth, H.; Turner, L.; Rollins, B.; Pasparakis, M.; et al. Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nat. Med.* **1999**, *5*, 828–831. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Candido, J.; Hagemann, T. Cancer-related inflammation. *J. Clin. Immunol.* **2013**, *33* (Suppl. 1), S79–S84. [[CrossRef](#)]
118. Hamano, R.; Huang, J.; Yoshimura, T.; Oppenheim, J.J.; Chen, X. TNF optimally activates regulatory T cells by inducing TNF receptor superfamily members TNFR2, 4-1BB and OX40. *Eur. J. Immunol.* **2011**, *41*, 2010–2020. [[CrossRef](#)]
119. Chen, X.; Subleski, J.J.; Hamano, R.; Howard, O.M.; Wiltrout, R.H.; Oppenheim, J.J. Co-expression of TNFR2 and CD25 identifies more of the functional CD4+FOXP3+ regulatory T cells in human peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* **2010**, *40*, 1099–1106. [[CrossRef](#)]
120. van Mierlo, G.J.; Scherer, H.U.; Hameetman, M.; Morgan, M.E.; Flierman, R.; Huizinga, T.W.; Toes, R.E. Cutting edge: TNFR-shedding by CD4+CD25+ regulatory T cells inhibits the induction of inflammatory mediators. *J. Immunol.* **2008**, *180*, 2747–2751. [[CrossRef](#)]
121. Charles, K.A.; Kulbe, H.; Soper, R.; Escorcio-Correia, M.; Lawrence, T.; Schultheis, A.; Chakravarty, P.; Thompson, R.G.; Kollias, G.; Smyth, J.F.; et al. The tumor-promoting actions of TNF-alpha involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J. Clin. Investig.* **2009**, *119*, 3011–3023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

122. Torrey, H.; Butterworth, J.; Mera, T.; Okubo, Y.; Wang, L.; Baum, D.; Defusco, A.; Plager, S.; Warden, S.; Huang, D.; et al. Targeting TNFR2 with antagonistic antibodies inhibits proliferation of ovarian cancer cells and tumor-associated Tregs. *Sci. Signal* **2017**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Donia, M.; Andersen, R.; Kjeldsen, J.W.; Fagone, P.; Munir, S.; Nicoletti, F.; Andersen, M.H.; Thor Straten, P.; Svane, I.M. Aberrant Expression of MHC Class II in Melanoma Attracts Inflammatory Tumor-Specific CD4+ T-Cells, Which Dampen CD8+ T-cell Antitumor Reactivity. *Cancer Res.* **2015**, *75*, 3747–3759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Grivennikov, S.I.; Wang, K.; Mucida, D.; Stewart, C.A.; Schnabl, B.; Jauch, D.; Taniguchi, K.; Yu, G.Y.; Osterreicher, C.H.; Hung, K.E.; et al. Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth. *Nature* **2012**, *491*, 254–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Teng, M.W.; Bowman, E.P.; McElwee, J.J.; Smyth, M.J.; Casanova, J.L.; Cooper, A.M.; Cua, D.J. IL-12 and IL-23 cytokines: From discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 719–729. [[CrossRef](#)]
126. Coussens, L.M.; Zitvogel, L.; Palucka, A.K. Neutralizing tumor-promoting chronic inflammation: A magic bullet? *Science* **2013**, *339*, 286–291. [[CrossRef](#)]
127. Wang, W.; Zou, W. Amino Acids and Their Transporters in T Cell Immunity and Cancer Therapy. *Mol. Cell* **2020**, *80*, 384–395. [[CrossRef](#)]
128. Sivick, K.E.; Desbien, A.L.; Glickman, L.H.; Reiner, G.L.; Corrales, L.; Surh, N.H.; Hudson, T.E.; Vu, U.T.; Francica, B.J.; Banda, T.; et al. Magnitude of Therapeutic STING Activation Determines CD8(+) T Cell-Mediated Anti-tumor Immunity. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 3074–3085.e3075. [[CrossRef](#)]
129. Lu, C.; Klement, J.D.; Ibrahim, M.L.; Xiao, W.; Redd, P.S.; Nayak-Kapoor, A.; Zhou, G.; Liu, K. Type I interferon suppresses tumor growth through activating the STAT3-granzyme B pathway in tumor-infiltrating cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunother. Cancer* **2019**, *7*, 157. [[CrossRef](#)]
130. Chen, J.; Cao, Y.; Markelc, B.; Kaeppler, J.; Vermeer, J.A.; Muschel, R.J. Type I IFN protects cancer cells from CD8+ T cell-mediated cytotoxicity after radiation. *J. Clin. Investig.* **2019**, *129*, 4224–4238. [[CrossRef](#)]
131. Evgin, L.; Huff, A.L.; Wongthida, P.; Thompson, J.; Kottke, T.; Tonne, J.; Schuelke, M.; Ayasoufi, K.; Driscoll, C.B.; Shim, K.G.; et al. Oncolytic virus-derived type I interferon restricts CAR T cell therapy. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 3187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Zhang, S.; Kodys, K.; Li, K.; Szabo, G. Human type 2 myeloid dendritic cells produce interferon-lambda and amplify interferon-alpha in response to hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* **2013**, *144*, 414–425.e417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. Zaroni, I.; Granucci, F.; Broggi, A. Interferon (IFN)-lambda Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1661. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Zhang, H.; Chua, K.S.; Guimond, M.; Kapoor, V.; Brown, M.V.; Fleisher, T.A.; Long, L.M.; Bernstein, D.; Hill, B.J.; Douek, D.C.; et al. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Med.* **2005**, *11*, 1238–1243. [[CrossRef](#)]
135. Bentebibel, S.E.; Hurwitz, M.E.; Bernatchez, C.; Haymaker, C.; Hudgens, C.W.; Kluger, H.M.; Tetzlaff, M.T.; Tagliaferri, M.A.; Zalevsky, J.; Hoch, U.; et al. A First-in-Human Study and Biomarker Analysis of NKTR-214, a Novel IL2Rbetagamgamma-Biased Cytokine, in Patients with Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Cancer Discov.* **2019**, *9*, 711–721. [[CrossRef](#)]
136. Diab, A.; Tannir, N.M.; Bentebibel, S.E.; Hwu, P.; Papadimitrakopoulou, V.; Haymaker, C.; Kluger, H.M.; Gettinger, S.N.; Sznol, M.; Tykodi, S.S.; et al. Bempedaldesleukin (NKTR-214) plus Nivolumab in Patients with Advanced Solid Tumors: Phase I Dose-Escalation Study of Safety, Efficacy, and Immune Activation (PIVOT-02). *Cancer Discov.* **2020**, *10*, 1158–1173. [[CrossRef](#)]
137. Charych, D.H.; Hoch, U.; Langowski, J.L.; Lee, S.R.; Addepalli, M.K.; Kirk, P.B.; Sheng, D.; Liu, X.; Sims, P.W.; VanderVeen, L.A.; et al. NKTR-214, an Engineered Cytokine with Biased IL2 Receptor Binding, Increased Tumor Exposure, and Marked Efficacy in Mouse Tumor Models. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2016**, *22*, 680–690. [[CrossRef](#)]
138. Heaton, K.M.; Ju, G.; Grimm, E.A. Human interleukin 2 analogues that preferentially bind the intermediate-affinity interleukin 2 receptor lead to reduced secondary cytokine secretion: Implications for the use of these interleukin 2 analogues in cancer immunotherapy. *Cancer Res.* **1993**, *53*, 2597–2602.
139. Sun, Z.; Ren, Z.; Yang, K.; Liu, Z.; Cao, S.; Deng, S.; Xu, L.; Liang, Y.; Guo, J.; Bian, Y.; et al. A next-generation tumor-targeting IL-2 preferentially promotes tumor-infiltrating CD8(+) T-cell response and effective tumor control. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3874. [[CrossRef](#)]
140. Skak, K.; Frederiksen, K.S.; Lundsgaard, D. Interleukin-21 activates human natural killer cells and modulates their surface receptor expression. *Immunology* **2008**, *123*, 575–583. [[CrossRef](#)]
141. Jure-Kunkel, M.; Masters, G.; Girit, E.; Dito, G.; Lee, F.; Hunt, J.T.; Humphrey, R. Synergy between chemotherapeutic agents and CTLA-4 blockade in preclinical tumor models. *Cancer Immunol. Immunother.* **2013**, *62*, 1533–1545. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
142. Kowalczyk, A.; Wierzbicki, A.; Gil, M.; Bambach, B.; Kaneko, Y.; Rokita, H.; Repasky, E.; Fenstermaker, R.; Brecher, M.; Ciesielski, M.; et al. Induction of protective immune responses against NXS2 neuroblastoma challenge in mice by immunotherapy with GD2 mimotope vaccine and IL-15 and IL-21 gene delivery. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 1443–1458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Waugh, J.; Perry, C.M. Anakinra: A review of its use in the management of rheumatoid arthritis. *BioDrugs* **2005**, *19*, 189–202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Lust, J.A.; Lacy, M.Q.; Zeldenrust, S.R.; Dispenzieri, A.; Gertz, M.A.; Witzig, T.E.; Kumar, S.; Hayman, S.R.; Russell, S.J.; Buadi, F.K.; et al. Induction of a chronic disease state in patients with smoldering or indolent multiple myeloma by targeting interleukin 1{beta}-induced interleukin 6 production and the myeloma proliferative component. *Mayo Clin. Proc.* **2009**, *84*, 114–122. [[CrossRef](#)]

145. Lust, J.A.; Lacy, M.Q.; Zeldenrust, S.R.; Witzig, T.E.; Moon-Tasson, L.L.; Dinarello, C.A.; Donovan, K.A. Reduction in C-reactive protein indicates successful targeting of the IL-1/IL-6 axis resulting in improved survival in early stage multiple myeloma. *Am. J. Hematol.* **2016**, *91*, 571–574. [[CrossRef](#)]
146. Isambert, N.; Hervieu, A.; Rebe, C.; Hennequin, A.; Borg, C.; Zanetta, S.; Chevriaux, A.; Richard, C.; Derangere, V.; Limagne, E.; et al. Fluorouracil and bevacizumab plus anakinra for patients with metastatic colorectal cancer refractory to standard therapies (IRAFU): A single-arm phase 2 study. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1474319. [[CrossRef](#)]
147. Dubois, E.A.; Rissmann, R.; Cohen, A.F. Rilonecept and canakinumab. *Br. J. Clin. Pharm.* **2011**, *71*, 639–641. [[CrossRef](#)]
148. Fizazi, K.; De Bono, J.S.; Flechon, A.; Heidenreich, A.; Voog, E.; Davis, N.B.; Qi, M.; Bandekar, R.; Vermeulen, J.T.; Cornfeld, M.; et al. Randomised phase II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-IL-6 monoclonal antibody, in combination with mitoxantrone/prednisone versus mitoxantrone/prednisone alone in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Eur. J. Cancer* **2012**, *48*, 85–93. [[CrossRef](#)]
149. Rossi, J.F.; Negrier, S.; James, N.D.; Kocak, I.; Hawkins, R.; Davis, H.; Prabhakar, U.; Qin, X.; Mulders, P.; Berns, B. A phase I/II study of siltuximab (CNTO 328), an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in metastatic renal cell cancer. *Br. J. Cancer* **2010**, *103*, 1154–1162. [[CrossRef](#)]
150. Dijkgraaf, E.M.; Santegoets, S.J.; Reyners, A.K.; Goedemans, R.; Wouters, M.C.; Kenter, G.G.; van Erkel, A.R.; van Poelgeest, M.I.; Nijman, H.W.; van der Hoeven, J.J.; et al. A phase I trial combining carboplatin/doxorubicin with tocilizumab, an anti-IL-6R monoclonal antibody, and interferon-alpha2b in patients with recurrent epithelial ovarian cancer. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 2141–2149. [[CrossRef](#)]
151. Ghiringhelli, F.; Larmonier, N.; Schmitt, E.; Parcellier, A.; Cathelin, D.; Garrido, C.; Chauffert, B.; Solary, E.; Bonnotte, B.; Martin, F. CD4+CD25+ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 336–344. [[CrossRef](#)]
152. Zhang, L.; Dermawan, K.; Jin, M.; Liu, R.; Zheng, H.; Xu, L.; Zhang, Y.; Cai, Y.; Chu, Y.; Xiong, S. Differential impairment of regulatory T cells rather than effector T cells by paclitaxel-based chemotherapy. *Clin. Immunol.* **2008**, *129*, 219–229. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Ridolfi, L.; Petrini, M.; Granato, A.M.; Gentilcore, G.; Simeone, E.; Ascierto, P.A.; Pancisi, E.; Ancarani, V.; Fiammenghi, L.; Guidoboni, M.; et al. Low-dose temozolomide before dendritic-cell vaccination reduces (specifically) CD4+CD25++Foxp3+ regulatory T-cells in advanced melanoma patients. *J. Transl. Med.* **2013**, *11*, 135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Larmonier, N.; Janikashvili, N.; LaCasse, C.J.; Larmonier, C.B.; Cantrell, J.; Situ, E.; Lundeen, T.; Bonnotte, B.; Katsanis, E. Imatinib mesylate inhibits CD4+ CD25+ regulatory T cell activity and enhances active immunotherapy against BCR-ABL- tumors. *J. Immunol.* **2008**, *181*, 6955–6963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Zhao, J.; Cao, Y.; Lei, Z.; Yang, Z.; Zhang, B.; Huang, B. Selective depletion of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by low-dose cyclophosphamide is explained by reduced intracellular ATP levels. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 4850–4858. [[CrossRef](#)]
156. Viaud, S.; Flament, C.; Zoubir, M.; Pautier, P.; LeCesne, A.; Ribrag, V.; Soria, J.C.; Marty, V.; Vielh, P.; Robert, C.; et al. Cyclophosphamide induces differentiation of Th17 cells in cancer patients. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 661–665. [[CrossRef](#)]
157. Balachandran, V.P.; Cavnar, M.J.; Zeng, S.; Bamboat, Z.M.; Ocuin, L.M.; Obaid, H.; Sorenson, E.C.; Popow, R.; Ariyan, C.; Rossi, F.; et al. Imatinib potentiates antitumor T cell responses in gastrointestinal stromal tumor through the inhibition of IDO. *Nat. Med.* **2011**, *17*, 1094–1100. [[CrossRef](#)]
158. Tanaka, A.; Nishikawa, H.; Noguchi, S.; Sugiyama, D.; Morikawa, H.; Takeuchi, Y.; Ha, D.; Shigeta, N.; Kitawaki, T.; Maeda, Y.; et al. Tyrosine kinase inhibitor imatinib augments tumor immunity by depleting effector regulatory T cells. *J. Exp. Med.* **2020**, *217*, e20191009. [[CrossRef](#)]
159. Vicari, A.P.; Luu, R.; Zhang, N.; Patel, S.; Makinen, S.R.; Hanson, D.C.; Weeratna, R.D.; Krieg, A.M. Paclitaxel reduces regulatory T cell numbers and inhibitory function and enhances the anti-tumor effects of the TLR9 agonist PF-3512676 in the mouse. *Cancer Immunol. Immunother.* **2009**, *58*, 615–628. [[CrossRef](#)]
160. Heeren, A.M.; van Luijk, I.F.; Lakeman, J.; Pocorni, N.; Kole, J.; de Menezes, R.X.; Kenter, G.G.; Bosse, T.; de Kroon, C.D.; Jordanova, E.S. Neoadjuvant cisplatin and paclitaxel modulate tumor-infiltrating T cells in patients with cervical cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* **2019**, *68*, 1759–1767. [[CrossRef](#)]
161. Quirt, I.; Verma, S.; Petrella, T.; Bak, K.; Charette, M. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma: A systematic review. *Oncologist* **2007**, *12*, 1114–1123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
162. Iversen, T.Z.; Brimnes, M.K.; Nikolajsen, K.; Andersen, R.S.; Hadrup, S.R.; Andersen, M.H.; Bastholt, L.; Svane, I.M. Depletion of T lymphocytes is correlated with response to temozolomide in melanoma patients. *Oncoimmunology* **2013**, *2*, e23288. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Borghaei, H.; Paz-Ares, L.; Horn, L.; Spigel, D.R.; Steins, M.; Ready, N.E.; Chow, L.Q.; Vokes, E.E.; Felip, E.; Holgado, E.; et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 1627–1639. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Garon, E.B.; Rizvi, N.A.; Hui, R.; Leighl, N.; Balmanoukian, A.S.; Eder, J.P.; Patnaik, A.; Aggarwal, C.; Gubens, M.; Horn, L.; et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 2018–2028. [[CrossRef](#)]
165. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Schadendorf, D.; Dummer, R.; Smylie, M.; Rutkowski, P.; et al. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *373*, 23–34. [[CrossRef](#)]

166. Schadendorf, D.; Wolchok, J.D.; Hodi, F.S.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Rutkowski, P.; Grob, J.J.; Cowey, C.L.; Lao, C.D.; Chesney, J.; et al. Efficacy and Safety Outcomes in Patients With Advanced Melanoma Who Discontinued Treatment With Nivolumab and Ipilimumab Because of Adverse Events: A Pooled Analysis of Randomized Phase II and III Trials. *J. Clin. Oncol.* **2017**, *35*, 3807–3814. [[CrossRef](#)]
167. Powles, T.; Eder, J.P.; Fine, G.D.; Braitheh, F.S.; Loriot, Y.; Cruz, C.; Bellmunt, J.; Burris, H.A.; Petrylak, D.P.; Teng, S.L.; et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* **2014**, *515*, 558–562. [[CrossRef](#)]
168. Rittmeyer, A.; Barlesi, F.; Waterkamp, D.; Park, K.; Ciardiello, F.; von Pawel, J.; Gadgeel, S.M.; Hida, T.; Kowalski, D.M.; Dols, M.C.; et al. Atezolizumab versus docetaxel in patients with previously treated non-small-cell lung cancer (OAK): A phase 3, open-label, multicentre randomised controlled trial. *Lancet* **2017**, *389*, 255–265. [[CrossRef](#)]
169. Horn, L.; Mansfield, A.S.; Szczesna, A.; Havel, L.; Krzakowski, M.; Hochmair, M.J.; Huemer, F.; Losonczy, G.; Johnson, M.L.; Nishio, M.; et al. First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2220–2229. [[CrossRef](#)]
170. McDermott, D.F.; Sosman, J.A.; Sznol, M.; Massard, C.; Gordon, M.S.; Hamid, O.; Powderly, J.D.; Infante, J.R.; Fasso, M.; Wang, Y.V.; et al. Atezolizumab, an Anti-Programmed Death-Ligand 1 Antibody, in Metastatic Renal Cell Carcinoma: Long-Term Safety, Clinical Activity, and Immune Correlates From a Phase Ia Study. *J. Clin. Oncol.* **2016**, *34*, 833–842. [[CrossRef](#)]
171. Schmid, P.; Adams, S.; Rugo, H.S.; Schneeweiss, A.; Barrios, C.H.; Iwata, H.; Dieras, V.; Hegg, R.; Im, S.A.; Shaw Wright, G.; et al. Atezolizumab and Nab-Paclitaxel in Advanced Triple-Negative Breast Cancer. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 2108–2121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
172. Polk, A.; Svane, I.M.; Andersson, M.; Nielsen, D. Checkpoint inhibitors in breast cancer-Current status. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, *63*, 122–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Ansell, S.M.; Lesokhin, A.M.; Borrello, I.; Halwani, A.; Scott, E.C.; Gutierrez, M.; Schuster, S.J.; Millenson, M.M.; Cattray, D.; Freeman, G.J.; et al. PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **2015**, *372*, 311–319. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Ferrara, R.; Imbimbo, M.; Malouf, R.; Paget-Bailly, S.; Calais, F.; Marchal, C.; Westeel, V. Single or combined immune checkpoint inhibitors compared to first-line platinum-based chemotherapy with or without bevacizumab for people with advanced non-small cell lung cancer. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2020**, *12*, CD013257. [[CrossRef](#)]
175. Rotte, A.; Jin, J.Y.; Lemaire, V. Mechanistic overview of immune checkpoints to support the rational design of their combinations in cancer immunotherapy. *Ann. Oncol.* **2018**, *29*, 71–83. [[CrossRef](#)]
176. Chan, T.A.; Yarchoan, M.; Jaffee, E.; Swanton, C.; Quezada, S.A.; Stenzinger, A.; Peters, S. Development of tumor mutation burden as an immunotherapy biomarker: Utility for the oncology clinic. *Ann. Oncol.* **2019**, *30*, 44–56. [[CrossRef](#)]
177. Le, H.K.; Graham, L.; Cha, E.; Morales, J.K.; Manjili, M.H.; Bear, H.D. Gemcitabine directly inhibits myeloid derived suppressor cells in BALB/c mice bearing 4T1 mammary carcinoma and augments expansion of T cells from tumor-bearing mice. *Int. Immunopharmacol.* **2009**, *9*, 900–909. [[CrossRef](#)]
178. Vincent, J.; Mignot, G.; Chalmin, F.; Ladoire, S.; Bruchard, M.; Chevriaux, A.; Martin, F.; Apetoh, L.; Rebe, C.; Ghiringhelli, F. 5-Fluorouracil selectively kills tumor-associated myeloid-derived suppressor cells resulting in enhanced T cell-dependent antitumor immunity. *Cancer Res.* **2010**, *70*, 3052–3061. [[CrossRef](#)]
179. Alizadeh, D.; Trad, M.; Hanke, N.T.; Larmonier, C.B.; Janikashvili, N.; Bonnotte, B.; Katsanis, E.; Larmonier, N. Doxorubicin eliminates myeloid-derived suppressor cells and enhances the efficacy of adoptive T-cell transfer in breast cancer. *Cancer Res.* **2014**, *74*, 104–118. [[CrossRef](#)]
180. Germano, G.; Frapolli, R.; Belgiovine, C.; Anselmo, A.; Pesce, S.; Liguori, M.; Erba, E.; Ubaldi, S.; Zucchetti, M.; Pasqualini, F.; et al. Role of macrophage targeting in the antitumor activity of trabectedin. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 249–262. [[CrossRef](#)]
181. Xie, W.; Forveille, S.; Iribarren, K.; Sauvat, A.; Senovilla, L.; Wang, Y.; Humeau, J.; Perez-Lanzon, M.; Zhou, H.; Martinez-Leal, J.F.; et al. Lurbinectedin synergizes with immune checkpoint blockade to generate anticancer immunity. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, e1656502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
182. Arrieta, O.; Zatarain-Barron, Z.L.; Cardona, A.F. New opportunities in a challenging disease: Lurbinectedin for relapsed small-cell lung cancer. *Lancet Oncol.* **2020**, *21*, 605–607. [[CrossRef](#)]
183. Diel, I.J.; Solomayer, E.F.; Costa, S.D.; Gollan, C.; Goerner, R.; Wallwiener, D.; Kaufmann, M.; Bastert, G. Reduction in new metastases in breast cancer with adjuvant clodronate treatment. *N. Engl. J. Med.* **1998**, *339*, 357–363. [[CrossRef](#)]
184. Cassetta, L.; Pollard, J.W. Targeting macrophages: Therapeutic approaches in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2018**, *17*, 887–904. [[CrossRef](#)]
185. Javeed, A.; Ashraf, M.; Riaz, A.; Ghafoor, A.; Afzal, S.; Mukhtar, M.M. Paclitaxel and immune system. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2009**, *38*, 283–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Kodumudi, K.N.; Woan, K.; Gilvary, D.L.; Sahakian, E.; Wei, S.; Djeu, J.Y. A novel chemomodulating property of docetaxel: Suppression of myeloid-derived suppressor cells in tumor bearers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2010**, *16*, 4583–4594. [[CrossRef](#)]
187. Buhtoiarov, I.N.; Sondel, P.M.; Wigginton, J.M.; Buhtoiarova, T.N.; Yanke, E.M.; Mahvi, D.A.; Rakhmilevich, A.L. Anti-tumour synergy of cytotoxic chemotherapy and anti-CD40 plus CpG-ODN immunotherapy through repolarization of tumour-associated macrophages. *Immunology* **2011**, *132*, 226–239. [[CrossRef](#)]

188. Wan, S.; Pestka, S.; Jubin, R.G.; Lyu, Y.L.; Tsai, Y.C.; Liu, L.F. Chemotherapeutics and radiation stimulate MHC class I expression through elevated interferon-beta signaling in breast cancer cells. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e32542. [[CrossRef](#)]
189. Green, D.R.; Ferguson, T.; Zitvogel, L.; Kroemer, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* **2009**, *9*, 353–363. [[CrossRef](#)]
190. Schafer, Z.T.; Brugge, J.S. IL-6 involvement in epithelial cancers. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 3660–3663. [[CrossRef](#)]
191. Waugh, D.J.; Wilson, C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6735–6741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
192. Showalter, A.; Limaye, A.; Oyer, J.L.; Igarashi, R.; Kittipatarin, C.; Copik, A.J.; Khaled, A.R. Cytokines in immunogenic cell death: Applications for cancer immunotherapy. *Cytokine* **2017**, *97*, 123–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Anderson, B.E.; McNiff, J.M.; Matte, C.; Athanasiadis, I.; Shlomchik, W.D.; Shlomchik, M.J. Recipient CD4+ T cells that survive irradiation regulate chronic graft-versus-host disease. *Blood* **2004**, *104*, 1565–1573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Qu, Y.; Jin, S.; Zhang, A.; Zhang, B.; Shi, X.; Wang, J.; Zhao, Y. Gamma-ray resistance of regulatory CD4+CD25+Foxp3+ T cells in mice. *Radiat. Res.* **2010**, *173*, 148–157. [[CrossRef](#)]
195. Muroyama, Y.; Nirschl, T.R.; Kochel, C.M.; Lopez-Bujanda, Z.; Theodros, D.; Mao, W.; Carrera-Haro, M.A.; Ghasemzadeh, A.; Marciscano, A.E.; Velarde, E.; et al. Stereotactic Radiotherapy Increases Functionally Suppressive Regulatory T Cells in the Tumor Microenvironment. *Cancer Immunol. Res.* **2017**, *5*, 992–1004. [[CrossRef](#)]
196. Belcaid, Z.; Phallen, J.A.; Zeng, J.; See, A.P.; Mathios, D.; Gottschalk, C.; Nicholas, S.; Kellett, M.; Ruzevick, J.; Jackson, C.; et al. Focal radiation therapy combined with 4-1BB activation and CTLA-4 blockade yields long-term survival and a protective antigen-specific memory response in a murine glioma model. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e101764. [[CrossRef](#)]
197. Liao, C.; Xiao, W.; Zhu, N.; Liu, Z.; Yang, J.; Wang, Y.; Hong, M. Radiotherapy suppressed tumor-specific recruitment of regulator T cells via up-regulating microR-545 in Lewis lung carcinoma cells. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 2535–2544.