



HAL
open science

Etude d'un régime enrichi en inuline sur la fonction du microbiote et la réponse immune anti-cancer

Emilie Boucher

► **To cite this version:**

Emilie Boucher. Etude d'un régime enrichi en inuline sur la fonction du microbiote et la réponse immune anti-cancer. Cancer. Université Grenoble Alpes [2020-..], 2023. Français. NNT : 2023GRALS032 . tel-04354302

HAL Id: tel-04354302

<https://theses.hal.science/tel-04354302>

Submitted on 19 Dec 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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

École doctorale : ISCE - Ingénierie pour la Santé la Cognition et l'Environnement

Spécialité : BIS – Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et l'environnement

Unité de recherche : Translational Innovation in Medicine and Complexity

Étude d'un régime enrichi en inuline sur la fonction du microbiote et la réponse immune anti-cancer

Study of the impact of an inulin-enriched diet on gut microbiota and the host immune anti-cancer response

Présentée par

Emilie BOUCHER

Direction de thèse :

Delphine ALDEBERT

MAÎTRESSE DE CONFÉRENCE, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Dalil HANNANI

CHARGÉ DE RECHERCHE CNRS, Université Grenoble Alpes

Co-encadrant de thèse

Rapporteurs :

Nathalie Chaput

PROFESSEURE DES UNIVERSITÉS – PRATICIENNE HOSPITALIÈRE, Institut Gustave Roussy

Emmanuel Scotet

DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université de Nantes

Thèse soutenue publiquement le **27 octobre 2023**, devant le jury composé de :

Delphine Aldebert

MAÎTRESSE DE CONFÉRENCE, Université Grenoble Alpes

Directrice de thèse

Nathalie Chaput

PROFESSEURE DES UNIVERSITÉS – PRATICIENNE HOSPITALIÈRE, Institut Gustave Roussy

Rapporteuse

Emmanuel Scotet

DIRECTEUR DE RECHERCHE, Université de Nantes

Rapporteur

Bruno Quesnel

PROFESSEUR DES UNIVERSITÉS – PRATICIEN HOSPITALIER, Institut Carnot Opale

Président du jury

Julie Charles

PROFESSEURE DES UNIVERSITÉS – PRATICIENNE HOSPITALIÈRE, CHU Université Grenoble Alpes

Examinatrice

Dalil Hannani

CHARGÉ DE RECHERCHE CNRS, Université Grenoble Alpes

Co-encadrant de thèse



REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à adresser mes remerciements aux membres du jury qui me font l'honneur de juger cette thèse, les rapporteurs le Pr. Nathalie Chaput et le Dr. Emmanuel Scotet, ainsi que les examinateurs le Pr. Julie Charles et le Pr. Bruno Quesnel. Je les remercie sincèrement de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

Ces trois années de thèse ont été passionnantes, enrichissantes, scientifiquement et humainement. Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à cette belle aventure.

Delphine, je te remercie d'avoir accepté d'être ma directrice de thèse et d'avoir pris ce rôle tant à cœur. Si nos thématiques de recherches semblaient éloignées, tu as su les faire se rencontrer et me faire découvrir un tout nouveau domaine. Je tiens surtout à te remercier pour tes encouragements et ton soutien durant ces trois années.

Dalil, un grand merci pour tout ce que tu m'as appris, et surtout que « en immuno, ça dépend ». Merci pour ces trois années de thèse, et plus largement pour ces 5 années d'encadrement. Merci de m'avoir confié un sujet passionnant, de m'avoir formée et de m'avoir appris à gagner en autonomie, ce qui n'a pas été toujours facile ! Tu m'as fait découvrir la recherche, avec ses bons et ses mauvais moments (comme avec cette satanée B16) et je t'en suis très reconnaissante.

Ce projet n'aurait pas pu se réaliser sans l'aide de nos nombreux collaborateurs. Merci Mathias Lavie-Richard, Antonia Suau et Irène Mangin pour avoir réalisé les analyses de caractérisation du microbiote. Merci Caroline Aspod pour m'avoir formée sur la méthode SCENITH et pour nous avoir fourni les échantillons de sang. Merci Sylvie Berthier de la plateforme de cytométrie en flux et Caroline Plazy de la plateforme de métabolomique. Merci également à Stéphanie Blanquet-Diot de nous avoir fourni des échantillons d'eaux fécales. Un grand merci à la Plateforme de Haute Technologie Animale au sein de laquelle j'ai pu réaliser la majorité de mes expériences. Enfin, un merci particulier à la « H₂ team », Philippe, François, Stéphane, Jean-

Pierre, Cordélia et Victor, pour la mise en commun de nos forces et compétences sur le projet liant inuline et H₂.

Merci à Pascal Fender et Christine Chirat pour leur confiance, et de m'avoir permis de participer à leurs projets d'immuno-oncologie.

Mes années de thèse se sont déroulées dans un cadre extrêmement bienveillant, au sein d'une belle équipe de recherche. Je remercie tous les membres de l'Equipe TrEE, et plus largement du laboratoire TIMC, en particulier Fabien, Bertrand, Béatrice, Françoise, Muriel, Hélène et Sophie. Merci de m'avoir si bien accueillie dans l'équipe dès mon stage de M1. Je remercie également Catherine Zoppis et Hélène Barrès qui m'ont donné la chance de présenter ma passion pour la recherche devant différents publics.

Je tiens à remercier Françoise Cornillon et Fabienne Agasse de m'avoir fait découvrir et adorer l'enseignement.

Merci aux membres de mon Comité de Suivi Individuel de thèse, Véronique Frachet et Françoise Gabert pour leurs conseils et leur bienveillance.

Je remercie également les copains et collègues, mes piliers au laboratoire (et au-delà !). Un immense merci Caroline. Tu as toujours été disponible pour m'aider, me former, m'accompagner ou simplement discuter, en échange d'un twix de la survie, ce qui est peu cher payé. Je suis honorée d'avoir eu la chance de travailler avec toi. Je remercie également Clément, mon super binôme de bureau, de m'avoir accompagnée à l'animalerie et surtout de m'avoir appris toute la biologie moléculaire que j'avais en horreur. Tu as su rendre les PCR, les statistiques, les analyses d'ADN presque amusantes. Alex, je te remercie pour ton aide pour mieux comprendre le microbiote, mais surtout pour ta bonne humeur au labal (oui je vais faire l'effort). Tu es un ami formidable, rigolal, et je sais que je pourrai toujours compter sur toi. Merci Razak d'avoir été un si gentil colocataire de bureau. Tu as toujours su trouver les mots justes pour m'encourager. Je retiendrai cet adage que tu m'as appris « Si on monte à cheval pour tuer ton père, quand tu verras une termitière au loin dans la savane tu fuiras ». Julie, merci d'avoir redonné de la vie « et du champignon » dans notre bureau !

Je tiens à remercier tous les stagiaires qui m'ont aidée et accompagnée dans mes expérimentations : Célia, Driss, Mathou, Alan, et en particulier Margaux et Victor, aka « les cafards ». Vos blagues, chansons, reportages et créations artistiques étaient à la hauteur de vos qualités scientifiques : remarquables ! Je vous remercie sincèrement pour votre implication dans vos projets de stage, et pour la super ambiance que vous avez apportée au 8^{ème} étage. Je suis fière d'avoir participé à votre encadrement de stage, et je vous remercie d'avoir contribué à mon projet de thèse.

Enfin, merci à tous ceux qui m'ont soutenue pendant ces années. Merci papa et maman d'avoir été les premiers à me faire aimer la recherche. Vous aviez raison : « les années de thèse, ce sont les plus belles années ». Merci Tichat d'avoir toujours été là, de m'avoir toujours soutenue dans cette aventure. Tes encouragements et ton admiration ont été une source d'énergie que tu ne soupçonnes pas. Merci Tété pour tout. Tu as été présent à chaque instant et un réel soutien. Je n'aurais pas pu rêver meilleur partenaire dans cette aventure. Merci Patrice et Véro pour vos encouragements et votre soutien inconditionnel. Enfin, merci à tous les copains, qui ont participé à la joie et la bonne humeur ces trois dernières années : Titou, Emma, Erwan, Simon, les CMBs et tous les autres.

RESUME EN FRANÇAIS

Le microbiote intestinal (MI) regroupe tous les micro-organismes vivant dans la lumière de l'intestin d'un hôte et est impliqué dans de nombreux aspects de la santé, dont l'immunité. L'émergence des bienfaits du MI sur la santé en fait une cible thérapeutique pour de nombreuses pathologies. En cancérologie, il a été montré que le microbiote joue un rôle important à la fois dans la prévention de la maladie, mais aussi dans la réponse des patients aux immunothérapies. Moduler le MI pourrait être un moyen de renforcer le système immunitaire afin d'aider à la prévention et au traitement du cancer. La composition et la fonction du MI dépend fortement de l'alimentation. Les prébiotiques, communément appelés fibres alimentaires, ont un potentiel de diversification du MI et d'optimisation de ses fonctions, et subséquemment de l'immunité. La modulation du MI par l'alimentation pourrait renforcer l'immunité de l'hôte et ainsi améliorer la réponse antitumorale. L'objet de cette thèse a été d'analyser les propriétés immunostimulantes et anti-cancéreuses d'un régime enrichi en inuline, un prébiotique présent dans les végétaux. Ce travail montre que dans les conditions physiologiques, l'inuline impacte profondément la composition et la fonction métabolique du microbiote intestinal. De plus, elle renforce l'immunité intestinale du côlon, en augmentant la proportion de Lymphocytes T (LT) $\gamma\delta$ produisant de l'interféron γ (IFN γ). L'inuline favorise également l'intégrité de la barrière intestinale en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation. Dans différents modèles cancéreux, l'inuline permet un meilleur contrôle de la croissance tumorale par rapport à un régime standard, et augmente le pourcentage de LT $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'interféron γ (IFN γ), dans les tumeurs. Cet effet antitumoral est dépendant du microbiote intestinal mais aussi des LTs $\gamma\delta$, qui assurent à la fois un rôle cytotoxique et un rôle de soutien immunitaire. Ce travail représente une preuve de concept préclinique que l'alimentation est un paramètre majeur de régulation de l'immunosurveillance antitumorale et ouvre des perspectives de stratégies de prévention par l'alimentation, ou de thérapeutique associée aux thérapies anticancéreuses déjà existantes.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS

The gut microbiota (GM) encompasses all microorganisms living in the gut lumen and is implicated in various aspects of its host's health. The emerging health benefits of the GM make it a therapeutic target for many pathologies. In oncology, it has been shown that the microbiota plays an important role not only in preventing the disease but also in patients' response to immunotherapies. Modulating the microbiota could be a way to boost the immune system, aiding in the prevention and treatment of cancer. The composition and function of the GM, along with subsequent immunity, strongly depend on the diet. Prebiotics, also known as dietary fibers, significantly impact and diversify the GM. Modulating the GM through dietary interventions could potentially strengthen the host's immune system and enhance the anti-tumoral response. This project aimed to analyze the immunostimulatory properties of an inulin-enriched diet, a dietary fiber commonly found in vegetables. Under physiological conditions, we have demonstrated that inulin consumption modulates the composition and metabolic function of the gut microbiota. Moreover, inulin strengthens gut immunity by increasing the proportion of IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells. It also promotes gut barrier integrity by upregulating genes involved in inflammation regulation. In several transplantable tumor models, the inulin-enriched diet inhibits tumor growth by promoting the infiltration of IFN γ -producing $\gamma\delta$, CD4+, and CD8⁺ T cells into the tumors. This antitumor effect is mediated by the GM and also by $\gamma\delta$ T cells, which serve cytotoxic and helper roles. This work presents a preclinical proof of concept, highlighting the role of diet as a key regulator of anticancer immunosurveillance. These findings support and rationalize the utilization of such prebiotic approaches for the prevention and/or treatment of cancers.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé en Français	1
Résumé en Anglais.....	2
Table des matières	3
Liste des Figures	11
Liste des Tableaux	16
Liste des Abréviations.....	17
Introduction	21
<i>I. Le cancer</i>	21
Données épidémiologiques.....	21
Le mélanome	23
Les différents types de mélanome.....	24
Les facteurs de risque	25
Les stades de la maladie.....	26
Les traitements de mélanomes	28
Chirurgie	28
Immunothérapie	28
Thérapies ciblées : Inhibiteurs de la voie BRAF-MAPK-ERK	29
Immunothérapies par blocage des points de contrôle	30
<i>II. Introduction au système immunitaire</i>	34
Les organes lymphoïdes	34
L'immunité innée	36
Les granulocytes.....	36
Les Macrophages et les cellules dendritiques	37
Les Natural Killers	38
Les lymphocytes T $\gamma\delta$	38
L'immunité acquise	39
Les lymphocytes B.....	39
Les lymphocytes T	40
Les LTs CD4 ⁺	41
Les LTs CD8 ⁺	43
Entre immunité innée et acquise.....	44
<i>III. L'immunité intestinale</i>	45
Structure de l'intestin.....	45
L'épithélium intestinal.....	47
La lamina Propria.....	49
Le microbiote intestinal.....	50

Le microbiote bactérien	51
Composition	51
Fonctions	54
Le microbiote fongique	55
Composition	55
Fonctions	56
Evolution du microbiote intestinal.....	58
Interactions entre l'immunité intestinale et le microbiote	59
Détection des MAMPs.....	59
Détection des métabolites.....	60
<i>IV. Les LTs $\gamma\delta$ au cœur du dialogue immunité-microbiote</i>	<i>62</i>
Les sous-types	62
Leurs Fonctions	63
Le $\gamma\delta$ TcR.....	65
Reconnaissance de type MHC.....	65
Reconnaissance directe d'antigènes	67
Reconnaissance via les butyrophilines	67
LTs $\gamma\delta$ et microbiote	68
<i>V. Immunologie des cancers et immunothérapies.....</i>	<i>70</i>
Immuno-édition des cancers	70
La règle des 3 E.....	72
Elimination.....	72
Equilibre.....	72
Echappement	73
Moyens d'échappement des cellules tumorales.....	73
Production de molécules pro-tumorales.....	73
Recrutement de cellules immunosuppressives.....	74
Tolérance à l'IFN γ	76
Inactivation et induction d'apoptose des cellules immunitaires	76
Fas/TRAIL.....	76
Les points de contrôle immunitaires	77
Immuno thérapies	79
Immuno thérapies ciblant les LTs $\gamma\delta$	80
Thérapies actives.....	80
Thérapies passives.....	81
Inhibition des points de contrôle	81
Moduler le microbiote pour moduler l'efficacité des inhibiteurs de point de contrôle	82
Probiotiques	83
Transplantation de microbiote fécal (FMT).....	84
Interventions nutritionnelles	85
<i>VI. L'inuline.....</i>	<i>88</i>
Produits issus de la Fermentation de l'inuline.....	89
Fructose	90

SCFAs	91
Dihydrogène	92
L'inuline comme thérapeutique.....	93
L'inuline en traitement de maladies métaboliques.....	93
L'inuline dans le traitement de cancers.....	93
Objectifs du projet.....	95
Chapitre 1 : Effet immunostimulant de l'inuline	97
<i>I. IMPACT DE L'INULINE SUR LE MICROBIOME INTESTINAL</i>	<i>98</i>
Méthodologie : séquençages 16S et ITS2, et spectrométrie de masse	98
Animaux.....	99
Extraction d'ADN de fèces de souris.....	100
Extraction d'ADN au FastPrep®	100
Précipitation de l'ADN et des impuretés	100
Précipitation de l'ADN purifié	101
Séquençage 16S bactérien.....	102
La diversité- α	103
La diversité- β	104
Séquençage ITS2 fongique	106
Métabolomique.....	107
Préparations d'eaux fécales	107
Spectrométrie de masse	107
Traitement des échantillons	107
Pré-analyse des données	108
Analyses statistiques	108
Analyses statistiques et création de figures	108
Résultats	109
Modulation du microbiote intestinal bactérien	109
Impact sur le microbiote fongique.....	112
Impact sur le métabolisme.....	114
Conclusion	116
<i>II. IMPACT DE L'INULINE SUR L'IMMUNITE INTESTINALE.....</i>	<i>117</i>
Méthodologie : analyse des cellules immunitaire coliques.....	117
Animaux.....	118
Collecte de côlons et tri des Lymphocytes Intraépithéliaux et des Cellules de la Lamina Propria	118
Collecte de côlons	118
Isolement des IELs.....	118
Isolement des LPCs.....	119
Cytométrie en flux.....	119
Stimulation des leukocytes	119
Marquage extra- et intra-cellulaire.....	119
Tri cellulaire	120
Rétro-Transcription et Réaction en chaîne par polymérase en temps réel (RT-qPCR).....	120

Extraction d'ARN	121
Rétrotranscription	121
RT-qPCR	122
Résultats	125
Impact sur les Lymphocytes Intra-Epithéliaux (IELs)	125
Impact sur les cellules de la Lamina Propria (LPCs)	127
Conclusion	130
III. EFFET ANTITUMORAL DE L'INULINE	131
Méthodologie : modeles de tumeurs transplantées	131
Animaux	132
Culture cellulaire	132
Lignées cellulaires	132
Mélanome B16 OVA	132
Cancer colorectal MC38 OVA	133
Fibrosarcome MCA205 OVA	133
Implantation tumorale	133
Collecte et Digestion des tumeurs	134
Cytométrie en flux	135
Résultats	135
Effet inhibiteur de la croissance tumorale	135
Immunité infiltrant la tumeur	136
Extension à d'autres modèles de tumeurs transplantables	141
Conclusion	144
IV. ROLE DES LYMPHOYTES T $\gamma\delta$ DANS L'EFFET ANTITUMORAL DE L'INULINE	145
Méthodologie : blocage <i>in vivo</i> des $\gamma\delta$ TcR	145
Animaux	146
Blocage <i>in vivo</i> des $\gamma\delta$ TcR	146
Culture cellulaire	146
Implantation tumorale	146
Collecte et Digestion des tumeurs	146
Cytométrie en flux	146
Résultats	148
Les lymphocytes T $\gamma\delta$: des acteurs clés de l'effet antitumoral de l'inuline	148
Les lymphocytes T $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ : un marqueur de bon pronostic	149
Conclusion	151
V. Caractérisation des lymphocytes t $\gamma\delta$ intra-tumoraux	152
Méthodologie : Evaluation des capacités cytotoxiques et de cellules presentatrices d'antigènes des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux	152
Animaux	153
Culture cellulaire	154
Implantation tumorale	154
Collecte et Digestion des tumeurs	154
Cytométrie en flux	154
Résultats	155

Fonctions cytotoxiques des LTs $\gamma\delta$	155
Fonction APC des LTs $\gamma\delta$	156
Conclusion	158
VI. <i>comment Les lymphocytes T $\gamma\delta$ rejoignent-ils la tumeur ?</i>	159
Méthodologie : Analyse des ganglions et du sang	159
Animaux.....	160
Préparation d'une suspension cellulaire à partir de ganglions.....	160
preparation des échantillons de sang.....	160
Cytométrie en flux.....	161
Résultats	161
Analyse des LTs $\gamma\delta$ des ganglions.....	161
Anlayse des LTs $\gamma\delta$ dans le sang.....	162
Conclusion	164
VII. <i>Origine des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux</i>	165
Méthodologie : Analyse des sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans le côlon, le sang et la tumeur ..	165
Animaux.....	166
Collecte de côlons et tri des Lymphocytes Intraépithéliaux	166
Préparation des échantillons de sang.....	166
Culture cellulaire	166
Implantation tumorale	166
Collecte et Digestion des tumeurs.....	166
Cytométrie en flux.....	167
Résultats	168
LTs $\gamma\delta$ dans le côlon.....	168
LTs $\gamma\delta$ dans le sang	169
LTs $\gamma\delta$ dans la tumeur.....	172
Conclusion	174
VIII. <i>Immunosurveillance accrue : modèle de tumeur chimio-induite</i>	175
Méthodologie : Tumeur induite par injection de Méthylcholantène.....	175
Animaux.....	176
Création du modele de tumeurs chimio-induites	176
Résultats	177
Conclusion	178
IX. <i>L'effet antitumoral de l'inuline peut-il synergiser avec une immunothérapie anti-PD-1 ?</i>	179
Méthodologie : Combinaison d'inuline et d'immunothérapie anti-PD-1	179
Animaux.....	180
Injection d'immunotherapie anti-pd-1	180
Culture cellulaire	180
Implantation tumorale	180
Collecte et Digestion des tumeurs.....	180
Cytométrie en flux.....	180
Résultats	181

Conclusion	184
<i>Conclusion du chapitre 1</i>	185
Chapitre 2 : Comment l'inuline active-t-elle l'immunité ?	187
<i>I. Implication du microbiote intestinal bactérien dans l'effet anti-tumoral de l'inuline</i>	188
Méthodologie : Elimination du microbiote intestinal bactérien par antibiotiques	188
Animaux.....	189
Suppression <i>in vivo</i> du microbiote intestinal bactérien	189
Culture cellulaire	189
Implantation tumorale	189
Collecte et Digestion des tumeurs.....	189
Cytométrie en flux.....	190
Résultats	190
Conclusion	192
<i>II. Implication du microbiote fongique dans l'effet antitumoral de l'inuline</i>	193
Méthodologie : Elimination du microbiote intestinal fongique par antifongique	193
Animaux.....	194
Suppression <i>in vivo</i> du microbiote intestinal fongique	194
Culture cellulaire	194
Implantation tumorale	194
Collecte et Digestion des tumeurs.....	194
Cytométrie en flux.....	194
Résultats	195
Conclusion	197
<i>III. Importance du degré de polymérisation de l'inuline</i>	198
Méthodologie : Evaluation de l'effet antitumoral d'une inuline à chaîne courte	198
Animaux.....	199
Création du modèle de tumeurs chimio-induites	199
Résultats	200
Conclusion	202
<i>IV. Les métabolites</i>	203
Méthodologie : Activation <i>in vitro</i> de LTs $\gamma\delta$ humains dérivés du sang	203
Génération des échantillons d'eaux fécales	204
Isolement de LTs $\gamma\delta$ humains	204
Séparation des Cellules Mononucléées Sanguines Périphériques (PBMCs).....	204
Analyse de l'activation des LTs $\gamma\delta$	205
Cytométrie en flux.....	205
Résultats	206
Conclusion	208
<i>V. Le fructose</i>	209
Méthodologie : SCENITH.....	209
Animaux.....	210
Collecte de côlons et tri des Lymphocytes Intraépithéliaux	210

Tri cellulaire induit par fluorescence des LTs $\gamma\delta$	210
Résonance Magnétique Nucléaire.....	211
RT-qPCR.....	211
SCENITH™.....	212
Stimulation des leucocytes.....	213
Incubation avec les inhibiteurs.....	213
Marquage extra- et intra-cellulaire.....	214
Analyse.....	214
Résultats.....	215
Internalisation du fructose par les LTs $\gamma\delta$	215
Profils métaboliques des IELs.....	216
Conclusion.....	218
<i>VI. Le dihydrogène.....</i>	<i>219</i>
Méthodologie : comparaison des effets de l'inuline et de l'H ₂	219
Animaux.....	221
Mesure de l'H ₂ produit par la fermentation d'inuline.....	221
Hydrogénéothérapie.....	222
Culture cellulaire.....	223
Implantation tumorale.....	223
Collecte et Digestion des tumeurs.....	223
preparation des échantillons de sang.....	223
Cytométrie en flux.....	223
Résultats.....	224
Effet antitumoral d'un gavage d'inuline.....	224
Profil de production d'H ₂ à la suite de la consommation d'inuline.....	225
Comparaison de l'effet antitumoral de l'inuline et de l'H ₂ T.....	226
Comparaison de l'effet immunostimulant de l'inuline et de l'H ₂ T.....	228
Conclusion.....	230
<i>Conclusion du chapitre 2.....</i>	<i>231</i>
Conclusion générale.....	232
Discussion.....	233
Figures supplémentaires.....	241
Références.....	245
Projets annexes.....	267
<i>L'inuline protège contre une infection létale à Pseudomonas aeruginosa.....</i>	<i>267</i>
<i>Effet de l'inuline dans un modèle de colite inflammatoire.....</i>	<i>268</i>
<i>Collaboration avec l'équipe adénovirus de l'institut de Biologie Structurale.....</i>	<i>270</i>
Communication.....	271

Publications	271
Présentations orales.....	271
Présentations de posters	272
Vulgarisation scientifique.....	272
Annexe 1.....	273
Annexe 2.....	285
Annexe 3.....	296

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Estimation de l'incidence et de la mortalité de différents cancers dans le monde en 2020, tous sexes et tous âges confondus.	22
Figure 2 : Estimation de l'incidence et de la mortalité de différents cancers en France en 2020, tous sexes et tous âges confondus.	23
Figure 3 : Anatomie de la peau.	23
Figure 4 : Les 4 types principaux de mélanome.....	25
Figure 5 : Les 5 stades du mélanome.....	26
Figure 6 : Effet antitumoral de l'immunothérapie IFN α	29
Figure 7 : Voies de signalisation BRAF-MAPK-ERK et ses inhibiteurs thérapeutiques.....	30
Figure 8 : Les points de contrôle immunitaire entre les LTs et les DCs, et leurs inhibiteurs thérapeutiques.	31
Figure 9 : Arbre de décision pour le traitement systémique des mélanomes de stade III et IV.	33
Figure 10 : Les organes lymphoïdes primaires et secondaires.....	34
Figure 11 : Cellules de l'immunité innée, acquise, avec des caractéristiques communes.	35
Figure 12 : Modes d'action des anticorps contre les agents pathogènes.....	40
Figure 13 : Les signaux nécessaires à l'activation complète des LTs.....	41
Figure 14 : Les différents sous-types de LTs CD4+ auxiliaires et régulateurs.	42
Figure 15 : Les différents sous-types de LTs CD8+ cytotoxiques.....	43
Figure 16 : Rôles de LTs CD8+.	44
Figure 17 : Parties du côlon.....	45
Figure 18 : Structures de la paroi intestinale.....	46
Figure 19 : Structure de la muqueuse colique.....	47
Figure 20 : Expression de molécules d'adressage intestinal par les IELs.	48
Figure 21 : Estimation de la densité des populations bactériennes le long du tube digestif. ...	51
Figure 22 : Structure des ribosomes bactériens.	52
Figure 23 : Classification non exhaustive d'exemples d'espèces bactériennes présentes dans le microbiote intestinal, avec leur nouvelle taxonomie.	53
Figure 24 : Rôles du microbiote intestinal.	54
Figure 25 : Exemples d'interactions entre les bactéries et les champignons du microbiote intestinal.	57
Figure 26 : Les sous-types de LTs $\gamma\delta$ chez l'homme et chez la souris, et leur localisation, en fonction de leurs chaînes γ et δ	62
Figure 27 : Les sous-types de LTs $\gamma\delta$ chez l'homme et chez la souris en fonction des cytokines qu'ils produisent.	63
Figure 28 : Populations de LTs $V\gamma 9\delta 2$ suivant leurs fonctions.	64
Figure 29 : Rôles de LTs $\gamma\delta$	65
Figure 30 : Les reconnaissances de type MHC des TcR $\gamma\delta$	66
Figure 31 : Exemples d'antigènes reconnus directement par les TcR $\gamma\delta$	67
Figure 32 : Activation des TcR $\gamma\delta$ via les phosphoantigènes.	68

Figure 33 : L'immuno-édition des cancers.....	71
Figure 34 : Molécules pro-tumorales produites par les cellules cancéreuses.....	74
Figure 35 : Exemples de cellules immunosuppressives recrutées sur le site tumoral par les cellules cancéreuses.....	75
Figure 36 : Fonctions pro-tumorales des LTs $\gamma\delta$	75
Figure 37 : Diminution et mutations de molécules détectées par l'immunité.....	76
Figure 38 : Exemples de molécules de points contrôle exprimées par LTs.....	77
Figure 39 : Exemples de molécules de point de contrôle et leurs ligands, exprimés par les LTs.....	79
Figure 40 : Formule chimique de l'inuline.....	88
Figure 41 : Exemple d'aliments contenant de l'inuline.....	88
Figure 42 : Liaisons ciblées par les endo- et exo-inulinases.....	89
Figure 43 : Absorption du fructose et fermentation de l'inuline dans le tube digestif.....	90
Figure 44 : Résumé des voies métaboliques microbiennes impliquées dans la synthèse des SCFAs à la suite de la fermentation de l'inuline.....	91
Figure 45 : Projet de thèse.....	95
Figure 46 : Étude de l'effet immunostimulant de l'inuline dans un contexte de cancer.....	97
Figure 47 : Plan expérimental pour l'analyse de microbiome.....	99
Figure 48 : Exemple de comparaison de la diversité- α de 2 échantillons, basée sur le nombre d'espèces bactériennes.....	103
Figure 49 : Exemple de comparaison de la diversité- α de 2 échantillons, avec comptage des OTU, et prenant en compte l'abondance relative des espèces.....	104
Figure 50 : Diversité- β de 6 échantillons, suivant 2 variables.....	105
Figure 51 : Exemple de cercle de corrélation avec 5 variables (V1 à V5).....	105
Figure 52 : Exemple de PCA.....	106
Figure 53 : Composition du microbiote bactérien des souris contrôles et inulines.....	109
Figure 54 : Diversité- β par analyse Bray Curtis.....	110
Figure 55 : Diversité- α	111
Figure 56 : Abondance relative de l'espèce <i>Bifidobacterium animalis</i>	111
Figure 57 : Abondances relatives des phyla fongiques les plus présents.....	112
Figure 58 : Diversité- β par analyse Bray Curtis.....	113
Figure 59 : Abondance relative du genre <i>Claviceps</i>	113
Figure 60 : Chromatogrammes des profils métaboliques des eaux fécales contrôles et inulines, obtenus par LC-MS/MS.....	114
Figure 61 : Diagramme de score d'analyse en composantes principales (ACP).....	115
Figure 62 : Volcano plot des eaux fécales contrôles et inulines.....	115
Figure 63 : Modulation du microbiote intestinal par le régime inuline.....	116
Figure 64 : Organisation de l'immunité colique.....	117
Figure 65 : Plan expérimental pour l'analyse de l'immunité intestinale.....	118
Figure 66 : Programme appliqué au thermocycleur pour amplifier les ADNc.....	124
Figure 67 : Exemple d'un profil d'amplification permettant de déterminer la valeur du Ct...124	124
Figure 68 : Analyse des IELs du côlon.....	125
Figure 69 : Analyse des IELs produisant de l'IFN γ	126
Figure 70 : Analyse de l'expression génique dans l'épithélium du côlon.....	127
Figure 71 : Analyse des LPCs du côlon.....	127

Figure 72 : Analyse des LPCs produisant de l'IL-10.....	128
Figure 73 : Analyse de l'expression génique dans la lamina propria du côlon.	129
Figure 74 : Schéma résumant les effets de l'inuline sur l'immunité du côlon de souris.	130
Figure 75 : Plan expérimental pour l'évaluation de l'effet antitumoral de l'inuline.....	131
Figure 76 : Effet antitumoral du régime inuline.	136
Figure 77 : Infiltration tumorale.....	137
Figure 78 : LTs infiltrant les tumeurs.....	137
Figure 79 : LTs produisant de l'IFN γ	138
Figure 80 : Cellules dendritiques.....	139
Figure 81 : Fonction des cellules dendritiques.	140
Figure 82 : LTs spécifiques de l'OVA.	141
Figure 83 : Effet antitumoral du régime inuline dans plusieurs modèles de tumeurs transplantées.....	142
Figure 84 : Immunité infiltrant les tumeurs dans plusieurs modèles de tumeurs transplantées.	143
Figure 85 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ dans plusieurs modèles de tumeurs transplantées.....	143
Figure 86 : Effet antitumoral de l'inuline.	144
Figure 87 : Plan expérimental pour l'évaluation de l'implication des LTs $\gamma\delta$ dans l'effet antitumoral de l'inuline.	145
Figure 88 : Sélection des lymphocytes T pour les analyses de cytométrie en flux.	147
Figure 89 : Effet antitumoral du régime inuline après blocage des $\gamma\delta$ TcR in vivo.	148
Figure 90 : LTs produisant de l'IFN γ	149
Figure 91 : LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ et croissances tumorales.....	150
Figure 92 : Les lymphocytes T $\gamma\delta$: acteurs clés de l'effet antitumoral du régime inuline.....	151
Figure 93 : Plan expérimental pour l'analyse des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux.	153
Figure 94 : LTs $\gamma\delta$ exprimant des marqueurs d'activation.....	155
Figure 95 : LTs $\gamma\delta$ exprimant des marqueurs de APC.	156
Figure 96 : LTs $\gamma\delta$ exprimant CD80 et MHC II.	157
Figure 97 : Les divers rôles des LTs $\gamma\delta$ dans les tumeurs de souris nourries avec de l'inuline.	158
Figure 98 : Localisation des ganglions analysés.....	159
Figure 99 : Plan expérimental pour l'analyse de l'immunité circulante.....	160
Figure 100 : LTs des ganglions drainants et drainants.....	161
Figure 101 : LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ dans les ganglions drainants et mésentériques.	162
Figure 102 : LTs du sang.	163
Figure 103 : LTs IFN γ ⁺ du sang.....	163
Figure 104 : Modulation de l'immunité circulante par la consommation d'inuline.	164
Figure 105 : Plan expérimental pour l'analyse des sous-types de LTs $\gamma\delta$	166
Figure 106 : Sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans les côlons de souris.....	168
Figure 107 : Les LTs $\gamma\delta$ du côlon produisant de l'IFN γ	169
Figure 108 : Sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans le sang de souris.	170
Figure 109 : Les LTs $\gamma\delta$ du sang produisant de l'IFN γ	170
Figure 110 : LTs $\gamma\delta$ exprimant plusieurs chaînes V γ dans le sang.	171
Figure 111 : Coexpression des chaînes V γ 1 et V γ 7.....	172

Figure 112 : Sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans les tumeurs de souris.....	173
Figure 113 : Les sous-types de LTs $\gamma\delta$ majoritairement présents dans le sang, le côlon et les tumeurs de souris.....	174
Figure 114 : Plan expérimental pour évaluer l'effet préventif de l'inuline sur l'apparition de tumeurs chimio-induites.	175
Figure 115 : Nombre de tumeurs cutanées post-injection de MCA.	177
Figure 116 : Croissance des fibrosarcomes apparus post-injection de MCA.....	178
Figure 117 : Plan expérimental pour évaluer la combinaison de l'inuline et d'une immunothérapie anti-PD-1.	179
Figure 118 : Effet antitumoral de la combinaison de l'inuline et d'un anti-PD-1.	181
Figure 119 : LTs conventionnels produisant de l'IFN γ	182
Figure 120 : LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ	183
Figure 121 : Expression de PD-1 par les LTs.....	183
Figure 122 : Hypothèses de mécanismes d'action lymphocytaires de l'inuline et de l'immunothérapie anti-PD-1.....	184
Figure 123 : Proposition de mécanisme d'action de l'inuline sur l'immunité intestinale, circulante, et antitumorale.....	185
Figure 124 : Possibles voies d'activation de l'immunité par l'inuline.....	187
Figure 125 : Plan expérimental pour l'étude de l'implication du microbiote intestinal bactérien dans l'effet antitumoral de l'inuline.....	189
Figure 126 : Implication du microbiote intestinal bactérien dans l'effet antitumoral de l'inuline.	190
Figure 127 : Lymphocytes T infiltrant les tumeurs.	191
Figure 128 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ	191
Figure 129 : L'inuline doit être fermentée par le microbiote intestinal pour exercer un effet antitumoral.	192
Figure 130 : Plan expérimental pour l'étude de l'implication du microbiote intestinal fongique dans l'effet antitumoral de l'inuline.....	194
Figure 131 : Implication du microbiote intestinal fongique dans l'effet antitumoral de l'inuline.	195
Figure 132 : Lymphocytes T infiltrant les tumeurs.	196
Figure 133 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ	196
Figure 134 : Le mycobiote intestinal n'impacte l'effet antitumoral de l'inuline.....	197
Figure 135 : Exemple d'inulines à chaînes longues ou courtes.	198
Figure 136 : Plan expérimental pour étudier l'importance du degré de polymérisation de l'inuline dans son effet antitumoral.	199
Figure 137 : Proportion des souris ayant développé une tumeur cutanée post-injection de MCA.	200
Figure 138 : Croissance des fibrosarcomes apparus post-injection de MCA.....	201
Figure 139 : Proportion des souris ayant développé une tumeur cutanée 120 jours post-injection de MCA.	201
Figure 140 : Le degré de polymérisation de l'inuline affecte son impact sur l'apparition de cancers.....	202
Figure 141 : Plan expérimental pour tester l'activation des LTs $\gamma\delta$ grâce aux métabolites microbiens.	203

Figure 142 : Localisation de l'anneau de PBMCs après la centrifugation sur Ficoll.....	204
Figure 143 : Analyse de l'activation des LTs $\gamma\delta$ par de l'eau fécale.	206
Figure 144 : Analyse de la production de cytokines par les LTs $\gamma\delta$ exposés à de l'eau fécale.	207
Figure 145 : Les métabolites produits par le microbiote intestinal peuvent activer les LTs $\gamma\delta$	208
Figure 146 : Plan expérimental pour étudier le profil métabolique des IELs $\gamma\delta$ coliques.....	210
Figure 147 : Structure de la puromycine.	213
Figure 148 : Exemple de marquages de la puromycine obtenus.	214
Figure 149 : Endométabolome des IELs $\gamma\delta$ des souris nourries avec de l'inuline.	215
Figure 150 : Analyse de l'expression des transporteurs de fructose par les IELs du côlon.	216
Figure 151 : Analyse de l'activité métabolique des IELs $\gamma\delta$ du côlon par SCENITH™.....	217
Figure 152 : Analyse des profils métaboliques des IELs $\gamma\delta$ du côlon par SCENITH™.....	217
Figure 153 : Plan expérimental pour la détermination du profil de production d'H ₂ à la suite de la consommation d'inuline.	220
Figure 154 : Plan expérimental pour la comparaison des effets antitumoraux de l'inuline et de l'H ₂ T.....	220
Figure 155 : Plan expérimental pour la comparaison des effets immunostimulants de l'inuline et de l'H ₂ T.	221
Figure 156 : Schéma simplifié du dispositif de mesure d'H ₂	222
Figure 157 : Schéma du dispositif d'hydrogénéothérapie.....	223
Figure 158 : Effet antitumoral de l'inuline administrée par gavage.....	224
Figure 159 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ dans les tumeurs.....	225
Figure 160 : Profil de production d'H ₂ post gavage de 70 mg d'inuline.	226
Figure 161 : Effet antitumoral d'une dose faible d'inuline et d'une hydrogénéothérapie.....	227
Figure 162 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ dans les tumeurs.....	228
Figure 163 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ dans le sang.....	229
Figure 164 : La consommation d'inuline et l'hydrogénéothérapie entraînent le même effet antitumoral et immunostimulant dans le sang et dans les tumeurs.	230
Figure 165 : Proposition de mécanisme d'action de l'inuline sur l'immunité.	231
Figure supplémentaire S1 : Sélection des lymphocytes T pour les analyses de cytométrie en flux.	241
Figure supplémentaire S2 : Effet antitumoral du régime inuline chez des souris mâles.....	242
Figure supplémentaire S3 : Lymphocytes T infiltrant les tumeurs de souris mâles.	242
Figure supplémentaire S4 : LTs $\gamma\delta$ exprimant plusieurs chaînes V γ dans le côlon.	243
Figure supplémentaire S5 : Analyse des profils métaboliques des IELs CD4 ⁺ et CD8 ⁺ du côlon par SCENITH™.....	243

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Taux de survie sur 5 ans associé au stade du mélanome au moment du diagnostic.	27
Tableau 2 : Concentration (ng/μL) et pureté des ADNg récupérés après extraction.	102
Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des IELs et des LPCs.....	120
Tableau 4 : Quantification des ARN purifiés.	121
Tableau 5 : Volumes des solutions d'ARN utilisés pour les rétro-transcription, et quantités d'ARN correspondantes.	122
Tableau 6 : Critères de conceptions des amorces de RT-qPCR.	122
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR. FW = séquence Forward (sens) ; RV = séquence reverse (anti-sens).	123
Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des TILs	146
Tableau 9 : Marqueurs analysés à la surface des LTs $\gamma\delta$ pour évaluer leur capacité cytotoxique.	153
Tableau 10 : Marqueurs analysés à la surface des LTs $\gamma\delta$ pour évaluer leur capacité de cellule présentatrice d'antigènes.	153
Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des TILs cytotoxiques	154
Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des TILs APC.....	154
Tableau 13 : Listes de anticorps utilisés pour l'analyse des LTs $\gamma\delta$ coliques et intra-tumoraux.	167
Tableau 14 : Panels d'anticorps utilisés pour l'analyse des LTs $\gamma\delta$ sanguins.	167
Tableau 15 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse de l'expression de PD-1.....	180
Tableau 16 : Comparaison des 2 inulines Orafti [®] testées.	199
Tableau 17 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des IELs et des LPCs.....	205
Tableau 18 : Liste des anticorps utilisés pour le tri des LTs $\gamma\delta$	211
Tableau 19 : Quantification des ARNs purifiés.....	212
Tableau 20 : Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR. FW = séquence Forward (sens) ; RV = séquence Reverse (anti-sens).....	212

LISTE DES ABBREVIATIONS

A

ADN : Acide Désoxyribonucléique
AhR : Récepteur d'Aryl hydrocarbure
ARN : Acide Ribonucléique
APC : Cellule Présentatrice d'Antigène

B

BcR : Récepteur de cellule B
BTN : Butyrophiline

C

CCL : Ligand de Chimiokine C-C
CCR : Récepteur de Chimiokine C-C
CD : Classe de Différenciation
CEACAM1 : CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1
CH₄ : Méthane
CO₂ : Dioxyde de carbone
COX : Cyclo-Oxygénase
CTA : Antigènes Cancéreux/Testiculaires
CTLA-4 : Antigène 4 du Lymphocyte T Cytotoxique

D

DC : Cellule Dendritique
DMEM : Dulbeco's Modified Essential Medium
DP : Degré de Polymérisation
DR : Death Receptor

DXS2 : 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase 2

E

EGFR : Récepteur de Facteurs de Croissance Externes
EPCR : Récepteur Endothélial de Protéine C
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases

F

FasL : Ligand de Fas
FDA : United States Food and Drug Administration
FGL-1 : Protéine de type Fibrinogène
FMT : Transplantation de Microbiote Fécal
FOS : Fructo-Oligo-Saccharide
FoxP3 : facteur de transcription Forkhead box P3

G

GALT : Tissus lymphoïdes associés au Tube digestif
GAPDH : GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase
GF : Germ-Free / Sans germe
GPCR : Récepteurs Couplés à la Protéine G

H

H₂ : Dihydrogène
H₂T : Hydrogénéothérapie
HBSS : Hank's Balanced Solution
HDAC : Histones DésACétylases

HFD : Régime riche en lipides

HIV : Virus de l'Immunodéficience

Humaine

HMBPP : (E)-4-hydroxy-3-methyl-but-2-enylpyrophosphate

HSV-g1 : Glycoprotéine Virale Herpès Simplex I

I

IARC : Agence Internationale de Recherche sur le Cancer

ICI : Inhibiteurs de point de contrôle

ICSP : Comité International de Systématique des Procaryotes

IDO : Indoléamine 2,3-DiOxygénase

IEL : Lymphocyte Intra-Epithélial

IFN α : Interféron alpha

IFN γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ILC : Cellule Lymphoïde Innée

IPP : Isopentenylpyrophosphate

ITS : Espaceur Interne Transcrit

J

K

L

LAG-3 : Lymphocyte Activation Gene 3

LB : Lymphocyte B

LC-MS/MS : Chromatographie Liquide couplée à de la Spectrométrie de Masse

LDA LefSe : Analyse Linéaire Discriminante par Effet de Taille

LFD : Régime pauvre en lipides

LP : Lamina Propria

LT : Lymphocyte T

M

MAMP : Motif Moléculaire Associé aux Micro-organismes

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MCA : MéthylCholAntrène

MDMC : Cellule Suppressive Dérivée de Myéloïde

MEK : Mitogen Activated Protein Kinase Kinase

MHC I : Complex Majeur d'Histocompatibilité de classe I

MHC II : Complex Majeur d'Histocompatibilité de classe II

MICA/MICB : Chaines A ou B apparentées aux MHC de classe I

MIP : Protéine Inflammatoire Macrophagique

MMP : Métalloprotéinase Matricielle

MR1 : Molécules de type MHC de classe I

N

NCI : National Cancer Institut

NIH : National Institut of Health

NK : Natural Killer

NKG2D : Natural Killer Receptor Group 2D

NLR : Récepteurs de type NOD

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle

OVA : Ovalbumine

P

p-Ag : Phosphoantigène

PBS : Tampon Phosphate Salin

PC : Composante Principale

PCA : Analyse en Composante Principale

PCR : Réactions en Chaîne par Polymérase

PD-1 : Protéine 1 de la mort cellulaire programmée

pDC : DCs plasmacytoïdes

PDGF : Facteur de Croissance Dérivé des Plaquettes

PD-L1 : Ligand 1 de PD-1

PD-L2 : Ligand 2 de PD-1

PMA : 12-myristate 13-acetate

PRR : Récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1

PVPP : PolyVinylPolyPyrrolidone

Q

R

ROR γ t : Receptor-related Orphan

Receptor- γ

RPM : Rotation Par Minute

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

RQ : Quantité Relative

S

SA : Super Antigène

SCFA : Acides Gras à Chaînes Courtes

SEA : Enterotoxine Staphylococcale A

SEM : Erreur type

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T

TAA : Antigène Associé à la Tumeur

TAM : Macrophages Associés à la Tumeur

Tc : Lymphocyte T cytotoxique

TcR : Récepteur de cellule T

TGF- β : Facteur de Croissance

Transformant bêta

T_H : Lymphocyte T helper/auxiliaire

TIL : Lymphocyte Infiltrant la Tumeur

TIM-3 : T-cell Immunoglobulin and Mucin containing protein 3

TLR : Récepteur de type Toll

TME : MicroEnvironnement Tumoral

TNF- α : Facteur de Nécrose Tumorale alpha

TRAIL : TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

T_{REG} : Lymphocyte T Régulateur

TSA : Antigènes Spécifiques de la Tumeur

U

ULBP4 : Ligand UL16 de la Protéine 4

UV : Ultra-Violet

V

VISIG-3 : V-Set and Immunoglobulin domain containing 3

VISTA : V-domain Ig Suppressor of T cell Activation

VEGF : Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire

W

X

Y

Z

ZO-1 : Protéine 1 de jonction serrée

INTRODUCTION

I. LE CANCER

DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES

Le cancer est la deuxième cause de mortalité dans le monde, après les maladies cardiovasculaires, d'après l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC) de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [1]. Avec plus de 18 millions de nouveaux cas et environ 10 millions de décès par an, c'est l'équivalent de la population entière du Guatemala qui développe un cancer, et l'équivalent de la population du Portugal qui disparaît chaque année à cause de cette maladie [1]. L'OMS estime que d'ici 2040, ces deux chiffres auront pratiquement doublé : 31 millions de nouveaux cas seront détectés par an, et 16 millions de décès seront dus au cancer.

Dans le monde, en 2020, les cancers avec la plus haute incidence sont le cancer du sein chez la femme (2,2 millions de nouveaux cas), le cancer du poumon (2,2 millions de nouveaux cas), le cancer colorectal (1,9 million de nouveaux cas) et le cancer de la prostate chez l'homme (1,4 million de nouveaux cas). Les cancers avec la plus haute mortalité sont le cancer du poumon (1,7 million de décès), le cancer colorectal (0,9 million de décès) et le cancer du foie (0,9 million de décès) [1] (Figure 1).

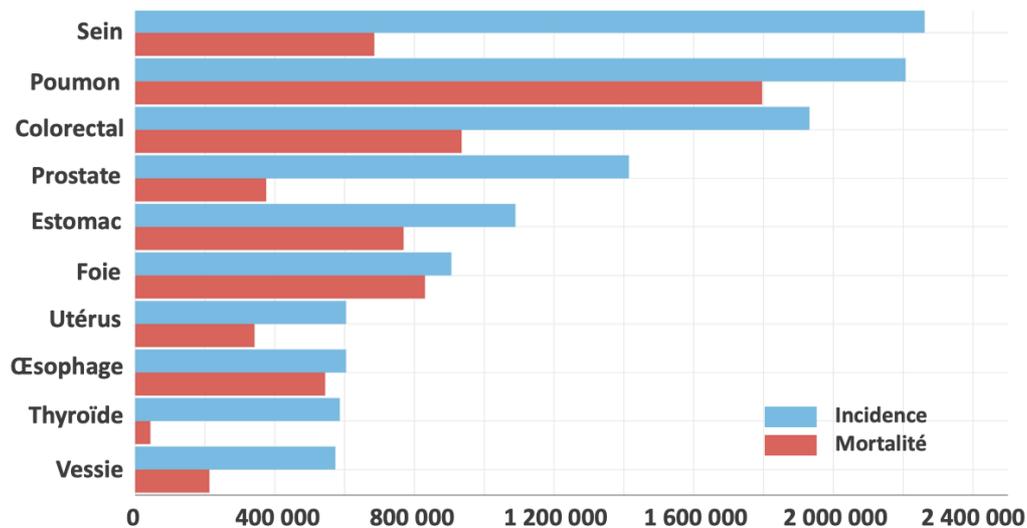


Figure 1 : Estimation de l'incidence et de la mortalité de différents cancers dans le monde en 2020, tous sexes et tous âges confondus. (D'après l'IARC, OMS).

En France, en 2018, 382 000 nouveaux cas de cancer tous cancers confondus ont été diagnostiqués, et environ 157 000 personnes sont décédées des suites de cette maladie [2]. Des données de l'OMS de 2020 indiquent que, toujours pour la France, les cancers avec la plus haute incidence étaient le cancer de la prostate chez l'homme (66 000 nouveaux cas), le cancer du sein chez la femme (58 000 nouveaux cas), puis le cancer du poumon (48 000 nouveaux cas) et le cancer colorectal (48 000 nouveaux cas) (Figure 2) [1]. Les cancers avec la plus haute mortalité sont le cancer du poumon (37 000 décès), le cancer colorectal (21 000 décès), le cancer du sein (14 000) et le cancer du pancréas (13 000 décès) [1] (Figure 2).

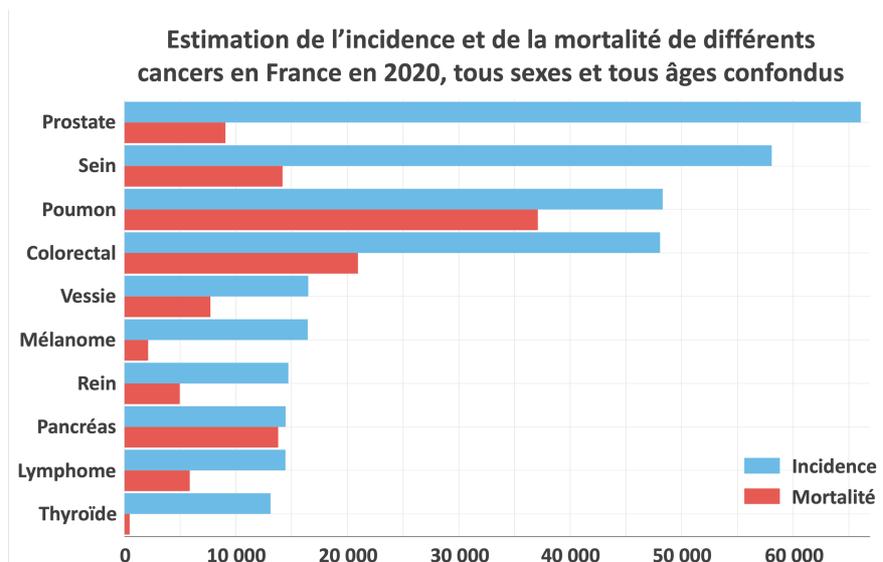


Figure 2 : Estimation de l'incidence et de la mortalité de différents cancers en France en 2020, tous sexes et tous âges confondus. (D'après l'IARC, OMS).

LE MELANOME

En France, en 2018, le nombre de nouveaux cas de mélanome était estimé à 14 600, et le nombre de décès associés au mélanome était de 2 200 [2]. Toujours en France, le mélanome est le premier cancer pour lequel l'augmentation d'incidence est la plus élevée chaque année. En 40 ans, entre 1980 et 2018, au Royaume-Uni, l'incidence du mélanome a augmenté de 700% chez l'homme et de 332% chez la femme [3].

Le mélanome est un cancer de la peau, issu de mélanocytes, des cellules productrices de mélanine, responsables de la coloration de la peau, dans l'épiderme (Figure 3).

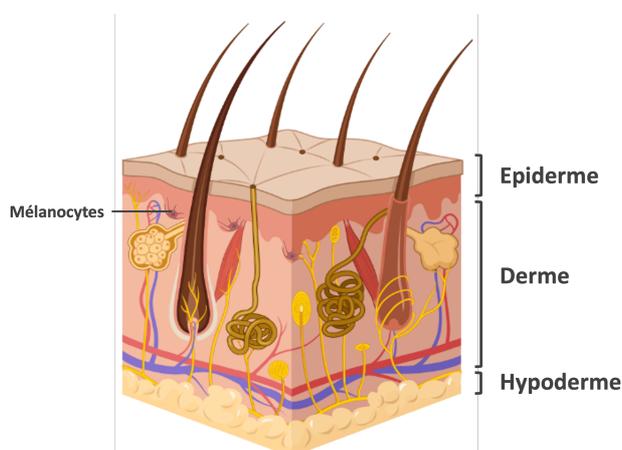


Figure 3 : Anatomie de la peau.

LES DIFFERENTS TYPES DE MELANOME

Pour détecter les mélanomes, la démarche analytique visuelle « ABCDE » est utilisée comme méthode de référence en France [4]. Cet acronyme s'appuie sur les critères permettant de différencier un grain de beauté d'un mélanome :

- **Asymétrie** : Les 2 moitié du nævus ne sont pas identiques et superposables.
- **Bords irréguliers** : Les contours de la tâche ne sont pas nets et réguliers, mais plutôt diffus, et peuvent apparaître flous. Les pigments peuvent s'être étendus sur le contour du grain de beauté.
- **Couleur** : La couleur n'est pas homogène, mais comporte différentes teintes de couleur et différentes nuances de noir, marron et brun. Dans certains cas, du gris, du rouge, du rose, du bleu et du blanc peuvent être visibles.
- **Diamètre** : La plupart du temps, les mélanomes ont un diamètre supérieur à 6 mm au moment du diagnostic. Ils peuvent cependant être plus petits.
- **Évolution** : Contrairement à un grain de beauté bénin, un mélanome évolue et croît rapidement au cours des semaines/mois. Il peut être irrité et saigner.

Si certains mélanomes se développent sur des grains de beauté, appelés nævus, existants, 80% des mélanomes apparaissent sur peau saine. Il peut être parfois compliqué de différencier des nævus bénins de nævus malins. C'est pourquoi des nouvelles méthodes de diagnostic, basées sur le « deep-learning » ou apprentissage profond, se sont développées ces dernières années [5]. Des algorithmes comparent une photo de haute qualité d'un nævus à classifier avec une base de données, et définissent ainsi un diagnostic précis. Cependant, cette méthode nécessite de larges bases de données, actuellement trop peu fournies. Actuellement, différents algorithmes de deep-learning permettent de donner un diagnostic de mélanome fiable à environ 95% [6].

Il existe 4 principaux types de mélanome : le mélanome superficiel extensif, le mélanome de Dubreuilh, le mélanome nodulaire et le mélanome acro-lentigineux [7] (Figure 4).

	Mélanome superficiel extensif	Mélanome de Dubreuilh	Mélanome nodulaire	Mélanome acrolentigineux
Aspect				
Fréquence (%)	70	10	10 - 20	2 - 10

Figure 4 : Les 4 types principaux de mélanome.

Le mélanome superficiel extensif est la forme de mélanome la plus courante. Il se caractérise par une tache pigmentée asymétrique de plus de 5 mm de diamètre, avec des contours irréguliers, des variations de teinte et un élargissement progressif [8]. Le mélanome de Dubreuilh apparaît principalement chez les personnes âgées. Son aspect clinique est celui d'une tache qui s'étend, la plupart du temps sur le visage [9]. Le mélanome nodulaire est celui avec le moins bon pronostic. Il est plus profond que les autres mélanomes et a une évolution très rapide. Il se caractérise par la formation d'une masse surélevée, majoritairement sur le torse, les bras, les jambes ou le cuir chevelu des hommes âgés [10]. Le mélanome acro-lentigineux se développe surtout sur les extrémités, comme les ongles, la paume des mains et des pieds. Chez les patients à peau claire, il ne représente que 2 à 3% des mélanomes, alors que chez les personnes à peau sombre, il peut représenter jusqu'à 76% des mélanomes (76% des mélanomes des patients de peau noire, 50% des mélanomes des patients à la peau asiatique et 30% de ceux avec une peau hispanique) [11].

LES FACTEURS DE RISQUE

Pour le mélanome, différents facteurs de risques sont identifiés, et se divisent en 2 catégories [12,13]. Les facteurs de risque intrinsèques, qui sont directement liés à l'individu, et les facteurs de risques extrinsèques qui sont liés à l'environnement. Parmi les facteurs de risque intrinsèques, on retrouve :

- Antécédents personnels ou familiaux (parents au 1^{er} degré)

- Phototype : sensibilité de la peau de l'individu aux Ultra-Violets (UVs). Le phototype le plus sensible est caractérisé par une peau claire, des cheveux blonds ou roux, des yeux clairs et la présence de taches de rousseur.
- La sensibilité de la peau face au soleil ; une peau qui a tendance à brûler, et qui ne bronze pas est plus sensible au soleil.
- Un nombre de grains de beauté supérieur à 50.
- La présence de grains de beauté de grande taille.
- Une immuno-dépression.

Les facteurs de risque extrinsèques sont :

- L'exposition au soleil et aux UVs naturels ou artificiels.
- Les antécédents de coups de soleil, principalement durant l'enfance. Les personnes ayant subi au moins 5 coups de soleil avec cloques avant 20 ans ont 80% de risque en plus de développer un mélanome [12,13].

LES STADES DE LA MALADIE

La stadification du cancer décrit son état d'avancement et sa localisation dans l'organisme [14]. La stadification du mélanome repose sur la méthode TNM : Tumeur (T), Ganglions (N, Nodes en anglais), Métastase (M). Cette méthode permet de classer un mélanome suivant la taille de la tumeur (T), le degré d'invasion des ganglions lymphatiques (N) et d'autres organes (M). A partir de cette classification, 5 stades sont décrits, comme représentés sur la Figure 5.

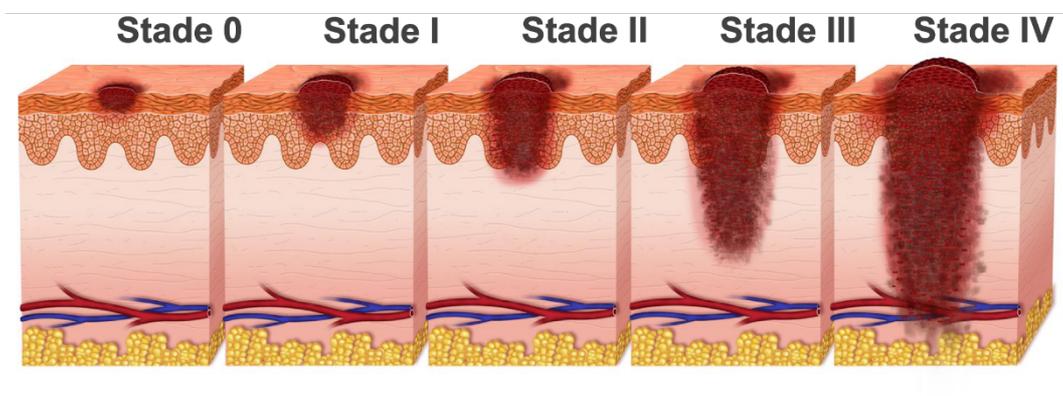


Figure 5 : Les 5 stades du mélanome. (D'après [15])

Un mélanome de stade 0 est détecté de manière précoce. Il est petit et n'a atteint que la partie superficielle de la peau. Il est généralement de bon pronostic et peut être facilement traité. Un mélanome de stade I est encore dans un stade précoce, et reste localisé. La tumeur mesure alors moins de 1 mm de diamètre. Une tumeur de mélanome de stade II est légèrement plus étendue, environ 2 mm de diamètre, peut présenter des ulcérations mais ne touche pas d'autres parties de l'organisme. Au stade III, le mélanome affecte au moins un ganglion lymphatique, et peut ou non avoir engendré de petites tumeurs dans les vaisseaux lymphatiques. Le stade IV est le maximum que puisse atteindre un mélanome. Il s'est alors étendu à d'autres parties de l'organisme, peu importe la taille de la tumeur originale. Les taux de survie sur 5 ans des patients suivant le stade du mélanome sont présentés en Tableau 1.

Les mélanomes de stades 0, I et II sont décrits comme précoces, car ils n'atteignent pas de ganglions. Les mélanomes de stades III et IV sont aussi appelés mélanomes avancés, car ils ont atteint au moins un ganglion. En fonction du stade du mélanome lors de son diagnostic, différentes thérapies sont proposées : l'excision du mélanome par chirurgie, les thérapies ciblées – quand les mutations sont présentes – et les immunothérapies.

Tableau 1 : Taux de survie sur 5 ans associé au stade du mélanome au moment du diagnostic. (D'après la base de données du National Cancer Institut (NCI) du National institut of Health (NIH), disponible à : <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>)

Type	Définition	Taux de survie sur 5 ans
Localisé Stades 0, I et II	Le cancer ne s'est pas étendu en profondeur dans la peau, dans les ganglions ou les vaisseaux lymphatiques.	99%
Régional Stade III	Le mélanome s'est étendu aux ganglions et vaisseaux lymphatiques.	68%
Distant Stade IV	Le mélanome a métastasé.	30%

LES TRAITEMENTS DE MELANOMES

CHIRURGIE

Les mélanomes à un stade précoce sont pour la plupart d'entre eux localisés uniquement dans l'épiderme et le derme. Le traitement standard pour ces tumeurs est l'excision chirurgicale. Souvent, cette prise en charge à elle seule peut être suffisante. Afin de retirer la totalité de la tumeur une excision locale large est pratiquée, permettant de retirer toutes les cellules malades et avoisinantes. Dans certains cas, le ou les ganglion(s) sentinelles, c'est-à-dire les ganglions drainant la tumeur, sont prélevés et analysés afin de vérifier l'absence de cellules cancéreuses. Cette vérification permet de s'assurer que le mélanome excisé n'avait pas déjà progressé au stade III. Si une trop grande partie de la peau a été retirée, une chirurgie reconstructrice peut être envisagée.

IMMUNOTHERAPIE

Pour certains mélanomes de stade II, une immunothérapie peut être proposée en adjuvant de la chirurgie. Les immunothérapies visent à renforcer l'immunité du patient, afin de l'aider à éliminer les cellules cancéreuses. Dans ce cas, une immunothérapie par administration d'une molécule appelée interféron alpha ($IFN\alpha$) peut être utilisée comme traitement adjuvant. L' $IFN\alpha$ est habituellement produit par différentes cellules de l'organisme, comme les lymphocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules endothéliales, ou les ostéoblastes, et est impliqué dans l'élimination des infections virales. En thérapie, ce traitement adjuvant aide le patient à éliminer les cellules cancéreuses ayant échappé à la chirurgie et réduit le risque de récurrence (Figure 6). Pour cela, l' $IFN\alpha$ agit à la fois sur les cellules cancéreuses, en limitant leur prolifération, en favorisant leur apoptose et en augmentant leur immunogénicité, mais également sur les cellules du système immunitaire, en réduisant la régulation de l'inflammation et en favorisant la maturation et l'activation de cellules cytotoxiques. La Figure 6 résume les différents effets de l'immunothérapie par administration d' $IFN\alpha$. Le rôle des différentes cellules immunitaires est décrit page 36.

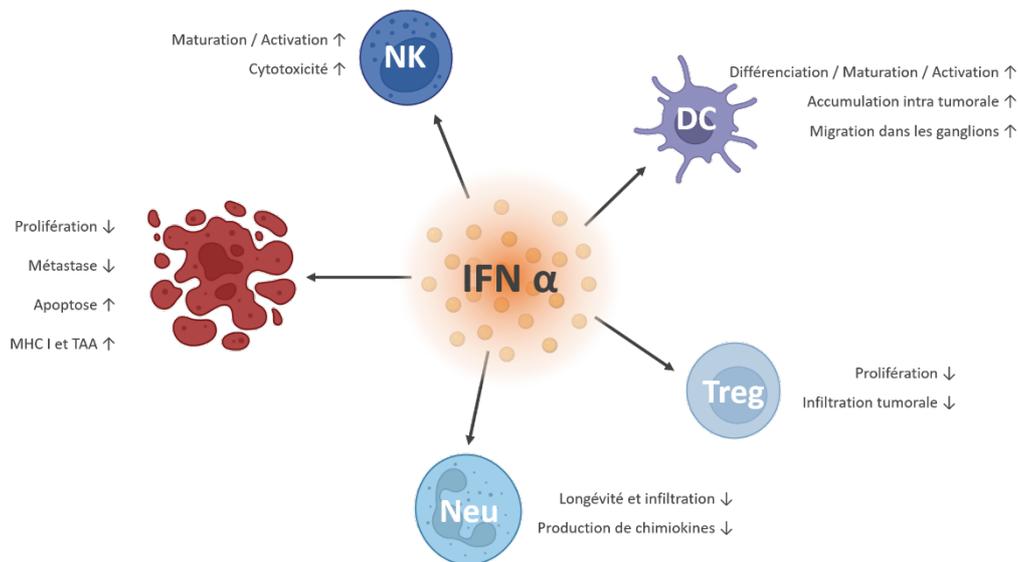


Figure 6 : Effet antitumoral de l’immunothérapie IFN α . NK = Cellule Natural Killer ; DC = Cellule Dendritique ; Treg = Lymphocyte T régulateur ; Neu = Neutrophile ; MHC = Complexe Majeur d’Histocompatibilité ; TAA = Antigène Associé à la Tumeur [16].

THERAPIES CIBLEES : INHIBITEURS DE LA VOIE BRAF-MAPK-ERK

La voie BRAF-MAPK-ERK est une voie de signalisation qui, à la suite de la fixation de facteurs de croissance sur un récepteur de facteurs de croissance externes (EGFR, External Growth Factor Receptor), via une cascade de phosphorylations, entraîne l’activation de protéines spécifiques appelées ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases). Dans une cellule normale, la protéine ERK active différents processus cellulaires, dont la prolifération, la différenciation, la mobilité, la réponse au stress et la survie de la cellule [17]. La protéine BRAF est une sérine/thréonine kinase, principale activatrice de MEK (Mitogen Activated Protein Kinase Kinase), une protéine impliquée dans la voie des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) (Figure 7). En 2022, Davies *et al.* décrit dans le journal *Nature* les mutations activatrices de la protéine BRAF retrouvées dans de nombreux cancers, et notamment dans 59% des mélanomes [18]. Cependant, cette mutation est également présente dans 80% des nævus bénins [19]. Dans environ 75 à 80% des cas, la mutation apparait dans la région codant pour le domaine kinase et consiste en la substitution d’un résidu glutamate par un résidu valine en position 600 : V600E [20]. Les mutations oncogènes de BRAF, comme V600E, rendent la voie BRAF-MAPK-ERK très active, malgré l’absence de facteurs de croissance. Ainsi, des traitements ciblant la voie de signalisation MAPK ont été développés et ont montré des résultats très probants.

Ainsi, chez des patients présentant une mutation V600E sur le gène codant pour BRAF, le traitement de référence est l'utilisation d'une combinaison d'anti-BRAF et anti-MEK. Cela permet alors de bloquer la prolifération et l'activité cellulaire aberrantes des cellules cancéreuses présentant la mutation (Figure 7).

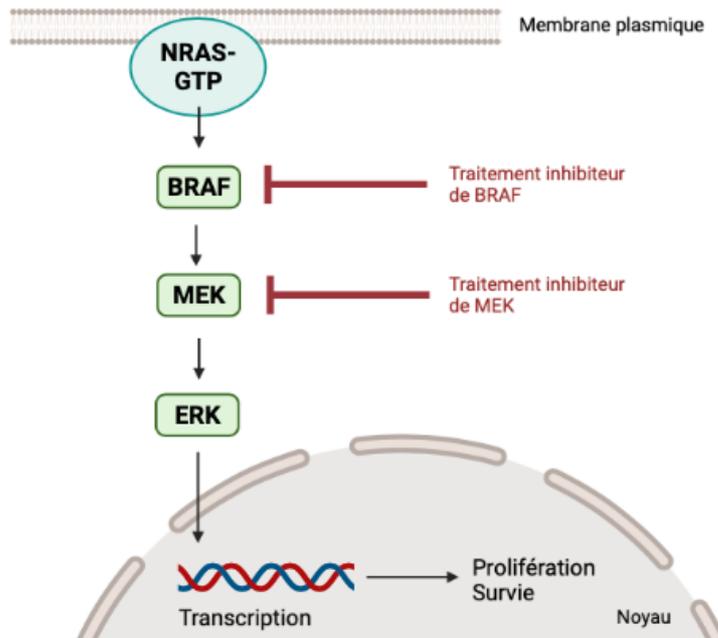


Figure 7 : Voie de signalisation BRAF-MAPK-ERK et ses inhibiteurs thérapeutiques. (D'après [21])

Des exemples de traitements anti-BRAF sont le Vemurafenib [22] et le Dabrafenib [23]. Ils peuvent être utilisés seuls, ou en combinaison avec des anti-MEK comme le Cobimetinib [24] ou le Trametinib [25].

IMMUNOTHERAPIES PAR BLOCAGE DES POINTS DE CONTROLE

Les immunothérapies visent directement le système immunitaire du patient, dans le but de le renforcer pour qu'il élimine naturellement les cellules malades. Dans le cas d'un mélanome avancé (Stade III et IV), en l'absence de mutation V600E, une immunothérapie par inhibiteur de point de contrôle est recommandée. En conditions physiologiques, les points de contrôles sont des interactions entre un Lymphocyte T (LT) et une autre cellule permettant de contrôler l'amplitude de la réponse immunitaire et empêcher une sur-inflammation. Ces cellules interagissant avec les LTs peuvent être des cellules épithéliales, ou des Cellules Présentatrices

d'Antigènes (APC, Antigen-Presenting Cells), capables d'activer ou d'inactiver les LTs cytotoxiques. Par exemple, pour inactiver les LTs, les APCs expriment à leur surface PD-L1 ou PD-L2, les ligands naturels de PD-1, exprimé par les LTs. Lorsque PD-1 interagit avec un de ses ligands, le LT est inactivé, et perd son activité cytotoxique [26]. Les cellules cancéreuses profitent de ces interactions appelées « points de contrôle », en exprimant à leur tour les protéines PD-L1 ou PD-L2. Ainsi, elles peuvent entraîner l'inactivation des LTs, et limiter la réponse immunitaire anticancer [27]. Après leur activation, les LTs expriment CTLA-4 dont les ligands naturels sont les protéines B7, exprimées par les APCs. Les protéines B7 sont également reconnues par CD28, un récepteur de costimulation exprimé par les LTs. Cependant, B7 a plus d'affinité pour CTLA-4 que CD28. Ainsi, l'interaction de CTLA-4 avec la protéine B7 entraîne l'inactivation du LT.

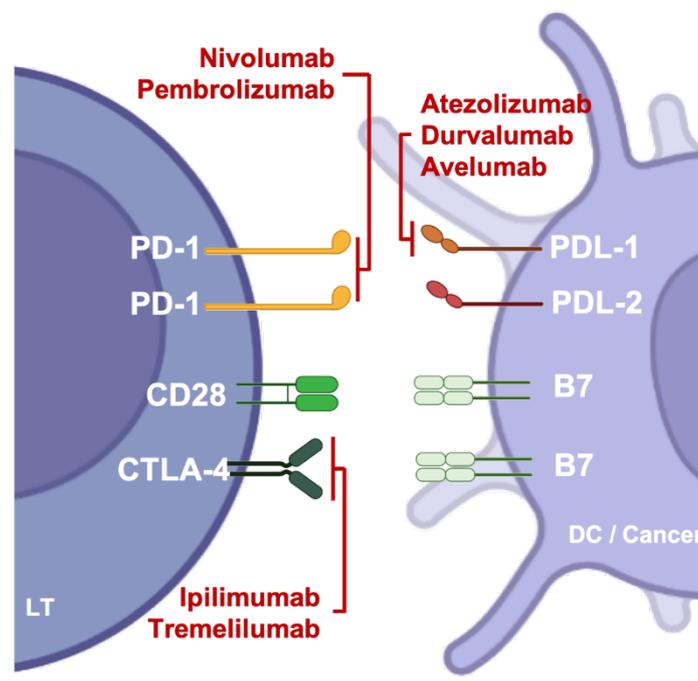


Figure 8 : Les points de contrôle immunitaire entre les LTs et les DCs, et leurs inhibiteurs thérapeutiques. PD-1 : protéine 1 de la mort cellulaire programmée ; PD-L1 : ligand 1 PD-1 ; PD-L2 : ligand 2 de PD-1 ; CTLA-4 : antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique ; CD28 : Classe de Différenciation 28; B7 : membre de la superfamille B7.

Les immunothérapies par inhibition des points de contrôle ciblent ces interactions (Figure 8) [28]. Pour cela, des anticorps monoclonaux bloquent les interactions entre les protéines de surface et leurs ligands, et prévient ainsi toute inhibition des LTs par les cellules cancéreuses. De cette manière, le système immunitaire reste activable et peut cibler toutes les cellules cancéreuses de l'organisme, y compris les métastases. Dans le traitement du mélanome, l'axe PD-1/PD-L1 est principalement ciblé. C'est pourquoi les anticorps anti-PD-1 Nivolumab et Pembrolizumab sont utilisés en première ligne. Le Nivolumab peut montrer un meilleur taux de réponse et une amélioration de la survie globale en association avec un anti-CTLA-4, l'Ipilimumab. Cependant, cette association a une toxicité importante, et n'est donc prescrite qu'à des patients en bon état général et avec peu de comorbidités. En deuxième ligne, l'Ipilimumab peut être utilisé en monothérapie. [29–31].

Ces immunothérapies peuvent également être utilisées en deuxième ligne de traitement si les inhibiteurs de la voie BRAF-MAPK-ERK se sont montrés inefficaces.

Ainsi, pour les mélanomes de stade III inopérables et les mélanomes de stade IV, le choix de la première ligne de traitement dépend de la présence de la mutation V600E de la protéine BRAF par les cellules cancéreuses [32]. La Figure 9 représente l'arbre décisionnel recommandé par l'Institut National du Cancer pour le traitement systémique des mélanomes métastatiques non résecables.

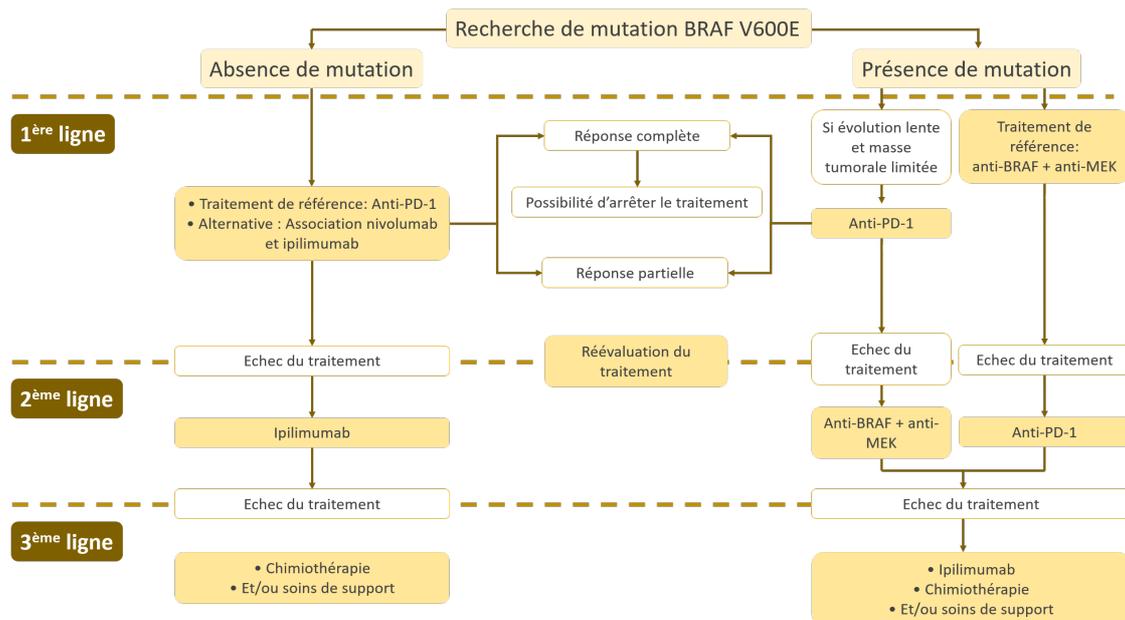


Figure 9 : Arbre de décision pour le traitement systémique des mélanomes de stade III et IV. (D'après © *Patients atteints de mélanome de stade III inopérable ou de stade IV / Société française de dermatologie*, septembre 2017.)

Cependant, lorsque utilisées en traitement de première ligne, les immunothérapies inhibitrices de point de contrôle ne sont efficaces qu'à 50% [33]. Cela signifie que la moitié des patients éligibles et traités par immunothérapie ne répondent pas au traitement. Pour renforcer la proportion de patients répondeurs, de nouvelles approches doivent être mises en place. Plusieurs pistes d'amélioration ont été identifiées. Parmi elles, l'implication du microbiote intestinal a été étudiée. En effet, le microbiote semble être étroitement lié au système immunitaire du patient ainsi qu'à sa réponse aux immunothérapies. Ainsi, la modulation du microbiote intestinal apparaît prometteuse pour augmenter les chances de succès thérapeutique des patients.

II. INTRODUCTION AU SYSTEME IMMUNITAIRE

Le système immunitaire regroupe l'ensemble des cellules, ainsi que les molécules qu'elles produisent, impliquées dans la défense de notre organisme contre des dysfonctionnements internes et des infections [34]. Les premières défenses de notre organisme sont la peau et les muqueuses, qui protègent l'intérieur de notre corps du milieu extérieur. Si ces barrières sont franchies, des signaux internes activent le système immunitaire, afin qu'il élimine le pathogène infiltré. Dans ce chapitre, les cellules immunitaires seront brièvement décrites. Une attention particulière sera portée à certaines cellules dont l'implication est clé dans ce projet.

LES ORGANES LYMPHOÏDES

Le système immunitaire est présent dans tout l'organisme, dans des organes spécialisés appelés organes lymphoïdes. On distingue les organes lymphoïdes primaires et secondaires (Figure 10) [34].

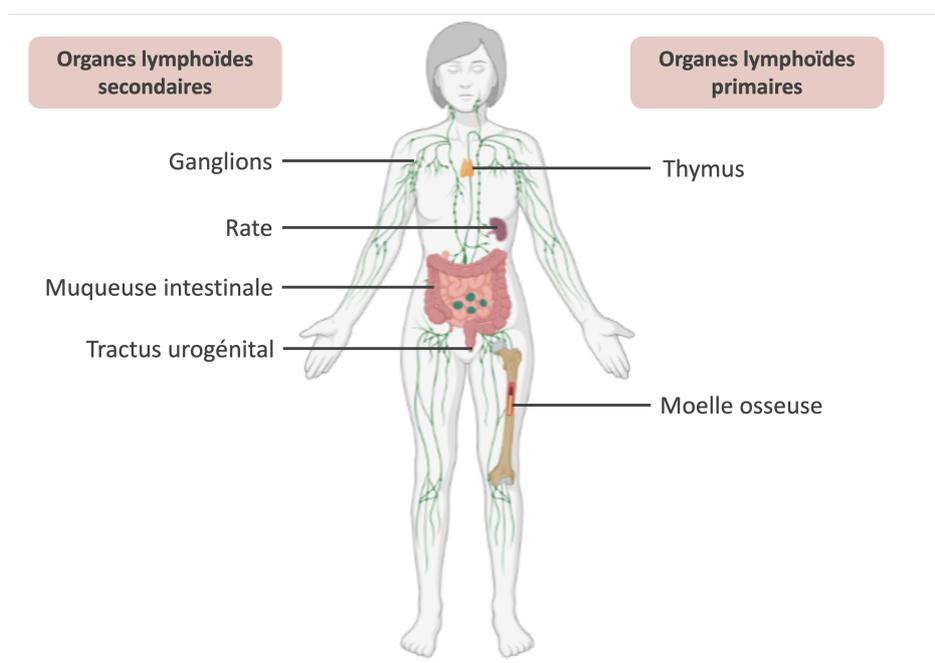


Figure 10 : Les organes lymphoïdes primaires et secondaires.

Les organes lymphoïdes primaires, ou centraux, sont spécialisés dans la production de nouveaux lymphocytes. Les LTs sont produits dans le thymus, tandis que les lymphocytes B (LBs) sont produits dans la moelle osseuse. Les progéniteurs de ces deux types de cellules immunitaires proviennent de la moelle osseuse.

Les organes lymphoïdes secondaires, ou périphériques, sont spécialisés dans le stockage et l'initiation d'une réponse immunitaire. Ces organes sont : les ganglions, la rate, la muqueuse intestinale, le tractus urogénital et d'autres muqueuses. Les ganglions sont connectés entre eux par un système de vaisseaux lymphatiques, qui assure le drainage des fluides extracellulaires jusqu'aux ganglions, pour ensuite retourner dans le sang.

Les organes lymphoïdes contiennent des cellules immunitaires, pouvant être classées en immunité innée et acquise (Figure 11) [35].

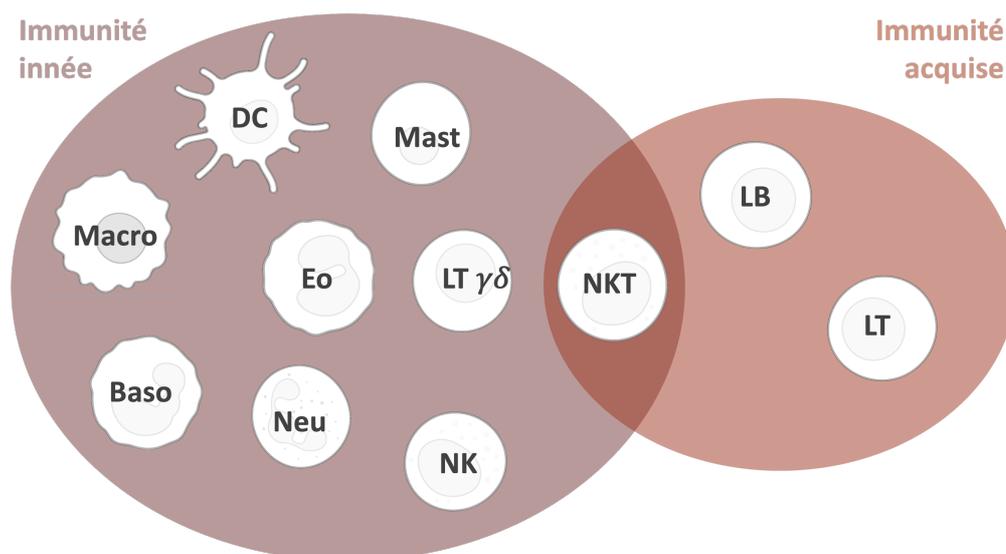


Figure 11 : Cellules de l'immunité innée, acquise, avec des caractéristiques communes. DC = Cellule Dendritique, Mast = Mastocyte, Macro = Macrophage, Eo = Éosinophile, Baso = Basophile, Neu = Neutrophile, NK = Natural Killer, LT $\gamma\delta$ = lymphocyte T $\gamma\delta$, NKT = Natural Killer T, LB = Lymphocyte B, LT = Lymphocyte T.

La plupart des pathogènes extérieurs peuvent être détectés et éliminés en quelques minutes par l'immunité innée de l'organisme. Celle-ci ne nécessite pas l'activation et l'expansion de cellules immunitaires ayant reconnu spécifiquement l'antigène en amont. Les cellules de l'immunité innée reconnaissent un antigène, qui est une molécule, ou partie de molécule [36]. On l'appelle immunité innée car elle est héréditaire, et ne subit pas de maturation spécifique de l'environnement dans les premières années de la vie. Les cellules de l'immunité innée portent des récepteurs qui reconnaissent des motifs conservés.

Parmi les cellules de l'immunité innée se trouvent : les granulocytes (basophiles, éosinophiles et neutrophiles), les macrophages, les mastocytes, les cellules dendritiques les natural killers (NK), les mastocytes et les Lymphocytes T $\gamma\delta$.

LES GRANULOCYTES

Les granulocytes, ou polymorphonucléaires, sont une sous-population de globules blancs, ou leucocytes, la plus représentée dans l'organisme. On estime que 50 à 70% des leucocytes sont des neutrophiles, 1 à 3% sont des éosinophiles et moins de 1% sont des basophiles [37]. Les neutrophiles forment la première ligne de défense contre les infections bactériennes [38]. Après avoir détecté un produit bactérien (peptides formylés, lipopolysaccharides) ils ont la capacité d'infiltrer rapidement un site infectieux, en « roulant » sur la paroi endothéliale des vaisseaux sanguins. Les neutrophiles peuvent alors exercer leur action anti-infectieuse, grâce à leurs capacités de phagocytose (internalisation et destruction du pathogène), de dégranulation d'enzymes cytotoxiques et de production de cytokines pro-inflammatoires. Les éosinophiles sont impliqués dans la réponse immunitaire contre les bactéries, les parasites et les infections virales [39]. Ils sont capables de produire et détecter un large panel de cytokines, les rendant multifonctionnels. En réponse à des stimuli (cytokines), ils peuvent dégranuler et libérer des enzymes cytotoxiques ou immuno-stimulatrices. Les basophiles défendent l'organisme contre les infections virales, fongiques et bactériennes, et sont aussi impliqués dans les réactions

allergiques [40]. Les mastocytes sont majoritairement tissu-résidents, impliqués dans la réponse immunitaire contre les parasites, avec un rôle central dans les réactions allergiques [41].

LES MACROPHAGES ET LES CELLULES DENDRITIQUES

Les macrophages sont des cellules spécialisées dans la phagocytose de débris cellulaires, de cellules mortes, de cellules cancéreuses, et de matériel étranger, comme des agents pathogènes [42]. Ils sont également impliqués dans le développement et la réparation tissulaire. Ils peuvent être catégorisés en macrophages M1 et M2 suivant leur fonction. Les macrophages M1 sont principalement pro-inflammatoires, et exercent une activité antibactérienne et antitumorale. Les macrophages M2 sont plutôt anti-inflammatoires. Ils sont impliqués dans la réparation tissulaire, l'angiogenèse et peuvent être pro-tumoraux.

Les cellules dendritiques (DCs) sont des cellules de l'immunité innée particulières, car elles assurent le bon fonctionnement de l'immunité acquise [43]. Elles sont spécialisées dans la reconnaissance, l'internalisation et la présentation d'antigènes aux cellules de l'immunité acquise : les lymphocytes (Tableau 2). Elles sont donc appelées cellules présentatrices d'antigènes. Comme les macrophages, les DCs peuvent phagocyter des pathogènes extracellulaires, comme des bactéries. Ces pathogènes sont ensuite clivés en peptides (antigènes) pouvant être présentés sur des Complexes Majeurs d'Histocompatibilité (MHC, Major Histocompatibility Complex) de classe II, qui seront ensuite reconnus par des LTs CD4⁺. Les DCs ont un second moyen de présenter un antigène, lorsque celui-ci pénètre dans le cytosol, par exemple lors d'une infection virale. L'antigène est alors présenté à la surface de la DC, sur une molécule MHC de classe I. L'antigène peut alors être reconnu par les LTs CD8⁺. Les antigènes provenant de pathogènes extracellulaires peuvent aussi être présentés aux LTs CD8⁺, via des molécules MHC I ; c'est la présentation croisée.

Tableau 2 : Les différents moyens des DCs pour présenter des antigènes aux lymphocytes T.

	Antigène extracellulaire		Antigène intracellulaire	
Exemple d'antigène	Bactéries, champignons, parasites, antigènes solubles, particules virales.		Virus, antigènes tumoraux	
Classe de MHC	MHC de classe II	MHC de classe I	MHC de classe I	MHC de classe II
Lymphocyte T activé	Lymphocyte T CD4 ⁺	Lymphocyte T CD8 ⁺ (présentation croisée)	Lymphocyte T CD8 ⁺	Lymphocyte T CD4 ⁺

LES NATURAL KILLERS

Les Natural Killers, ou cellules NK, contrôlent les infections bactériennes et limitent la croissance tumorale [44]. Ils ont à la fois une activité cytotoxique et productrice de cytokines pro-inflammatoires. Grâce à un récepteur activateur appartenant à la superfamille des lectines de type C (NKG2D, Natural Killer - Group 2D), ils peuvent détecter des ligands induits par un stress, et s'activer. Ils sont également dotés de récepteurs inhibiteurs, afin de distinguer les cellules saines des cellules malades, et ainsi prévenir une activation contre des cellules du soi.

LES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$

Contrairement aux LTs conventionnels CD4⁺ et CD8⁺, les LTs $\gamma\delta$ sont des LTs non-conventionnels [45]. Pendant longtemps, ces cellules n'étaient ni définies comme faisant partie de l'immunité innée, ni de l'immunité acquise. En effet, elles partagent des caractéristiques communes aux deux types d'immunité. Les LTs $\gamma\delta$ peuvent être activés par différentes classes de récepteurs de type « innés » : des récepteurs NKG2D et des récepteurs de type Toll (TLRs, Toll-like Receptors). Les récepteur NKG2D sont activés en réponse à des molécules de stress, et les TLRs détectent des Motifs Moléculaires Associés aux Micro-organismes (MAMPs, Microorganism-Associated Molecular Patterns), comme détaillé page 59. Comme les LTs de l'immunité acquise, les LTs $\gamma\delta$ possèdent un Récepteur de Cellule T (TcR, T cell Receptor) permettant de détecter

des antigènes. Cependant, ce récepteur ne requiert pas nécessairement de cellule présentatrice d'antigènes et de MHC, ce qui a finalement permis de classer ces cellules dans l'immunité innée.

L'IMMUNITE ACQUISE

L'immunité innée ne fonctionne que contre certains pathogènes, en déclenchant une réponse non-spécifique. Pour se défendre efficacement, certaines cellules du système immunitaire, comme les lymphocytes, ont évolué pour reconnaître une grande variété de motifs ; c'est l'immunité acquise [46].

LES LYMPHOCYTES B

Lorsqu'ils rencontrent un antigène, les LBs s'activent, prolifèrent et se différencient en LBs mémoires et en plasmocytes [47]. Les LBs mémoires persistent au cours du temps, permettant, en cas de seconde infection, l'enclenchement d'une réponse immunitaire spécifique rapide. Les plasmocytes, quant à eux, produisent de immunoglobulines (Ig) communément appelées anticorps. Les anticorps sont des protéines capables de s'associer aux antigènes entiers – non-clivés en peptides et non présentés par des molécules spécialisées comme les MHC – et d'aider à leur élimination par les cellules immunitaires. Pour cela, différents moyens existent (Figure 12) :

- La neutralisation : En se fixant à la surface du pathogène, les anticorps recouvrent entièrement l'entité infectieuse et préviennent ainsi son interaction avec des cellules de l'hôte.
- L'activation du système complément : Le complexe C1 reconnaît un pathogène lorsqu'il a été repéré par des anticorps. La fixation du complexe C1 sur des anticorps à la surface d'un pathogène active la voie du complément classique, pour éliminer le pathogène.
- L'opsonisation : Les anticorps fixés à l'agent pathogène servent de signal pour la phagocytose par les macrophages ou les neutrophiles.

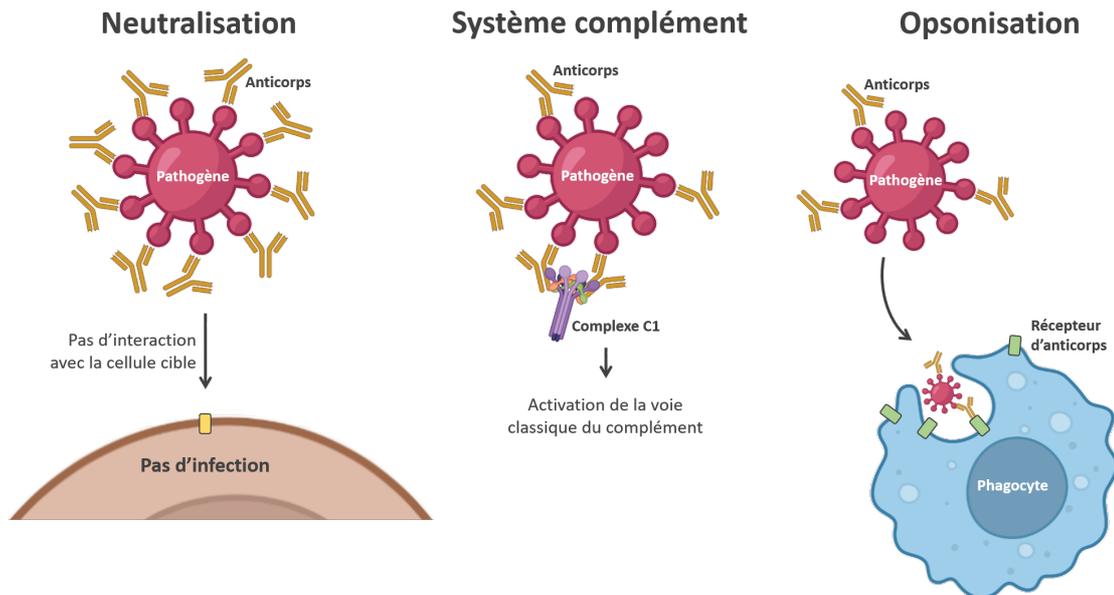


Figure 12 : Modes d'action des anticorps contre les agents pathogènes.

Grâce aux anticorps, les LBs peuvent être des APCs très efficaces [48]. Pour cela, ils expriment à leur surface des IgM, formant le Récepteur de Cellule B (BcR, B cell Receptor), pouvant se complexer à des antigènes spécifiques, puis être internalisés par endocytose. L'antigène internalisé est ensuite apprêté à une molécule MHC de classe II, puis présenté à la surface de la cellule pour activer des LTs CD4⁺.

LES LYMPHOCYTES T

Les lymphocytes T sont spécialisés dans la reconnaissance de cellules malades ou défectueuses, comme les cellules infectées ou cancéreuses. Les LTs sont activés à la suite de la reconnaissance par leur Récepteur de Cellule T (TcR, T cell Receptor) d'un motif moléculaire (peptide) présenté par une APC via des molécules MHC. La majorité des TcR sont des hétérodimères formés d'une chaîne α et d'une chaîne β . Les gènes codant pour ces chaînes contiennent différents fragments, V, D et J, qui se réarrangent lors du développement thymique des LTs, pour former une grande variété de TcRs. Durant le développement dans le thymus, les LTs suivent une sélection positive et une sélection négative. La sélection positive détermine si le TcR recombiné est capable de reconnaître correctement les molécules MHC présentées par les APCs. A l'issue de cette sélection, le LT coexprime avec son TcR une molécule CD4 ou CD8 suivant le MHC

reconnu. La sélection négative élimine les LTs avec un TcR ayant une trop forte affinité pour le soi. Après la sélection positive, les LTs sont divisés en 2 sous-types : les LTs CD4⁺ et les LTs CD8⁺ [49].

Lorsqu'un LT est activé, l'APC présente différents signaux (Figure 13). Dans le cas d'un LT CD4⁺, l'antigène est présenté par un MHC de classe II au TcR. Dans le cas d'un LT CD8⁺, l'antigène est présenté par un MHC de classe I au TcR. Cette interaction entre le MHC et le TcR active le LT. Le signal de costimulation CD28-CD80/86 promeut la survie et l'activation du LT. Enfin, les cytokines produites par les APCs, et détectées par le LT lors de son activation, déterminent la polarisation du LT en un sous-type défini. Les sous-types de LTs CD4⁺ et CD8⁺ sont décrits ci-dessous.

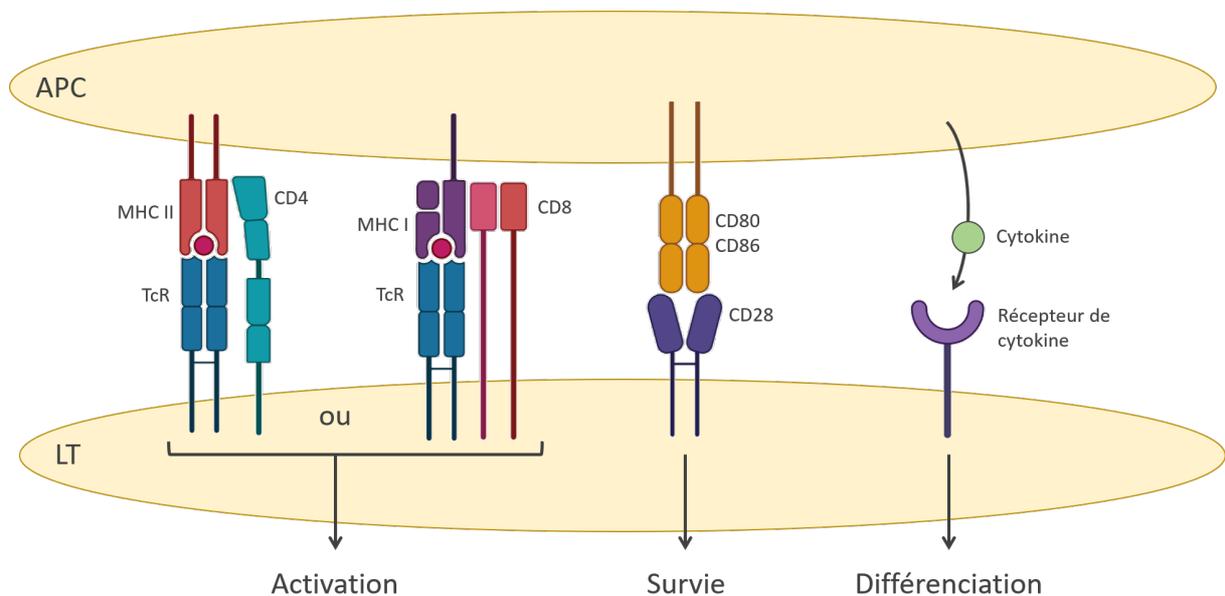


Figure 13 : Les signaux nécessaires à l'activation complète des LTs. APC = Antigen Presenting Cell, LT = Lymphocyte T, MHC = Major Histocompatibility Complex, TcR = T cell Receptor.

LES LTs CD4⁺

Les LTs CD4⁺ peuvent être des LTs auxiliaires (*helpers*), ou régulateurs [50]. Les LTs auxiliaires aident la réponse immunitaire, notamment en produisant de l'Interleukine (IL)-2, une molécule activatrice des lymphocytes T et B. Une fois activés, les LTs CD4⁺ peuvent se différencier en différents sous-types, classés suivant les cytokines qu'ils produisent (Figure 14). Les principaux sous-types de LTs auxiliaires sont les T_H1 (T Helper, 1), les T_H2, les T_H17, les T_{FH} (T folliculaires

Helpers). Les T_H1 sont caractérisés par leur production d'IFN γ , une cytokine pro-inflammatoire, impliquée dans la réponse antibactérienne et anti-cancer. Les T_H2 sont caractérisés par leur production d'IL-4, IL-5 et IL-13. Ces interleukines promeuvent les réponses immunitaires médiées par les éosinophiles, les mastocytes et les LBs. Les T_H17 se caractérisent par leur production d'IL-17 et IL-22, et sont particulièrement impliqués dans les réponses antibactériennes et antifongiques. Ces cytokines entraînent notamment la production de peptides antimicrobiens par les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et les fibroblastes, et permettent le recrutement de neutrophiles. Les T_{FH} produisent essentiellement de l'IL-21, afin de favoriser la prolifération des lymphocytes B et T dans les centres germinatifs. Enfin, les T_{REG} expriment le facteur de transcription Forkhead box P3 (FoxP3) qui leur confère des propriétés de régulateurs. Par leur production d'IL-10 ou de Facteur de croissance transformant (TGF, Transforming Growth Factor)- β ils sont impliqués dans la régulation de la réponse immunitaire. Les T_{REG} ont aussi un rôle de suppresseur, par exemple en exprimant CTLA-4, qui inhibe l'expression des molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 sur les Cellules Présentatrices d'Antigènes (APC, Antigen-Presenting Cells) [51]. De plus, par un phénomène de trogocytose dépendant du CTLA-4, les T_{REG} échangent un fragment de leur membrane plasmique avec celui de l'APC portant les molécules CD80 et CD86. Ce phénomène résulte en l'expression de PD-L1 par l'APC [52].

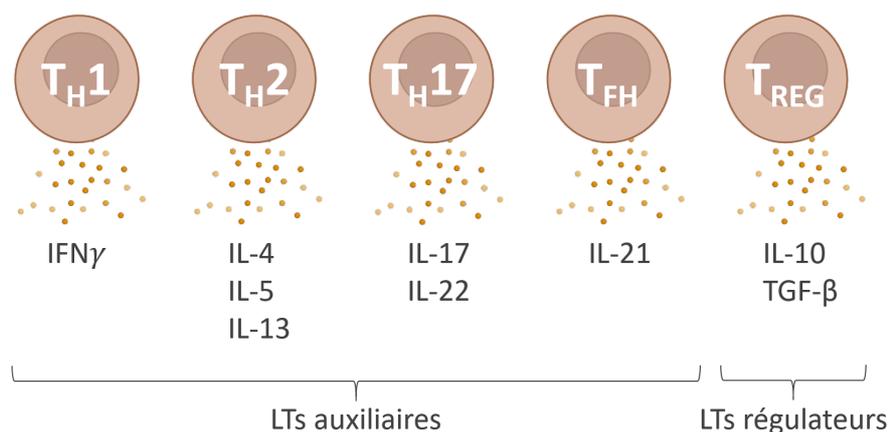


Figure 14 : Les différents sous-types de LTs CD4+ auxiliaires et régulateurs. T_H = T Helper ; T_{FH} = T folliculaire Helper ; T_{REG} = T régulateur ; IFN γ = Interféron γ ; IL = Interleukine ; TGF- β = Facteur de croissance transformant- β .

LES LTs CD8⁺

Les LTs CD8⁺ sont aussi appelés LTs cytotoxiques, car ils sont équipés pour éliminer les cellules cibles, transformées (cancer), ou lors d'infections intracellulaires par des agents bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires. Pour cela, les LTs CD8⁺ exercent plusieurs grandes fonctions.

La première grande fonction des LTs CD8⁺ est la production de cytokines. Tout comme pour les LTs CD4⁺, il existe plusieurs sous-types de LTs CD8⁺, suivant les cytokines qu'ils produisent (Figure 15). Les principaux sous-types sont les T cytotoxiques (Tc) 1, les Tc2, les Tc9, les Tc17 et les Tc22 [53]. Les Tc1 sont caractérisés par leur production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IFN γ et le TNF- α . Ce sous-type de LTs CD8⁺ est très efficace contre les cellules cancéreuses et les cellules infectées par des virus. Les Tc2 sont caractérisés par la production d'IL-4, IL-5 et IL-13, et sont impliqués dans la médiation de la réponse allergique, particulièrement dans le tractus respiratoire. Les Tc9 sont similaires aux Tc2, mais ils produisent aussi de l'IL-9, impliquée dans le développement de l'asthme et l'hyperréactivité bronchique, et ne sont que très peu cytotoxiques. Les Tc17 produisent de l'IL-17A, de l'IL-17F et de l'IL-22. Ces cellules peu cytotoxiques, sont particulièrement impliquées dans la réponse antifongique. Les Tc17 ont été décrits comme délétères dans certaines maladies auto-immunes, comme la sclérose en plaque et la réaction du greffon contre l'hôte. Enfin, comme les Tc17, les Tc22 se caractérisent par leur production d'IL-22 et d'IL-17. Cependant, leur production d'IL-17 est moindre. Les Tc22 contribuent à la progression de pathologies inflammatoires comme le psoriasis, et ont une forte activité antitumorale.

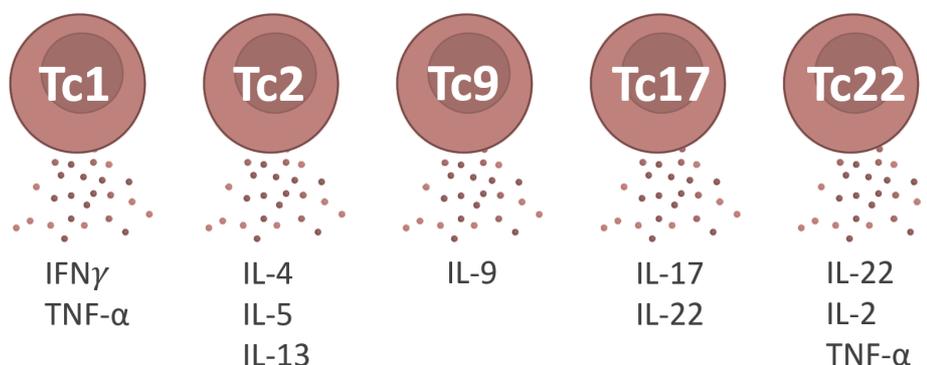


Figure 15 : Les différents sous-types de LTs CD8⁺ cytotoxiques. Tc = T Cytotoxique ; IFN γ = Interféron γ ; IL = Interleukine ; TNF- α = Tumor Necrosis Factor- α .

La seconde grande fonction des LTs CD8⁺ est leur production et relargage de granules contenant de la perforine et les granzymes (Figure 16).

Enfin, les LTs CD8⁺ peuvent détruire les cellules cibles à la suite de l'interaction de Fas avec son ligand FasL. En effet, si la molécule Fas, exprimée par les LTs CD8⁺ et les cellules NK, entre en contact avec son ligand FasL sur une cellule infectée, une cascade de caspase se déclenche dans la cellule cible et entraîne son apoptose (Figure 16).

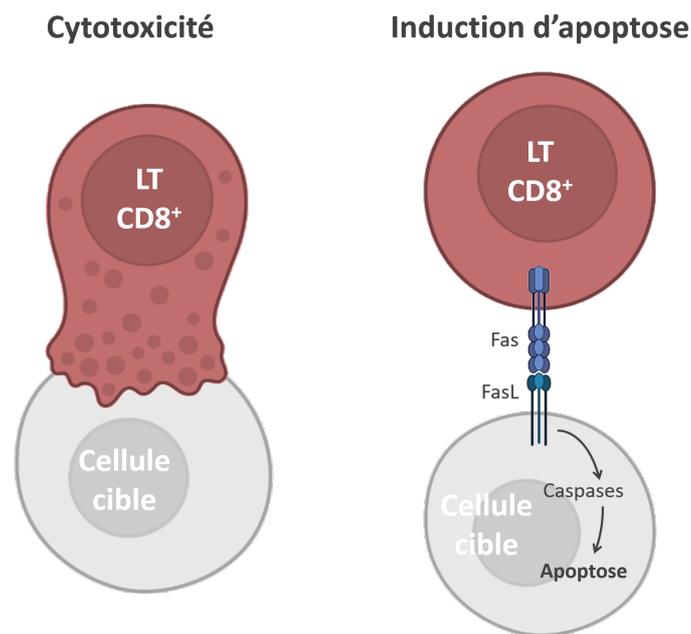


Figure 16 : Rôles de LTs CD8⁺. LT = Lymphocyte T, FasL = Ligand de Fas.

ENTRE IMMUNITE INNEE ET ACQUISE

Certaines cellules immunitaires ont des caractéristiques à la fois de l'immunité innée et acquise. C'est le cas des cellules NK T, qui partagent des caractéristiques des cellules NK et des lymphocytes T [54]. La plupart des cellules NK T possèdent un TcR $\alpha\beta$ semi-invariant, afin de détecter des antigènes présentés sur des molécules MHC non classiques, les CD1d, présentes sur les cellules présentatrices d'antigènes. Contrairement aux LTs conventionnels, les NK T n'expriment pas de molécules CD4 ou CD8. De plus, ils possèdent également des caractéristiques des cellules NK de l'immunité innée, comme la molécule de surface CD161, impliquée dans la régulation de la cytotoxicité des cellules NK.

III. L'IMMUNITE INTESTINALE

STRUCTURE DE L'INTESTIN

L'intestin est composé de 2 segments principaux : l'intestin grêle et le gros intestin. Cette partie bibliographique se concentre sur la structure du gros intestin.

Le gros intestin est divisé 4 segments : le caecum, le côlon, le rectum et l'anus. Le caecum relie l'intestin grêle et le côlon. Le côlon est divisé en 4 parties : le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant et le côlon sigmoïde (Figure 17). Le gros intestin se termine ensuite par le rectum et l'anus.

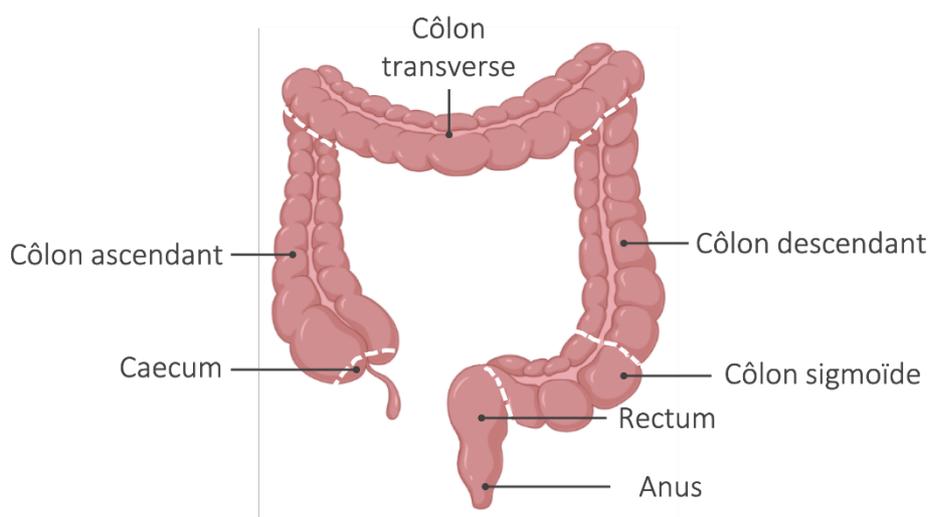


Figure 17 : Parties du côlon.

Le côlon est composé de 4 couches : La séreuse, la musculuse, la sous-muqueuse et la muqueuse (de l'extérieur vers la lumière intestinale) (Figure 18).

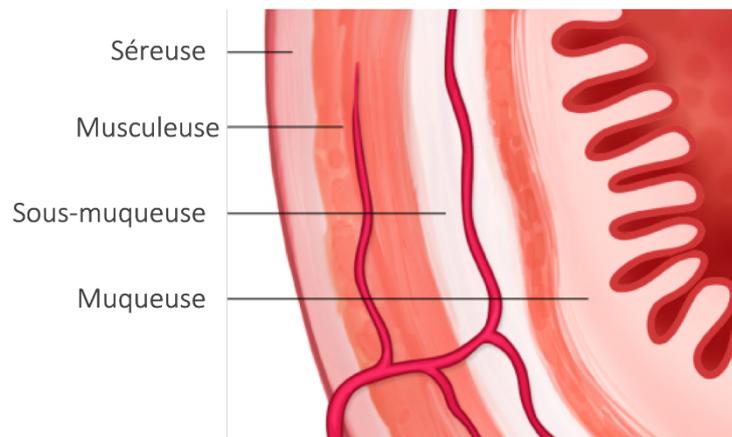


Figure 18 : Structures de la paroi intestinale.

La séreuse est la partie externe de l'intestin. Elle constitue une partie du péritoine, délimitant la cavité abdominale et les viscères contenus à l'intérieur. La séreuse est constituée d'une couche simple de cellules épithéliales, qui tapisse l'abdomen, le pelvis et les viscères. Elle est elle-même constituée de 3 feuillets : le péritoine viscéral (en contact avec l'intestin), le péritoine pariétal (qui tapisse l'abdomen), et la cavité péritonéale (entre le péritoine viscéral et le péritoine pariétal). La séreuse joue un rôle de maintien des organes.

Le long de la séreuse se trouve la musculeuse, composée de 2 couches de fibres musculaires lisses. La musculeuse sert aux mouvements de l'intestin, et à sa tonicité. Ses contractions assurent le transit du contenu intestinal, dans un phénomène appelé péristaltisme.

Sous la couche musculeuse se trouve la couche sous-muqueuse, composée de glandes muqueuses, de tissu conjonctif, de vaisseaux sanguins et lymphatiques et de nerfs. Elle assure l'élasticité de l'intestin lors des mouvements péristaltiques.

La muqueuse est la couche qui se trouve en contact direct avec la lumière intestinale, formant des villosités. Elle est composée d'une couche de cellules épithéliales reposant sur une lame basale la séparant d'un tissu conjonctif appelé *Lamina Propria* (LP). La LP contient des vaisseaux sanguins, des myofibroblastes, des nerfs, et une grande variété de cellules immunitaires. Au-dessus, l'épithélium contient des cellules épithéliales, appelées entérocytes, ainsi que d'autres

cellules spécialisées : des cellules caliciformes, des cellules microfold (M), des cellules de Paneth, des cellules entéro-endocrines et des cellules souches. (Figure 19).

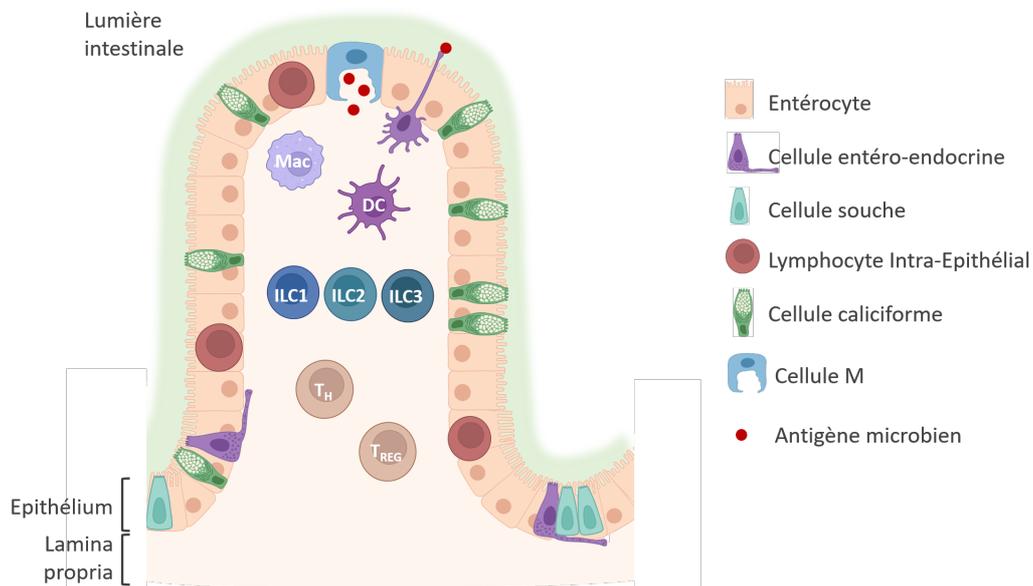


Figure 19 : Structure de la muqueuse colique. Mac = Macrophage ; DC = Cellule Dendritique ; ILC = Cellule Lymphoïde Innée ; T_H = LT auxiliaire ; T_{REG} = LT régulateur.

L'ÉPITHELIUM INTESTINAL

Les cellules caliciformes sont des cellules glandulaires spécialisées dans la production de mucus tapissant l'épithélium intestinal. La quantité de cellules caliciformes augmente le long du tube digestif créant une barrière physique protectrice entre le contenu intestinal et l'épithélium.

Les cellules M ont une structure repliée à leur surface luminaire. Elles ne sécrètent ni enzymes digestives, ni mucus, et sont donc couvertes d'une couche de mucus plus fine que les entérocytes voisins. Les cellules M sont donc directement exposées aux micro-organismes dans la lumière intestinale. Ainsi, ces cellules assurent le transport d'antigènes de la lumière intestinale vers les organes lymphoïdes périphériques intestinaux.

Les cellules entéro-endocrines produisent des hormones impliquées dans la coordination des étapes de la digestion : absorption des nutriments, sécrétion d'insuline et sentiment de satiété

[55]. Localisées dans les cryptes intestinales, les cellules souches sont responsables du renouvellement de l'épithélium [56].

La muqueuse contient également des tissus lymphoïdes associés au tube digestif (GALT, Gut-Associated Lymphoid Tissue). Les plaques de Peyer, localisées uniquement dans l'intestin grêle, contiennent des regroupements importants de lymphocytes T et B, organisés en follicules lymphoïdes. D'autres lymphocytes sont enchâssés dans la barrière épithéliale [57]. La majorité de ces Lymphocytes Intra-Epithéliaux (IELs, intra-Epithelial lymphocytes) sont des LTs, et principalement des $CD8^+$ (80%), suivis par les LTs $\gamma\delta$ (20%) puis les LTs $CD4^+$ (1%). Même en absence d'infection, les IELs présentent un phénotype de LTs activés, et contiennent des granules cytotoxiques avec de la perforine et des granzymes.

Pour rester accrochés à la barrière épithéliale, les IELs expriment différents marqueurs de surface (Figure 20) [58,59]. Dans l'intestin grêle, le récepteur de Chimiochine C-C (CCR, C-C Chemokine Receptor) de type 9 (CCR9) se lie à son Ligand de Chimiochine C-C (CCL) de type 25 (CCL25) exprimé par les entérocytes. De plus, l'intégrine $\alpha4\beta7$ se lie à l'E-cadhérine exprimée par les entérocytes. Dans le côlon, seulement 37% des IELs expriment CCR9 [60]. Ainsi, pour se maintenir dans l'épithélium, ils expriment une molécule similaire à CCR9, CCR10, se liant à son ligand CCL26 exprimé par les entérocytes du côlon.

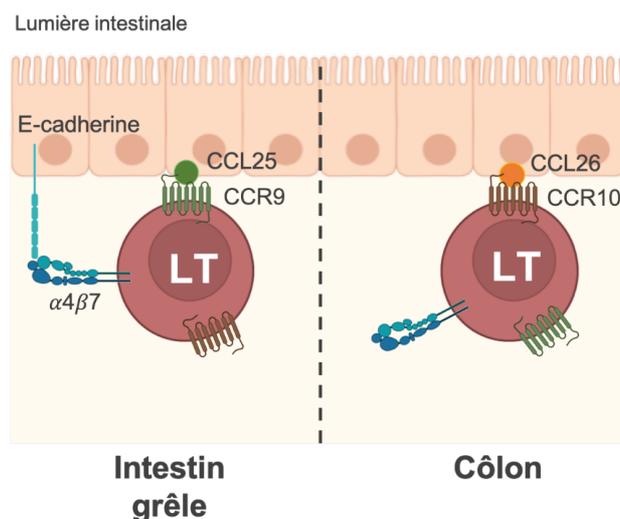


Figure 20 : Expression de molécules d'adressage intestinal par les IELs. LT = Lymphocyte T.

En-dessous de l'épithélium se trouve la lamina propria, un tissu conjonctif contenant une grande diversité de cellules immunitaires.

Les cellules dendritiques et les macrophages sont parmi les cellules immunitaires les plus présentes dans la lamina propria, et longent l'épithélium [61]. De cette manière elles peuvent détecter des antigènes présents dans l'intestin, de différentes manières :

- Les antigènes peuvent être transportés à travers l'épithélium par les entérocytes eux-mêmes, ou par les cellules M.
- Un entérocyte infecté, en entrant en apoptose, peut libérer des antigènes dans la lamina propria, directement aux macrophages ou aux DCs.
- Les macrophages et les DCs peuvent créer des prolongements cytoplasmiques au travers de l'épithélium, pour directement phagocyter du contenu intestinal.
- Les cellules caliciformes peuvent transporter des antigènes solubles de leur pôle apical à leur pôle basal, dans la lamina propria.

En capturant ces antigènes intestinaux, les DCs jouent un rôle important dans la mise en place d'une tolérance immunitaire envers les cellules du soi et les micro-organismes bénéfiques du microbiote intestinal. Cette tolérance immunitaire est médiée en grande partie par les LTs CD4+ de la lamina propria, bien plus abondants que dans l'épithélium intestinal.

Les cellules lymphoïdes innées (ILCs, Innate Lymphoid Cells) sont classées en 3 groupes : ILC1, ILC2 et ILC3. Elles participent à la protection de l'organisme contre des pathogènes, et à l'homéostasie intestinale. Comme les sous-types de LTs auxiliaires, les sous-types d'ILC diffèrent par les cytokines qu'elles produisent et les cytokines qui déclenchent leur différenciation. En effet, les ILCs s'activent de manière indépendante des antigènes, uniquement à la suite de stimuli chimiques. Ainsi, les ILC1 s'activent après détection d'IL-12, d'IL-15 ou d'IL-18, et en retour expriment le facteur de transcription T-bet (T-box transcription factor) et produisent de l'IFN γ , et exercent de ce fait une action pro-inflammatoire. Les ILC2 s'activent en réponse aux IL-25 et IL-33, puis expriment le facteur de transcription GATA-3 (GATA binding protein 3) et produisent de l'IL-5 et de l'IL-13, afin d'induire une réponse

immunitaire de type T_H2 . Enfin, les ILC3 détectent l'IL-1 β et l'IL-23, puis expriment le facteur de transcription ROR γ t, (Receptor-related Orphan Receptor- γ) et produisent de l'IL-17, de l'IL-22 du GM-CSF et des lymphotoxines.

Dans la muqueuse intestinale, la classe dominante d'anticorps est l'immunoglobuline A (IgA), produite dans la lamina propria par les plasmocytes [62]. A cet endroit, les IgA sont principalement sous forme de dimères, attachés par une chaîne J. Les LBs naïfs précurseurs des plasmocytes producteurs d'IgA sont activés dans les Plaques de Peyer ou dans les ganglions mésentériques. Les LTs auxiliaires T_{FH} aident ensuite à la différenciation des LBs en plasmocytes producteurs d'IgA grâce à la production de cytokines parmi lesquelles l'IL-21. Les IgA traversent ensuite l'épithélium pour rejoindre la lumière intestinale, où ils s'accrochent aux carbohydrates composant le mucus. Dans la lumière intestinale, les IgA peuvent ensuite neutraliser les pathogènes et induire si nécessaire une réponse immunitaire ciblée. On estime que jusqu'à 75% des micro-organismes commensaux du microbiote sont recouverts d'IgA, les empêchant d'infiltrer l'épithélium et de créer une infection.

LE MICROBIOTE INTESTINAL

Le microbiote intestinal, ou flore intestinale, est composé de l'ensemble des micro-organismes commensaux qui vivent en symbiose dans notre intestin [63]. Même si d'autres parties de notre corps ont leur propre microbiote (bouche, poumons, vagin, peau), on estime que 95% de nos micro-organismes résident dans notre intestin [64]. Le microbiote intestinal comprend des bactéries, des champignons et levures, mais aussi des virus et des phages. Dans ce chapitre, une attention particulière sera portée aux bactéries et aux champignons dont l'implication est clé dans ce projet. Les virus et les phages ne seront pas abordés.

Le microbiote intestinal peut être divisé en 2 compartiments, avec des compositions différentes : la lumière intestinale et la muqueuse [65]. Le microbiote de la lumière intestinale est le plus étudié, car il peut être prélevé dans le microbiote fécal. Le microbiote associé à la muqueuse intestinale est enfermé dans un mucus épais. Il est donc plus difficile de le prélever et de l'analyser.

COMPOSITION

Le microbiote intestinal chez l'homme contient plus de cent mille milliards (10^{14}) de microorganismes, et la densité bactérienne a été estimée à 10^{12} bactéries par millilitre dans le côlon [63,66]. Il pèse entre 1 et 2 kg, et contient près de 200 espèces bactériennes différentes par individu [67]. La répartition des espèces du microbiote n'est pas uniforme sur toute la longueur du tractus digestif. Les variations de pH et de concentration de dioxygène (O_2) en sont la principale cause. L'environnement de l'estomac est très acide ($2 < \text{pH} < 5$), ainsi on retrouve seulement 10^{2-3} bactéries/mL vivant en condition aérobie. Vient ensuite l'intestin grêle, divisé en 3 segments : le duodénum, le jéjunum et l'iléum. La population bactérienne se densifie le long de l'intestin grêle, de 10^{4-5} bactéries/mL dans le duodénum, jusqu'à 10^{7-8} bactéries/mL dans l'iléum [68]. Enfin, la majorité des bactéries du microbiote intestinal, soit 10^{12} bactéries/mL se trouvent dans la partie qui fait suite à l'intestin grêle, le côlon, en anaérobie et à pH 5,5 à 7 (Figure 21) [69]. Ainsi le terme « microbiote intestinal » décrit souvent le microbiote du côlon uniquement.

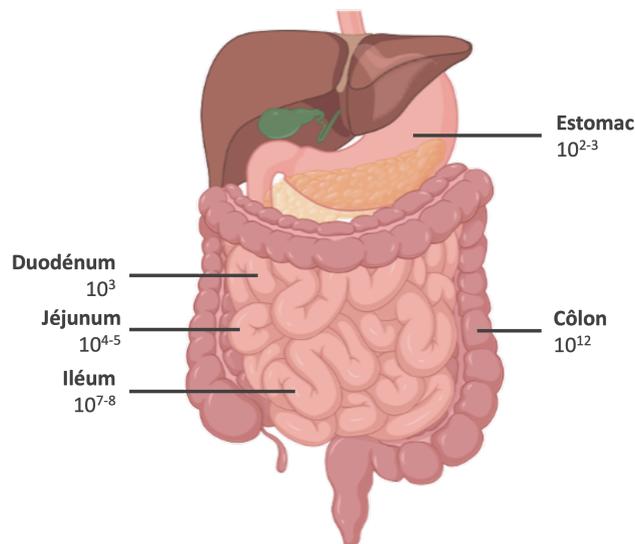


Figure 21 : Estimation de la densité des populations bactériennes le long du tube digestif. Les quantités indiquées sont exprimées en bactéries/mL.

Pendant des années, l'étude du microbiote intestinal s'est basée sur des approches de culture bactérienne. Les conditions de culture à mettre en place étant particulièrement spécifiques, il était difficile d'identifier toutes les espèces bactériennes faisant partie du microbiote intestinal.

De nouvelles approches ciblant l'ADN bactérien ont permis une étude plus approfondie des espèces colonisant le microbiote intestinal. Pour cela, un fragment d'ARN particulier contenu dans les ribosomes bactériens est utilisé. Les ribosomes bactériens sont composés de deux sous-unités : une grande sous-unité, appelée 50S, et une petite sous-unité, appelée 30S (Figure 22). La petite sous-unité contient un ARNr 16S, spécifique de chaque genre bactérien, et qui permet de détecter toutes les bactéries et parfois d'identifier les bactéries au niveau de l'espèce [70]. C'est la raison pour laquelle pour identifier les bactéries colonisant le microbiote intestinal, on utilise l'ADN codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S, qui est d'abord amplifié, puis séquencé.

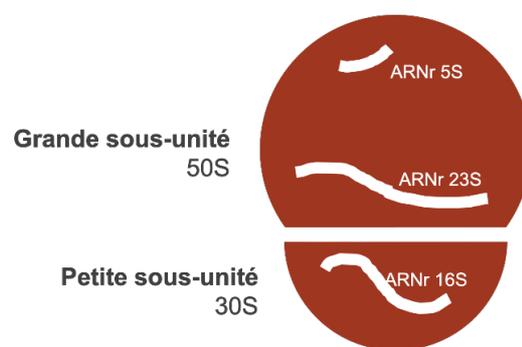


Figure 22 : Structure des ribosomes bactériens.

Cette méthode a permis de mettre en évidence les 6 phyla bactériens le plus présents dans le microbiote intestinal : Bacillota, Bacteroidota, Actinomycetota, Pseudomonadota, Fusobacteriota, et Verrucomicrobiota. La proportion de ces 6 phyla diffère entre les individus, mais les phyla Bacillota et Bacteroidota représentent plus de 80% du microbiote intestinal d'un individu [71]. En 2021, le Comité International de Systématique des Procaryotes (ICSP, International Committee on Systematics of Prokaryotes) a renommé et re-classifié 42 phyla de bactéries et d'archées, afin de standardiser les recherches en microbiologie. Ainsi, les 6 phyla précédemment cités, les plus présents dans le microbiote, étaient autrefois connus sous les noms de Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria et Verrucomicrobia. La Figure 23 présente les principales classes, ordres, familles, genres et espèces retrouvées dans les microbiotes intestinaux de personnes saines, avec la nouvelle nomenclature.

En plus de la grande diversité d'espèces présentes dans le microbiote intestinal, ces bactéries présentent également une grande diversité génétique. Ainsi 3,3 millions de gènes uniques sont

portés par les bactéries du microbiote intestinal, soit 150 fois plus que le génome humain (30 000 gènes) [72]. Le terme microbiome est alors utilisé pour décrire l'ensemble des micro-organismes constituant le microbiote intestinal ainsi que leur génome.

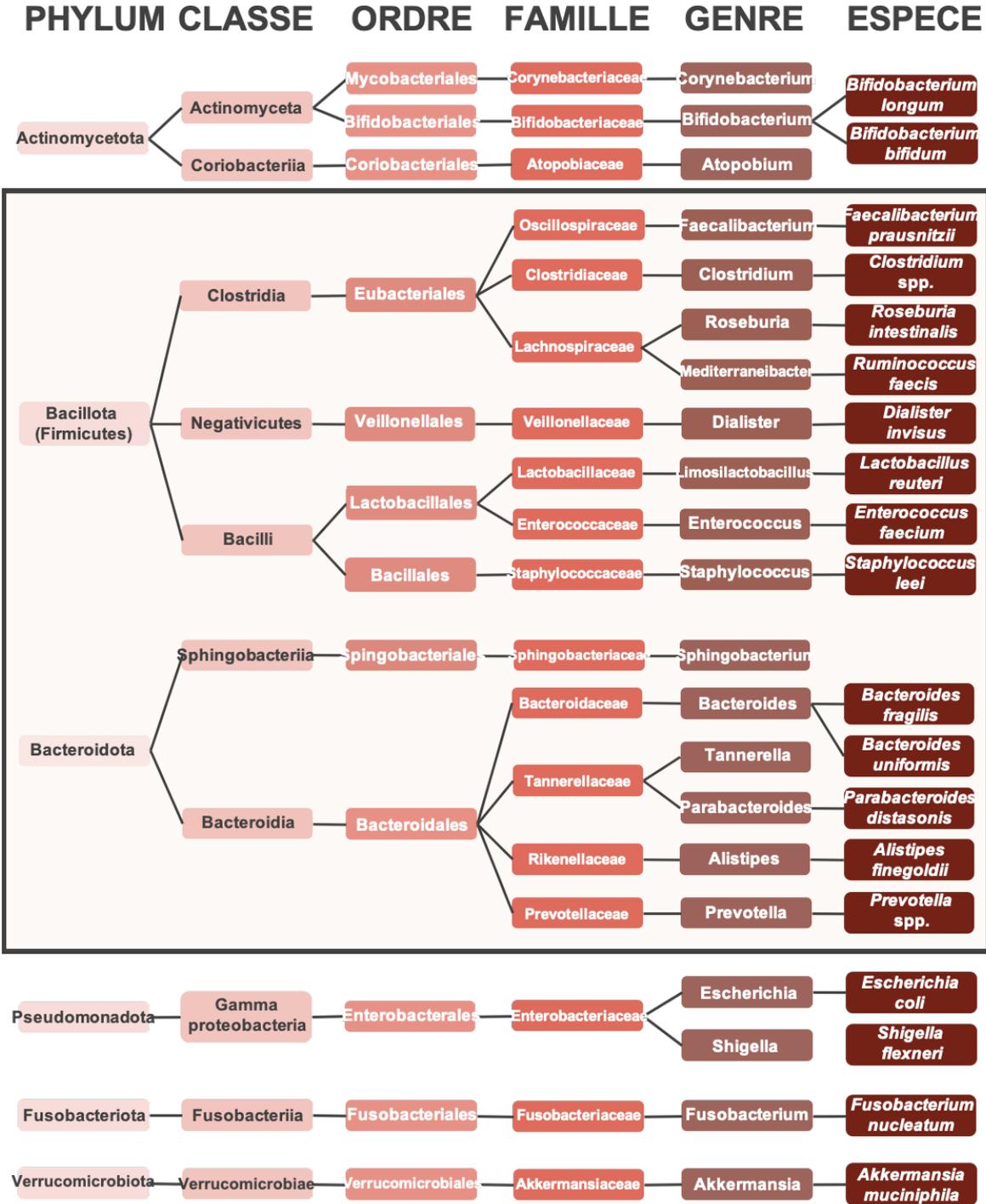


Figure 23 : Classification non exhaustive d'exemples d'espèces bactériennes présentes dans le microbiote intestinal, avec leur nouvelle taxonomie.

FONCTIONS

Le microbiote intestinal est impliqué dans la santé de l'hôte (Figure 24).

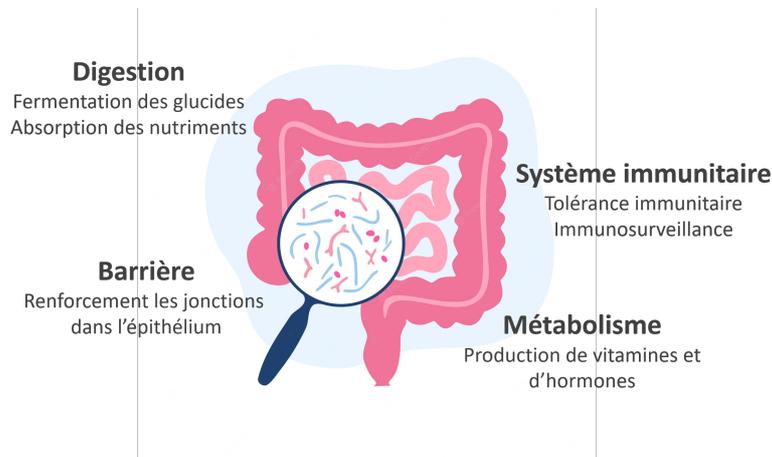


Figure 24 : Rôles du microbiote intestinal.

Son rôle principal est d'aider à la digestion et à l'absorption des nutriments. Certains composés alimentaires, majoritairement des carbohydrates, ne sont pas digérés par les enzymes de digestion de l'hôte. Ainsi, ils poursuivent leur périple le long du tractus digestif, jusqu'au côlon, où les bactéries et leurs enzymes spécifiques les dégradent. Les produits de cette dégradation peuvent ensuite être assimilés par nos cellules. La fermentation des carbohydrates par le microbiote intestinal entraîne la production d'Acides Gras à Chaînes Courtes (SCFAs, Short-Chain Fatty Acids), qui peuvent être utilisés par les cellules humaines comme précurseurs de la gluconéogenèse, lipogenèse, and cholesterologénèse [73]. La fermentation par le microbiote intestinal entraîne également la production de gaz, comme le dioxyde de carbone (CO_2), le dihydrogène (H_2) et le méthane (CH_4) [74].

Le microbiote intestinal joue aussi un rôle important dans le renforcement et l'intégrité de la barrière intestinale. Des études ont montré que certaines bactéries modulent l'expression de protéines impliquées dans le maintien des desmosomes, permettant de renforcer l'adhésion des cellules épithéliales entre elles [75]. La production de SCFAs par le microbiote intestinal permet de renforcer les jonctions serrées de l'épithélium, notamment en augmentant l'expression des gènes codant pour ZO-1 et l'occludine [76]. Au niveau des jonctions serrées entre les cellules épithéliales, la protéine ZO1 permet de lier l'actine du cytosquelette avec la protéine occludine, impliquée dans la stabilité de la jonction serrée.

Le microbiote intestinal est en collaboration étroite avec notre système immunitaire. D'un point de vue immunogène, les micro-organismes sont perçus comme des pathogènes par le système immunitaire, qui devra les reconnaître et les éliminer. Cependant, la grande majorité des micro-organismes du microbiote sont commensaux (non-pathogènes), et cohabitent avec l'hôte. Le microbiote et le système immunitaire ont donc évolué ensemble depuis la naissance de l'hôte, pour parfaire leur relation collaborative contre les pathogènes [77]. La relation entre microbiote et immunité est détaillée page 59.

LE MICROBIOTE FONGIQUE

Aussi appelé mycobiote, le microbiote fongique comprend tous les champignons filamenteux et levures colonisant notre intestin, estimé à 10^6 cellules fongiques par gramme de contenu intestinal [78]. Bien que les champignons représentent moins de 1% des microorganismes commensaux intestinaux, ils ont une taille environ 100 fois supérieure à celle des bactéries [79]. Même si les variations du mycobiote le long du tube digestif sont peu décrites, la proportion de cellules fongiques est probablement plus importante dans l'appareil digestif supérieur (estomac et intestin grêle).

COMPOSITION

Comme pour le microbiote bactérien, l'étude du mycobiote est rendue complexe par la difficulté de cultiver les champignons issus du microbiote. Des méthodes de séquençage, similaires au séquençage 16S bactérien ont été développées afin de déterminer les espèces constituant le mycobiote. Ces méthodes reposent sur le séquençage du fragment d'ADN codant pour une séquence d'ARNr Espaceur Interne Transcrit (ITS, Internal Transcribed Spacer). Ce fragment d'ADN est divisé en 2, ITS1 et ITS2, chacun fournissant des caractéristiques pour l'identification du champignon [80]. La longueur de la séquence ITS varie d'un champignon à l'autre, ce qui impacte l'efficacité de l'amplification de la séquence d'ADN avant le séquençage [81]. Cette méthode, bien que déjà très utilisée, est toujours en cours d'amélioration.

La majorité des espèces fongiques du mycobiote sont des anaérobies facultatifs, et peuvent persister dans des environnements complètement hypoxiques, comme le côlon.

Les 2 phyla principaux du mycobiote sont Ascomycota (70%) et Basidiomycota (30%). Le mycobiote est très variable d'un individu à l'autre, mais on estime que généralement, une vingtaine d'espèces fongiques le colonisent. Cependant, 10 genres fongiques semblent être communs à la plupart des mycobiototes : *Candida*, *Saccharomyces*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Cladosporium*, *Galactomyces*, *Debaryomyces* and *Trichosporon*.

Des études suggèrent que le microbiote fongique est transitoire plutôt que stable. En effet, les champignons sont très présents dans certains aliments et dans l'environnement. On en retrouve principalement dans le fromage, la bière, le pain, le vin, et l'air. Il serait alors possible qu'une partie des champignons du mycobiote provienne de l'ingestion de souches fongiques de l'alimentation. Une fois dans l'intestin, ces champignons colonisent l'intestin, et ce, de manière transitoire [82]. Ce sont les champignons non-résidents, car ils rencontrent des difficultés voire incapacités à coloniser l'intestin à 37°C. D'autres champignons, les résidents, peuvent perdurer dans le temps, en colonisant l'intestin.

FONCTIONS

Plusieurs études ont mis en évidence des interactions entre les bactéries et les champignons du microbiote (Figure 25). Ces interactions peuvent être classées en 3 catégories [83]:

- Mutualisme : chaque micro-organisme trouve un avantage dans l'interaction.
- Commensalisme : l'un des micro-organismes trouve un avantage dans l'interaction, sans affecter négativement l'autre micro-organisme.
- Compétition : les deux micro-organismes subissent des effets négatifs de cette interaction.

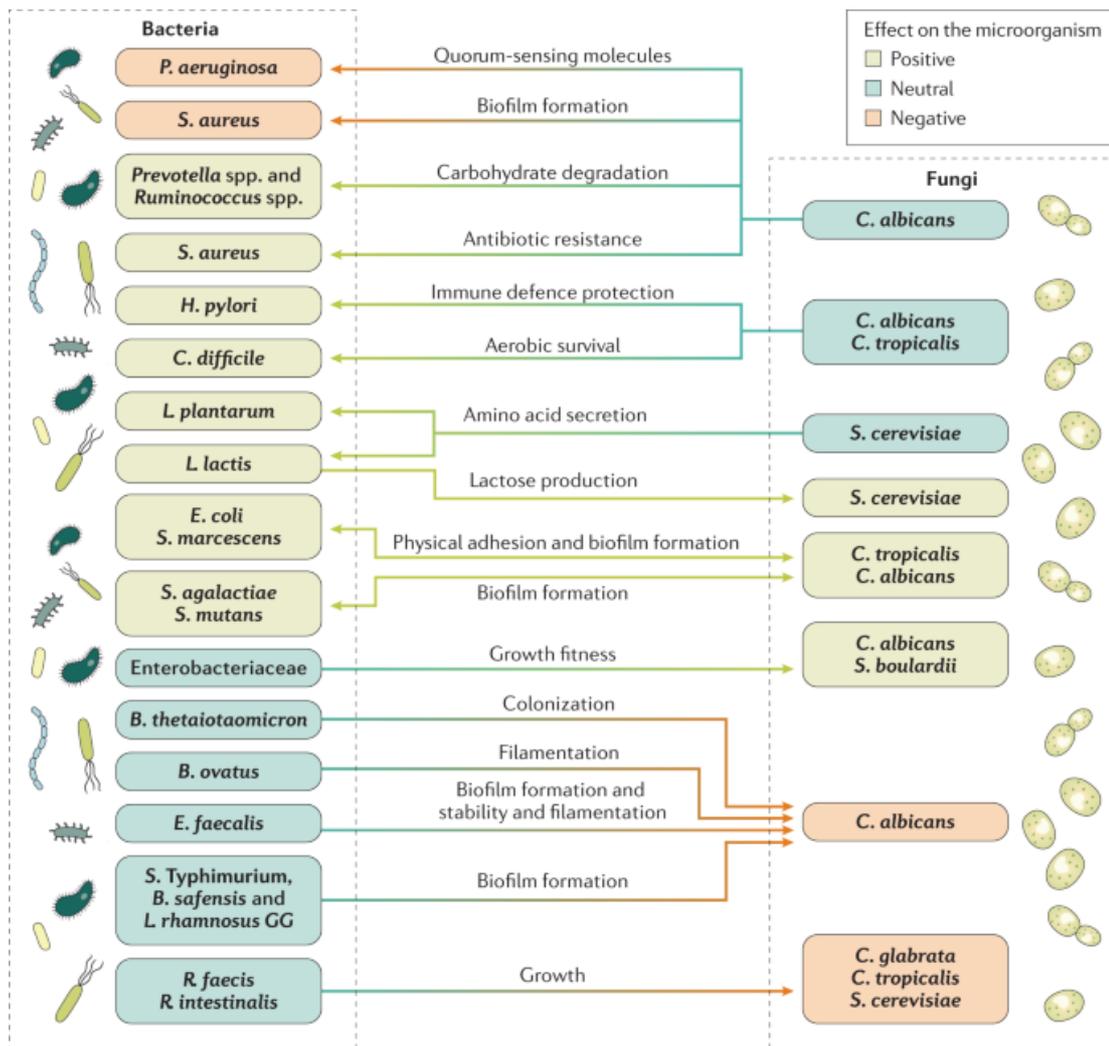


Figure 25 : Exemples d'interactions entre les bactéries et les champignons du microbiote intestinal. (Source : [83])

Etant donnée la structure de la paroi des champignons, ils sont primordiaux pour le microbiote bactérien. En effet, ils sont composés de polysaccharides complexes, pouvant servir de source de carbone pour les bactéries [84]. Par exemple, les β -glucanes et la chitine sont impactés par les bactéries du microbiote intestinal, qui les dégradent de manière enzymatique [85].

Les champignons ne sont par définition pas impactés par les antibiotiques. Au contraire, il a été montré que lors de traitements antibiotiques, les champignons colonisent plus facilement le microbiote qu'en présence de bactéries [86].

Avant la naissance, le fœtus est considéré comme stérile. Ce n'est qu'à partir de la naissance que son microbiote commence à se former. Lors d'une naissance par voies naturelles, le nouveau-né est en contact avec le microbiote vaginal et intestinal de sa mère, ensemençant le tractus digestif. S'il est ensuite allaité, il ingèrera également du microbiote de la peau, et certaines bactéries et champignons contenues dans le lait maternel, appelées probiotiques [87]. Le lait maternel contient également des prébiotiques, qui favorisent la croissance du microbiote de l'enfant. Le microbiote intestinal continue de se former durant les 2 à 3 premières années de la vie, avec l'introduction de la nourriture solide notamment. Durant cette période, le microbiote éduque le système immunitaire de l'hôte, en distinguant les micro-organismes commensaux des pathogènes [88].

A l'âge adulte, le microbiote intestinal est relativement stable. Cependant, le mode de vie de l'hôte peut moduler sa composition et sa fonction. La principale source de modification du microbiote intestinal est l'alimentation. Généralement, une alimentation riche en fruits, légumes et fibres alimentaires est associée avec un microbiote riche et diversifié, à la fois au niveau des espèces bactériennes et fongiques [89,90]. D'autres aspects du mode de vie peuvent également impacter la composition du microbiote intestinal, comme l'âge, la pratique d'une activité sportive, la prise de médicaments, et principalement d'antibiotiques [91,92].

Si certains facteurs environnementaux peuvent favoriser un microbiote riche et stable, d'autres peuvent au contraire entraîner un déséquilibre, appelé dysbiose. Plusieurs modifications peuvent être à l'origine d'une dysbiose intestinale. La proportion de bactéries commensales peut diminuer, entraînant ou non une augmentation de la proportion de bactéries pathogènes. Une baisse de la richesse et de la diversité peut aussi être considérée comme une dysbiose. Ce déséquilibre affecte les fonctions du microbiote et lui fait perdre son rôle protecteur. Ainsi, la barrière intestinale est fragilisée, laissant l'opportunité à des pathogènes et à des produits bactériens d'infiltrer l'organisme de son hôte. Le système immunitaire crée une inflammation initialement pour contenir l'infiltration bactérienne, pouvant finalement détruire le tissu intestinal [93].

La reconnaissance du microbiote intestinal par le système immunitaire est primordiale, afin d'induire une tolérance immunitaire envers les micro-organismes bénéfiques et une réponse inflammatoire contre des agents pathogènes.

DETECTION DES MAMPS

Les cellules épithéliales et immunitaire de l'intestin de l'hôte peuvent détecter des MAMPs, grâce à des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, Pattern Recognition Receptor). Ainsi, les cellules de la muqueuse intestinale peuvent exprimer différentes classes de PRRs, à leur surface ou dans leur cytosol, dont les principaux sont :

Les récepteurs de type-Toll (TLR, Toll-Like Receptor) [94,95]

Les TLRs sont des protéines transmembranaires, pouvant être exprimées à la surface des cellules, ou à la surface d'endosomes à l'intérieur de la cellule. Sous forme de monomères, ou de dimères, ils peuvent reconnaître différents types de molécules :

- Dimère TLR1 – TLR2 (surface) : Reconnaît des lipoprotéines bactériennes, des composants des parois de bactéries Gram⁺, et des MAMPs fongiques.
- Dimère TLR2 – TLR6 (surface) : Reconnaît des lipoprotéines bactériennes, l'acide lipoteichoïque et des β -glucanes fongiques.
- Dimère TLR4 (surface) : Reconnaît l'acide lipoteichoïque, des lipopolysaccharides (LPS), des polysaccharides et des composants des parois des champignons.
- Monomère TLR5 (surface) : Reconnaît la protéine flagelline dans les flagelles de bactéries.
- Monomère TLR3 (endosomal) : Reconnaît l'ARN viral double brin et l'ADN fongique double brin.
- Monomère TLR7 (endosomal) : Reconnaît l'ARN viral et fongique simple brin.
- Monomère TLR9 (endosomal) : Reconnaît l'ADN génomique double brin fongique.

Une fois la cible fixée sur le TLR, une cascade de signalisation s'active dans la cellule, entraînant généralement une réponse pro-inflammatoire.

Récepteurs de type NOD (NLR, NOD-Like Receptors) [96]

Les NLRs sont des capteurs cytoplasmiques détectant des dommages cellulaires et des infections bactériennes. En cas de présence d'ATP extracellulaire, due à la mort de cellules voisines, un flux d'ion K^+ entre dans la cellule, et active les NLRs cytoplasmiques. Ils peuvent également détecter différents types de peptidoglycanes, formant les parois bactériennes. Une fois activés, ils activent le facteur de transcription NF κ B pour enclencher une réponse pro-inflammatoire.

DETECTION DES METABOLITES

En plus des molécules caractéristiques des bactéries exprimées à leur surface et reconnues par les PRRs, les micro-organismes du microbiote intestinal produisent des métabolites libérés dans la lumière intestinale. Ces petites molécules sont des produits dérivés de l'activité métabolique des micro-organismes, et peuvent impacter avec le système immunitaire [97]. Ces métabolites aux capacités immunomodulatrices sont appelés immuno-métabolites.

Les SCFAs (butyrate, propionate et acétate) font partie des immuno-métabolites les plus étudiés. Le butyrate exerce un effet anti-inflammatoire, notamment en favorisant les populations de T_{REG} , mais aussi en empêchant la différenciation de LTs naïfs en LTs effecteurs produisant de l'IFN γ . Il favorise la production d'IL-10 anti-inflammatoire par les DCs et décroît ainsi la population de T_H17 . Le butyrate limite aussi le transport de bactéries à travers l'épithélium intestinal par les macrophages et prévient ainsi l'inflammation intestinale. Les SCFAs ont également un effet anti-inflammatoire indirect, en renforçant l'intégrité de la barrière intestinale [76]. Cela prévient la translocation bactérienne à travers l'épithélium et limite l'inflammation. Dans certains cas, les SCFAs peuvent aussi exercer un effet pro-inflammatoire, notamment en promouvant les populations de T_H1 et T_H17 en contexte infectieux. La détection de succinate par les macrophages entraîne leur différenciation en macrophage de type M1 (Pro-inflammatoire).

Les effets des SCFAs sont principalement médiés par 2 voies : l'inhibition des Histones DésAcétylases (HDACs) et l'activation de récepteurs de surface [98,99]. En inhibant l'activité des HDACs, les SCFAs favorisent l'acétylation des histones, ce qui entraîne l'induction et/ou la répression de l'expression de certains gènes. Par exemple, le butyrate ou le propionate, en inhibant l'activité des HDACs, limitent l'expression des gènes codant pour la cytokine pro-inflammatoire IL-8 par des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) stimulées avec des Lipopolysaccharides [100]. Les SCFAs peuvent aussi directement activer des Récepteurs Couplés à la Protéine G (GPCR, G Protein-Coupled Receptors), notamment GPR41 et GPR43, exprimés par les adipocytes, les cellules épithéliales du côlon et les cellules mononucléées sanguines périphériques [101]. L'engagement de ces récepteurs peut entraîner un effet anti-inflammatoire, en inhibant le facteur de transcription NF- κ B, ce qui réduit ainsi la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 [100].

Le microbiote intestinal produit également des vitamines B, entraînant des effets pro- et anti-inflammatoires chez les cellules immunitaires suivant leur type [102]. Par exemple, la vitamine B12 promeut la survie cellulaire des LTs et des cellules NK. La vitamine B5 soutient la production de cytokines pro-inflammatoires, et aide à l'élimination de certains pathogènes microbiens.

Des acides aminés ainsi que des dérivés métaboliques des acides aminés peuvent exercer un effet immuno-stimulant. C'est le cas notamment du tryptophane et de ses dérivés, comme les indoles et la kynurénine. Ces métabolites sont détectés après internalisation par la cellule, par le Récepteur d'Aryl hydrocarbure (AhR, Aryl hydrocarbure Receptor) [103]. Ces métabolites sont généralement décrits comme immunosuppresseurs, en inhibant l'expression de MHC de classe II par les DCs, et en favorisant la production de cytokines anti-inflammatoires.

Ainsi, le système immunitaire est façonné en grande partie par le microbiote intestinal et par les métabolites qu'il produit. Un déséquilibre de ce dernier peut être à l'origine de nombreuses pathologies, et notamment du cancer [104]. Un microbiote intestinal sain est souvent corrélé avec un système immunitaire efficace, indispensable dans la prévention et l'élimination des cancers.

IV. LES LTs $\gamma\delta$ AU CŒUR DU DIALOGUE IMMUNITÉ-MICROBIOTE

Les LTs $\gamma\delta$ sont parmi les populations immunitaires majoritaires dans les muqueuses, comme les poumons, la peau et les intestins, et sont donc à l'interface directe entre le milieu extérieur, les microbiotes et l'organisme. Les liens entre le microbiote et les LTs $\gamma\delta$ seront abordés après une présentation de leurs caractéristiques.

LES SOUS-TYPES

Le TcR des LTs $\gamma\delta$ est composé d'une chaîne γ et d'une chaîne δ , tandis que les TcR des LTs conventionnels sont composés d'une chaîne α et d'une chaîne β . Les TcR $\gamma\delta$ sont beaucoup moins variables que les TcR $\alpha\beta$, car ils ne subissent pas de réarrangement et pas de sélection thymique. Ainsi, les TcR $\gamma\delta$ reconnaissent des motifs non-variables. Suivant les chaînes γ et δ formant le TCR, différents sous-types de LTs $\gamma\delta$ peuvent être décrits [105,106]. Ces sous-types résident dans des tissus distincts, et sont différents entre l'homme et la souris (Figure 26). Les LTs $\gamma\delta$ sont généralement retrouvés dans les muqueuses, où ils constituent la première ligne de défense contre les pathogènes.

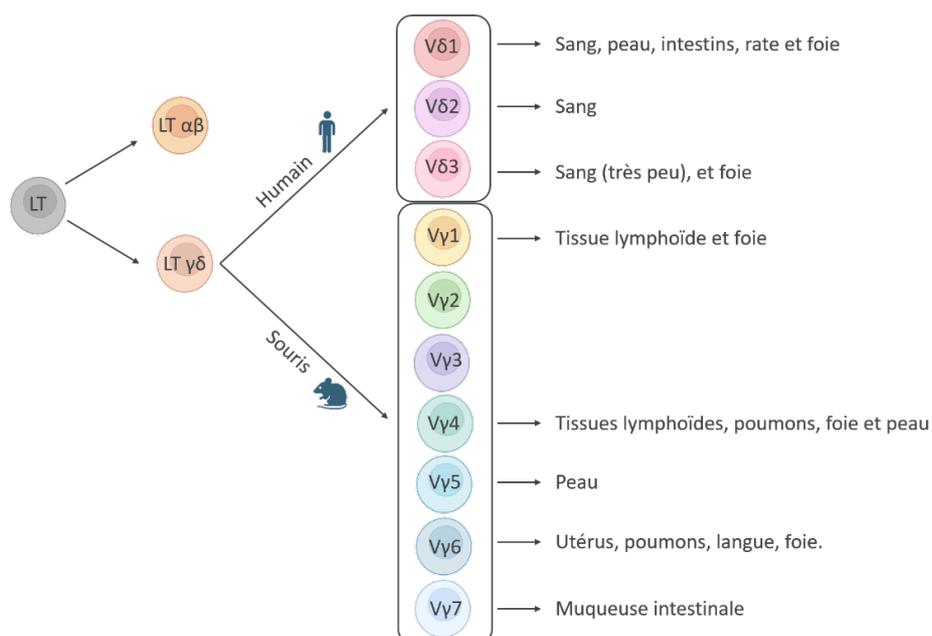


Figure 26 : Les sous-types de LTs $\gamma\delta$ chez l'homme et chez la souris, et leur localisation, en fonction de leurs chaînes γ et δ . LT = Lymphocyte T.

Chez l'homme, les sous-types de LTs $\gamma\delta$ sont définis par leur chaîne δ , alors que chez la souris, ils sont définis par leur chaîne γ .

Chez l'homme, on distingue principalement les $V\delta 2^+$ des $V\delta 2^-$. Les $V\delta 2^+$ sont majoritairement présents dans le sang, et sont impliqués dans les réponses anti-infectieuses et antitumorales [107,108]. Ils peuvent être couplés à différentes chaînes γ , mais sont le plus souvent couplés à la chaîne $\gamma 9$, formant ainsi le sous-type $V\gamma 9\delta 2$.

Les $V\delta 2^-$ sont principalement des $V\delta 1$, circulant dans le sang, ou résidant dans l'épithélium intestinal, la peau, la rate et le foie, sont impliqués dans le maintien de l'intégrité du tissu épithélial. Ils peuvent exercer des effets antitumoraux et antiviraux. Enfin, les $V\delta 3$ sont détectés dans le sang de patients avec des infections virales, notamment au Virus de l'Immunodéficience Humaine (HIV, Human Immunodeficient Virus). Des LTs $\gamma\delta$ exprimant d'autres chaînes $V\delta$ ont été détectés chez des patients atteints de lymphome, mais leur rôle n'a pas encore été déterminé. Chez la souris, 7 sous-types de LTs $\gamma\delta$ sont identifiés, et résident dans des tissus particuliers (26).

LEURS FONCTIONS

Il existe un autre moyen de classer les LTs $\gamma\delta$, suivant les cytokines qu'ils produisent. Ainsi, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, on distingue les LTs $\gamma\delta 1$ et $\gamma\delta 17$ (Figure 27) [109].

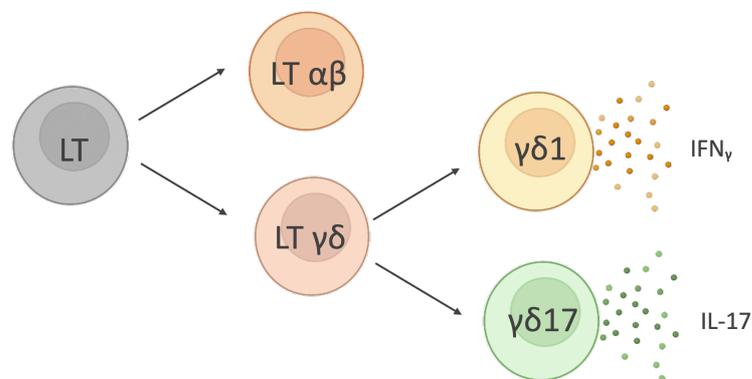


Figure 27 : Les sous-types de LTs $\gamma\delta$ chez l'homme et chez la souris en fonction des cytokines qu'ils produisent. LT = Lymphocyte T, IFN γ = Interféron γ , IL = Interleukine.

Les LTs $\gamma\delta 1$ se caractérisent par leur production d'IFN γ , tandis que les $\gamma\delta 17$ produisent principalement de l'IL-17. Les LTs $\gamma\delta$ peuvent exercer une action cytotoxique contre des cellules infectées ou transformées, notamment en libérant des granules contenant des enzymes cytotoxiques (Figure 29) [110]. Ces enzymes sont de 2 familles : la perforine et les granzymes. La perforine crée des pores dans la membrane plasmique de la cellule cible, ce qui permet aux granzymes de rentrer à l'intérieur de la cellule et d'entraîner son apoptose.

Les LTs humains V $\gamma 9\delta 2$ présentent une grande plasticité fonctionnelle à la suite de leur activation (Figure 28), similaire à celle des LTs CD4⁺ [111].

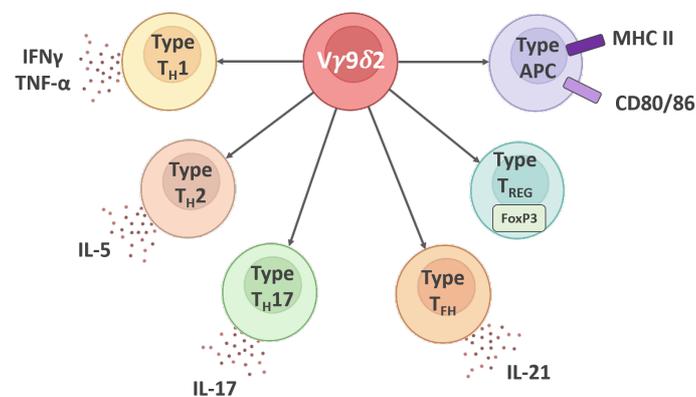


Figure 28 : Populations de LTs V $\gamma 9\delta 2$ suivant leurs fonctions. IFN γ = Interféron γ , TNF- α = Tumor Necrosis Factor, IL = Interleukine, MHC = Major Histocompatibility Complex. (D'après [111])

Comme les $\gamma\delta 1$, les LTs $\gamma\delta$ de type T_{H1} se caractérisent par une production d'IFN γ , parfois de TNF- α , et sont particulièrement cytotoxiques. Les LTs $\gamma\delta$ de type T_{H2} permettent le recrutement d'éosinophiles en sécrétant de l'IL-5. Les LTs $\gamma\delta$ de type T_{H17} produisent de l'IL-17 et exercent un effet pro-tumoral. Les LTs $\gamma\delta$ de type T_{FH} produisant de l'IL-21 aident à la prolifération des LTs et des LBs dans les centres germinatifs. Les LTs $\gamma\delta$ peuvent également présenter un phénotype de type T_{REG}, en exprimant le facteur de transcription FoxP3, et en produisant TGF- β . De plus, les LTs V $\gamma 9\delta 2$ sont capables d'acquérir une fonction de cellule présentatrice d'antigènes (Figure 29) [112,113]. Après exposition à une molécule activatrice des LTs $\gamma\delta$, le zolédronate, les LTs $\gamma\delta$ expriment des marqueurs et donc des fonctions d'APCs, comme CD80, CD86 et les MHC de classes I et II. En effet, lorsque les LTs $\gamma\delta$ sont cultivés avec un antigène

exogène d'intérêt et du zolédronate, puis avec des LTs conventionnels naïfs, ils induisent l'initiation (« priming »), puis l'activation et la prolifération de LTs CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de l'antigène d'intérêt. Les LTs $\gamma\delta$ avec un phénotype et une fonction APC ont également été observés chez la souris [114].

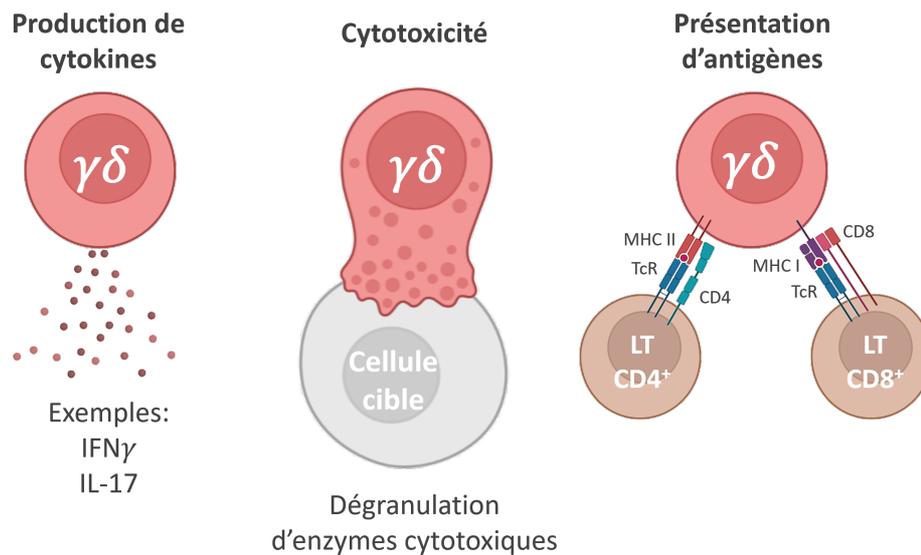


Figure 29 : Rôles de LTs $\gamma\delta$. LT = Lymphocyte T, IFN γ = Interféron γ , IL = Interleukine, MHC = Major Histocompatibility Complex, TcR = T cell Receptor.

LE $\gamma\delta$ TCR

Le fonctionnement du $\gamma\delta$ TCR n'est pas encore complètement compris. Cependant, des études ont permis de mettre en évidence des éléments nécessaires à l'activation des LTs $\gamma\delta$ via leur TCR.

RECONNAISSANCE DE TYPE MHC

Comme les LTs conventionnels, les LTs $\gamma\delta$ peuvent être activés via l'interaction de leur TCR avec une molécule de type MHC classique (Figure 30). Il semblerait que certaines molécules MHC I et MHC II soient des ligands activateurs de LTs $\gamma\delta$ cytotoxiques. Il a été montré que certains LTs $\gamma\delta$ peuvent reconnaître des MHC seulement si ces derniers présentent un antigène, quel qu'il

soit [115]. Les MHC étant beaucoup plus stables lorsqu'ils portent un antigène, il est possible que les LTs $\gamma\delta$ ciblent ces MHC stables plutôt que l'antigène présenté.

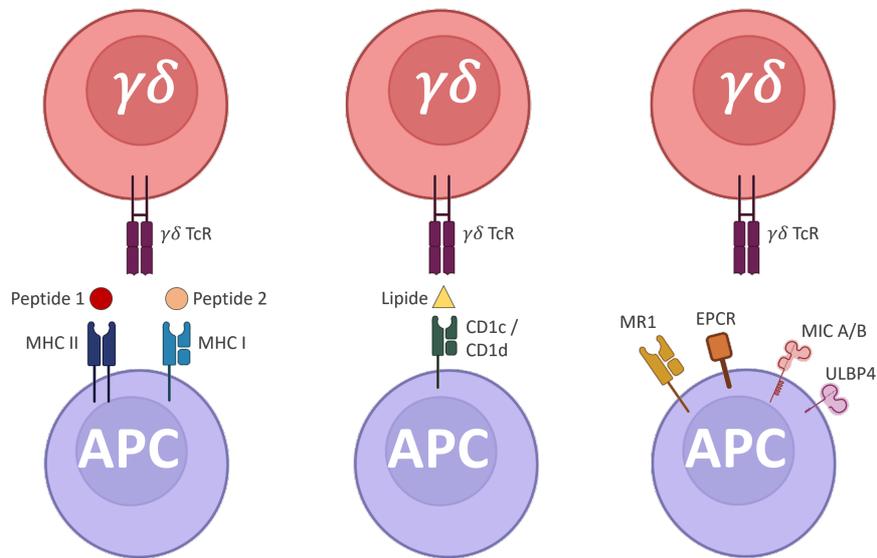


Figure 30 : Les reconnaissances de type MHC des TcR $\gamma\delta$. TcR = T cell Receptor, MHC = Major Histocompatibility Complex, MR1 = MHC-related protein 1, EPCR = Endothelial Protein C Receptor, MIC A/B = MHC class I-related Chain A / B, ULBP4 = UL16-Binding Protein 4

CD1c et CD1d sont des molécules de surface cellulaire de la famille des MHC non-classiques, permettant aux APCs de présenter des lipides. Les LTs $\gamma\delta$ humains V δ 1 et V δ 3 peuvent reconnaître les CD1 présentant différents phospholipides et glycophospholipides (Figure 30) [116]. Les $\gamma\delta$ TcR peuvent également reconnaître des molécules CD1 ne présentant pas de lipide, mais avec une plus faible affinité.

Les $\gamma\delta$ TcR peuvent interagir avec d'autres molécules de type MHC ne portant pas d'antigène, comme les molécules de type MHC de classe I (MR1, MHC-related protein 1), le Récepteur Endothélial de Protéine C (EPCR, Endothelial Protein C Receptor), les chaînes A ou B apparentées aux MHC de classe I (MICA/MICB, MHC class I-related Chain A / B), le ligand UL16 de la Protéine 4 (ULBP4, UL16-Binding Protein 4) chez l'homme (Figure 30), et le MHC de classe Ib (T10/T22) chez la souris [117].

La reconnaissance de molécules MHC ou de type MHC par les $\gamma\delta$ TcR semble être indépendante de l'antigène porté par cette molécule.

RECONNAISSANCE DIRECTE D'ANTIGENES

Les $\gamma\delta$ TcR détectent également des antigènes non portés par des complexes spécialisés, de la même manière que les immunoglobulines. De cette manière, ils peuvent détecter des antigènes pathogènes viraux, comme la Glycoprotéine Virale Herpès Simplex I (HSV-gI, Herpes Simplex Virus Glycoprotein I), ou bactériens, comme les Super Antigènes (SA) Enterotoxine Staphylococcale A (SEA, Staphylococcal Enterotoxin A) ou 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase 2 (DXS2) (Figure 31) [118,119]. La détection de ces antigènes entraîne l'activation du LT $\gamma\delta$, et la production d'IFN γ .

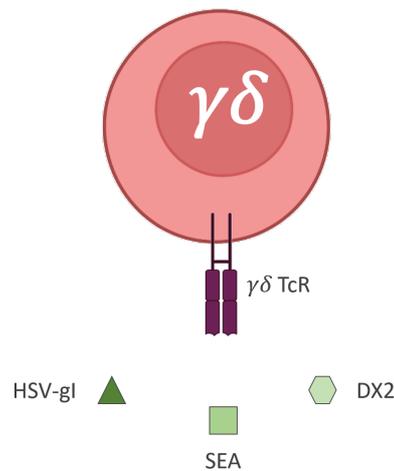


Figure 31 : Exemples d'antigènes reconnus directement par les TcR $\gamma\delta$. TcR = T cell Receptor, HSV-gI = Herpes Simplex Virus Glycoprotein I, SEA = Staphylococcal Enterotoxin A, DXS2 = 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate synthase 2.

RECONNAISSANCE VIA LES BUTYROPHILINES

Chez l'homme, le TcR V δ 2 est capable de détecter des molécules phosphorylées appelées phosphoantigènes (p-Ags) [117]. Les 2 p-Ags les plus décrits sont les métabolites (E)-4-hydroxy-3-méthyl-but-2-enylpyrophosphate (HMBPP), et l'Isopentenylpyrophosphate (IPP). L'HMBPP est un p-Ag bactérien, tandis que l'IPP est produit par les cellules eucaryotes et procaryotes, par la voie du mévalonate. La reconnaissance de ces petites molécules par les $\gamma\delta$ TcR nécessite un contact entre 2 cellules. Les protéines Butyrophilines (BTN) 3A1 et 2A1 ont été identifiées comme essentielles pour la reconnaissance de p-Ags par les $\gamma\delta$ TcR. BTN3A1 et BTN2A1 sont des protéines transmembranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines (Figure 32) exprimées par diverses cellules de l'organisme. A ce jour, le mode d'action des BTNs pour présenter des p-Ags aux LTs $\gamma\delta$ n'est pas encore complètement établi. L'hypothèse la plus

admise est que le p-Ag se fixe au domaine intracellulaire B30.2 de BTN3A1. Cela permet la formation d'un complexe BTN3A1-BTN2A1, entraînant l'activation du LT $\gamma\delta$ via son TcR (Figure 32) [120,121].

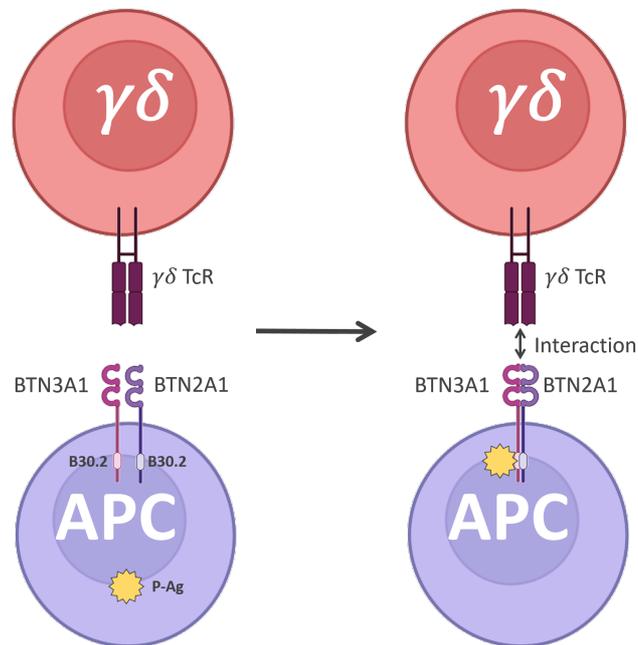


Figure 32 : Activation des TcR $\gamma\delta$ via les phosphoantigènes. TcR = T cell Receptor, BTN = Butyrophiline, APC = Antigen-Presenting Cell.

LTs $\gamma\delta$ ET MICROBIOTE

Les LTs $\gamma\delta$ sont situés à l'interface entre les tissus et le milieu extérieur, et sont en contact permanent avec des microorganismes commensaux et pathogènes du microbiote. Ils permettent le maintien d'un microbiote sain et stable au cours du temps. Grâce à leur production d'IL-17, les LTs $\gamma\delta$ recrutent des neutrophiles, pouvant contrôler la charge microbienne, et sélectionner les micro-organismes commensaux [122]. Cependant, dans certaines pathologies, comme l'obésité ou la stéatohépatite non alcoolique, une dysbiose intestinale favorise la présence de micro-organismes pathogènes [123]. Cette augmentation de la charge microbienne pathogène entraîne un recrutement accru de LTs $\gamma\delta$ 17 dans le foie, qui favorisent alors la progression de la maladie [124].

Le microbiote intestinal impacte également le développement des LTs $\gamma\delta$. Chez des souris nées sans microbiote (GF, Germ-Free), certaines populations systémiques de LTs $\gamma\delta$ sont diminuées, comme les LTs $\gamma\delta 17$ du foie, de la peau et le lamina propria [122]. Cela signifie qu'en absence de microbiote durant le développement embryonnaire et post-natal, ces populations de LTs $\gamma\delta$ ne peuvent pas se développer complètement. De la même manière, il a été observé que chez des souris adultes traitées par antibiotiques, la proportion de LTs $\gamma\delta 17$ de la lamina propria était diminuée par rapport à des souris non-traitées. Cela suggère que le microbiote façonne également la différenciation et l'expansion de LTs $\gamma\delta 17$ au cours de la vie de l'hôte. Ainsi, un microbiote diversifié et complet permet le développement et le maintien de certaines populations systémiques de LTs $\gamma\delta$.

L'analyse transcriptomique de 18 000 tumeurs provenant de plus de 39 types de cancer, a permis d'identifier l'abondance de l'infiltration tumorale en LTs $\gamma\delta$ comme le marqueur de pronostic le plus favorable parmi 22 sous-types de cellules immunitaires [125]. La variété d'antigènes détectables par les LTs $\gamma\delta$ en fait une cellule immunitaire efficace contre les cellules cancéreuses. Ils sont non seulement capables d'éliminer les cellules cancéreuses, mais aussi de stimuler l'activation d'autres cellules immunitaires, grâce aux cytokines qu'ils produisent et à leur fonction d'APC, comme décrit précédemment.

Cependant, certaines tumeurs entraînent la subversion des LTs $\gamma\delta$. Ils deviennent alors pro-tumoraux, à la suite de mécanismes d'échappement des cellules cancéreuses.

V. IMMUNOLOGIE DES CANCERS ET IMMUNOTHERAPIES

IMMUNO-EDITION DES CANCERS

Le concept d'immunosurveillance a été proposé en 1909 par Paul Ehrlich [126]. Il pensait que dans certains cas, l'immunité pouvait aider à prévenir l'apparition de cancer. A l'époque, les techniques de laboratoire n'étaient cependant pas suffisantes pour tester cette hypothèse. A partir de 1950, et grâce au développement de l'immunologie, des études ont montré que des souris pouvaient être immunisées contre des transplants de tumeurs, ce qui suggéra l'existence d'antigènes spécifiques des cellules cancéreuses. Sir. Macfarlane Burnet et Lewis Thomas apportèrent des éléments soutenant cette hypothèse, pour finalement, en 1970, définir « l'immunosurveillance » [127]:

« Chez les grands animaux à longue vie, comme la plupart des vertébrés à sang chaud, les changements génétiques héréditaires doivent être courants dans les cellules somatiques et une proportion de ces changements représente une étape vers la malignité. C'est une nécessité évolutive qu'il devrait y avoir un mécanisme pour éliminer ou inactiver les cellules mutantes potentiellement dangereuse et il est postulé que ce mécanisme est de caractère immunologique. »

Durant de nombreuses années, le concept d'immunosurveillance n'était qu'une hypothèse attendant d'être vérifiée. C'est en 1998, que Robert Schreiber démontre l'existence d'un processus d'immunosurveillance chez les individus immunocompétents, ainsi que certains éléments clés, comme la cytokine IFN γ [128].

Nous savons maintenant que le système immunitaire joue un rôle central à la fois dans la prévention et paradoxalement dans le développement des cancers, dans un processus appelé l'immuno-édition. Ce phénomène est divisé en 3 phases, aussi appelé la règle des 3 E : Élimination, Équilibre et Échappement (Figure 33) [129].

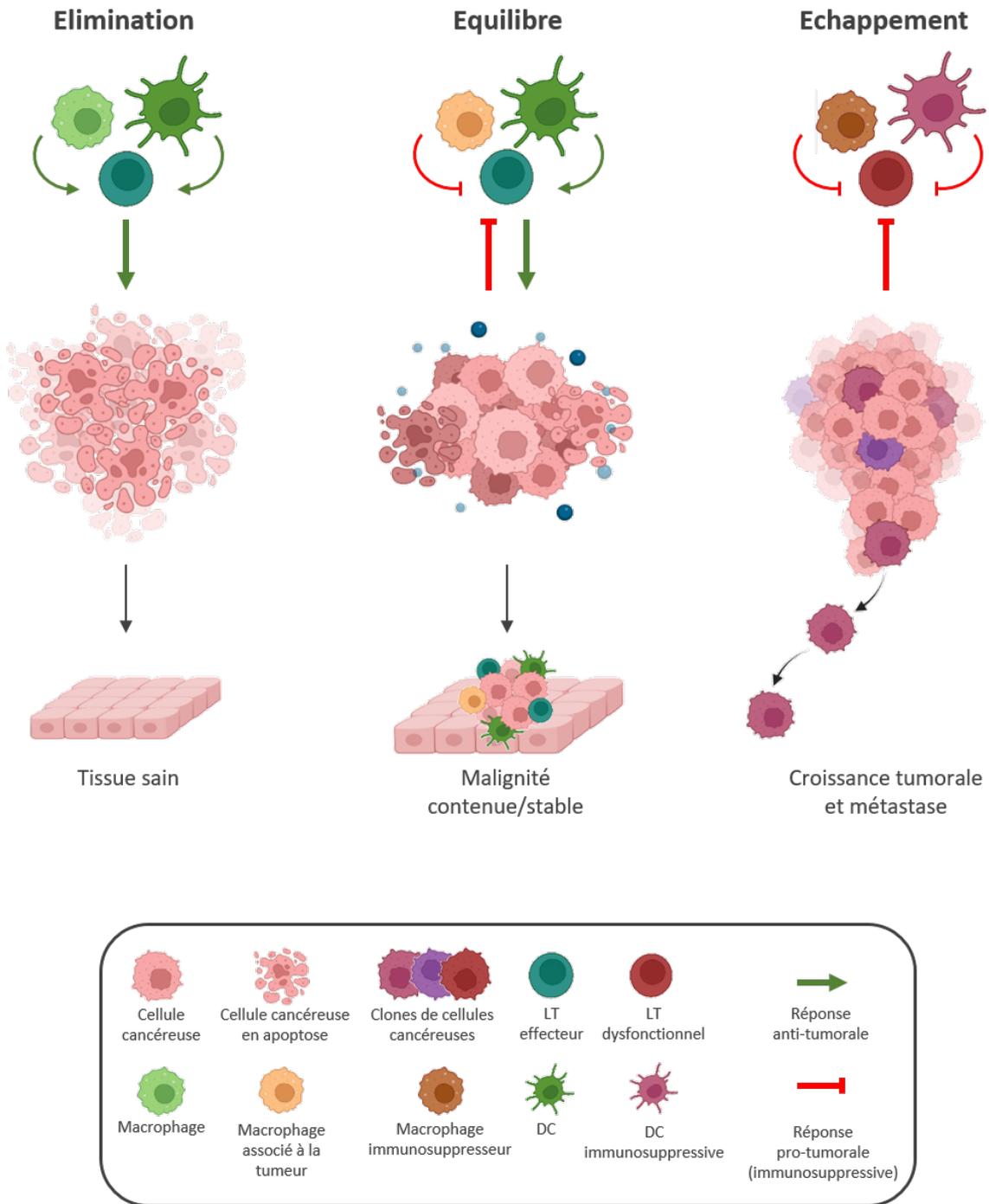


Figure 33 : L'immuno-édition des cancers. Dans la phase d'élimination (panel de gauche), les LT effecteurs, les DCs et les macrophages éliminent les cellules cancéreuses rapidement, permettant le maintien d'un tissu sain. Dans la phase d'équilibre (panel central), le système immunitaire exerce une pression de sélection sur les cellules cancéreuses, permettant l'apparition, la survie et la prolifération de cellules immuno-résistantes. Dans la phase d'échappement (panel de droite), les cellules cancéreuses deviennent invisibles ou insensibles aux cellules immunitaires en créant un environnement tumoral immunosuppresseur et se développent de manière incontrôlée jusqu'à former une tumeur palpable et diagnosticable. (D'après [129]).

ELIMINATION

La phase d'Élimination, également appelée immunosurveillance correspond à l'étape durant laquelle le système immunitaire patrouille dans l'organisme, reconnaît et élimine les cellules cancéreuses, grâce à des Antigènes Spécifiques de la Tumeur (TSA, Tumor-Specific Antigens) ou des Antigènes Associés à la Tumeur (TAA, Tumor-Associated Antigens).

Les TSA, ou néoantigènes, ne sont exprimés que par les cellules cancéreuses. Ce sont des molécules normalement exprimées par des cellules saines, mais mutées dans les cellules cancéreuses, ce qui les rend immunogènes. Les TSA n'étant exprimés que par les cellules cancéreuses, elles forment des cibles de choix pour le système immunitaire. Les TAA sont des antigènes très exprimés dans les cellules cancéreuses, et faiblement exprimées par certaines cellules saines. Par exemple, les antigènes cancéreux/testiculaires (CTA, Cancer-Testis Antigens) ne sont normalement exprimés que par les cellules germinales males. MAGE-A1 est un CTA, impliqué dans la répression de la différenciation des cellules germinales, et est également sur-exprimé par de nombreuses cellules de mélanome, ce qui en fait un TAA [130].

La phase d'Élimination est d'abord médiée par des cellules de l'immunité innée : les cellules NK, les macrophages, les LTs $\gamma\delta$ et les DCs. Elles sont rapidement recrutées sur le site tumoral, et produisent de l'IFN γ . Cette molécule exerce à la fois des effets cytotoxiques directs sur les cellules cancéreuses, mais aussi pro-inflammatoires. La mort cellulaire induite par cette première réaction immunitaire permet ensuite aux DCs d'activer l'immunité acquise. Des LTs CD8⁺ cytotoxiques et CD4⁺ auxiliaires T_H1 sont alors recrutés sur le site tumoral pour aider l'immunité innée à éliminer complètement les cellules cancéreuses restantes. Après la phase d'Élimination, soit la tumeur est complètement « éliminée », soit des cellules cancéreuses persistent, et il s'agit alors de la phase d'Équilibre.

EQUILIBRE

Dans la phase d'Équilibre, les cellules cancéreuses et le système immunitaire entrent dans un équilibre dynamique. Les LTs et l'IFN γ exercent une pression de sélection sur les cellules cancéreuses, permettant d'en éliminer une partie, sans complètement éradiquer la tumeur. Grâce à la capacité de prolifération et de mutation rapide des cellules cancéreuses, le

MicroEnvironnement Tumoral (TME, Tumor Micro-Environment) s'enrichit en nouveaux clones de cellules tumorales, de plus en plus résistants et invisibles pour le système immunitaire. Le TME décrit l'environnement cellulaire et tissulaire dans lequel évoluent les cellules cancéreuses. Cela comprend la matrice extracellulaire, les vaisseaux sanguins, les cellules immunitaires et les cellules saines. [131] La phase d'équilibre peut durer plusieurs années avant que finalement, les cellules cancéreuses immuno-résistantes échappent au système immunitaire.

ECHAPPEMENT

Dans la phase d'échappement, les cellules cancéreuses deviennent invisibles ou insensibles aux cellules immunitaires et se développent de manière incontrôlée jusqu'à former une tumeur palpable et diagnosticable. Pour cela, les cellules cancéreuses peuvent mettre en place différents mécanismes. Elles recrutent des cellules immunosuppressives dans le TME, exercent une suppression active de l'immunité sur place, et résistent à l'apoptose. Ces modes d'échappement des cellules cancéreuses sont développées ci-dessous.

MOYENS D'ECHAPPEMENT DES CELLULES TUMORALES

PRODUCTION DE MOLECULES PRO-TUMORALES

Les cellules cancéreuses peuvent favoriser le développement d'un TME immunosuppresseur en produisant des molécules immunosuppressives comme le TGF- β , la galectine ou l'Indoléamine 2,3-DiOxygénase (IDO) (Figure 34) [132]. La sécrétion de TGF- β entraîne l'inhibition de l'activation des DCs, des LTs et des cellules NK, et la galectine entrave l'activité et la survie des LTs. L'enzyme IDO est impliquée dans la métabolisation du tryptophane en kynurénines, inhibant la prolifération des LTS CD8⁺ et entraînant l'apoptose des LTs CD4⁺. IDO favorise également des DCs tolérogènes (immuno-suppressives), ce qui favorise la présence de LTs T_{REG} dans le TME.

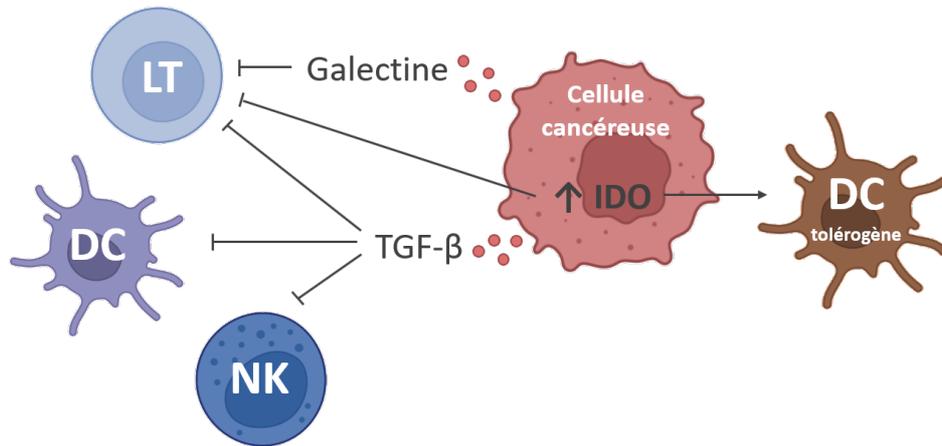


Figure 34 : Molécules pro-tumorales produites par les cellules cancéreuses. LT = Lymphocyte T ; NK = Cellule NK ; TGF- β = Facteur de croissance transformant- β ; IDO = Indoléamine 2,3-DiOxygénase ; DC = Cellule Dendritique.

RECRUTEMENT DE CELLULES IMMUNOSUPPRESSIVES

Les cellules cancéreuses recrutent également des cellules immunosuppressives sur le site tumoral, parmi lesquelles : Des T_{REG}, des Cellules Suppressives Dérivées de Myéloïdes (MDMCs, Myeloid-Derived Suppressor Cells), des macrophages et des LTs $\gamma\delta$ (Figure 35). En produisant le Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire (VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor), les cellules cancéreuses favorisent l'angiogenèse sur le site tumoral, et donc le recrutement de MDMCs. Les MDMCs forment un groupe hétérogène de cellules immunitaires myéloïdes, qui régulent les fonctions des LTs, des DCs, des cellules NK et des macrophages. Ces macrophages sont des Macrophages Associés à la Tumeur (TAMs, Tumor-Associated Macrophages), inhibant l'immunité antitumorale en produisant du TGF- β et de l'IL-10. Les TAMs favorisent aussi l'angiogenèse et le développement du stroma tumoral en sécrétant le Facteur de Croissance Dérivé des Plaquettes (PDGF, Platelet-Derived Growth Factor) et du VEGF.

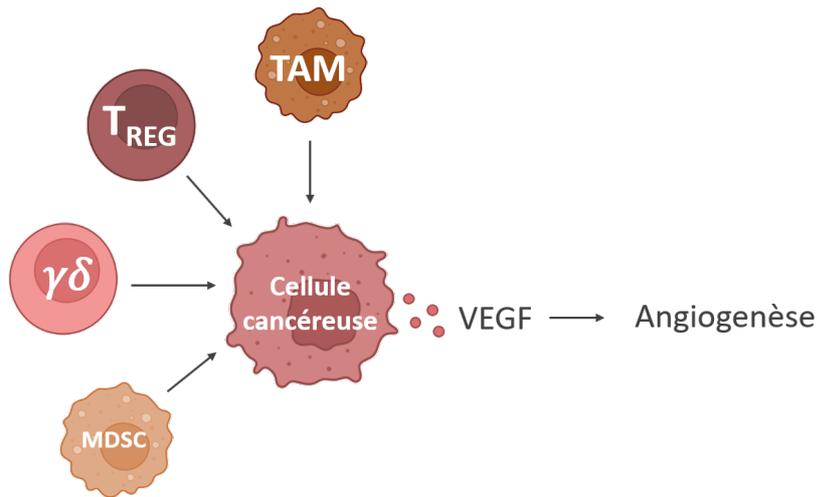


Figure 35 : Exemples de cellules immunosuppressives recrutées sur le site tumoral par les cellules cancéreuses. TAM = Macrophage associé à la tumeur ; T_{REG} : Lymphocyte T régulateur ; $\gamma\delta$ = Lymphocyte T $\gamma\delta$; MDSC = Cellule suppressive dérivée de myéloïde ; VEGF = Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire.

Les LTs $\gamma\delta$ peuvent exercer un effet pro-tumoral, notamment à travers leur production d'IL-17 (Figure 36) [45]. Une fois dans le TME, l'IL-17 favorise le recrutement de neutrophiles immunosuppresseurs et de macrophages angiogéniques. L'IL-17 augmente la perméabilité entre les cellules endothéliales, ce qui contribue au phénomène métastatique. Les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IL-4 sont également pro-tumoraux, et inhibent la capacité cytotoxique des autres LTs $\gamma\delta$. Enfin, les LTs $\gamma\delta$ peuvent exprimer des molécules impliquées dans les points de contrôle immunitaires, comme la galectine, le ligand naturel de TIM-3, et PD-L1.

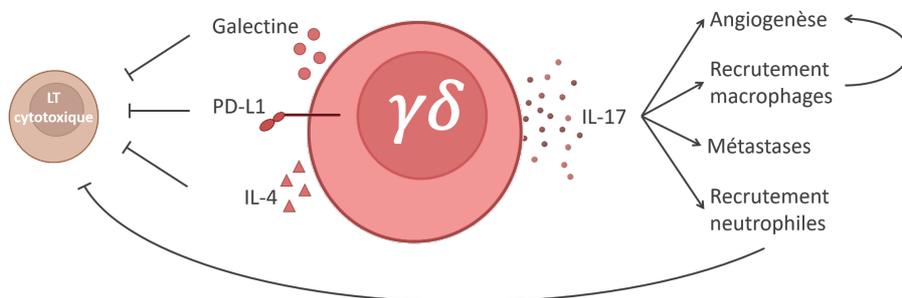


Figure 36 : Fonctions pro-tumorales des LTs $\gamma\delta$. LT = Lymphocyte T, PD-L1 = Programmed Death-Ligand 1, IL = Interleukine. (D'après [45])

TOLERANCE A L'IFN γ

Le système immunitaire exerce une pression de sélection sur les cellules cancéreuses. Elles peuvent échapper à leur détection par le système immunitaire en induisant une tolérance immunitaire locale [133]. Pour cela, les cellules cancéreuses peuvent perdre la capacité de détection et de réponse à l'IFN γ , grâce à des mutations ou à des extinctions par modifications épigénétiques des gènes codant pour les composants des récepteurs à l'IFN γ .

INACTIVATION ET INDUCTION D'APOPTOSE DES CELLULES IMMUNITAIRES

FAS/TRAIL

De la même manière, les cellules cancéreuses peuvent exprimer des récepteurs de mort cellulaire mutés inactifs, comme DR (Death Receptor) 5, et Fas. En conditions physiologiques, l'activation de ces récepteurs par leurs ligands, TRAIL (TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand) et Fas-Ligand respectivement, entraîne l'apoptose de la cellule. Les cellules cancéreuses exprimant des récepteurs de mort cellulaire mutés sont insensibles à ces interactions et donc à l'induction de leur apoptose (Figure 37). Les cellules cancéreuses peuvent cesser d'exprimer des ligands naturels du récepteur NKG2D, présent sur les cellules NK et sur les LTs $\gamma\delta$, et ainsi prévenir leur détection par ces cellules. Elles peuvent également diminuer l'expression de molécules MHC, ou de néo-antigènes. De cette manière, les cellules cancéreuses deviennent invisibles pour certaines cellules immunitaires comme les LTs.

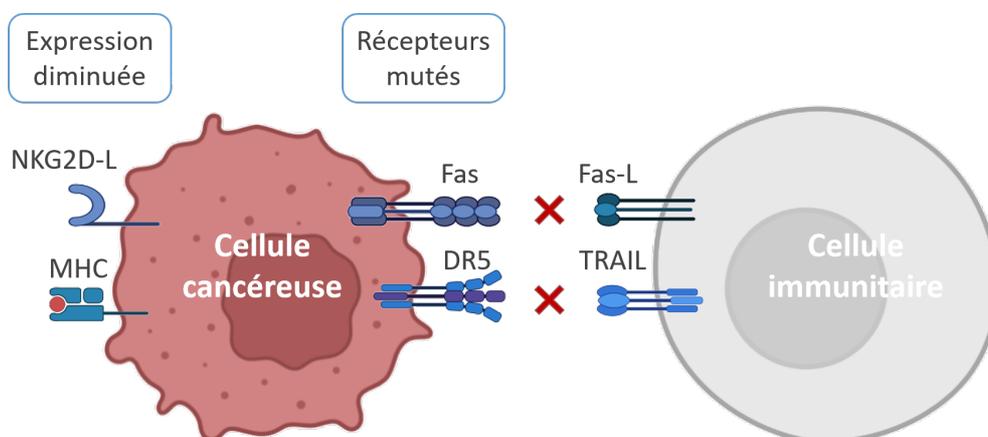


Figure 37 : Diminution et mutations de molécules détectées par l'immunité. NKG2D-L = Ligand de NKG2D ; MHC = Complexe majeur d'histocompatibilité ; DR5 = Death Receptor ; Fas-L = Ligand de Fas.

LES POINTS DE CONTROLE IMMUNITAIRES

- Les points de contrôle immunitaires sont des récepteurs cellulaires impliqués dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires, afin de prévenir un phénomène de sur-inflammation et d'auto-immunité. Des exemples de points de contrôle exprimés par les LTs sont : La Protéine 1 de la mort cellulaire programmée (PD-1, Programmed cell Death 1), l'Antigène 4 du Lymphocyte T Cytotoxique (CTLA-4, Cytotoxic T Lymphocyte-Associated protein 4), LAG-3 (Lymphocyte Activation Gene 3), et TIM-3 (T-cell Immunoglobulin and Mucin containing protein 3), VISTA (V-domain Ig Suppressor of T cell Activation) (Figure 38) [134].

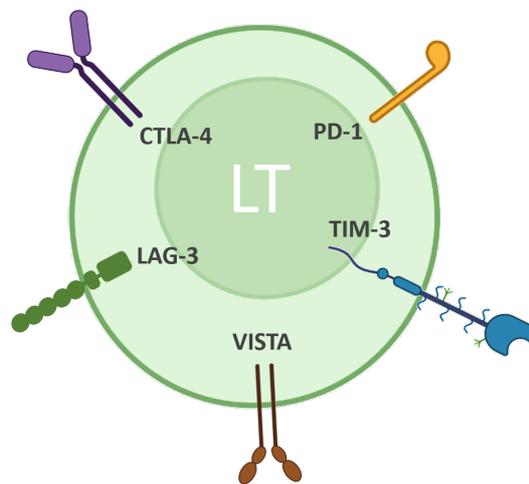


Figure 38 : Exemples de molécules de points contrôle exprimées par LTs. LT = Lymphocyte T ; CTLA-4 = Antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique ; LAG-3 = Lymphocyte Activation Gene 3 ; VISTA = V-domain Ig Suppressor of T cell Activation ; PD-1 = Protéine 1 de la mort cellulaire programmée ; TIM-3 = T-cell Immunoglobulin and Mucin containing protein 3 [135].

La protéine PD-1, exprimée par les LTs, les LBs et les cellules NK a 2 ligands naturels : PD-L1 et PD-L2. Lorsqu'un LT est activé, il exprime PD-1 à sa surface. L'interaction de PD-1 avec un de ses ligands entraîne l'inactivation du LT engagé. Les ligands PD-L1 et PD-L2 sont faiblement exprimés dans les tissus sains, mais sur-exprimés par certaines cellules tumorales. En exprimant PD-L1 et/ou PD-L2, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité d'inactiver les LTs qu'elles rencontrent, et ainsi de se protéger de leur fonctions antitumorales. De plus, le TME contient beaucoup d'IFN γ , qui entraîne l'expression de PD-L1 par les cellules épithéliales et stromales, pouvant aussi inactiver les LTs.

La protéine CTLA-4 est peu exprimée par les LTs naïfs, et sur-exprimée par les LTs après leur activation. Cette protéine a 2 ligands naturels : B7.1, aussi appelée CD80 et B7.2, aussi appelée CD86. CD80 et CD86 sont reconnus également par CD28, un récepteur de costimulation exprimé par les LTs. Cependant, CD80/86 a plus d'affinité pour CTLA-4 que CD28. Ainsi, CTLA-4 est un antagoniste de la costimulation induite par CD28 avec CD80/86. L'effet inhibiteur de l'axe CTLA-4 est principalement ganglionnaire, lors de l'initiation des LTs par les DCs.

LAG-3 est exprimé par les LTs, les LBs, les cellules NK et les DCs plasmacytoïdes (pDCs, plasmacytoid Dendritic Cells). Ses ligands sont les MHC de classe II et la protéine de type fibrinogène (FGL-1, Fibrinogen-Like Protein). De manière similaires à PD-1 et CTLA-4, son interaction avec son ligand entraîne l'inactivation du LT.

TIM-3 est exprimé à la surface des LTs CD8⁺, des T_H1, et des T_H17 [136]. TIM-3 exerce une forte action inhibitrice sur le LT, dont le mode d'action n'est pas complètement élucidé. Comme pour les récepteurs précédemment décrits, l'effet inhibiteur de TIM-3 se déclenche après son interaction avec un de ses ligands : Galectine-9, CEACAM1 (CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 (CEACAM1), Phosphatidylserine, et HMGB1, pouvant être exprimés par les cellules cancéreuses. Une forte expression de TIM-3 par LTs intra-tumoraux est associée avec un faible pronostic dans certains types de cancer.

VISTA, aussi appelé homologue de PD-1, fait partie de la famille des B7, et est exprimé par les de nombreuses cellules immunitaires, dont les LTs et les APCs [137]. Il détecte plusieurs ligands, comme PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1), exprimé par les LTs, les cellules myéloïdes et les plaquettes, VSIG-3 (V-Set and Immunoglobulin domain containing 3), très exprimé par certaines cellules cancéreuses, et la Galectine-9, notamment produite par les cellules cancéreuses. Suivant la cellule qui l'exprime, VISTA peut être un récepteur ou un ligand. Lorsque VISTA est exprimé par une APC, il agit comme le ligand de PSGL-1, VSIG-3 et Galectine-9, exprimés par les LTs, et entraîne leur inactivation d'une manière similaire à l'axe PD-1/PD-L1.

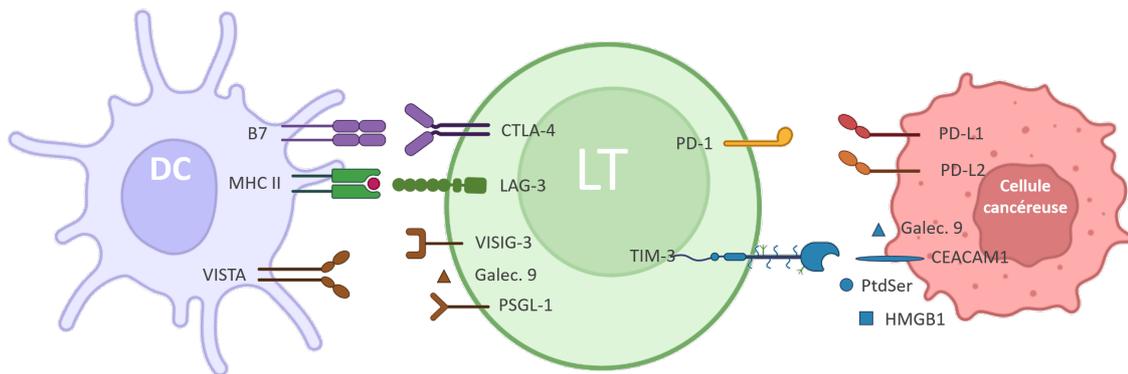


Figure 39 : Exemples de molécules de point de contrôle et leurs ligands, exprimés par les LTs. DC = Cellule dendritique ; B7 = Membre de la superfamille B7 ; MHC II = Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II ; VISTA = V-domain Ig Suppressor of T cell Activation ; LT = Lymphocyte T ; CTLA-4 = antigène 4 du lymphocyte T cytotoxique ; LAG-3 = Lymphocyte Activation Gene 3 ; VISIG-3 = V-Set and Immunoglobulin domain containing 3 ; Galec. 9 = Galectine 9 ; PSGL-1 = P-selectin glycoprotein ligand-1 ; PD-1 = Protéine 1 de la mort cellulaire programmée ; TIM-3 = T-cell Immunoglobulin and Mucin containing protein 3 ; PD-L1 = Ligand 1 de PD-1 ; PD-L2 = Ligand 2 de PD-1 ; CEACAM1 = CarcinoEmbryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1 ; PtdSer = Phosphatidylserine ; GMHB1 = High Mobility Group Box 1.

Les LTs co-exprimant une ou plusieurs molécules de point de contrôle sont en épuisement fonctionnel, décrit par un déclin de leur prolifération et de leur fonction. Les LTs PD-1⁺ TIM-3⁺ sont les LTs épuisés avec le phénotype le plus sévère, incapables de proliférer et de produire des cytokines.

IMMUNOTHERAPIES

Les immunothérapies visent à inverser les effets immunosuppresseurs induits par la tumeur. Pour réactiver ce système immunitaire subverti, différentes méthodes existent. L'injection de cytokines, comme l'IL-2 ou l'IFN α , a montré des effets protecteurs dans plusieurs types de cancers, en favorisant l'activation et la prolifération des cellules immunitaires [138,139]. Le blocage de cytokines immunosuppressives, comme TGF- β , a montré des bons effets en monothérapies [140]. Des inhibiteurs de la voie de signalisation du VEGF peuvent aussi être administrés aux patients [141]. Des études précliniques évaluent actuellement le potentiel

thérapeutique du blocage des galectines et de IDO. Le blocage de l'axe Fas/FasL a été beaucoup étudié, mais les anticorps anti-Fas créés ont révélé une grande toxicité [142]. Le blocage des récepteurs de TRAIL par anticorps monoclonaux a montré une bonne efficacité, entraînant parfois une rémission complète chez certains patients atteints de lymphome [143].

IMMUNOTHERAPIES CIBLANT LES LTs $\gamma\delta$

L'infiltration tumorale en LTs $\gamma\delta$ est le meilleur marqueur de bon pronostic [125]. Leur activité antitumorale d'une part, et leur subversion par le TME d'autre part en font une cible thérapeutique de choix. Ainsi, de nouvelles immunothérapies se sont développées, dans le but de renforcer l'activité cytotoxique des LTs $\gamma\delta$.

THERAPIES ACTIVES

Les immunothérapies actives visent à renforcer le système immunitaire du patient, pour qu'il élimine lui-même les cellules cancéreuses.

L'activation des LTs $\gamma\delta$ humains V δ 2 peut nécessiter l'interaction du TcR $\gamma\delta$ avec un complexe BTN3A-BTN2A. Les molécules BTN sont exprimées par de nombreuses cellules de l'organisme, principalement dans les tissus épithéliaux. La molécule BTN3A est sur-exprimée dans certains types de cancers, notamment dans les mélanomes [144], ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante. Des agonistes de BTN3A ont donc été développés, pour induire un changement de conformation de BTN3A, et ainsi leur permettre d'activer les LTs $\gamma\delta$ V δ 2. Dans un essai clinique de 2020 (NCT04243499), des résultats préliminaires montrent que le traitement par agoniste de BTN3A entraîne une diminution de la proportion de LTs $\gamma\delta$ V δ 2 circulants, mais une augmentation de la proportion de V γ 9 δ 2 dans la tumeur, suggérant que le traitement favorise le recrutement de ces cellules sur le site tumoral [145].

Les LTs $\gamma\delta$ humains V δ 2 peuvent être activés par des p-Ags. Ainsi, l'accumulation de p-Ags dans les cellules tumorales contribue à l'effet cytotoxique anticancer des LTs $\gamma\delta$ [146]. Le zolédronate, en bloquant la voie du mévalonate, favorise l'accumulation intracellulaire d'IPP, qui permet l'activation des LTs $\gamma\delta$ via leur TcR [147]. La plupart des essais cliniques se sont basés

sur l'injection systémique de zolédronate, parfois combiné avec de l'IL-2. La forte capacité antitumorale de cette thérapie observée *in vitro* n'a cependant pas été reproduite chez des patients [148]. Une hypothèse expliquant l'inefficacité du traitement est que le zolédronate est rapidement éliminé par l'organisme, probablement avant même d'avoir atteint le site tumoral. Pour pallier ce problème d'élimination de l'agent thérapeutique, des thérapies passives ont été mises en place.

THERAPIES PASSIVES

Les immunothérapies passives se font via l'injection directe au patient du ou des composés (ou cellules) lui manquant pour éliminer les cellules cancéreuses.

Ainsi, des transferts adoptifs de LTs $\gamma\delta$ activés *ex vivo* ont été évalués en clinique. Pour cela, des LTs $\gamma\delta$ V δ 2 de patient sont récupérés, puis activés *ex vivo* avec du zolédronate et de l'IL-2, avant d'être réinjectés au patient. Cependant, cette méthode s'est montrée peu efficace [149]. Une hypothèse pouvant l'expliquer est qu'une fois réinjectés dans le sang du patient, les LTs $\gamma\delta$ ne recirculent pas jusqu'à la tumeur, et s'accumulent dans les ganglions lymphatiques [150].

Parmi les méthodes d'immunothérapies, les inhibiteurs de points de contrôle demeurent les plus couramment utilisés.

INHIBITION DES POINTS DE CONTROLE

Les molécules de point de contrôle précédemment présentées sont la cible d'un type d'immunothérapie : les inhibiteurs de point de contrôle (ICI, Immune Checkpoint Inhibitors). Les ICIs visent à prévenir l'interaction de ces points de contrôle avec leurs ligands, et donc l'inactivation subséquente des cellules immunitaires pro-inflammatoires, et principalement les LTs conventionnels cytotoxiques. Pour cela, des anticorps monoclonaux ciblant les récepteurs ou les ligands des points de contrôle sont utilisés. Les deux axes principalement ciblés sont les axes CTLA-4/B7, et l'axe PD-1/PD-L1.

L'ipilimumab, un anti-CTLA-4 a obtenu l'autorisation de la FDA (United States Food and Drug Administration) en 2011 pour le traitement des mélanomes non-résécables de stade III et IV.

Ce traitement permet l'augmentation de l'infiltration tumorale en LTs spécifiques de néo-antigènes tumoraux, ce qui entraîne une régression tumorale. Dans des modèles murins, il semblerait que les anti-CTLA-4 permettent également la diminution de l'infiltration tumorale en T_{REG}. L'ipilimumab a permis à 22% des patients traités de bénéficier de 3 années supplémentaires de vie [151]. Cependant, les anti-CTLA-4 sont encore peu efficaces dans des cancers plus virulents comme le cancer de la prostate, le carcinome rénal et le cancer du poumon.

L'expression des molécules PD-1 et PD-L1 par les cellules cancéreuses et du TME est associée avec un mauvais pronostic pour le patient, ce qui fait de l'axe PD-1/PD-L1 une cible thérapeutique intéressante. Le blocage de PD-1 par des anticorps monoclonaux permet le retour de la cytotoxicité des LTs CD8⁺ cytotoxiques, et limite le phénomène métastatique dans des modèles de tumeurs transplantées chez la souris. Le pembrolizumab et le nivolumab, des anticorps anti-PD-1, obtinrent l'autorisation de la FDA en 2014 pour le traitement de mélanomes non-résécables. Le nivolumab a permis une survie globale de 72,9% après 1 an, comparé à 42,1% pour des patients traités par chimiothérapie [152]. Depuis, d'autres essais cliniques ont permis d'étendre le champ d'action du nivolumab et du pembrolizumab à d'autres types de cancer, comme les cancers bronchiques non à petites cellules, les lymphomes de Hodgkin et les cancers de la vessie. La molécule PD-L1 peut aussi être la cible d'anticorps monoclonaux, comme l'atezolizumab, approuvé par la FDA en 2016 pour le traitement du cancer de la vessie. Si à ce jour l'atezolizumab ne montre pas de meilleure protection que le traitement standard dans le cancer de la vessie (chimiothérapie), son application a tout de même été élargie à plusieurs types de cancer difficiles à traiter, comme le cancer du sein triple négatif, le cancer du poumon et certains carcinomes.

MODULER LE MICROBIOTE POUR MODULER L'EFFICACITE DES INHIBITEURS DE POINT DE CONTROLE

En moyenne, les patients traités par inhibiteurs de points de contrôle peuvent avoir une rémission partielle ou complète dans 30 à 40% des cas [153]. On distingue alors les patients répondeurs et non-répondeurs. Des études ont montré que la composition de la flore intestinale des patients répondeurs aux ICI était différente de celle des patients non-répondeurs [154]. En effet, le microbiote intestinal des patients répondeurs aux anti-PD-1 est plus diversifié,

et la proportion de certaines espèces de bactéries commensales est augmentée par rapport aux microbiotes de patients non-répondants. Par exemple, les genres *Akkermansia* et *Bifidobacterium* ont été associés avec une bonne réponse aux immunothérapies par ICI dans le traitement de mélanomes [154,155]. De plus, les patients ayant utilisé des antibiotiques avant leur traitement par ICI ont une moins bonne réponse clinique. Cette observation a été confirmée dans une méta-analyse regroupant 48 études cliniques, soit plus de 12 000 patients. L'impact négatif de l'utilisation d'antibiotiques a principalement été observé chez des patients atteints de carcinomes à cellules rénales, de mélanomes, ou de cancers bronchiques non à petites cellules [156,157].

Ces observations soutiennent que le microbiote intestinal pourrait impacter l'efficacité des immunothérapies par ICI, et donc la réponse anticancer des patients. Des études ont alors cherché à moduler le microbiote intestinal des patients, afin de les aider à répondre aux ICI. Les méthodes principales pour moduler les espèces du microbiote intestinal sont la prise de probiotiques, la transplantation de microbiote fécal, les interventions nutritionnelles et les prébiotiques [158].

PROBIOTIQUES

Les probiotiques sont définis comme des compléments alimentaires composés de microorganismes vivants qui affectent positivement la santé de son hôte en régulant sa balance microbienne intestinale [159]. Les approches thérapeutiques probiotiques consistent donc en l'administration de souches microbiennes présélectionnées pour leurs propriétés bénéfiques sur la santé de l'hôte. Comme des études précédentes avaient identifié des espèces bactériennes associées à une bonne réponse anticancer, les premières approches de modulation du microbiote intestinal se sont basées sur l'administration de ces souches bactériennes.

Dans des modèles précliniques murins, l'administration de *Bifidobacterium* permettait de contrôler la croissance de tumeurs transplantées, et augmentait l'efficacité d'une immunothérapie par injection d'anti-PD-L1 [155]. En 2022, la souche probiotique *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 (CBM588) a été administrée lors d'un essai clinique à des patients atteints de carcinome rénal métastatique, traités par association d'ipilimumab (anti-CTLA-4) et

nivolumab (anti-PD-1). Cette souche bifidogénique a permis de restaurer la présence de *Bifidobacterium* dans le microbiote intestinal des patients, et a augmenté la survie sans progression de 10 mois en comparaison aux patients traités uniquement par immunothérapie. Des essais cliniques sont en cours pour évaluer l'effet potentiateur de l'administration directe de *Bifidobacterium* sur des immunothérapies anticancer, chez des patients atteints de carcinome hépatocellulaire avancé, ou de carcinome urothélial (NCT05620004, NCT05220124).

Caractérisée pour la première fois en 2004, la bactérie commensale *Akkermansia muciniphila* semble être bénéfique dans plusieurs pathologies, dont le cancer [160]. En effet, la présence de cette bactérie dans le microbiote intestinal de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules est associée avec une meilleure survie globale que celle de patients sans *Akkermansia muciniphila*. Cependant, il semblerait qu'une abondance relative élevée de cette bactérie soit, à l'inverse, délétère [161]. En effet, d'après cette étude, les patients avec une faible abondance relative d'*Akkermansia muciniphila* dans leur microbiote intestinal ont une meilleure survie globale que les patients avec une abondance relative élevée de cette bactérie. Le probiotique Oncobax®-ak a été créé à partir de cette bactérie, mais n'a encore jamais été utilisé chez l'homme. Un essai clinique est en cours afin d'évaluer son potentiel thérapeutique en supplément d'immunothérapie chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules, ou de cancer du sein (NCT05865730).

TRANSPLANTATION DE MICROBIOTE FECAL (FMT)

Il semblerait cependant qu'une bactérie à elle seule ne soit pas suffisante pour induire l'effet immunostimulant recherché. Si le microbiote d'accueil n'est pas adapté, la souche administrée peut ne pas persister assez longtemps dans le microbiote pour induire un effet bénéfique. Des méthodes se sont alors dirigées vers l'administration d'un microbiote entier d'un donneur sain à un malade. C'est la Transplantation de Microbiote Fécal (FMT, Fecal Microbiota Transplant) [162]. Pour cela, un échantillon de microbiote fécal est prélevé chez un donneur sain, puis administré à un patient receveur. Afin d'éliminer la majorité du microbiote intestinal du patient, celui-ci est traité par antibiotiques ou laxatifs avant de recevoir la FMT. La FMT peut être administrée par colonoscopie, par sonde nasogastrique, ou enrobée dans une gélule gastro résistante.

Actuellement, les FMT ne sont autorisées que dans le traitement d'infections chroniques à *Clostridium difficile* [163]. Cependant, des études en cours évaluent leur possible utilisation en combinaison d'immunothérapies anticancer. En 2021, un essai clinique a montré qu'une FMT permet à des patients atteints de mélanome et résistants à l'immunothérapie de répondre au traitement et ainsi de limiter la progression de la maladie [164]. Cette observation a été confirmée par un second essai clinique, en 2023, qui a montré une rémission partielle ou complète chez 75% des patients traités par combinaison d'anti-PD-1 et FMT [165].

Cependant, les FMT entraînent de nombreux effets secondaires modérés, comme des diarrhées, des flatulences, des nausées et des douleurs abdominales [165]. De plus, un microbiote complet de donneur sain peut également contenir des microorganismes pathogènes, souvent opportunistes, pouvant causer des infections chez les patients receveurs. Le long processus de traitement des échantillons fécaux des donneurs sains peut également modifier l'échantillon entre sa collecte chez le donneur et son administration au receveur [166]. Entre 2000 et 2020, sur 4241 patients traités par FMT, 1,4% a connu des effets secondaires sévères, comme des infections, entraînant parfois la mort du patient [167].

Malgré les effets prometteurs des FMT pour renforcer l'efficacité des immunothérapies anticancer, des améliorations sont encore nécessaires, notamment sur la sécurité du traitement.

INTERVENTIONS NUTRITIONNELLES

Le meilleur moyen de moduler le microbiote intestinal de manière stable est l'alimentation. De plus l'alimentation joue un rôle dans plusieurs aspects du cancer, de son apparition à son élimination par l'organisme. Il est estimé que 35% des cancers peuvent être liés à l'alimentation [168]. En effet l'alimentation impacte à la fois le métabolisme général de l'hôte, mais aussi son microbiote intestinal. Par exemple, il a été montré qu'un régime riche en lipides (HFD, High Fat Diet) promeut la présence d'espèces bactériennes qui produisent des acides biliaires favorisant l'apparition de tumeurs gastrointestinales, comme les carcinomes hépatocellulaires et les cancers colorectaux [169]. Une intervention nutritionnelle peut par exemple viser à supprimer de l'alimentation des nutriments pour la tumeur. C'est le cas des régimes pauvres en

carbohydrates qui limite le glucose disponible et utilisable par les tumeurs pour leur croissance [170]. Un essai clinique est en cours pour déterminer le potentiel thérapeutique de cette approche chez des patientes atteintes de cancer du sein métastatique (NCT05090358).

Dans les régimes pauvres en lipides (LFD, Low Fat Diet), l'apport en graisses doit être de moins de 30% des apports caloriques journaliers, et comporter majoritairement des fruits, des légumes et des céréales [171]. Sur le long terme, le LFD n'a entraîné aucune réduction du risque de cancer, mais a permis de diminuer la mortalité à la suite du diagnostic de cancers du sein [172]. Ce régime s'apparente aux régimes riches en fibres alimentaires, aussi appelées prébiotiques.

Les prébiotiques sont des carbohydrates alimentaires non-digérables par les enzymes humaines. Ils impactent profondément la composition et la fonction du microbiote intestinal, en favorisant la croissance de microorganismes bénéfiques [173]. En retour, le microbiote intestinal produit des métabolites pouvant impacter positivement la santé de l'hôte. La consommation d'une alimentation riche en fibres alimentaires peut être un bon moyen de favoriser la présence de bactéries bénéfiques, et anticancer, comme *Bifidobacterium*. Ce régime s'est montré efficace en préclinique et en clinique. Chez l'homme, il a été observé que les patients consommant suffisamment de fibres et traités par ICI avaient une meilleure survie sans progression que les patients uniquement traités par ICI [174]. Chez la souris, cette étude a montré qu'une consommation suffisante de fibres alimentaires permet de renforcer l'efficacité des immunothérapies par ICI, en augmentant l'infiltration tumorale en LTs cytotoxiques IFN γ ⁺, en comparaison avec un régime pauvre en fibres alimentaires. Un essai clinique de phase II est en cours afin de déterminer l'efficacité d'un régime riche en fibres alimentaires sur la modulation du microbiote intestinal et l'amélioration de l'état clinique de patients atteints de mélanomes de stades III et IV, et traités par ICI (NCT04645680). Un autre essai clinique similaire est également en cours chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules (NCT05805319).

Certaines études cherchent à mettre en évidence l'effet anticancer de prébiotiques particuliers. Par exemple, il a été montré que la consommation d'un mélange de prébiotiques (pectine, chitosane et anthocyane) permettait d'améliorer l'immunostimulation et le contrôle

de la croissance tumorale induits par une immunothérapie anti-PD-1 chez des souris porteuses de cancer colorectal [175].

Une meilleure compréhension des interactions entre le microbiote intestinal et le système immunitaire de l'hôte a permis le développement de nouvelles approches de modulation du microbiote intestinal, plus spécifiques, comme l'utilisation de postbiotiques et de synbiotiques.

Les postbiotiques sont des composés métaboliquement ou biologiquement actifs, dérivés de microorganismes. L'avantage de cette approche thérapeutique de nouvelle génération est qu'elle permet l'apport direct de la ou des molécules d'intérêt, en évitant l'utilisation de microorganismes métaboliquement actifs, qui ne s'adaptent pas au microbiote intestinal de tous les patients [176]. L'inosine est un exemple de postbiotique, produit par les bactéries *Bifidobacterium pseudolongum* et *Akkermansia muciniphila*. Une étude a mis en évidence la capacité de l'inosine à renforcer l'effet anti tumoral d'une immunothérapie anti-CTLA-4 chez des souris porteuses de tumeurs, en promouvant une immunité de type Th1 [177]. Un essai clinique en cours évalue un vaccin thérapeutique composé de peptides dérivés du microbiote intestinal chez des patients atteints de glioblastome et traités par immunothérapie anti-PD-1, combinée ou non avec un anti-VEGF (NCT04116658). Des résultats préliminaires soutiennent que ce vaccin thérapeutique permet de générer une immunité antitumorale forte [178].

Les synbiotiques sont des mélanges de probiotiques et de prébiotiques, permettant d'apporter dans le microbiote intestinal des prébiotiques, accompagnés des microorganismes capables de les digérer. L'administration d'un synbiotique composé d'inuline, d'oligofructose et des bactéries *Lactobacillus rhamnosus* et *Bifidobacterium lactis* a permis de légèrement prévenir la carcinogénèse induite chimiquement chez des rats [179]. Plus récemment, une étude a mis en évidence l'effet antitumoral d'un synbiotique composé de spores de la bactérie *Clostridium butyricum* encapsulés dans du dextrane, chez des souris porteuses de tumeurs du côlon [180].

Ces résultats soutiennent l'importance des fibres alimentaires dans l'alimentation, et leur implication dans la réponse anticancer. Le prébiotique inuline est décrit dans le chapitre suivant.

VI. L'INULINE

L'inuline est un exemple de prébiotique soluble, et plus particulièrement de Fructo-Oligo-Saccharide (FOS). Elle est composée d'une unité de glucose, liée à une chaîne de fructoses, liés entre eux par des liaisons glycosidiques $\beta(2,1)$ (Figure 40).

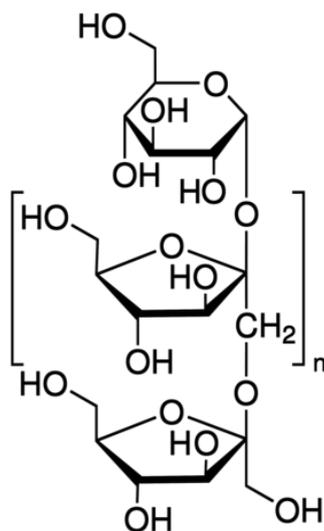


Figure 40 : Formule chimique de l'inuline. (Merck)

L'inuline est présente dans de nombreux végétaux, mais plus particulièrement dans les légumes et les racines. L'aliment contenant le plus d'inuline est la chicorée (environ 40%), mais d'autres aliments comme le topinambour, l'oignon et les asperges en contiennent également (Figure 41) [181].

Aliment	Quantité (g) d'inuline pour 100 g
Racine de chicorée	36 - 48
Topinambour	16 - 20
Feuilles de pissenlit	12 - 15
Ail	9 - 16
Oignon	1 - 8
Blé	1 - 4
Asperges	2 - 3

Figure 41 : Exemple d'aliments contenant de l'inuline. (D'après [181])

Le degré de polymérisation (DP) de l'inuline représente le nombre d'unités de fructose qu'elle contient. Le DP de l'inuline peut varier de 2 à 70 suivant la plante dont elle est issue. L'oignon contient de l'inuline avec un DP inférieur à 10, alors que l'artichaut contient de l'inuline avec un DP supérieur à 40. L'inuline que l'on peut trouver dans le commerce est principalement issue de racine de chicorée, et son degré de polymérisation varie de 5 à 60.

PRODUITS ISSUS DE LA FERMENTATION DE L'INULINE

Les liaisons glycosidiques $\beta(2,1)$ sont à l'origine de la capacité « prébiotique » de l'inuline. En effet, le corps humain ne contient pas l'enzyme nécessaire à sa dégradation. En revanche, des micro-organismes du microbiote intestinal, comme les *Bifidobacteria*, les *Lactobacilli*, ou encore les *Aspergilli*, expriment l'enzyme 2,1- β -D-fructan fructanohydrolase, aussi appelée inulinase [182,183]. Cette enzyme permet de dégrader les liaisons entre les unités de fructose, libérant ainsi des unités de fructose ou des FOS dans le côlon. Il existe 2 sortes d'inulinase : les endo- et les exo-inulinases [184]. Ces 2 inulinases diffèrent par le type de liaison qu'elles ciblent dans une molécule d'inuline. Les endo-inulinases ciblent les liaisons β 2-1 fructosyl entre le premier et le deuxième fructose, tandis que les exo-inulinases clivent ces liaisons de manière aléatoire et séquentielle (Figure 42). Ainsi, les endo-inulinases libèrent des FOS, et les exo-inulinases libèrent des unités de fructose [185].

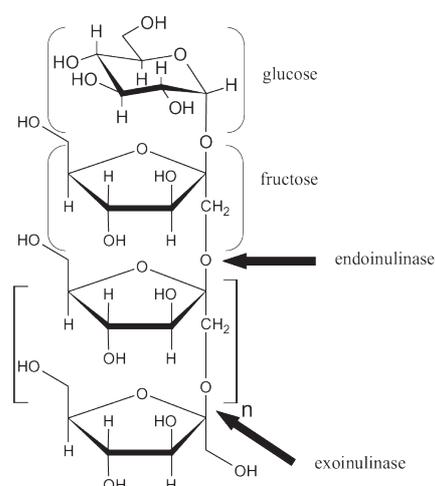


Figure 42 : Liaisons ciblées par les endo- et exo-inulinases. [185]

Les champignons produisent principalement des exo-inulinases, mais certaines espèces, comme les *Aspergillus niger* peuvent produire des endo-inulinases [186,187]. Les bactéries produisent principalement des exo-inulinases [188].

FRUCTOSE

Le fructose est la première molécule issue de la fermentation de l'inuline. Il peut rapidement être utilisé comme source de sucre dans la glycolyse, à la fois par les micro-organismes du microbiote et par les cellules de la muqueuse intestinale.

Lorsque le fructose est ingéré sous forme de monomères ou de polymères digérables par l'organisme, il est absorbé par les cellules épithéliales de l'intestin grêle, via un transporteur spécialisé : GLUT5. Ainsi, le côlon n'est pas impliqué dans son assimilation par l'organisme. Cependant, la consommation d'inuline, et particulièrement sa fermentation par le microbiote intestinal, induit la présence d'une grande quantité de fructose dans le côlon (Figure 43). Ce fructose peut alors être absorbé par les cellules de la muqueuse colique, ou utilisé par les bactéries et les champignons du microbiote intestinal pour leur métabolisme [189,190].

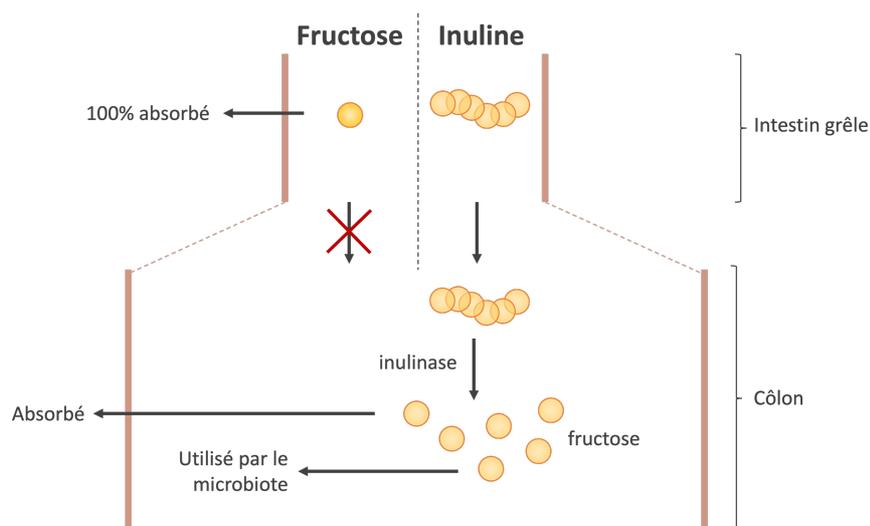


Figure 43 : Absorption du fructose et fermentation de l'inuline dans le tube digestif.

Le fructose exerce un effet immunostimulant, en favorisant la production de certaines cytokines, comme TNF- α , l'IL-6 et l'IL-10 [191]. Cependant, en favorisant la survie et la croissance cellulaire, un excès de fructose dans l'intestin peut promouvoir la croissance de cancer colorectal [192].

SCFAs

A travers la glycolyse, le fructose permet la synthèse de pyruvate, qui est le précurseur dans la synthèse des acides SCFAs (Figure 44). L'impact des SCFAs sur la santé de l'hôte est détaillée plus haut page 60.

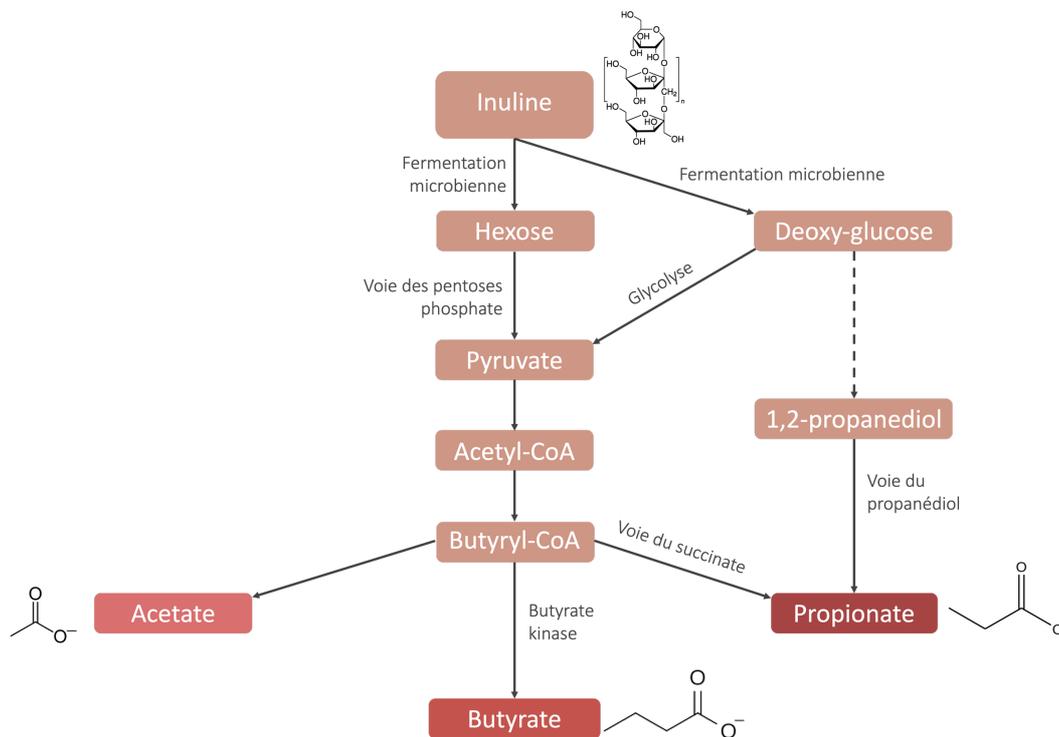


Figure 44 : Résumé des voies métaboliques microbiennes impliquées dans la synthèse des SCFAs à la suite de la fermentation de l'inuline. (D'après [193])

DIHYDROGENE

La fermentation de l'inuline entraîne également la production de dihydrogène (H₂), un gaz non-toxique et inodore par le microbiote intestinal. Les genres bactériens les plus impliqués dans la production d'H₂ sont *Bacteroides*, *Ruminococcus* et *Roseburia*. La voie métabolique préférentielle pour la production d'H₂ est la glycolyse, via l'oxydation des composés réduits FADH et NADH par les hydrogénases. D'autres voies métaboliques permettent aussi la production d'H₂, comme la réduction du pyruvate pour former de l'Acetyl-CoA et du formate à partir d'Acetyl-CoA, et le cycle de Krebs. La consommation de fibres alimentaires favorise la production d'H₂, principalement via la glycolyse. Sans fibre alimentaire, le côlon ne contient pas de sucres simples comme le glucose et le fructose. En revanche, l'hydrolyse des polysaccharides par le microbiote intestinal permet la présence de fructose colique, et donc favorise la glycolyse par les microorganismes du microbiote intestinal. Une fois produit dans la lumière intestinale, une partie de l'H₂, très volatile et très soluble, franchit la barrière intestinale et rejoint la circulation sanguine. Dans les poumons, l'H₂ est exhalé avec les autres gaz biologiques comme le CO₂.

Les propriétés thérapeutiques de l'H₂ ont été étudiées à partir de 2007, à l'issue de la publication des travaux de Ohsawa *et al.* [194]. Grâce à ses propriétés antioxydantes, l'H₂ protège le cœur et le cerveau des dommages causés lors d'une ischémie reperfusion. En effet, ces dommages sont liés à une production excessive de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS, Réactive Oxygène Species) par les cellules, à la suite de la restauration du flux sanguin dans des tissus ischémiques.

Chez des patients atteints de cancer bronchique non à petite cellules, un traitement par inhalation d'H₂ permet d'améliorer leur survie sans progression et d'augmenter la proportion de LTs CD4⁺, CD8⁺ et $\gamma\delta$ dans le sang [195,196]. Dans cette étude, le mélange de gaz administré aux patients contenait 67% d'H₂ et 33% de dioxygène. Bien qu'il soit non-toxique, même à des concentrations très élevées, l'H₂ est hautement inflammable au-dessus de 4%, ce qui limite ce type d'utilisation en clinique.

L'INULINE COMME THERAPEUTIQUE

Nos ancêtres avaient une alimentation quasiment végétarienne. Leur apport journalier de fibres alimentaires est estimé à 100 g par jour [197]. De nos jours, malgré un apport journalier recommandé de 25 g à 35 g par jour, notre consommation de fibres alimentaires est bien plus faible. Nos mauvaises habitudes alimentaires sont à l'origine de nombreux troubles et désordres métaboliques, comme le diabète et l'obésité.

L'INULINE EN TRAITEMENT DE MALADIES METABOLIQUES

La consommation d'inuline à des fins thérapeutiques est utilisée pour restaurer l'apport journalier en fibres, dans le cadre de maladies et troubles métaboliques, comme le diabète, la constipation ou encore pour aider à la perte de poids.

Une méta-analyse de 2019, regroupant 33 essais cliniques et plus de 1300 patients diabétiques (prédiabètes et diabètes de type II), a mis en évidence les bienfaits de la consommation d'inuline chez ces patients [198]. En effet, la consommation d'inuline a permis de réduire la glycémie et le taux d'insuline en dehors des repas, et d'améliorer la résistance à l'insuline. Dans un essai clinique (NCT02548247) comparant la consommation d'inuline avec un placebo chez des patients atteints de constipation chronique, l'inuline a permis d'augmenter la fréquence des selles, et de ramollir leur consistance [199]. Les patients traités avec de l'inuline montraient également un meilleur score de satisfaction que ceux traités avec le placebo.

L'INULINE DANS LE TRAITEMENT DE CANCERS

L'inuline est fermentée principalement dans le côlon, et a un impact bifidogénique, c'est-à-dire qu'elle favorise la croissance de la famille *Bifidobacteriaceae*. L'inuline favorise également la présence d'*Akkermansia muciniphila*, et réduit l'abondance relative de certaines espèces de *Lachnospiraceae* de *Clostridiaceae* et de *Ruminococcaceae* [200,201].

La présence de *Bifidobacteriaceae* et d'*Akkermansia muciniphila* dans le microbiote intestinal est associée avec une bonne réponse aux ICI dans le traitement de cancers [154,161]. Ainsi, en favorisant ces bactéries, la consommation d'inuline pourrait renforcer la réponse anticancer. Cette hypothèse a été confirmée en 2020 par Li *et al.*, qui ont montré que la consommation d'inuline permet un renforcement de l'immunité anticancer assez efficace pour inhiber la croissance de tumeurs implantées à des souris [202]. En effet, la consommation d'inuline permet une augmentation de l'infiltration tumorale en LTs CD4⁺, en CD8⁺ IFN γ ⁺, et en DCs. Ensuite, en 2021, Han *et al.* ont mis en évidence un effet synergique des effets antitumoraux de la consommation d'inuline et d'un traitement anti-PD-1 dans un modèle murin de tumeurs implantées. Ainsi, l'inuline, en favorisant la présence de bactéries bénéfiques dans le microbiote intestinal et en renforçant l'immunité anticancer, pourrait aider à prévenir l'apparition de cancers et renforcer l'efficacité des traitements anticancers existants.

OBJECTIFS DU PROJET

Ce projet de thèse repose sur l'hypothèse qu'une supplémentation de l'alimentation en inuline, bénéficiant à certaines bactéries commensales du microbiote intestinal, pourrait induire des stimulations immunitaires médiées par le MI, renforcer l'immunité anti tumorale, prévenir ainsi l'apparition de cancers et augmenter l'efficacité des immunothérapies (Figure 45). Ce projet, démarré en 2019, vise à comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans le dialogue entre le microbiote et l'immunité de l'hôte.

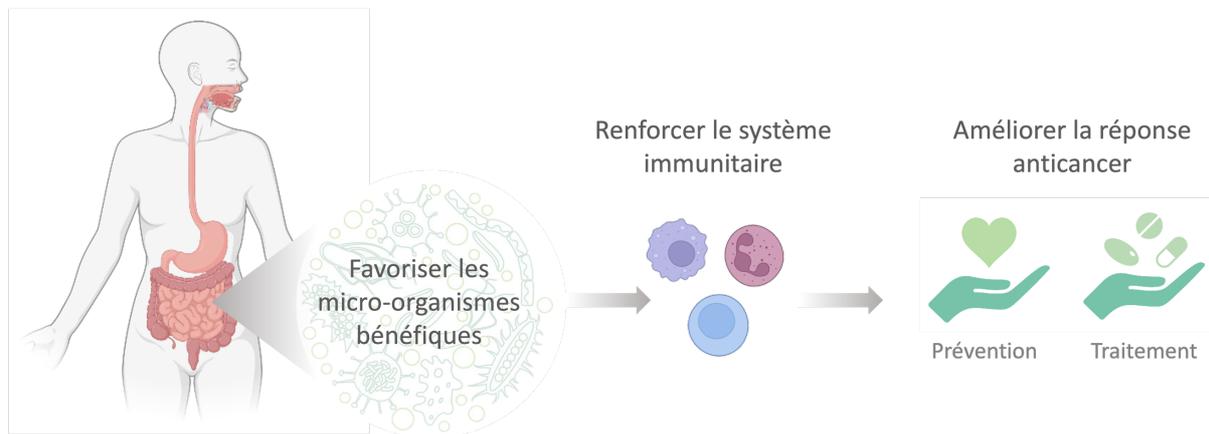


Figure 45 : Projet de thèse

CHAPITRE 1 : EFFET IMMUNOSTIMULANT DE L'INULINE

Ce chapitre présente les effets de la consommation d'inuline sur le microbiote intestinal et sur l'immunité de l'hôte en conditions physiologiques, et chez des souris porteuses de mélanome (Figure 46). La majorité de ces résultats a donné lieu à une publication dans le journal *Frontiers in Immunology*, publiée en février 2023 (Annexe 1) [203].

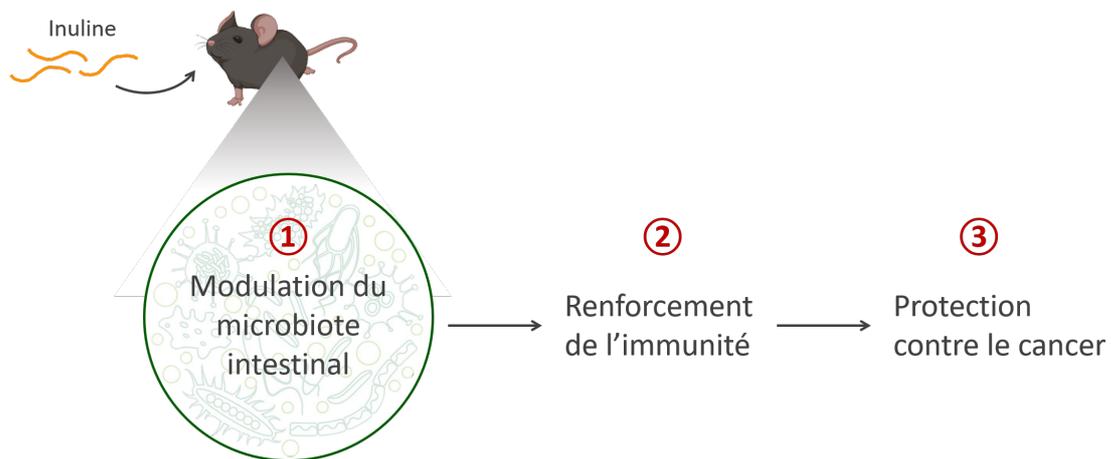


Figure 46 : Étude de l'effet immunostimulant de l'inuline dans un contexte de cancer.

I. IMPACT DE L'INULINE SUR LE MICROBIOME INTESTINAL

L'inuline est un prébiotique, fermenté par les microorganismes du microbiote intestinal, et plus particulièrement du côlon [204]. Les prébiotiques sont prometteurs pour la diversification et la modulation du microbiote intestinal, et donc pour l'optimisation de la totalité de ses fonctions, dont la modulation du système immunitaire [205]. Il a été montré qu'une supplémentation de l'alimentation avec de l'inuline diversifie la composition du microbiote intestinal, et augmente les populations de *Akkermansia muciniphila* et *Bifidobacterium* [206]. Ces bactéries ont largement été décrites comme bénéfiques dans diverses pathologies, et notamment en cancer [155]. Notre hypothèse est que la supplémentation en inuline, bénéficiant aux bactéries commensales comme *Akkermansia muciniphila* et *Bifidobacterium*, pourrait accroître l'immunité antitumorale. Nous avons tout d'abord caractérisé l'impact de la consommation d'inuline sur les populations bactériennes et fongiques du côlon. La fermentation de fibres alimentaires comme l'inuline n'impacte pas uniquement le microbiote intestinal, mais plus généralement le microbiome. Nous avons caractérisé chez les souris nourries avec de l'inuline non seulement le microbiote intestinal mais aussi leurs produits métaboliques c'est-à-dire le microbiome.

METHODOLOGIE : SEQUENÇAGES 16S ET ITS2, ET SPECTROMETRIE DE MASSE

Pour étudier l'effet de la consommation d'inuline sur les populations microbiennes du côlon, nous avons utilisé des souris C57BL/6, dont le microbiote intestinal est décrit comme très similaire à celui de l'homme [207]. Nous avons comparé à partir de fèces le microbiome intestinal de souris nourries avec un régime standard, avec celle de souris nourries avec un régime enrichi en inuline (Figure 47).

- Pour caractériser le microbiote bactérien, nous avons extrait l'ADN génomique (ADNg) de fèces de souris après 2 semaines de régime, puis nous avons amplifié et séquencé les portions d'ADN ribosomique 16S, permettant d'identifier et quantifier les bactéries à différents niveaux phylogéniques [208].

- Pour étudier le microbiote fongique, nous avons séquencé la portion d'ADNg Espaceur Interne Transcrit (Internal Transcribed Spacer, ITS), permettant d'identifier et quantifier les micromycètes à différents niveaux phylogéniques [209].
- Afin de comparer les métabolomes intestinaux de souris contrôles et inulines, nous avons réalisé une analyse par chromatographie liquide couplée à de la spectrométrie de masse.

L'extraction d'ADNg des fèces et les séquençages 16S et ITS2 ont été réalisés en collaboration avec le Dr. Mathias LAVIE-RICHARD de l'institut Micalis à l'INRAE, Jouy-en-Josas, France.

L'analyse métabolomique a été réalisée en collaboration avec le Dr. Caroline PLAZY, sur la plateforme GeXIm, Grenoble, France.

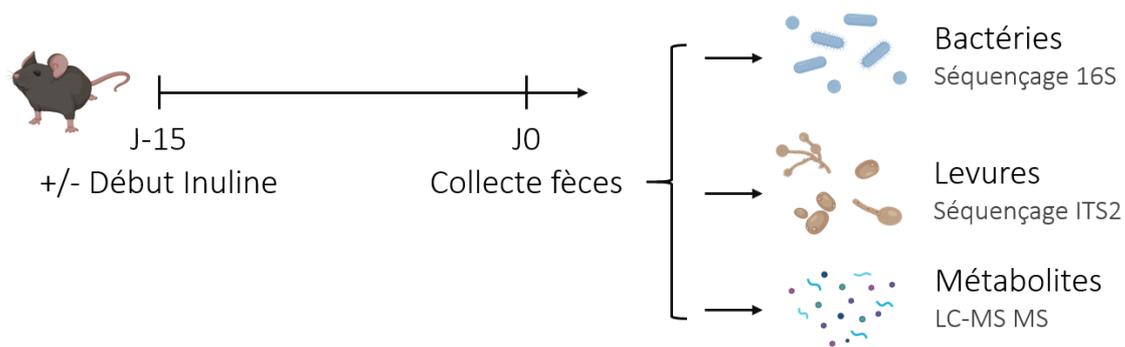


Figure 47 : Plan expérimental pour l'analyse de microbiome.

ANIMAUX

Les souris C57BL/6 femelles (âgées de 5 semaines) ont été achetées au laboratoire Janvier SA (Le Genest-Saint-Isle, France) et hébergées à la « Plateforme de Haute Technologie Animale » (PHTA) de l'UGA (Grenoble, France), EU0197, Autorisation C38-51610006, en condition libre de pathogènes spécifiques, avec un environnement à température contrôlée, avec des cycles de 12 heures lumière/obscurité, et un accès *ad libitum* à l'eau et à la nourriture. L'hébergement et les procédures des animaux ont été conduits en accord avec les recommandations de la Direction des Services Vétérinaires, le ministère de l'agriculture, en accord avec la Cour de Justice des Communautés Européennes, directive 2010/63/EU et en accord avec les recommandations pour le suivi de la santé de la fédération Européenne des Associations pour

la Science des Animaux de Laboratoire (FELASA). Les protocoles impliquant des animaux ont été examinés par le comité locale éthique « Comité d’Éthique pour l’Expérimentation Animale no#12, Cometh Grenoble » et approuvés par le ministère de la recherche (APAFIS#12905-2018010411002729.v7). Les souris ont été distribuées en groupes, suivant leur régime alimentaire. Le groupe « contrôle » était nourri avec un régime standard et de l’eau *ad libitum*. Les souris « inuline » étaient nourries avec un régime standard et de l’eau complémentée avec 72 g/L d’inuline Orafti® GR (DP > 10) (Beneo, Belgique) *ad libitum*. Les biberons d’inuline étaient changés 3 fois par semaine. A l’issue de 2 semaines de régimes, nous avons caractérisé la composition de leur microbiote bactérien grâce au séquençage de l’ADN ribosomal 16S présent dans leurs fèces. Il est compliqué et très invasif pour l’animal de collecter du contenu du côlon. C’est pourquoi nous avons réalisé une analyse de leur microbiote fécal, dont la composition est comparable à celle du côlon.

EXTRACTION D’ADN DE FECES DE SOURIS

EXTRACTION D’ADN AU FASTPREP®

Les échantillons de fèces (≈ 50 mg/souris) ont été collectés directement chez des souris vigiles et stockés secs à -80°C. L’ADN a ensuite été extrait des fèces en suivant le protocole optimisé de JJ Godon [210]. Après pesée, les échantillons ont été homogénéisés et incubés 10 minutes à température ambiante dans 250 µL de Guanidine Thiocyanate 4M, et 40 µL de N-Laurosyl Sarcosine 10% pour décongélation. Les échantillons ont ensuite été incubés 1h30 dans un bain sec à 70°C, après ajout de 500 µL de N-Laurosyl Sarcosine 5%. Pour détruire les parois et membranes plasmiques des microorganismes, 200 mg de billes de verre de 0,5 mm (pour les membranes des levures) et 200 mg de billes de verre de 0,1 mm (pour les parois bactériennes) ont été ajoutés. Les échantillons ont été agités au FastPrep®, à 10 000 Rotations Par Minute (RPM), 3 fois 30 secondes, entrecoupées de 5 minutes dans la glace pour empêcher les échantillons de chauffer. Puis 15 mg de PolyVinylPolyPyrrolidone (PVPP) ont été ajoutés, puis les échantillons ont été centrifugés 5 minutes à 20 000 G. Le surnageant a été récupéré, et le culot a été lavé 3 fois avec 750 µL de TENP (Tris-Cl, EDTA, NaCl, PVPP).

PRECIPITATION DE L’ADN ET DES IMPURETES

Les surnageants ont été dilués 2 fois dans de l’isopropanol à -20°C, puis incubés 10 minutes à température ambiante afin de précipiter les ADNs et les impuretés (protéines) avant de les

récupérer par centrifugation à 20 000 g pendant 10 minutes. Les culots ont été re-suspendus durant une nuit dans du tampon phosphate (pH 8,1) et 0,5 M acétate de potassium à 4°C.

PRECIPITATION DE L'ADN PURIFIÉ

Le lendemain matin de l'extraction, les surnageants ont ensuite été incubés 30 minutes à 37°C avec 40 µg/mL de RNase (EN0531, Fermentas, Villebon sur Yvette, France). Les acides nucléiques ont été précipités avec 1 mL d'éthanol absolu et 50 µL d'acétate de sodium 3M, puis centrifugés à 20 000 g pendant 10 minutes. Les culots d'ADN ont été lavés 3 fois avec de l'éthanol 70%, séchés, puis re-suspendus dans 100 µL de tampon Tris EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). L'ADN en suspension a été quantifié avec un NanoDrop™ et stocké à -20°C jusqu'à l'analyse 16S et ITS2. Les dosages d'ADNg obtenus sont listés dans le Tableau 2.

La pureté des échantillons a été évaluée par la mesure des ratios A_{260}/A_{280} , et A_{260}/A_{230} .

- A_{260}/A_{280} : Ce ratio évalue la contamination de l'échantillon en protéines, phénols et autres molécules absorbant à 280nm. Un échantillon d'ADN dont le ratio 260/280 est compris entre 1,6 et 1,8 est considéré comme relativement pur.
- A_{260}/A_{230} : Ce ratio évalue la présence de composés organiques et de sels dans les échantillons. Un échantillon dont le ratio 260/230 compris entre 2,0 et 2,2 est considéré comme relativement pur. Or, nos ADN sont dilués dans une solution contenant de l'EDTA, qui absorbe à 230 nm, ce qui peut expliquer que tous les ratios 260/230 soient largement inférieurs à 2,0.

Tableau 2 : Concentration (ng/μL) et pureté des ADNg récupérés après extraction.

	Echantillon	[ADNg] ng/μl	260/280	260/230		Echantillon	[ADNg] ng/μl	260/280	260/230
Contrôle	1	1442,15	1,81	1,34	Inuline	13	1308,95	1,79	1,06
	2	1785,53	1,81	1,26		14	1597,71	1,85	1,29
	3	849,83	1,71	0,82		15	524,88	1,65	1,15
	4	1396,6	1,76	1,01		16	634,45	1,73	0,79
	5	552,14	1,65	1,23		17	1252,03	1,82	1,2
	6	279,22	1,61	0,85		18	872,07	1,75	0,88
	7	871,56	1,72	0,81		19	448,87	1,68	1,1
	8	387,95	1,69	1,05		20	334,65	1,69	1
	9	588,18	1,63	1,28		21	1458,8	1,8	1,14
	10	376,84	1,66	0,96		22	995,64	1,82	1,13
	11	264,52	1,64	0,88		23	590,52	1,62	1,27
	12	456,57	1,66	1,08		24	741,45	1,76	0,86

SEQUENÇAGE 16S BACTERIEN

La diversité bactérienne a été déterminée pour chaque échantillon en ciblant les gènes ribosomaux. Des réactions en chaîne par polymérase (PCR) ont d'abord été mises en place pour préparer des amplicons en utilisant les oligonucléotides V3-V4 (PCR1F_460 : 5' CTTT CCCTACACGACGCTCTCCGATCTACGGRAGGCAGCAG 3', PCR1R_460 : 5' GGAGTTCAGACGTGTGCTCTCCGATCT TACCAGGGTATCTAATCCT 3'), avec 30 cycles d'amplification avec une température de fusion de 65°C. La qualité des amplicons a été vérifiée par électrophorèse sur gel, et les produits des PCR ont été envoyés à la plateforme @BRIDGE pour le séquençage sur une plateforme Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA).

Les séquences 16S ont été démultiplexées et sélectionnées avec la version 2.1.0 du logiciel QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) [211]. Elles ont été analysées et normalisées avec le pipeline (suite de programmes informatiques) Find rapidly OTU with Galaxy Solution (FROGS) [212,213]. Les amorces de PCR ont été retirées, et les séquences avec des erreurs de séquençage dans les amorces ont été exclues. Les séquences ont été groupées dans des unités taxonomiques opérationnelles (OTUs) avec la méthode de Swarm. Les chimères ont été exclues, et 580 OTUs ont été assignés à différents niveaux taxonomiques (du phylum à l'espèce), avec les trieurs RDP et NCBI Blast+ sur la base de données Silva_138.1_16S. Quand

nécessaire, la phylogénie était vérifiée en utilisant le navigateur Phylogeny (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>).

35538 séquences ont été sélectionnées aléatoirement dans chaque échantillon pour normaliser les données. Les données brutes ont été déposées sur la base de donnée SRA (ID: PRJNA888063). Pour l'analyse des données, le « Biom » et « Phyloseq » ont été utilisés sur le logiciel R [214]. Une analyse de raréfaction a été faite pour comparer les abondances relatives d'OTUs dans les échantillons. Pour comparer les groupes contrôle et inuline, différents paramètres ont été analysés : La diversité- α et la diversité- β .

LA DIVERSITE- α

Elle décrit la diversité microbienne au sein d'un seul échantillon. Plusieurs indicateurs peuvent être utilisés pour décrire la diversité- α d'un échantillon, comme la richesse basée sur le comptage de la table des OTUs sans prendre en compte l'abondance relative des espèces (Figure 48). Dans cet exemple, l'échantillon 2 est plus diversifié que l'échantillon 1.

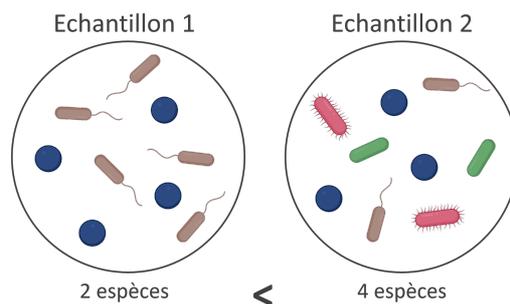


Figure 48 : Exemple de comparaison de la diversité- α de 2 échantillons, basée sur le nombre d'espèces bactériennes.

L'autre paramètre de la diversité, appelé régularité, est un comptage des OTUs, prenant en compte leur abondance relative (Figure 49).

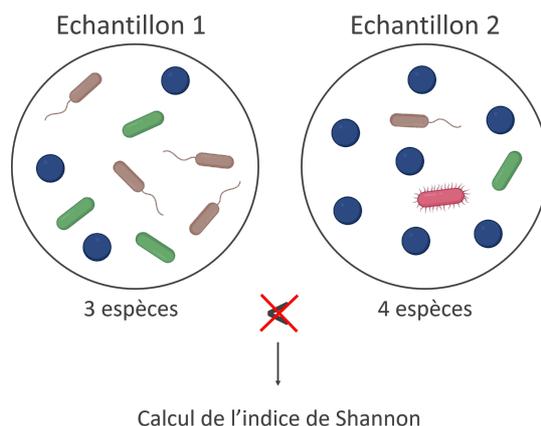


Figure 49 : Exemple de comparaison de la diversité- α de 2 échantillons, avec comptage des OTU, et prenant en compte l'abondance relative des espèces.

Ainsi, des indices avec des algorithmes différents ont été développés :

- Chao1 : Calcule la richesse et applique les corrections pour prendre en compte la régularité.
- Shannon, Simpson et inverse de Simpson : Calculent la richesse et la régularité.
- Observed : Calcule uniquement la richesse.

Dans cette étude, la diversité- α a été mesurée en utilisant les indices Observed, Chao1, Shannon, Simpson et inverse de Simpson. L'analyse linéaire discriminante (LDA) par effet de taille (LEfSe) a été utilisée pour identifier les taxons spécifiques au traitement des souris.

LA DIVERSITE- β

L'analyse Bray Curtis de la diversité- β permet de comparer la diversité d'écosystèmes entre les microbiotes de souris contrôles et inulines. L'objet de cette analyse est de comparer le nombre et la distribution des espèces bactériennes entre tous les échantillons.

Imaginons le cas de figure suivant : Le groupe « contrôle » contient 3 échantillons (C1, C2 et C3), et le groupe « traité » contient 3 échantillons (T1, T2 et T3). Nous souhaitons analyser la diversité- β de ces échantillons, suivant 2 variables : V1 et V2 (Figure 50).

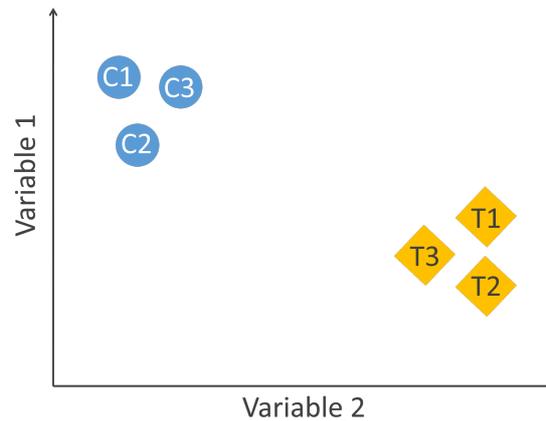


Figure 50 : Diversité- β de 6 échantillons, suivant 2 variables.

Avec seulement 2 variables, il est facile de représenter leur corrélation sur un plan en 2 dimensions. Cependant, le microbiote intestinal contient bien plus de 2 espèces bactériennes, et donc bien plus de 2 variables. Pour comparer des échantillons avec un très grand nombre de variables, on utilise l'Analyse en Composantes Principales (PCA, Principal Component Analysis). Tout d'abord, les différentes variables sont comparées entre elles, afin de dresser un cercle de corrélation (Figure 51).

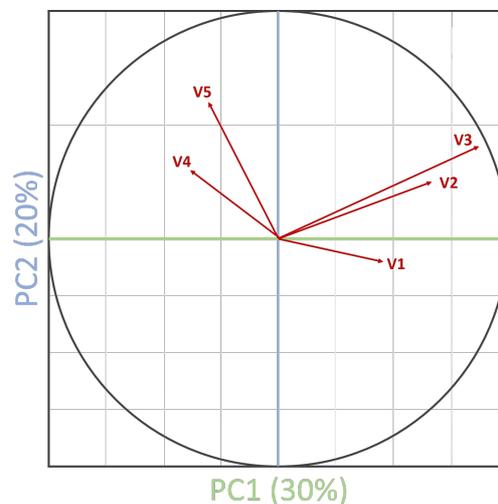


Figure 51 : Exemple de cercle de corrélation avec 5 variables (V1 à V5).

Dans le cercle de corrélation, les variables sont arrangées de la manière suivante :

- Angle aigu ($< 90^\circ$) : Les variables sont positivement corrélées.
- Angle droit ($= 90^\circ$) : Les variables ne sont pas corrélées.
- Angle obtu ($> 90^\circ$) : Les variables sont négativement corrélées.

L'axe horizontal, en vert sur la Figure 51, correspond à la Composante Principale (PC, Principal Component) 1 et l'axe vertical, en bleu sur la Figure 51, correspond à la PC2. Chaque PC regroupe plusieurs variables, suivant leur niveau de corrélation. Le pourcentage indiqué pour chaque PC reflète la proportion des variables illustrée dans la PC.

Ensuite, nous pouvons projeter les échantillons à comparer sur les axes PC1 et PC2 (Figure 52).



Figure 52 : Exemple de PCA.

Dans cette étude, la diversité- β a été mesurée avec la matrice de distance Bray-Curtis, et utilisée pour construire le graphique de PCA.

SEQUENÇAGE ITS2 FONGIQUE

La diversité fongique a été déterminée pour chaque échantillon en ciblant une portion des gènes ribosomaux. Un fragment ITS2 d'approximativement 350 bases a été amplifié grâce à l'amorce ITS2 (sens) 5'-GTGARTCATCGAATCTTT-3' and (anti-sens) 5'-GATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3', et le protocole de préparation de bibliothèque d'amplicons ITS2 optimisé et standardisé (METABIOTE®, Genoscreen, Lille, France). Pour chaque échantillon, l'ADNg dilué était utilisé pour des PCR de 25 μ L, réalisée dans les conditions suivantes : 2 minutes à 94°C, 35 cycles de 15 secondes à 94°C, 30 secondes à 52°C et 45 secondes à 72°C, suivis par 7 minutes à 72°C. Les produits des PCR ont été purifiés avec des billes AMPure XP (Beckman Coulters, Brea, CA) et quantifiés grâce au kit Picogreen (Molecular Probes, Paris, France). Une deuxième PCR de 9 cycles a été répétée dans des conditions similaires sur les produits purifiés de la première PCR, en ajoutant 10 identifiants multiplex de paires de bases (SIM identifiers) à la position 5' pour identifier spécifiquement chaque échantillon et éviter des biais de PCR. Les produits finaux des PCR ont été purifiés et quantifiés

comme décrit précédemment. Le séquençage a été réalisé sur un GS FLX Titanium Sequencing System (Roche Life Science, Mannheim, Germany).

Les séquences ITS2 ont été dé-multiplexées et sélectionnées avec la version 2.1.0 du logiciel QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) [211]. Les codes-barres ont été retirés des séquences et les amorces PCR ont été regroupées pour une longueur de séquence minimale de 150 paires de bases, un seuil de qualité de base minimal de 25 et une longueur d'homopolymère maximale de 7. Les séquences ont été assignées à des OTUs avec l'algorithme UCLUST [215] avec un seuil de 97% d'identité par paire et classées taxonomiquement avec la base de données UNIT ITS (alpha version 12_11) [216]. Une raréfaction a été effectuée et utilisée pour comparer les abondances d'OTU entre les échantillons. Des analyses en composantes principales (ACP) de la distance de Bray Curtis avec chaque échantillon coloré selon le traitement ont été construites et utilisées pour évaluer la variation entre les groupes expérimentaux. Le nombre d'espèces observées, ainsi que les indices de diversité de Shannon, Simpson et Chao1 ont été calculés à partir de données raréfiées et utilisés pour caractériser la diversité des espèces dans une communauté.

METABOLOMIQUE

PREPARATIONS D'EAUX FECALES

Les échantillons de fèces (\approx 50 mg/souris) ont été collectés directement chez des souris vigiles et mis en suspension dans de l'eau stérile (100 μ L d'eau pour 25 mg d'échantillon) dans des tubes de 1,5mL. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés au vortex 3 fois 1 minute, entrecoupés de 2 minutes dans la glace pour empêcher les échantillons de chauffer et prévenir la dégradation des métabolites. Les tubes ont été centrifugés 1h à 12 000 g à 4°C. Le surnageant a été récupéré et filtré à 0,22 μ m à l'aide d'une seringue. Tous les échantillons d'eaux fécales contrôles ont été groupés en un seul échantillon, de même pour les échantillons d'eaux fécales inulines. L'eau fécale était immédiatement stockée à -80°C jusqu'à utilisation.

SPECTROMETRIE DE MASSE

TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Les analyses de métabolomique ont été réalisées par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS/MS) sur un système Vanquish couplé au QExactive™ plus, doté de la technologie Orbitrap™ de Thermo Fisher. Les échantillons d'eaux fécales contrôles ou

d'eaux fécales inulines ont été préalablement déprotéinisés par un ajout de méthanol froid (rapport 1/5). Le mélange a été homogénéisé au vortex, conservé dans la glace pendant 30 minutes puis centrifugé à 4°C pendant 20 minutes à 15 000 g, le surnageant a été récupéré puis séché dans un évaporateur sous azote pour être conservé à -80°C. Les échantillons ont été ensuite reconstitués par 100 µL d'un mélange H₂O, acide formique (FA) 0,1%, acétonitrile (ACN) 1%. La colonne de chromatographie utilisée était une colonne C18 polaire (Luna Omega 1,6µm Polar C18, 150*2,1mm de Phenomenex®) permettant l'analyse d'un maximum de métabolites aux propriétés différentes.

PRE-ANALYSE DES DONNEES

Cette étape a pour objectif de générer, à partir des données brutes fournies par le spectromètre de masse, des données robustes pouvant faire l'objet d'une analyse statistique. Cette analyse a été réalisée à l'aide des logiciels MSConvert et Mzmine 3 et comprend la succession d'étapes suivantes : détection des masses en MS1 et MS2, construction des chromatogrammes, déconvolution, regroupement des isotopes, alignement et filtration des données.

ANALYSES STATISTIQUES

Les analyses statistiques ont été effectuées sur le logiciel MetaboAnalyst. La première étape de l'analyse consiste en une normalisation des données : normalisation des échantillons par la médiane et une normalisation des features (molécule identifiée par un rapport m/z et un temps de rétention) par une transformation en données logarithmiques, puis elles ont été centrées sur la moyenne et réduite par l'écart type de chaque variable au moyen de l'algorithme « pareto scaling ». Les analyses statistiques réalisées par la suite sont des analyses multivariées : non supervisées (ACP et Clustering) et supervisées (PLS-DA, t-test et volcano plot).

ANALYSES STATISTIQUES ET CREATION DE FIGURES

Toutes les analyses statistiques et les figures ont été réalisées sur le logiciel GraphPad PRISM.

RESULTATS

MODULATION DU MICROBIOTE INTESTINAL BACTERIEN

Les analyses métagénomiques ont mis en évidence les 5 phyla qui composent le microbiote des souris contrôles et inulines : *Firmicutes*, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Desulfobacterota*, et *Proteobacteria* (Figure 53). Les proportions de chaque phylum étaient relativement similaires entre les deux groupes, excepté pour le phylum *Actinobacteriota*, qui était beaucoup plus abondant dans le microbiote de souris nourries avec de l'inuline (0,005% en contrôle ; 4,65% en inuline).

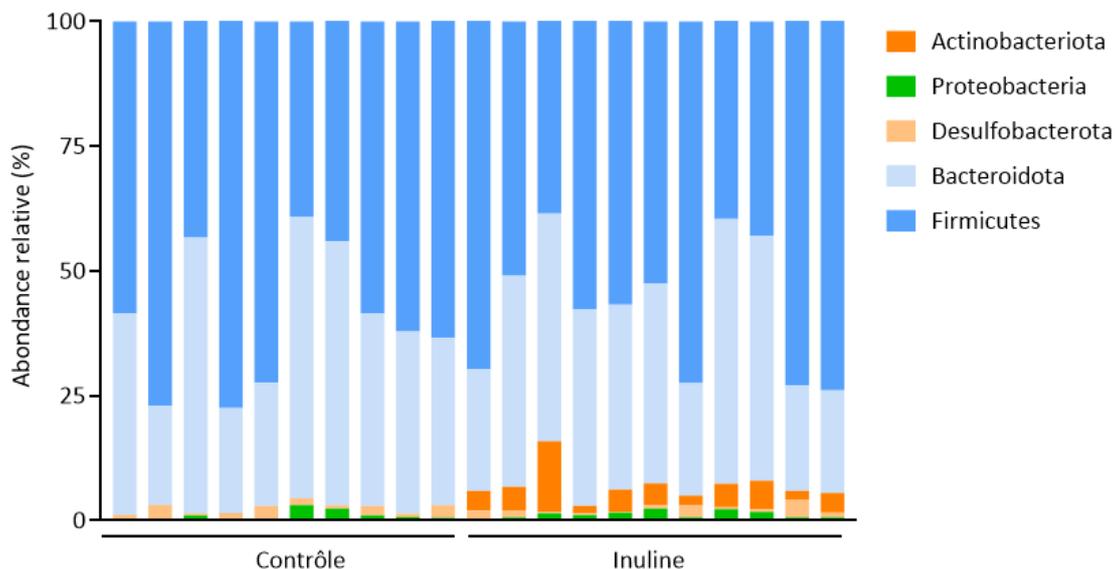


Figure 53 : Composition du microbiote bactérien des souris contrôles et inulines. Abondances relatives des phyla bactériens les plus présents dans le microbiote fécal de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=10) ou enrichi en inuline (n=11).

L'analyse Bray Curtis de la diversité- β par PCA a confirmé un regroupement significatif des microbiotes intestinaux des souris au sein d'un même régime alimentaire ($p < 0,001$) (Figure 54), montrant ainsi le profond impact du régime enrichi en inuline sur le microbiote intestinal.

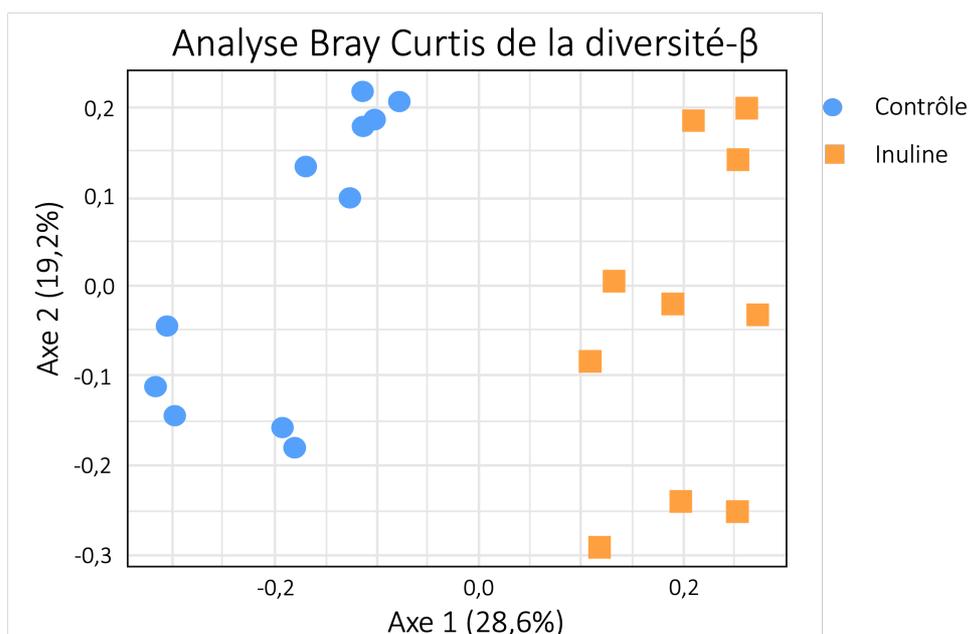


Figure 54 : Diversité-β par analyse Bray Curtis. Représentation PCA de la diversité-β dans le microbiote fécal de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=10) ou enrichi en inuline (n=11).

Concernant la diversité-α, le nombre total d'espèces n'a pas été significativement impacté (387 ± 53 OTUs pour les souris standards et 378 ± 43 OTUs pour les souris inulines). En revanche, la distribution des espèces était significativement différente entre les deux groupes (Indice de Shannon, $p = 0,00582$). Cela signifie que malgré un nombre d'espèces bactériennes similaire dans les microbiotes de souris contrôles et inulines, celles-ci n'étaient pas distribuées de la même manière. Afin d'identifier les espèces impactées par le régime inuline, nous avons réalisé une analyse différentielle de l'abondance en utilisant la LDA LeFSe. Les scores LDA représentés en cladogrammes montrent les rangs taxonomiques significativement différents entre les groupes contrôle et inuline (Figure 55).

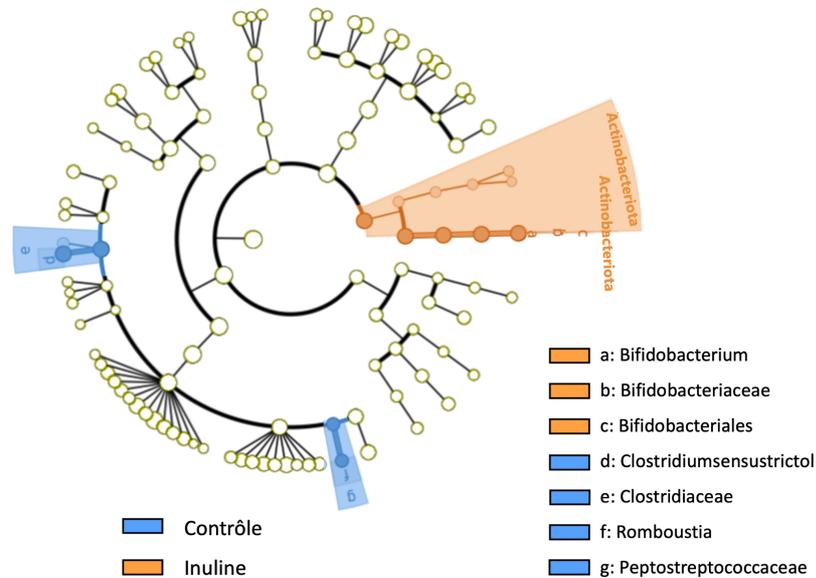
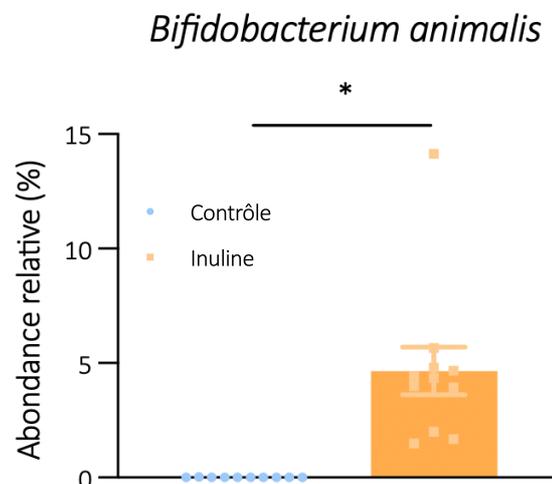


Figure 55 : Diversité- α , représentée en cladogramme, dans le microbiote fécal de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=10) ou enrichi en inuline (n=11).

L'un des signaux les plus forts était une augmentation de l'espèce *Bifidobacterium animalis*, un membre du phylum *Actinobacteriota*, dans les microbiotes de souris inulines (4,65%) comparé aux souris standards (0,005%) (Figure 56). Le second fort signal concernait la famille des *Clostridiaceae*, et plus particulièrement le genre *Clostridium* sensu stricto 1. Nos séquences étaient très proches des *Clostridium saudiense*, *Clostridium disporicum*, et *Clostridium celatum* (ces espèces ayant des séquences ADNr 16S très similaires). Ce *Clostridium* était diminué dans le microbiote des souris inulines (0,09%) comparé aux souris standards (6%). Le régime inuline impacte donc profondément le microbiote bactérien.

Figure 56 : Abondance relative de l'espèce *Bifidobacterium animalis*, dans le microbiote fécal de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=10) ou enrichi en inuline (n=11). L'histogramme représente la moyenne \pm SEM. ****p < 0,0001 avec un test Mann-Whitney.



IMPACT SUR LE MICROBIOTE FONGIQUE

Les analyses métagénomiques ont mis en évidence les 2 phyla qui composent les microbiotes des souris nourries avec un régime standard ou inuline : *Ascomycota* (85%) et *Basidiomycota* (15%) (Figure 57).

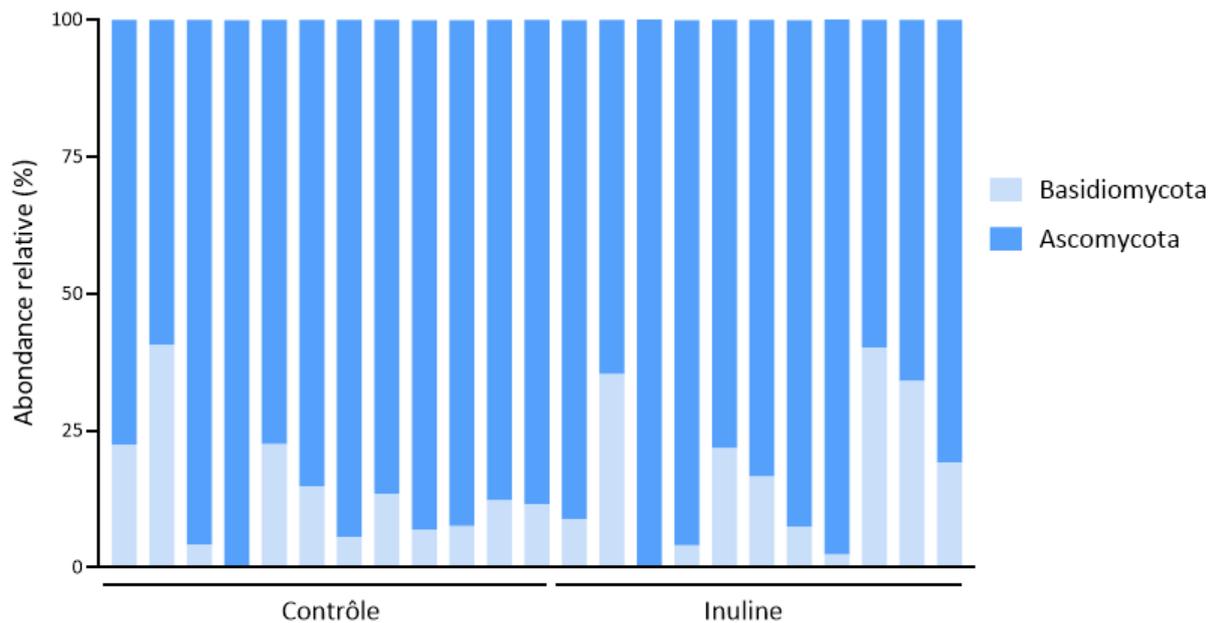


Figure 57 : Abondances relatives des phyla fongiques les plus présents dans le microbiote fécal de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=10) ou enrichi en inuline (n=11).

La diversité- α semble avoir été très légèrement appauvrie par le régime inuline, mais le nombre total d'espèces n'a pas été significativement impacté (11 ± 4 Operational Taxonomic Units (OTUs) pour les souris standards et 10 ± 4 OTUs pour les souris inulines), tout comme la distribution des séquences (Index de Shannon, $p = 0,48$).

L'analyse Bray Curtis de la diversité- β en PCA a confirmé la grande similarité entre les mycobiototes des souris nourries avec un régime standard ou inuline (Figure 58).

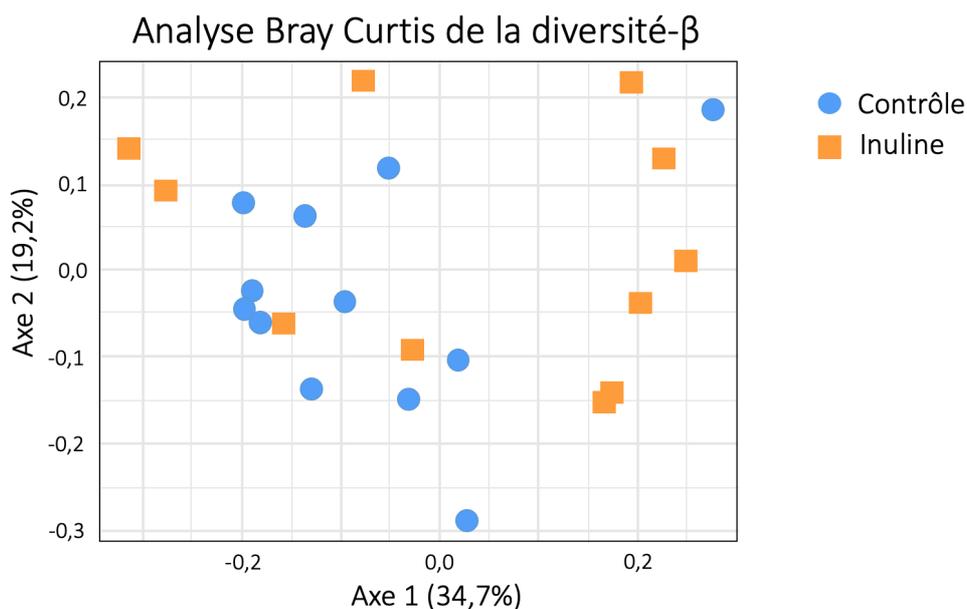


Figure 58 : Diversité-β par analyse Bray Curtis. Représentation PCA de la diversité-β dans le microbiote fécal de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=10) ou enrichi en inuline (n=11).

Ensuite, nous avons réalisé une analyse différentielle de l'abondance en utilisant la LDA LeFSe. Les scores LDA montrent une différence significative dans un rang taxonomique. Il s'agit du genre *Claviceps*, un membre du phylum *Ascomycota*, dans les mycobiotés de souris inulines (0,002%) comparé aux souris standards (0,04%) (Figure 59).

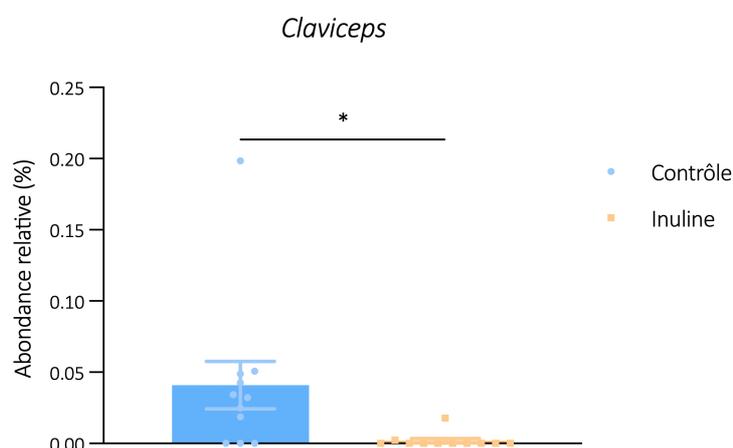


Figure 59 : Abondance relative du genre *Claviceps*, dans le microbiote fécal de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=10) ou enrichi en inuline (n=11). L'histogramme représente la moyenne \pm SEM. *p < 0,05 avec un test Mann-Whitney.

Le régime inuline n'impacte que très peu le mycobioté des souris, qui est déjà très différent d'un individu à l'autre.

IMPACT SUR LE METABOLISME

Pour caractériser au mieux le microbiote intestinal des souris nourries avec de l'inuline, nous avons analysé son métabolome. Pour cela, nous avons créé des eaux fécales, à partir de fèces de souris standards ou inulines, que nous avons analysées par LC-LS/MS. Un chromatogramme a été réalisé pour chaque échantillon (Figure 60). Chaque pic représente un ou plusieurs métabolites ayant un temps de rétention similaire mais présentant un rapport masse sur charge (m/Z) différent. Ce chromatogramme suggère des différences de composition et de quantité des métabolites présents dans les 2 eaux fécales, mais une analyse statistique était nécessaire pour conclure sur de réelles différences.

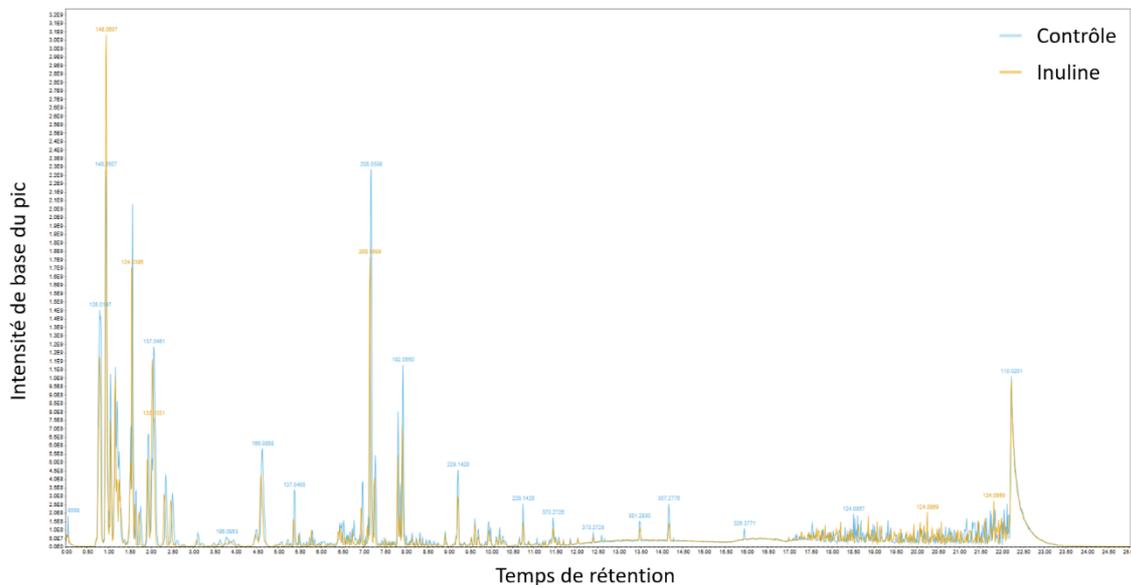


Figure 60 : Chromatogrammes des profils métaboliques des eaux fécales contrôles et inulines, obtenus par LC-MS/MS. Profils métaboliques de fèces de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 souris groupées en 1 échantillon par groupe).

Une analyse statistique non-supervisée, en composante principale (PCA, Principal Component Analysis) a montré une séparation marquée entre les groupes contrôle et inuline (20% sur la première composante et 30% sur la deuxième composante) (Figure 61). Ce résultat met en évidence des profils métaboliques bien distincts entre les eaux fécales contrôles et inulines.

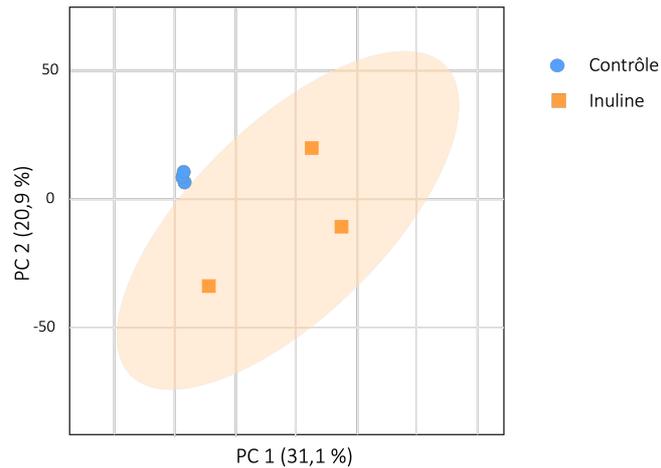


Figure 61 : Diagramme de score d'analyse en composantes principales (ACP). Profils métaboliques de fèces de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 souris groupées en 1 échantillon par groupe).

Une analyse supervisée a été réalisée afin d'identifier le nombre de métabolites dont l'expression variait de façon significative entre les deux groupes. Sur le volcano plot, les métabolites sous le seuil de significativité ($p < 0,05$) sont représentés en gris. L'expression des métabolites représentés en rouge est significativement augmentée dans l'échantillon d'eau fécale inuline, et l'expression des métabolites en bleu est significativement augmentée dans l'échantillon contrôle (Figure 62). Ainsi, 429 métabolites diffèrent entre les eaux fécales contrôles et inulines, dont 234 dont l'expression est plus importante dans l'eau fécale inuline.

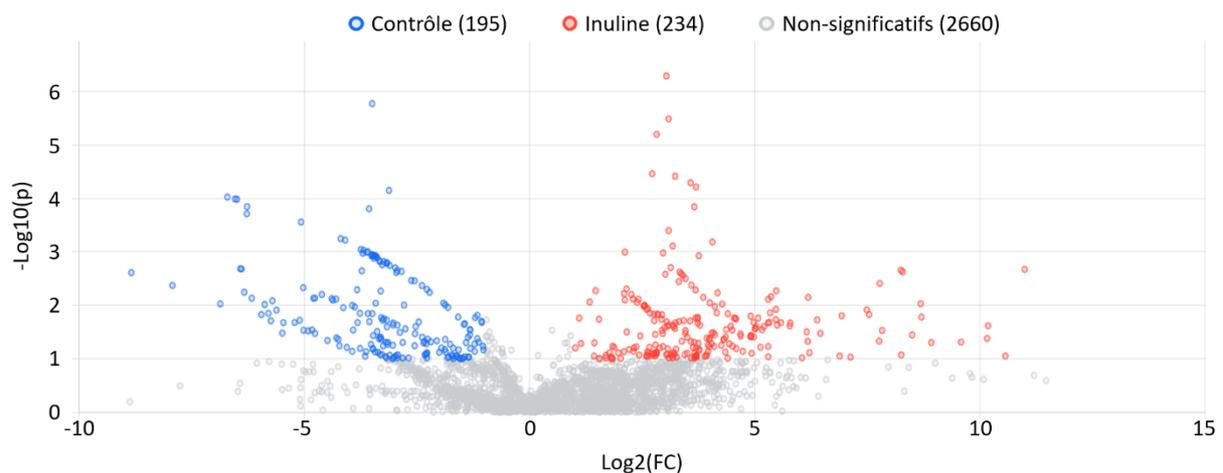


Figure 62 : Volcano plot des eaux fécales contrôles et inulines. Profils métaboliques de fèces de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 souris groupées en 1 échantillon par groupe). Les métabolites en gris ne présentent pas de différence d'expression entre les 2 groupes. Les métabolites bleus sont significativement ($p < 0,05$) plus présents dans l'échantillon contrôle et les métabolites rouges sont significativement ($p < 0,05$) plus présents dans l'échantillon inuline.

CONCLUSION

Comme précédemment décrit dans la littérature [206], la consommation d'inuline impacte profondément le microbiote bactérien intestinal. En effet, il augmente la diversité- β , soulignant une grande dissimilarité entre les microbiotes de souris contrôles et inulines. Parmi les espèces concernées, l'abondance relative de l'espèce *Bifidobacterium animalis* est significativement augmentée dans le microbiote de souris nourries avec de l'inuline. Le mycobiote n'est que faiblement modulé par la consommation d'inuline. En effet, l'inuline ne semble pas impacter la diversité du mycobiote, et diminue l'abondance relative du genre *Claviceps* (Figure 63). De plus, la consommation d'inuline semble impacter profondément le métabolome microbien. Cependant, l'analyse actuelle ne permet pas encore de déterminer quels sont les métabolites détectés.

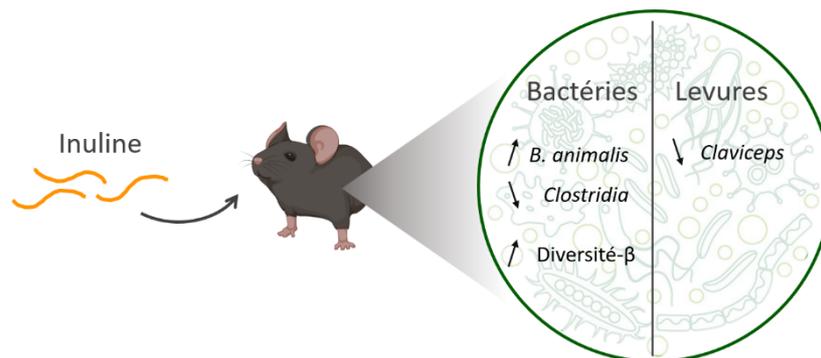


Figure 63 : Modulation du microbiote intestinal par le régime inuline.

II. IMPACT DE L'INULINE SUR L'IMMUNITE INTESTINALE

Il est désormais admis que le microbiome intestinal impacte le tonus immunitaire local (intestins) et systémique [217]. Comme environ 70% de notre système immunitaire se trouve dans nos intestins [218], nous avons caractérisé les modulations immunitaires induites par la consommation d'inuline à cet endroit. L'inuline est un prébiotique, fermenté par les micro-organismes anaérobies du caecum et du côlon. Nous nous sommes donc concentrés sur l'analyse de l'immunité colique plutôt que celle du petit intestin.

METHODOLOGIE : ANALYSE DES CELLULES IMMUNITAIRE COLIQUES

L'immunité dans le côlon est divisée en deux espaces : Les Lymphocytes IntraEpithéliaux (IELs) et les cellules de la Lamina Propria (LPCs) [61] (Figure 64).

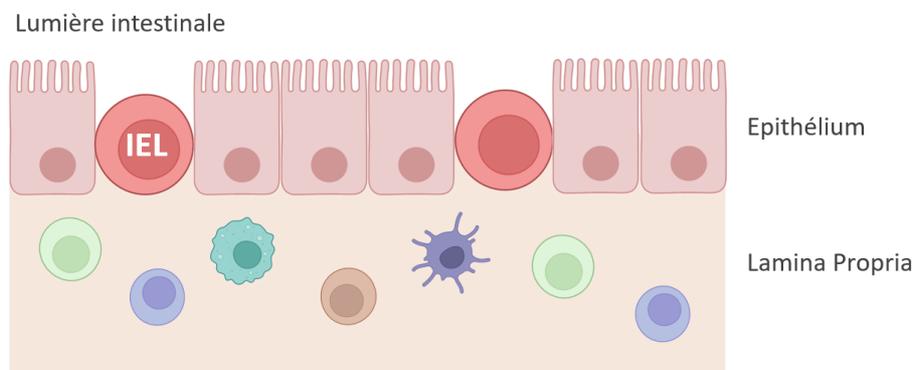


Figure 64 : Organisation de l'immunité colique.

Nous avons caractérisé l'immunité colique de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline par cytométrie en flux et Rétro-Transcription PCR (RT-qPCR) en suivant le plan expérimental présenté en Figure 65.

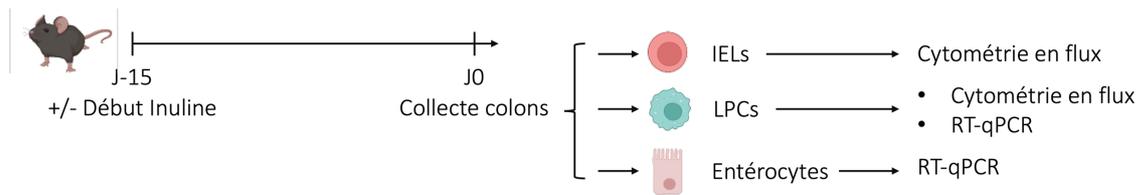


Figure 65 : Plan expérimental pour l'analyse de l'immunité intestinale.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

COLLECTE DE COLONS ET TRI DES LYMPHOCYTES INTRAEPITHÉLIAUX ET DES CELLULES DE LA LAMINA PROPRIA

COLLECTE DE COLONS

Les côlons ont été collectés *post-mortem*, vidés et ouverts longitudinalement afin de retirer délicatement le mucus sur l'épithélium. Les côlons ont été coupés en segments de 2 cm et placés dans 20 mL de tampon Hank's Balanced Salt Solution sans Ca^{2+} et Mg^{2+} (HBSS⁻) (Gibco) pour empêcher leur déshydratation.

ISOLEMENT DES IELs

Les morceaux de côlons ont été incubés dans 20 mL de tampon d'isolement des IELs, contenant 5 mM d'HEPES, 5 mM EDTA, 1 mM DTT et 5% SVF dans du tampon HBSS⁻, pendant 20 minutes à 37°C. Ce tampon permet la désintégration de la barrière intestinale et donc l'individualisation des cellules qui la composent. Après l'incubation, les suspensions cellulaires contenant les IELs ont été centrifugées 6 minutes à 600 G, puis les cellules récupérées ont été mises en suspension dans 10 mL de milieu Roswell Park Memorial Institut (RPMI) 10% Sérum de Veau Fœtal (SVF). Les morceaux de côlons ont été incubés une deuxième fois dans 20 mL de tampon d'isolement de IELs. La fraction cellulaire récupérée grâce à la deuxième incubation a ensuite pu être groupée avec la première, dans un volume final de 10 mL de RPMI 10% SVF.

ISOLEMENT DES LPCs

Les morceaux de côlon restants ont été lavés dans 20 mL de HBSS avec Ca^{2+} et Mg^{2+} (HBSS⁺) pendant 20 minutes à 37°C. Les morceaux de côlons propres ont ensuite été lacérés avec des scalpels et digérés avec 20 mL de RPMI contenant 0,5 mg/mL de Collagénase VIII, 10 U/mL de DNase I et 5% SVF à 37°C pendant 30 minutes. Enfin, les morceaux de côlons digérés contenant les cellules de la Lamina Propria ont été écrasés sur un tamis cellulaire de 70 μm , puis les cellules récupérées ont été mises en suspension dans 10 mL de RPMI complet 10% SVF.

CYTOMETRIE EN FLUX

La cytométrie en flux permet l'analyse quantitative et qualitative d'une suspension cellulaire. Les cellules sont préalablement marquées avec des anticorps couplés à des fluorochromes, ciblant des marqueurs extracellulaires et des molécules intracellulaires (cytokines).

STIMULATION DES LEUKOCYTES

Pour permettre le marquage intracellulaire des cytokines, les suspensions cellulaires ont été stimulées de manière aspécifique 4h à 37°C avec 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ionomycin (Sigma), et du Golgi StopTM (BD Biosciences). La combinaison de PMA et de ionomycine permet d'activer les facteurs de transcription NF- κ B et NFAT, et stimuler la production de cytokines. L'inhibiteur de transport vésiculaire Golgi StopTM permet l'accumulation des cytokines produites à l'intérieur de la cellule, en empêchant sa sécrétion.

MARQUAGE EXTRA- ET INTRA-CELLULAIRE

Pour le marquage extracellulaire, les cellules ont été incubées 20 minutes à température ambiante dans le noir avec 200 ng de chaque anticorps et un marqueur de viabilité (Live/DeadTM, Invitrogen). Les anticorps utilisés pour les marquages extracellulaires sont listés dans le Tableau 3.

Pour permettre le marquage intracellulaire des cytokines, les cellules ont d'abord été perméabilisées et fixées avec le kit FoxP3 staining buffer kit (eBioscience), en suivant les indications du fournisseur. Cette perméabilisation permet ensuite aux anticorps ciblant les protéines intracellulaires de pénétrer à l'intérieur des cellules. Les cellules ont ensuite été

incubées 1 heure à température ambiante dans le noir avec 200 ng de chaque anticorps. Les anticorps utilisés pour les marquages intracellulaires sont listés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des IELs et des LPCs

Fluorochrome	Cible
Laser bleu (488 nm)	
FITC	CD3
PE	IL-10
PerCP-Cy TM 5.5	CD4
PE/Cy TM 7	γδ TcR
Laser rouge (640 nm)	
APC	IFNγ
APC-Cy7	CD45
Laser Violet	
BD Horizon TM Brilliant Violet 421	IL-17
BD Horizon TM V500	Marqueur de viabilité

Après le marquage intracellulaire, les cellules ont été fixées avec du FACS Lysing Solution (BD Biosciences) et stockées à 4°C jusqu'à l'acquisition des données sur un cytomètre BD Biosciences FACSCanto II ou Lyric et analysées sur le logiciel FlowJo. La sélection des cellules a été faite comme indiqué en Figure supplémentaire S1.

TRI CELLULAIRE

Les cellules CD45⁺ et CD45⁻ de la Lamina Propria ont été triées avec le dispositif MACS de tri magnétique (Miltenyi Biotec) avec des microbilles CD45 (Cat n° #130-052-301), en suivant les instructions du fournisseur.

RETRO-TRANSCRIPTION ET REACTION EN CHAÎNE PAR POLYMERASE EN TEMPS REEL (RT-QPCR)

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) permettent d'amplifier une séquence d'ADN définie. La PCR quantitative en temps réels (qPCR) permet de suivre en continu ce processus d'amplification, en suivant la fluorescence émise par les fragments néo-formés. L'ADN est obtenu par Rétro-Transcription (RT) d'ARN purifié.

EXTRACTION D'ARN

L'ARN a été extrait des cellules avec le kit RNEASY-QIAGEN, en suivant les indications du fournisseur. L'ARN en a été suspendue dans un volume final de 30 µL et a été quantifiée avec un NanoDrop™ et stocké à -20°C jusqu'à la rétro-transcription. Les dosages d'ARN obtenues sont listés dans le Tableau 4. La pureté des échantillons a été évaluée par la mesure des ratios A_{260}/A_{280} , et A_{260}/A_{230} .

- A_{260}/A_{280} : Un échantillon d'ARN dont le ratio 260/280 avoisine 2,0 est considéré comme relativement pur.
- A_{260}/A_{230} : Un échantillon dont le ratio 260/230 compris entre 2,0 et 2,2 est considéré comme relativement pur. Le tampon final contenant les ARN peut cependant grandement affecter ce ratio.

Tableau 4 : Quantification des ARN purifiés.

	Echantillon		[ARN] ng/µl	260/280	260/230
CD45 ⁺	Contrôle	2	19,7	1,8	0,99
		3	3,12	2,82	0,33
		4	23,9	1,34	0,48
		5	52	1,97	1,15
		6	12,6	1,31	0,63
		Inuline	7	11,3	1,69
	8		13,4	1,78	0,56
	9		6,9	2,56	0,1
	11		3,1	5,28	0,32
	12	15,76	2,1	0,04	

	Echantillon		[ARN] ng/µl	260/280	260/230
CD 45 -	Contrôle	2	108,7	1,93	1,44
		3	33,36	2,09	1,62
		4	89,5	2	1,9
		5	104,6	2	1,77
		6	50,2	1,97	1,42
		Inuline	7	107,3	2,08
	8		53,4	1,95	1,49
	9		95,4	2,09	0,48
	11		68,6	2,16	0,8
	12		96,72	2,06	1,09

RETROTRANSCRIPTION

L'ARN extrait a ensuite été rétro-transcrit avec le kit SuperScript II en ADN complémentaire (ADNc), en suivant les indications du fournisseur. Les volumes des solutions d'ARN utilisés ainsi que les quantités d'ARN correspondantes sont listés dans le Tableau 5 (V_{ARN}). A la fin de cette étape, les ARNs d'origine sont détruits grâce à une RNase. Nos échantillons contenaient alors uniquement de l'ADNc simple brin identique à la séquence génomique.

Tableau 5 : Volumes des solutions d'ARN utilisés pour les rétro-transcription, et quantités d'ARN correspondantes.

	Échantillon		V _{ARN} (μL)	V _{eau} (μL)	Quantité d'ARN (ng)
CD45 ⁺	Contrôle	2	12	0	250
		3	12	0	50
		4	10,46	1,54	250
		5	9,62	2,38	500
		6	11,9	0,1	150
	Inuline	7	8,85	3,15	100
		8	11,19	0,81	150
		9	7,25	4,75	50
		11	12	0	50
		12	9,52	2,48	150

	Échantillon		V _{ARN} (μL)	V _{eau} (μL)	Quantité d'ARN (ng)
CD45 ⁻	Contrôle	2	4,6	7,4	500
		3	7,5	4,5	250
		4	5,59	6,41	500
		5	4,78	7,22	500
		6	9,96	2,04	500
	Inuline	7	4,66	7,34	500
		8	9,36	2,64	500
		9	5,24	6,76	500
		11	7,29	4,71	500
		12	5,17	6,83	500

RT-QPCR

La séquence entière du gène d'intérêt a été récupérée sur la base de données « Nucléotides » de la National Library of Medicine du National Institute of Health (NIH) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pour certains gènes, seulement l'exon principal (le plus long) a été utilisé. La séquence a ensuite été copiée sur le logiciel Primer3Web (<https://primer3.ut.ee/>), et une recherche de primer a été exécutée en suivant les critères listés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Critères de conceptions des amorces de RT-qPCR.

	Minimum	Optimal	Maximum
Longueur de l'amorce (bases)	19	20	21
Température de fusion (T _m)	59	60	61
Pourcentage d'appariement GC	40	50	60
Longueur de l'amplicon (bases) (peut varier)	100	-	150

Les paires amorce(s) ayant moins de 1,5°C de différence de température de fusion ont été sélectionnées. Pour vérifier ce duo d'amorces, leurs séquences ont été soumises au logiciel In-silico PCR de la plateforme Genome Browser de l'université de California Santa Cruz (<https://genome.ucsc.edu/>). Le logiciel indique la ou les séquences du génome amplifiées par la paire d'amorces. Si la seule séquence proposée correspond au gène d'intérêt, le duo

d'amorces était alors validé. Le même type de vérification a également été réalisé sur le logiciel « Nucleotide Blast » du NIH (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cette seconde vérification permet de s'assurer que la séquence du génome amplifiée se situe dans un exon (en cas d'élimination des introns durant la maturation des ARNm). Les amorces obtenues et utilisées sont listées dans le Tableau 7.

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR. FW = séquence Forward (sens) ; RV = séquence reverse (anti-sens).

Nom de l'amorce	Séquence (5' → 3')	Nom de l'amorce	Séquence (5' → 3')
GAPDH FW GAPDH RV	CCATCACCATCTTCCAGGAG CCTGCTTCACCACCTTCTTG	MMP-9 FW MMP-9 RV	TGGGGGCAACTCGGC GGAATGATCTAAGCCCAG
β2M FW β2M RV	GTATACTCACGCCACCCACC TCCCGTTCTTCAGCATTTGGA	iNOS FW iNOS RV	GTTGAAGACTGAGACTCTGG ACTAGGCTACTCCGTGGA
IL-1βγδ FW IL-1β RV	TGATGAGAATGACCTCTTCT CTTCTTCAAAGATGAAGGAAA	Cox-2 FW Cox-2 RV	GGGTTGCTGGGGGAAGAAATG GGTGGCTGTTTTGGTAGGCTG
IL-6 FW IL-6 RV	TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC TTGGTCCTTAGCCACTCCTTCC	TFF-3 FW TFF-3 RV	CCTGGTTGCTGGGTCCTCTG GCCACGGTTGTACACTGCTC
IL-10 FW IL-10 RV	TCCTTAATGCAGGACTTTAAGGG GGTCTTGGAGCTTATTAATAAT	Occludine FW Occludine RV	ACGGACCCTGACCACTATGA TCAGCAGCAGCCATGTACTC
IL-12 FW IL-12 RV	CCTGGGTGAGCCGACAGAAGC CCACTCCTGGAACCTAAGCAC	ZO-1 FW ZO-1 RV	GGGGCTACACTGATCAAGA TGGAGATGAGGCTTCTGCTT
IL-17 FW IL-17 RV	GCTCCAGAAGGCCCTCAGACTACC CTTCCCTCCGATTGACACAGC	FoxP3 FW FoxP3 RV	CCTATGGCTCCTTCTTGGC CCTTGGGTGCAGTCTTCCAG
TNF-α FW TNF-α RV	AACTAGTGGTGCCAGCCGAT CTTACAGAGCAATGACTCC	RegIIIγ FW RegIIIγ RV	TGGAGGTGGATGGGAATGGA GCCACAGAAAGCACGGTCTA
IFNγ FW IFNγ RV	GAACTGGCAAAAGGATGGTGA TGTGGGTTGTTGACCTCAAAC	IL-22 FW IL-22 RV	GTGCTCAACTTCACCCTGGA GGCTGGAACCTGTCTGACTG
MIP-2 FW MIP 2 RV	TCAATGCCTGAAGACCCTGC CGTCACACTCAAGCTCTGGA	IDO1 FW IDO1 RV	TGGGACATTCTTCAGTGGC TCTCGAAGCTGCCCGTTCT
MMP-2 FW MMP2-RV	TGCCGGCACCCTGAGGACTAC GGGCTGCCACGAGGAACA		

Les RT-qPCR ont été réalisées en duplicata pour chaque échantillon, sur StepOne™ RealTime PCR. Chaque mix de réaction contenait 5 µL de ADNc dilué (correspondant à 25 ng d'ARN), 13 µL de SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem), 1 µL d'amorce sens et 1 µL d'amorce anti-sens. Les conditions de PCR étaient : 2 minutes à 95°C, puis 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C (Figure 66).

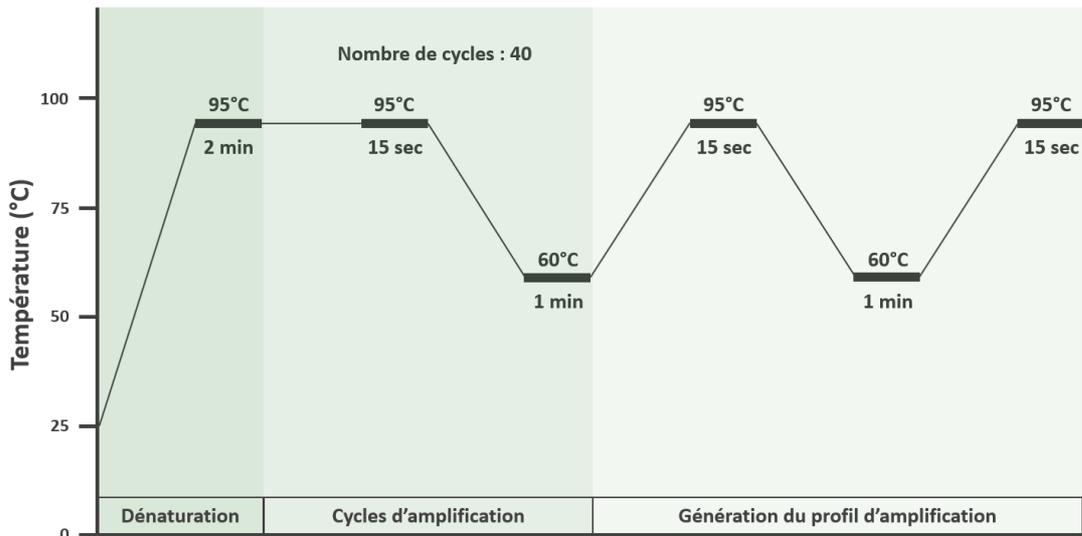


Figure 66 : Programme appliqué au thermocycleur pour amplifier les ADNc.

L'amplification de transcrits spécifiques était confirmée par un profil d'amplification généré à la fin du programme de PCR. Ce profil a permis d'isoler les valeurs Ct correspondant au cycle d'amplification durant lequel la fluorescence détectée a dépassé un certain seuil (Figure 67).

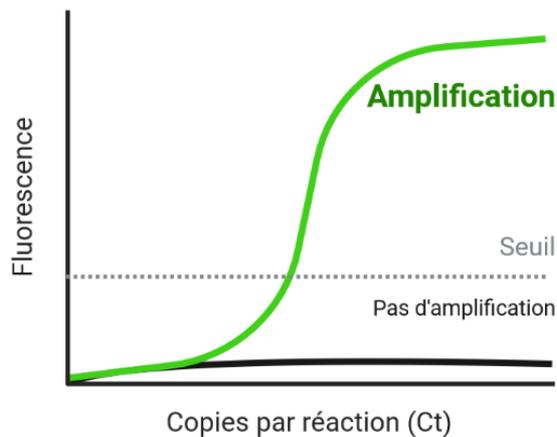


Figure 67 : Exemple d'un profil d'amplification permettant de déterminer la valeur du Ct.

La normalisation des résultats a été réalisée avec un contrôle endogène mesuré dans chaque échantillon : GAPDH et/ou β 2M. Le ΔCt correspond à la différence de Ct entre le gène d'intérêt et le contrôle endogène.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{contrôle endogène}}$$

Chaque valeur normalisée a été comparée avec un échantillon de référence appelé « calibreur ». Ce calibreur correspond à la moyenne des ΔCt du groupe contrôle. Le $\Delta\Delta Ct$ obtenu correspond à la différence de ΔCt entre l'échantillon analysé et l'échantillon calibreur.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{échantillon}} - \Delta Ct_{\text{calibreur}}$$

Enfin, la valeur RQ (Relative Quantification) indique le changement d'expression relatif entre l'échantillon testée et l'échantillon contrôle.

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

RESULTATS

IMPACT SUR LES LYMPHOCYTES INTRA-EPITHELIAUX (IELs)

Au contact direct du microbiome se trouve l'épithélium, contenant des Lymphocytes Intra-Epithéliaux (IELs). Pour les étudier, nous avons collecté les côlons de souris ayant reçu 2 semaines de régime inuline, puis nous avons analysé les IELs par cytométrie en flux. Les proportions de LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ n'ont pas été impactées par la consommation d'inuline (Figure 68).

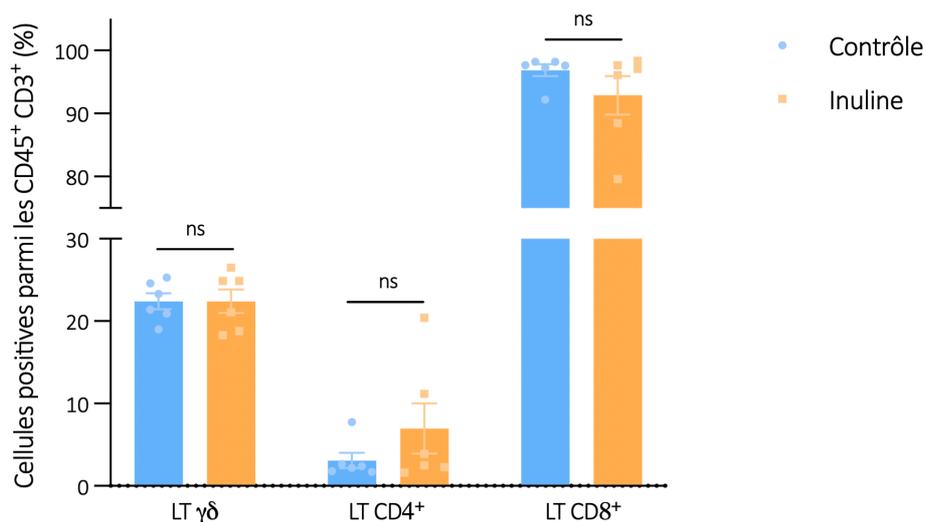


Figure 68 : Analyse des IELs du côlon. Proportion de LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$, sélectionnées parmi les cellules $CD45^+$, $CD3^+$ dans l'épithélium de côlon de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

Sous stimulation PMA/iono, la proportion de LTs $\gamma\delta$ producteurs d'IFN γ , une cytokine pro-inflammatoire, était doublée dans les IELs de souris nourries avec de l'inuline (Figure 69). En revanche, les proportions de LTs CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ n'ont pas été impactées par la consommation d'inuline.

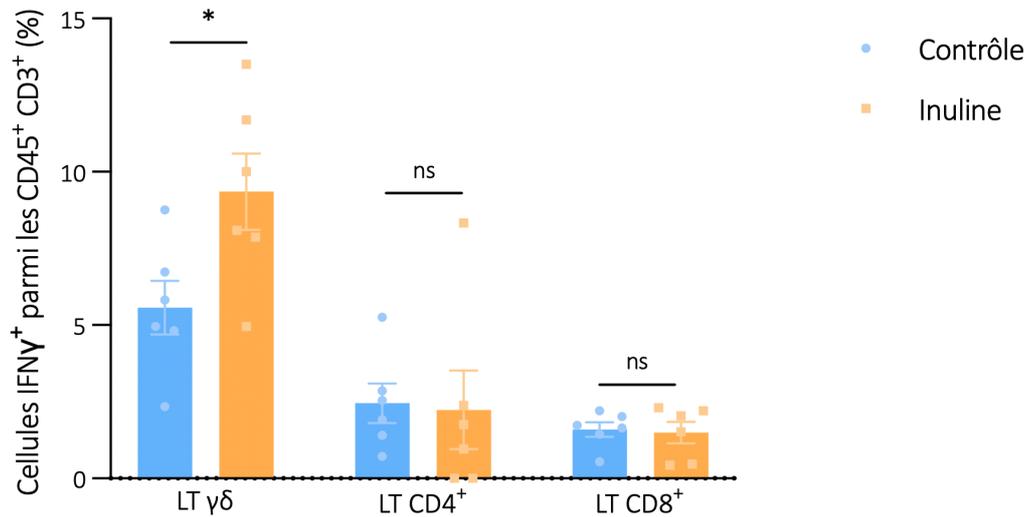


Figure 69 : Analyse des IELs produisant de l'IFN γ . Proportion des LTs intraépithéliaux produisant de l'IFN γ . Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif, * $p < 0,05$ avec un test Mann Whitney.

Pour mieux caractériser l'effet de l'inuline sur l'épithélium du côlon, nous avons récupéré les cellules non immunitaires de l'épithélium colique, et nous avons analysé le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans l'inflammation, la réparation tissulaire et les jointions serrées. Sur 9 gènes analysés, 4 gènes impliqués dans l'inflammation étaient significativement surexprimés ($p < 0,05$ Mann-Whitney) par les cellules épithéliales des souris nourries avec de l'inuline. Il s'agissait des gènes codant pour : le Facteur de nécrose Tumorale (TNF)- α , les Métalloprotéinase Matricielle (MMP)-2 et MMP-9, et la Cyclo-Oxygénase (COX)-2 (Figure 70).

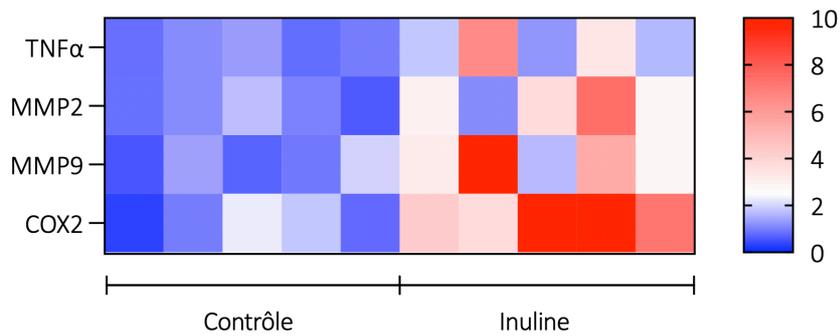


Figure 70 : Analyse de l'expression génique dans l'épithélium du côlon. Niveaux d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la réparation tissulaire et les jonctions serrées dans les cellules épithéliales coliques, de souris nourries avec un régime standard (n=5), ou enrichi en inuline (n=5). Le graphique représente les valeurs RQ de chaque souris.

En conclusion, le régime enrichi en inuline induit une réaction inflammatoire au niveau de l'épithélium du côlon, médiée à la fois par les cellules épithéliales et les IELs.

IMPACT SUR LES CELLULES DE LA LAMINA PROPRIA (LPCs)

En dessous de l'épithélium se trouve la Lamina Propria. Pour étudier l'impact de l'inuline sur les cellules qui la composent, nous les avons analysés par cytométrie en flux. Tout comme dans les IELs, les proportions de LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ n'ont pas été impactées par la consommation d'inuline (Figure 71).

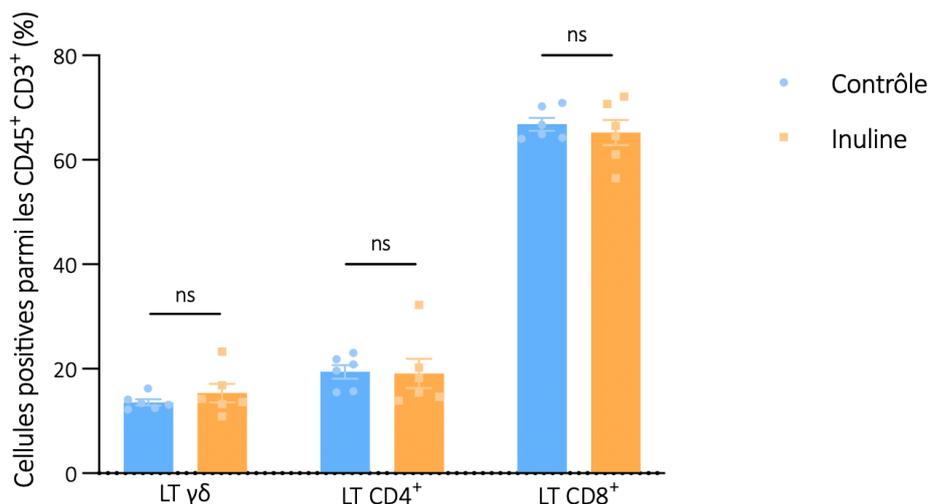


Figure 71 : Analyse des LPCs du côlon. Proportion de LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$, sélectionnées parmi les cellules $CD45^+$, $CD3^+$ dans la lamina propria de côlon de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

En revanche, nous avons observé une légère mais non-significative augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ produisant de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, dans la lamina propria des souris nourries avec de l'inuline (Figure 72).

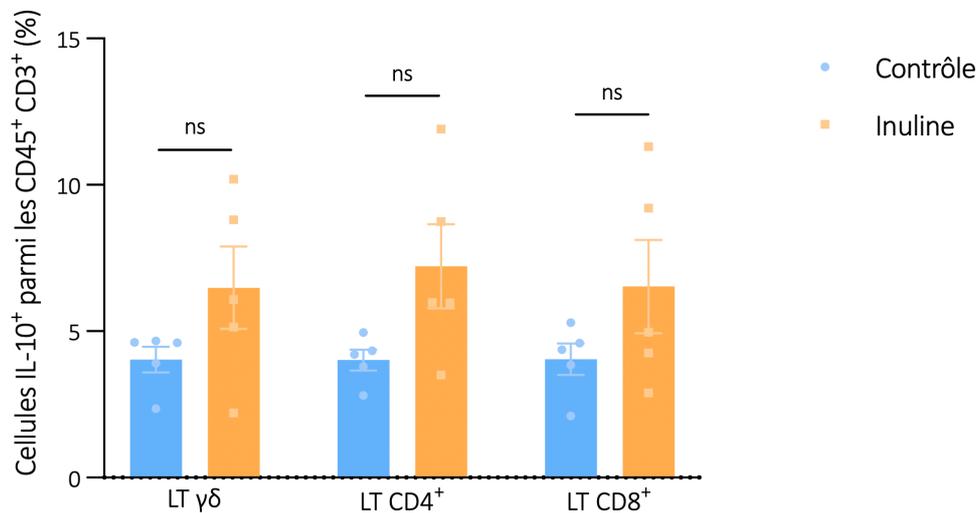


Figure 72 : Analyse des LPCs produisant de l'IL-10. Proportion des LTs de la lamina propria produisant de l'IL-10. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

Nous avons ensuite analysé le niveau d'expression de différents gènes impliqués dans l'inflammation, la réparation tissulaire et les jointions serrées. Parmi les 10 gènes analysés, 3 gènes impliqués dans la régulation de l'inflammation et l'intégrité tissulaire étaient significativement surexprimés ($p < 0,05$ Mann-Whitney) par les cellules de la lamina propria des souris nourries avec de l'inuline. Il s'agissait des gènes codant pour : le Forkhead Box P (FoxP)-3, l'Interleukine (IL)-22, et la Protéine Inflammatoire Macrophagique (MIP)-2 (Figure 73).

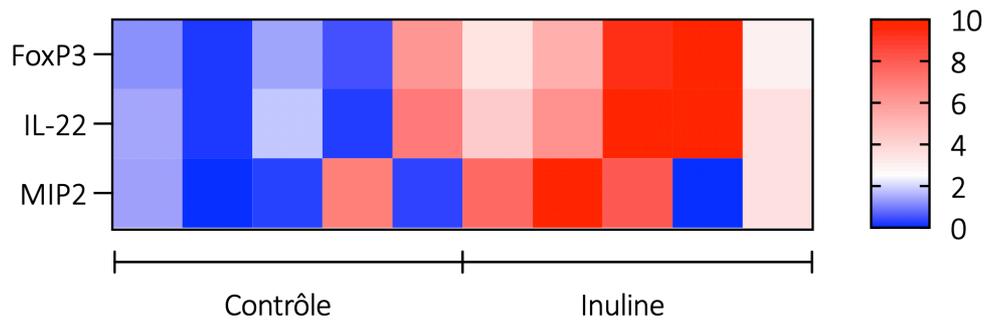


Figure 73 : Analyse de l'expression génique dans la lamina propria du côlon. Niveaux d'expression de gènes impliqués dans l'inflammation, la réparation tissulaire et les jonctions serrées dans les cellules de la lamina propria coliques, de souris nourries avec un régime standard (n=5), ou enrichi en inuline (n=5). Le graphique représente les valeurs RQ de chaque souris.

Le régime enrichi en inuline induit de la réparation tissulaire et de la tolérance immunitaire dans la lamina propria du côlon.

CONCLUSION

Le régime inuline module dans notre modèle l'immunité intestinale, à la fois dans l'épithélium, mais également dans la lamina propria. Il est intéressant de noter que les effets ne sont cependant pas les mêmes dans ces deux couches de la muqueuse intestinale. En effet, dans l'épithélium, le régime enrichi en inuline semble induire un effet pro-inflammatoire, en augmentant la proportion de LTs $\gamma\delta$ intraépithéliaux pouvant produire de l'IFN γ , et en augmentant l'expression de gènes impliqués dans l'inflammation par les entérocytes. A l'inverse, dans la lamina propria, le régime enrichi en inuline semble renforcer l'intégrité de la barrière intestinale, en augmentant l'expression de gènes impliqués dans la tolérance immunitaire et la réparation tissulaire. De plus, les LTs de la lamina propria de souris nourries avec de l'inuline tendent vers une polarisation anti-inflammatoire, avec une tendance légèrement plus haute à produire de l'IL-10 (Figure 74).

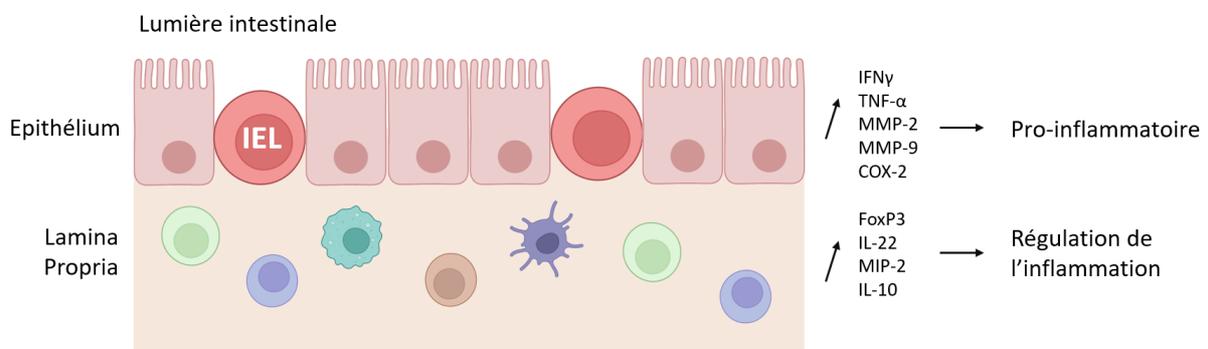


Figure 74 : Schéma résumant les effets de l'inuline sur l'immunité du côlon de souris.

III. EFFET ANTITUMORAL DE L'INULINE

Le régime enrichi en inuline semble moduler la composition du microbiote intestinal, en favorisant la présence de bactéries bénéfiques comme *Bifidobacterium animalis*. La présence de *Bifidobacterium* dans le microbiote intestinal de patients atteints de mélanome a été liée à une bonne réponse aux immunothérapies ainsi qu'à leur rémission [155]. De plus, le régime enrichi en inuline semble optimiser l'immuno-surveillance de son hôte, et renforçant son immunité intestinale. L'inuline, en modulant le microbiote intestinal et en renforçant le tonus immunitaire associé, pourrait exercer un effet antitumoral intéressant.

METHODOLOGIE : MODELES DE TUMEURS TRANSPLANTEES

Pour évaluer le possible effet antitumoral du régime enrichi en inuline, nous avons injecté en sous-cutané des cellules cancéreuses murines à des souris C57BL/6, après deux semaines de pré-conditionnement avec un régime enrichi en inuline, puis nous avons suivi la croissance tumorale durant 2 semaines supplémentaires, tout en maintenant le régime (Figure 75). Pour étudier le rôle du renforcement immunitaire induit par la consommation d'inuline dans ce modèle, nous avons récupéré les tumeurs après 2 semaines de croissance tumorale et nous avons analysé l'immunité infiltrant la tumeur par cytométrie en flux.

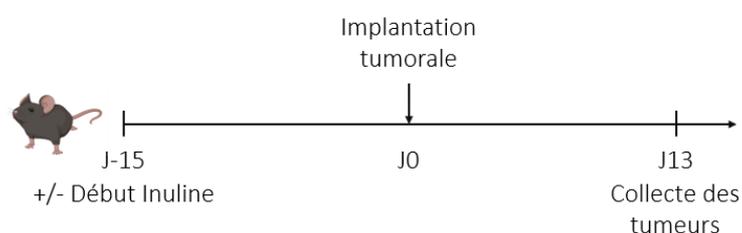


Figure 75 : Plan expérimental pour l'évaluation de l'effet antitumoral de l'inuline.

ANIMAUX

Voir page 99. Dans ce chapitre, des souris mâles et femelles ont été utilisées.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

CULTURE CELLULAIRE

LIGNEES CELLULAIRES

Trois lignées cellulaires de cancer murin ont été utilisées dans cette étude : B16 OVA, MC38 OVA et MCA205 OVA. Ces 3 lignées ont été sélectionnées car elles sont largement utilisées comme modèles murins de tumeurs transplantables dans la littérature, et peuvent être implantées en sous-cutané.

MELANOME B16 OVA

La lignée cellulaire mélanome B16 a été découverte et maintenue par le Jackson Laboratory en 1954, à la suite de l'apparition d'un mélanome spontanée sur une souris C57BL/6. Elle a depuis été transfectée avec un plasmide pour exprimer l'ovalbumine (OVA). Ces cellules sont adhérentes, fusiformes et allongées.

Les cellules B16 OVA ont été fournies par la Pr. L. Zitvogel de l'Institut Gustave Roussy, et cultivées en flasque T75 dans du milieu Dulbecco's modified essential medium (DMEM) complet (supplémenté avec 1 mM de pyruvate de sodium, 1% d'acides aminés non-essentiels, 50 U/mL pénicilline et 50 µg/mL streptomycine (Gibco)) 10% SVF. Les cellules étaient décongelées 10 jours avant l'implantation tumorale, et étaient passées au ¼ tous les 2 jours. Pour la sélection du plasmide contenant le gène OVA, l'antibiotique G418 (500µg/ml, Sigma) a été ajouté à partir du premier passage suivant la décongélation. La lignée a été testée sans mycoplasme (Mycoalert LT07-518 Lonza), et la présence du gène codant pour l'ovalbumine a été vérifiée par Théo Ziegelmeier de l'Institut of Advanced Biosciences, par Western Blot. Les cellules étaient maintenues en culture pendant 10 à 15 jours avant l'implantation tumorale.

CANCER COLORECTAL MC38 OVA

La lignée cellulaire d'adénocarcinome colorectal MC38 OVA est apparue chez une souris C57BL/6. Elle a ensuite été transfectée avec un plasmide pour exprimer l'ovalbumine (OVA). Ces cellules sont adhérentes, fusiformes et allongées.

Les cellules MC38 OVA ont été fournies par C. Fournier, Inserm U1209, et cultivées en flasque T75 dans du milieu DMEM complet 10% SVF. Les cellules étaient décongelées 10 jours avant l'implantation tumorale, et étaient passées au ¼ tous les 2 jours. Pour la sélection du plasmide contenant le gène OVA, l'antibiotique G418 (500µg/ml, Sigma) a été ajouté à partir du premier passage suivant la décongélation. La lignée a été testée sans mycoplasme. Les cellules étaient maintenues en culture pendant 10 à 15 jours avant l'implantation tumorale.

FIBROSARCOME MCA205 OVA

La lignée cellulaire MCA205 OVA est apparue à la suite de l'exposition de souris C57BL/6 à un cancérigène cutané appelé le MéthylCholAntrène (MCA). Elle a ensuite été transfectée avec un plasmide pour exprimer l'ovalbumine (OVA). Ces cellules sont adhérentes, fusiformes et allongées.

Les cellules MCA205 OVA ont été fournies par la Pr. L. Zitvogel de l'Institut Gustave Roussy, et cultivées en flasque T75 dans du milieu RPMI complet 10% SVF. Les cellules étaient décongelées 10 jours avant l'implantation tumorale, et étaient passées ½ tous les 2 jours. Pour la sélection du plasmide contenant le gène OVA, l'antibiotique Hygromycine B (50µg/ml, Sigma) a été ajouté à partir du premier passage suivant la décongélation. La lignée a été testée sans mycoplasme. Les cellules étaient maintenues en culture pendant 10 à 15 jours avant l'implantation tumorale.

IMPLANTATION TUMORALE

Le jour des implantations tumorales, les cellules en culture ont été détachées de leur support, lavées, comptées à l'aide de lames KOVA® et de bleu de trypan 0,02% et mises en suspension dans du Tampon Phosphate Salin (PBS, Phosphate Buffer Saline) 1X aux concentrations suivantes :

- 2 x 10⁶ cellules /mL pour les B16 OVA

- 5 x 10⁶ cellules/mL pour les MC38 OVA
- 2 x 10⁶ cellules /mL pour les MCA205 OVA

Ces suspensions cellulaires ont été gardées à température ambiante jusqu'à l'implantation *in vivo*. Les flancs droits des souris ont été rasés à l'aide d'une tondeuse électrique pour permettre l'injection sous-cutanée de 100 µL de chaque suspension cellulaire. Suivant les lignées cellulaires utilisées, les souris ont donc reçu :

- 2 x 10⁵ cellules /mL pour les B16 OVA
- 5 x 10⁵ cellules/mL pour les MC38 OVA
- 2 x 10⁵ cellules /mL pour les MCA205 OVA

Environ 7 jours plus tard, les tumeurs sont devenues palpables, et ont été mesurées tous les 2 à 3 jours avec un pied à coulisse. La taille des tumeurs (en mm²) a été mesurée suivant la formule suivante :

$$Taille_{tumeur} = longueur \times largeur$$

L'état général des animaux était évalué tous les 2 à 3 jours à partir de l'implantation tumorale. Si une souris présentait le moindre signe de souffrance, elle était placée sous surveillance accrue (évaluation de son état général tous les jours).

Pour les représentations graphiques, les volumes des tumeurs (en mm³) ont été calculés, suivant la formule suivante, en accord avec la littérature :

$$Volume_{tumeur} = 0,5 \times (longueur \times largeur^2)$$

COLLECTE ET DIGESTION DES TUMEURS

Dès qu'une tumeur atteignait la taille éthique maximale de 150 mm², toutes les souris étaient euthanasiées par dislocation cervicale afin de récupérer les tumeurs. Une fois collectées, les tumeurs étaient placées dans 2 mL de milieu RPMI dans une plaque 6 puits. Avec une paire de scalpels, les tumeurs ont été lacérées jusqu'à l'obtention d'un mélange quasi-homogène. Afin de compléter la digestion des tumeurs, 2 mL d'un tampon de digestion 2X contenant 50 µg/mL

de Liberase™ (Roche) ont été ajoutés sur chaque tumeur. Ainsi, les tumeurs ont été incubées 15 à 30 minutes (15 minutes pour les B16 OVA, 20 minutes pour les MC38 OVA et 30 minutes pour les MCA205 OVA) à 37°C avec 25 µg/mL de Liberase™ dans du RPMI. A la fin de la digestion, 2 mL de RPMI 10% SVF ont été ajoutés à chaque puits afin d'arrêter l'action de la Libérase™. Le contenu des puits a ensuite été transféré sur un tamis cellulaire de 70 µm sur un tube de 50 mL. Les tumeurs ont été écrasées sur le tamis, puis le tamis a été lavé avec 10 mL de RPMI complet 10% SVF. Les cellules obtenues ont été centrifugées 6 minutes à 600 g, puis suspendues dans 1 mL de RPMI 10% SVF.

CYTOMETRIE EN FLUX

Voir page 119, pour le protocole et pour la liste d'anticorps utilisés (Tableau 3).

RESULTATS

EFFET INHIBITEUR DE LA CROISSANCE TUMORALE

Pour évaluer le possible effet antitumoral du régime enrichi en inuline, nous avons injecté en sous-cutané des cellules de mélanome murin B16 OVA à des souris C57BL/6, après deux semaines de pré-conditionnement avec un régime enrichi en inuline, puis nous avons suivi la croissance tumorale durant 2 semaines supplémentaires. En accord avec une étude publiée par Li. *et al.* dans Cell Report [202], nous avons montré qu'un régime enrichi en inuline pendant 2 semaines avant l'implantation tumorale inhibe à 89% la croissance du mélanome (Figure 76).

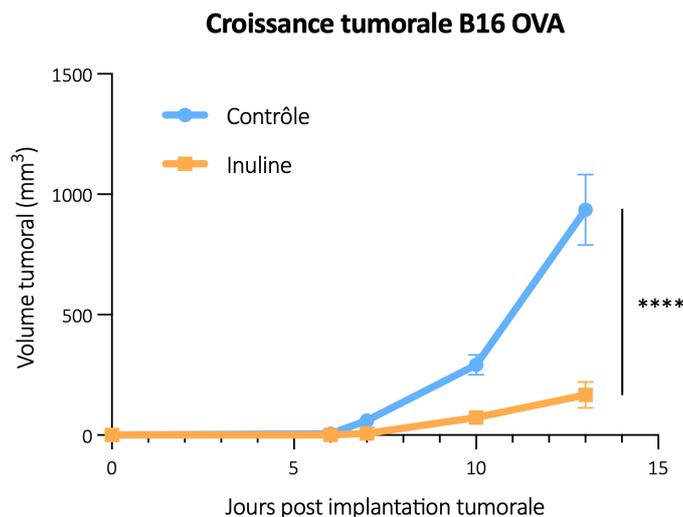


Figure 76 : Effet antitumoral du régime inuline. Croissance tumorale chez des souris C57BL/6 nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et ayant reçu en injection sous-cutanée 2×10^5 cellules de mélanome murin B16 OVA (n=6 par groupe). Les courbes représentent les moyennes \pm SEM. ****p < 0,0001 en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

Cet effet antitumoral du régime enrichi en inuline a été confirmé chez des souris mâles (Figure supplémentaire S2).

IMMUNITE INFILTRANT LA TUMEUR

Pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine de cette observation, nous avons analysé l'immunité infiltrant les tumeurs B16 OVA par cytométrie en flux. Dès qu'une tumeur a atteint la taille éthique maximale (13 jours post implantation tumorale de la B16 OVA), les tumeurs de toutes les souris ont été récupérées et traitées comme décrit page 134. L'étude par cytométrie en flux a révélé une plus grande infiltration en leucocytes (CD45⁺) dans les tumeurs de souris nourries avec de l'inuline, comparé aux souris nourries avec un régime standard (Figure 77).

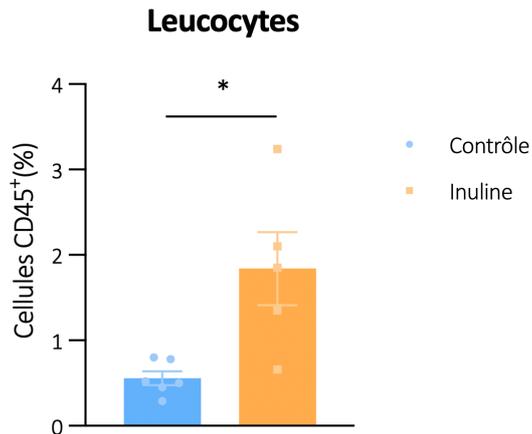


Figure 77 : Infiltration tumorale. Proportion de cellules CD45⁺ parmi toutes les cellules dans les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=5). L'histogramme représente la moyenne \pm SEM. *p < 0,05 avec un test Mann Whitney.

Les populations de LTs infiltrant les tumeurs (TILs, Tumor-Infiltrated Lymphocytes) semblaient être les plus impactées par la consommation d'inuline. En effet, parmi les LTs (CD45⁺ CD3⁺), la proportion de LTs non-conventionnels $\gamma\delta$ était significativement augmentée dans les tumeurs inuline, au détriment de la proportion de LTs CD8⁺ (Figure 78).

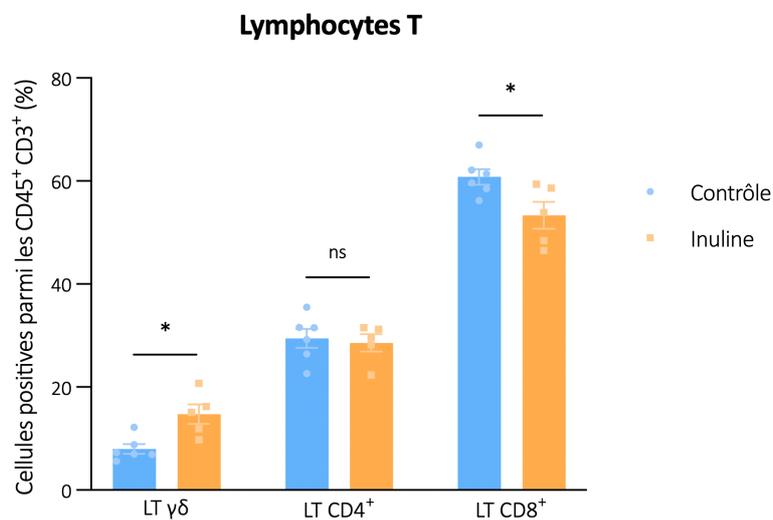


Figure 78 : LTs infiltrant les tumeurs. Proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ parmi les cellules CD45⁺, CD3⁺ infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=5). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif, *p < 0,05 avec un test Mann Whitney.

L'augmentation de la proportion de LTs intra-tumoraux dans les tumeurs de souris nourries avec de l'inuline a également été confirmée chez des souris mâles (Figure supplémentaire S3).

De façon cohérente avec le fort effet inhibiteur de croissance tumoral observé, le régime inuline a également entraîné une réponse Th1 antitumorale illustrée par l'augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ produisant de l'IFN γ dans les TILs (Figure 79).

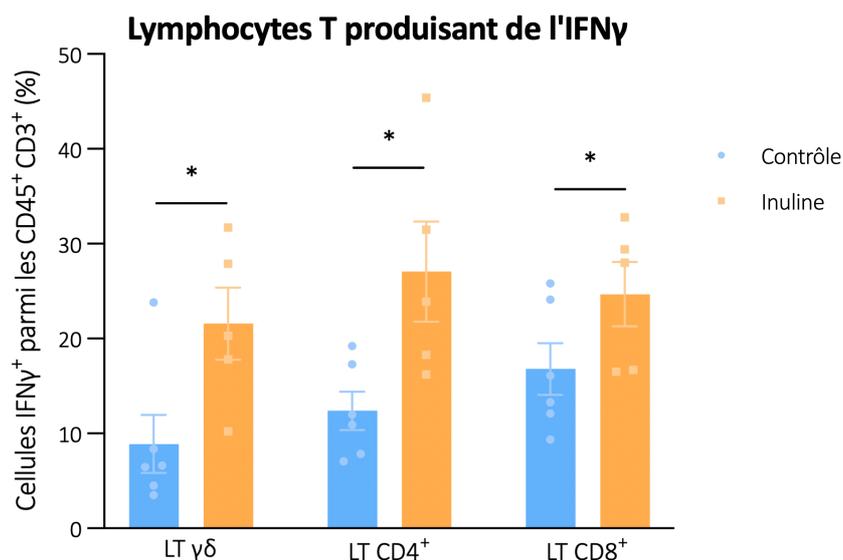


Figure 79 : LTs produisant de l'IFN γ . Proportion des LTs produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=5). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif, *p < 0,05 avec un test Mann Whitney.

Pour investiguer l'origine de l'activation des LTs sous inuline, nous avons étudié les cellules présentatrices d'antigènes. En accord avec la publication de Li *et al.* dans Cell Reports, nous avons montré que la consommation d'inuline semblait entraîner une plus grande infiltration tumorale en cellules dendritiques ($CD11c^+$ MHCII $^+$) (Figure 80).

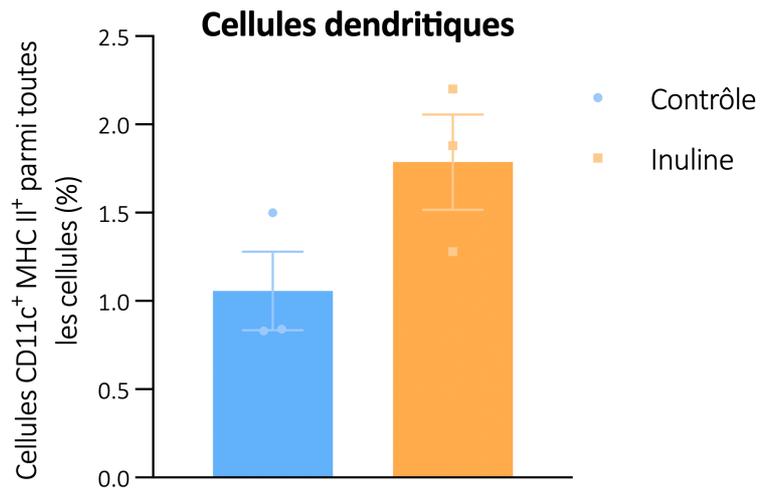


Figure 80 : Cellules dendritiques. Proportion de cellules dendritiques parmi toutes les cellules infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=3) ou enrichi en inuline (n=3). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM.

Nous avons analysé différents marqueurs d'activation des cellules dendritiques pour caractériser leur implication dans l'effet antitumoral de l'inuline :

- CD40 : Marqueur d'activation des cellules dendritiques.
- CD86 : Molécule co-stimulatrice présente sur les cellules dendritiques matures.
- PD-L1 : Régulateur de l'activation des LTs.
- PD-L2 : Inhibiteur de l'activation des LTs.

Aucun des marqueurs de surface des cellules dendritiques analysés n'a été impacté par le régime enrichi en inuline. En effet, les proportions de cellules dendritiques exprimant CD40, CD86, PD-L1 et PD-L2 ainsi que la moyenne d'intensité de fluorescence de ces marqueurs étaient très similaires entre les groupes contrôle et inuline (Figure 81).

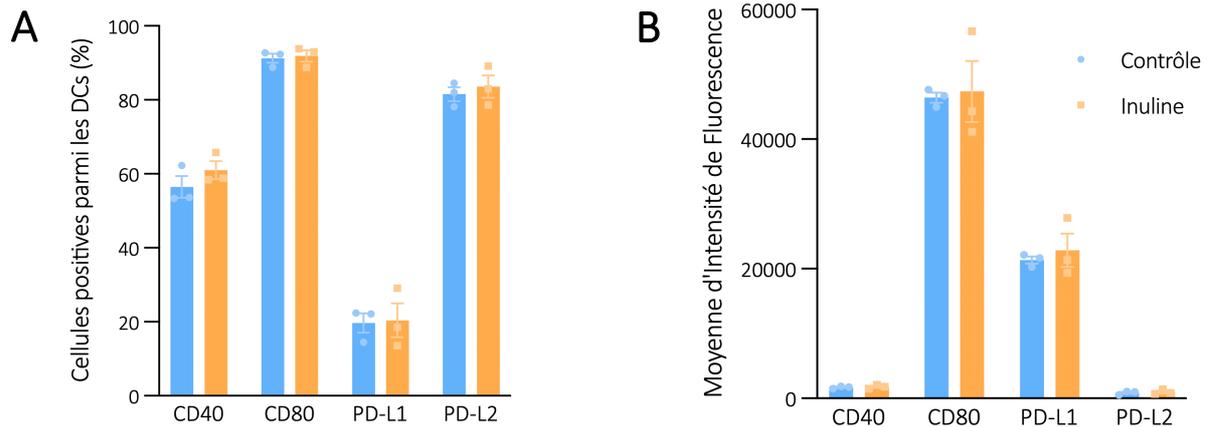


Figure 81 : Fonction des cellules dendritiques. (A) Fréquences et (B) moyennes d'intensité de fluorescence de marqueurs d'activation des cellules dendritiques dans les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=3) ou enrichi en inuline (n=3). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM.

Même si les tumeurs de souris inuline semblaient être plus infiltrées par des cellules dendritiques que les tumeurs contrôles, leurs marqueurs d'activation et donc leur capacité à présenter des antigènes tumoraux aux LTs ne semblaient pas impactés par la consommation d'inuline. Pour confirmer cette observation, nous avons analysé les populations de LTs spécifiques de l'OVA (ovalbumine, antigène exprimé par les tumeurs B16 OVA). Pour cela, nous avons utilisé un dextramer OVA, permettant de marquer les LTs CD4⁺ et CD8⁺ dont le TcR a été précédemment activé spécifiquement contre l'antigène OVA. En accord avec le phénotype des cellules dendritiques observé, les proportions de LTs CD4⁺ et CD8⁺ spécifiques de l'OVA ne semblaient pas impactées par le régime inuline (Figure 82).

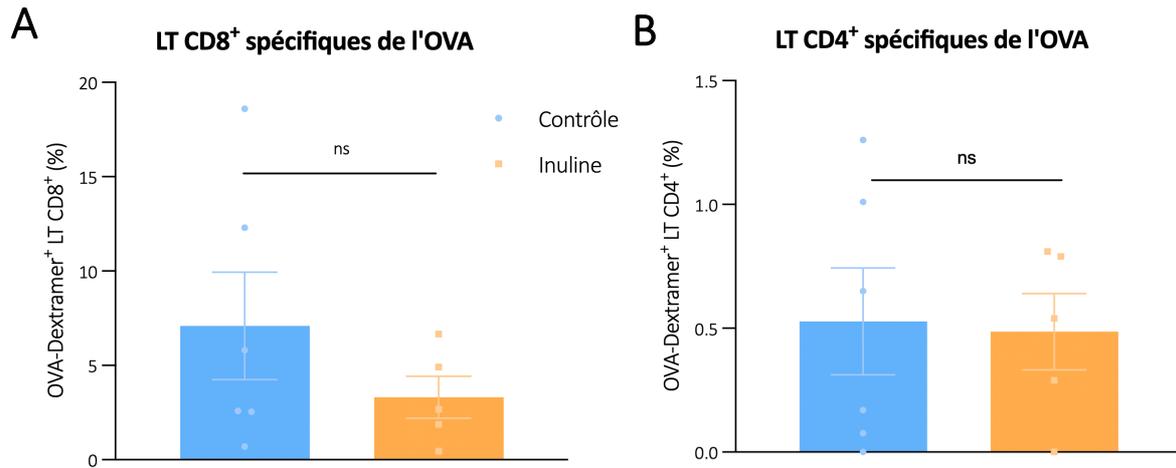


Figure 82 : LTs spécifiques de l'OVA. Proportions des LTs (A) CD8⁺ et (B) CD4⁺ spécifiques de l'ovalbumine dans les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=3) ou enrichi en inuline (n=3). Les histogrammes représentent la moyenne ± SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

EXTENSION A D'AUTRES MODELES DE TUMEURS TRANSPLANTABLES

L'effet antitumoral médié par le régime inuline a été étendu à deux autres modèles de tumeurs transplantables : le cancer colorectal MC38 OVA (Figure 83A) et le fibrosarcome MCA205 OVA (Figure 83B). Ainsi, nous avons montré que la consommation d'inuline durant 2 semaines avant l'implantation tumorale permet d'inhiber la croissance tumorale de 86% dans le modèle MC38 OVA et de 77% dans le modèle MCA205 OVA par rapport aux souris nourries avec un régime standard.

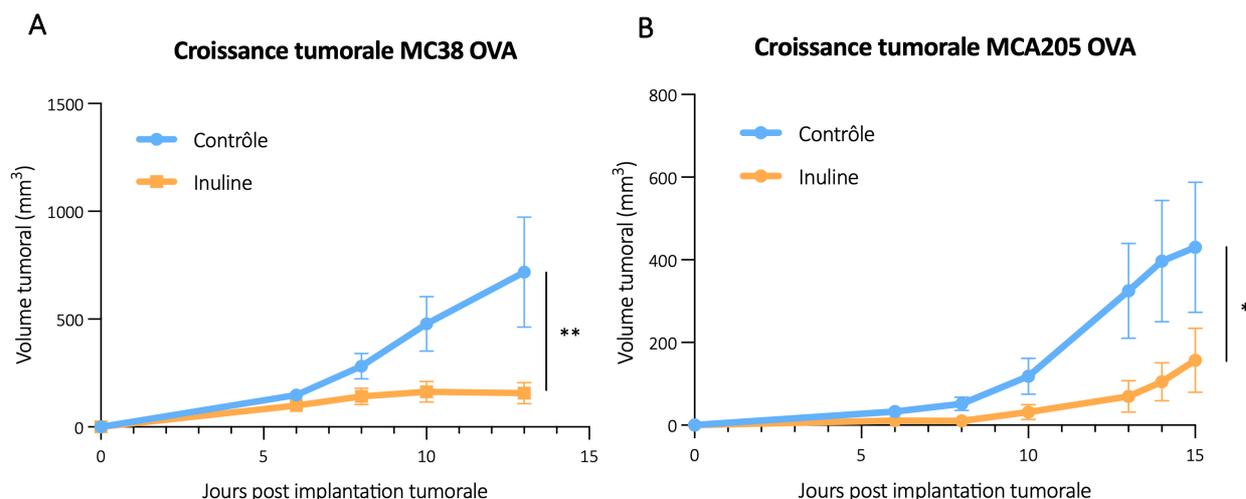


Figure 83 : Effet antitumoral du régime inuline dans plusieurs modèles de tumeurs transplantées. Croissances tumorales de souris C57BL/6, nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et ayant reçu en injection sous-cutanée de (A) 5×10^5 cellules de cancer colorectal murin MC38 OVA ($n=6$ par groupe), ou (B) 2×10^5 cellules de fibrosarcome murin MC38 OVA ($n=6$ par groupe). Les courbes représentent les moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$ en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

Pour confirmer l'implication de la modulation immunitaire apportée par le régime enrichi en inuline, nous avons analysé les populations de LTs infiltrant les tumeurs. De manière très intéressante, et tout comme dans le mélanome B16 OVA, la proportion de LTs $\gamma\delta$ était significativement augmentée dans les cancers colorectaux MC38 OVA (Figure 84A) et dans les fibrosarcomes MCA205 OVA (Figure 84B) de souris nourries avec de l'inuline.

Cependant, le régime inuline n'a pas entraîné d'augmentation de la proportion de LTs produisant de l'IFN γ dans ces modèles (Figure 85).

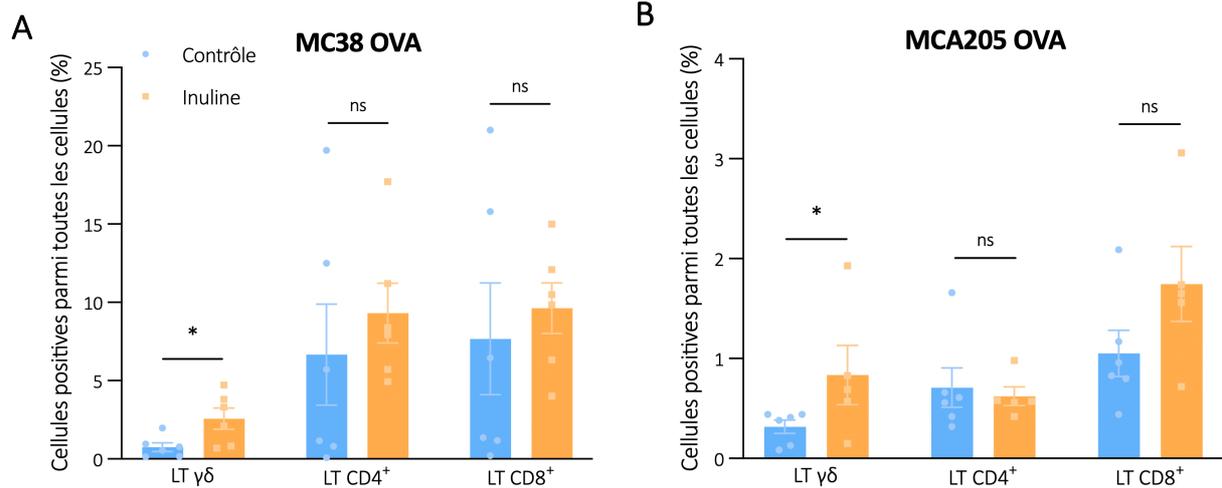


Figure 84 : Immunité infiltrant les tumeurs dans plusieurs modèles de tumeurs transplantées. Proportion de LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$, sélectionnées parmi toutes les cellules infiltrées dans les tumeurs (A) MC38 OVA ou (B) MCA205 OVA de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 par groupe). Les courbes représentent les moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$ en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM. ns = non-significatif, * $p < 0,05$, en test de Mann Whitney.

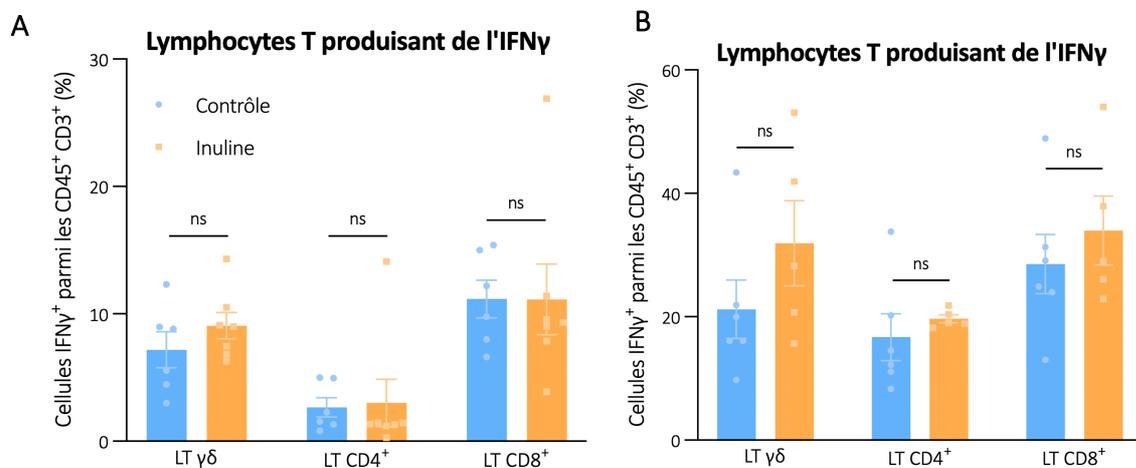


Figure 85 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ dans plusieurs modèles de tumeurs transplantées. Proportion de LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ produisant de l'IFN γ dans les tumeurs (A) MC38 OVA ou (B) MCA205 OVA de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 par groupe). Les courbes représentent les moyennes \pm SEM. * $p < 0,05$, ** $p < 0.01$ en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse. Les histogrammes représentent les moyennes \pm SEM. ns = non-significatif, * $p < 0,05$, en test de Mann Whitney.

CONCLUSION

Le régime inuline exerce un fort effet antitumoral en renforçant l'immunité infiltrant les tumeurs. En effet, un régime enrichi en inuline durant 2 semaines avant l'implantation tumorale chez la souris permet d'inhiber la croissance tumorale de 80% dans 3 tumeurs injectées en sous-cutané. De plus, nous avons montré une augmentation significative de l'infiltration tumorale en LTs $\gamma\delta$ dans les 3 modèles tumoraux. Dans le mélanome B16 OVA, cette observation s'accompagne de l'augmentation de la proportion des LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ produisant de l'IFN γ , ainsi qu'une augmentation de l'infiltration en DCs (Figure 86). Cette présence des LTs non-conventionnels $\gamma\delta$ intra-tumoraux et intra-épithéliaux dans le côlon nous a amenés à questionner leur importance dans l'effet antitumoral médié par l'inuline.

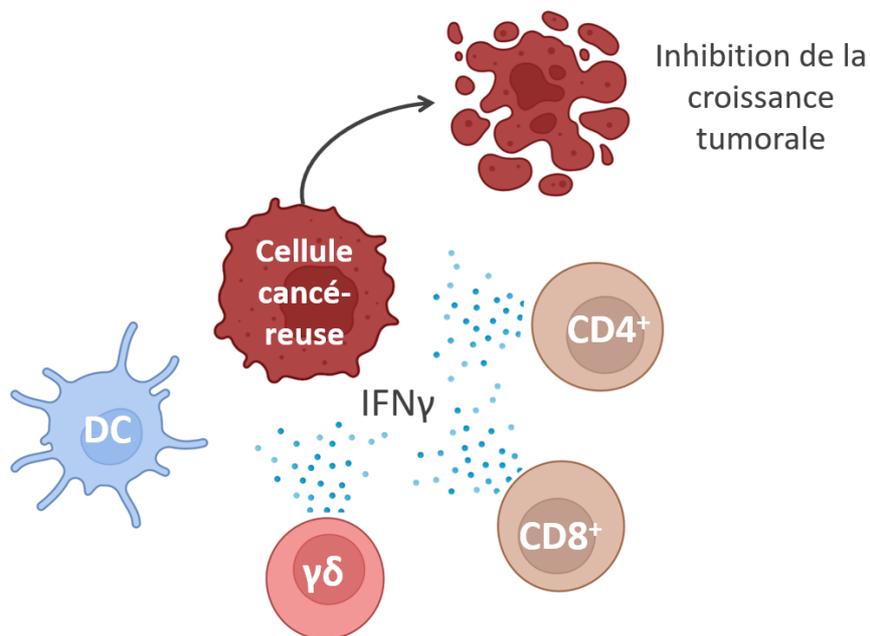


Figure 86 : Effet antitumoral de l'inuline.

IV. ROLE DES LYMPHOYTES T $\gamma\delta$ DANS L'EFFET ANTITUMORAL DE L'INULINE

Le régime enrichi en inuline renforce l'immunité intestinale et intra-tumorale. Parmi les cellules affectées par ce régime, les LTs $\gamma\delta$ semblent être des cellules cibles de l'effet antitumoral de l'inuline. En conditions physiologiques, le régime inuline augmente la proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$ produisant le l'IFN γ dans l'épithélium du côlon. Chez des souris porteuses de tumeurs (mélanome, ou cancer colorectal ou fibrosarcome), la proportion de LTs $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs est significativement augmentée. Le renforcement des LTs $\gamma\delta$ par le régime inuline pourrait être la clé de son effet antitumoral.

METHODOLOGIE : BLOPAGE *IN VIVO* DES $\gamma\delta$ TCR

Pour évaluer l'implication des LTs $\gamma\delta$ dans l'effet antitumoral du régime enrichi en inuline, nous avons injecté en sous-cutané des cellules de mélanome murin à des souris C57BL/6, après deux semaines de pré-conditionnement avec un régime enrichi en inuline et un blocage des $\gamma\delta$ TcR à partir de la veille de l'implantation tumorale (Figure 87). Après 2 semaines de suivi de la croissance tumorale, nous avons analysé l'immunité infiltrant la tumeur par cytométrie en flux.

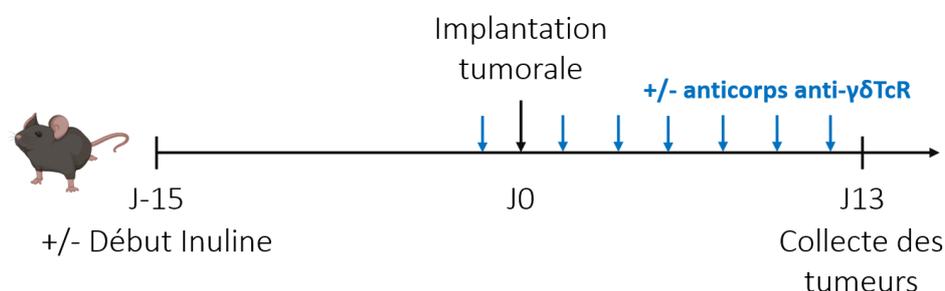


Figure 87 : Plan expérimental pour l'évaluation de l'implication des LTs $\gamma\delta$ dans l'effet antitumoral de l'inuline.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

BLOCAGE *IN VIVO* DES $\gamma\delta$ TCR

Les souris reçurent 100 μ L de PBS 1X contenant 100 μ g d'anticorps monoclonal anti- $\gamma\delta$ TcR (clone UC7-13D5, Bio X Cell) en intra-péritonéal. Les anticorps anti- $\gamma\delta$ TCR ont été injectés la veille de l'implantation tumorale, puis tous les 2 jours jusqu'à la fin de l'expérimentation.

CULTURE CELLULAIRE

Voir page 132.

IMPLANTATION TUMORALE

Voir page 133.

COLLECTE ET DIGESTION DES TUMEURS

Voir page 134.

CYTOMETRIE EN FLUX

Voir page 119. La liste des anticorps utilisés est présentée en Tableau 8.

Tableau 8 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des TILs

Fluorochrome	Cible
Laser bleu (488 nm)	
FITC	CD3
PE	IL-10
PerCP-Cy TM 5.5	CD4
Laser rouge (640 nm)	
APC	IFN γ
APC-Cy7	CD45
Laser Violet	
BD Horizon TM Brilliant Violet 421	IL-17
BD Horizon TM V500	Marqueur de viabilité

Pour éviter une compétition entre les anticorps anti- $\gamma\delta$ TcR injectés *in vivo* et les anticorps anti- $\gamma\delta$ marqués pour la cytométrie en flux, nous avons utilisé une nouvelle méthode de sélection des LTs $\gamma\delta$ présentée en Figure 88. Les cellules $CD45^+ CD3^+ CD4^+ CD8^-$ étaient identifiées comme LTs $CD4^+$. Les cellules $CD45^+ CD3^+ CD4^- CD8^+$ étaient identifiées comme LTs $CD8^+$.

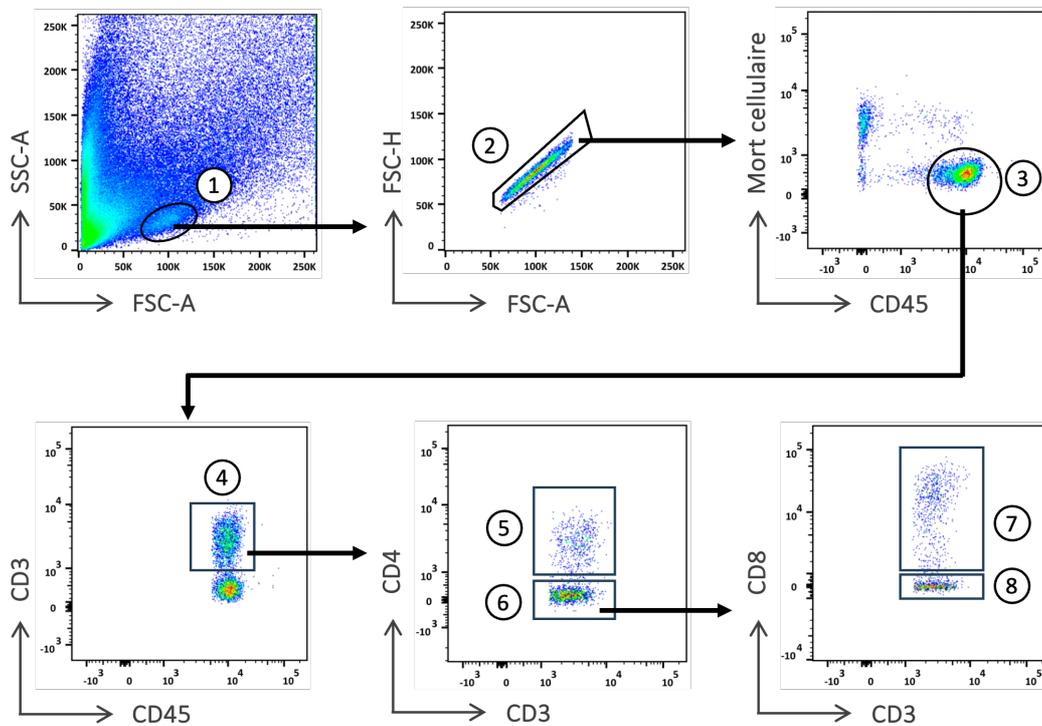


Figure 88 : Sélection des lymphocytes T pour les analyses de cytométrie en flux. Nuages de points illustrant la stratégie de sélection des LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$. ① Lymphocytes, en fonction de leur taille et granulométrie. ② Singulets. Expulsion des cellules doubles (attachées entre elles). ③ Cellules immunitaires vivantes. ④ Lymphocytes T. ⑤ Lymphocytes T $CD4^+$. ⑥ Autres Lymphocytes T. ⑦ Lymphocytes T $CD8^+$. ⑧ Lymphocytes T $\gamma\delta$.

RESULTATS

LES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$: DES ACTEURS CLES DE L'EFFET ANTITUMORAL DE L'INULINE

En condition physiologiques et pathologiques (chez des souris porteuses de tumeurs), les LTs $\gamma\delta$ semblent être la cible de l'effet immunostimulant du régime enrichi en inuline. Afin de tester leur implication dans l'effet antitumoral du régime inuline, nous avons suivi la croissance tumorale de mélanome B16 OVA chez des souris après blocage de leurs $\gamma\delta$ TcR. Nous avons pu observer que l'effet antitumoral de l'inuline est complètement abrogé lorsque les LTs $\gamma\delta$ voient leur $\gamma\delta$ TcR bloqués (Figure 89).

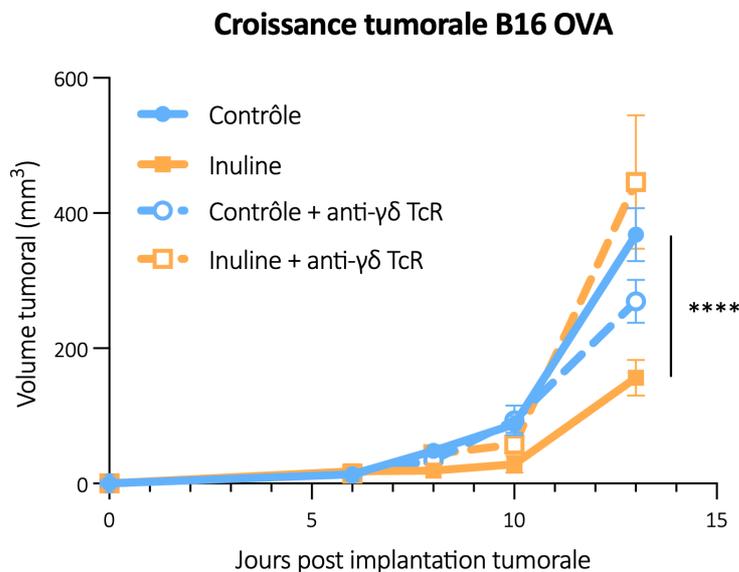


Figure 89 : Effet antitumoral du régime inuline après blocage des $\gamma\delta$ TcR in vivo. Croissance tumorale chez des souris C57BL/6 nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et ayant reçu une injection sous-cutanée de 2×10^5 cellules de mélanome murin B16 OVA (n=12 par groupe). La veille de l'implantation tumorale, puis tous les 2 jours, des anticorps anti- $\gamma\delta$ TcR ont été injectés par voie intra-péritonéale à 6 souris par groupe. Les courbes représentent les moyennes + SEM. ns = non-significatif, ****p < 0,0001 en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

L'analyse de l'immunité infiltrant les tumeurs a permis de montrer que lorsque les $\gamma\delta$ TcR sont bloqués, le renforcement immunitaire intra-tumoral de l'inuline est complètement annulé. En effet, la proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ n'est pas augmentée (Figure 90), et est donc comparable entre les tumeurs de souris contrôles et inulines.

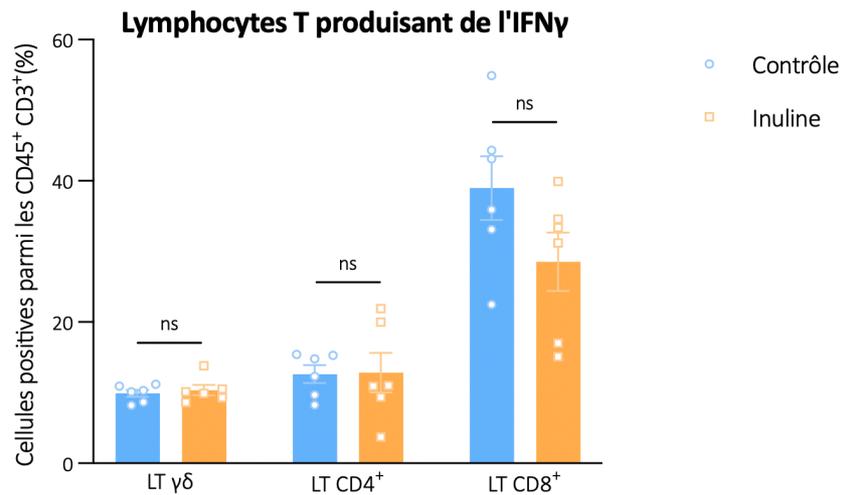


Figure 90 : LTs produisant de l'IFN γ . Proportion des LTs produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 par groupe). La veille de l'implantation tumorale, puis tous les 2 jours, des anticorps anti- $\gamma\delta$ TcR ont été injectés par voie intrapéritonéale. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif, avec un test Mann Whitney.

LES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ PRODUISANT DE L'IFN γ : UN MARQUEUR DE BON PRONOSTIC

En accord avec nos observations, les LTs $\gamma\delta$ ont précédemment été décrits comme pouvant être des marqueurs de bon pronostic chez les patients atteints de cancer [219–221]. Nous avons donc étudié le lien entre l'infiltration tumorale en LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ et la croissance tumorale. Nous avons observé une corrélation négative significative entre le pourcentage de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ et la croissance tumorale dans les 3 modèles tumoraux précédemment présentés : le mélanome B16 OVA, le cancer colorectal MC38 OVA et le fibrosarcome MCA205 OVA (Figure 91).

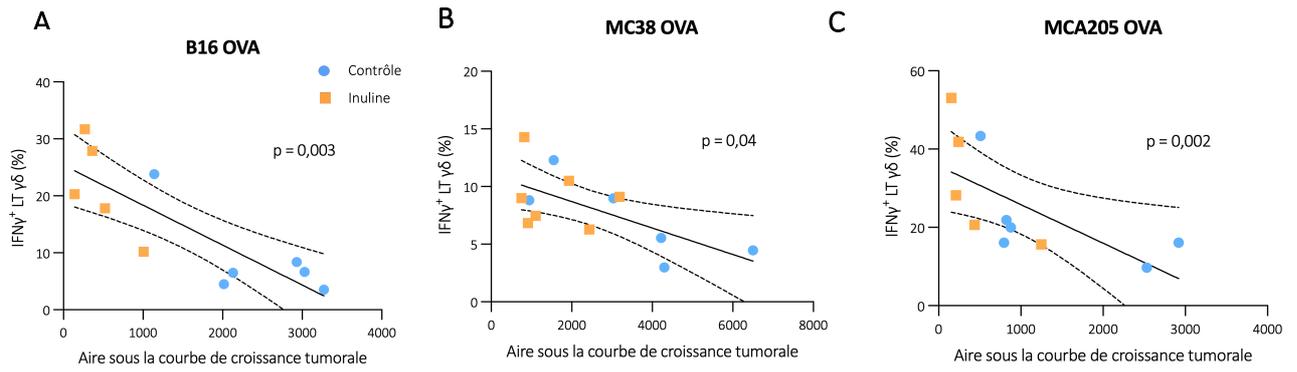


Figure 91 : LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ et croissances tumorales. Corrélation entre l'infiltration tumorale en LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ et la croissance tumorale de (A) mélanome B16 OVA, (B) cancer colorectal MC38 OVA, ou (C) fibrosarcome MCA205 OVA chez des souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 par groupe). Les RQ ont été calculés avec un test de Spearman.

CONCLUSION

L'effet antitumoral du régime inuline est abrogé chez des souris dont les $\gamma\delta$ TcR ont été bloqués par l'injection d'anticorps les ciblant. De plus, l'augmentation de l'infiltration immunitaire normalement observée dans les tumeurs de souris nourries avec de l'inuline est ici absente. Ces observations nous permettent de conclure que les LTs $\gamma\delta$ sont des acteurs immunitaires clés de l'effet antitumoral du régime inuline. De plus, nous n'observons plus d'augmentation de la proportion de LTs $CD4^+$ et $CD8^+$ produisant de l' $IFN\gamma$. Cela suggère qu'en plus de leur activité cytotoxique, les LTs $\gamma\delta$ pourraient exercer un rôle dans l'activation et la polarisation Th1 des LTs $CD4^+$ et des $CD8^+$ (Figure 92).

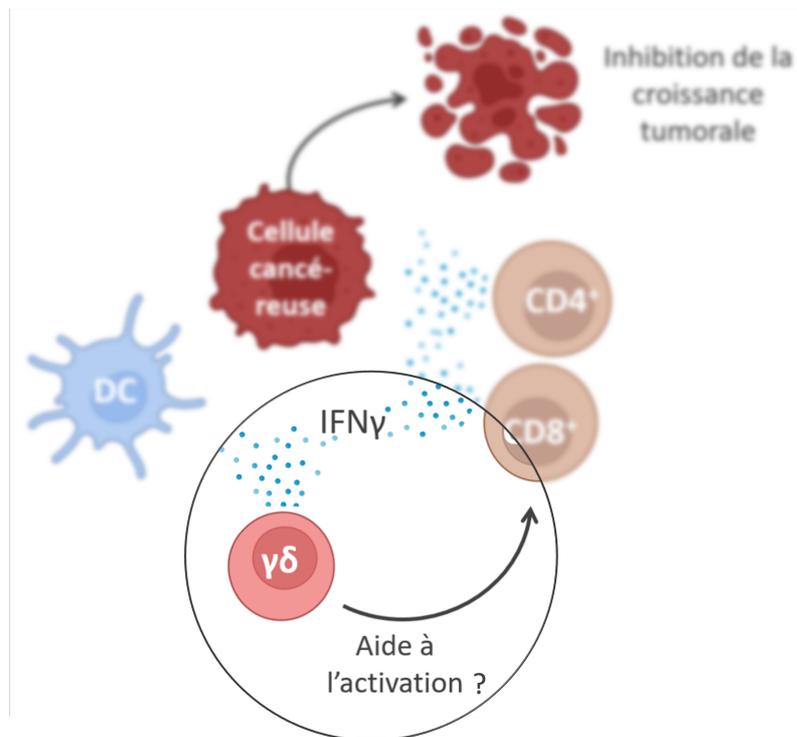


Figure 92 : Les lymphocytes T $\gamma\delta$: acteurs clés de l'effet antitumoral du régime inuline.

V. CARACTERISATION DES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ INTRA-TUMORAUX

Les LTs $\gamma\delta$ sont indispensables à l'effet antitumoral de l'inuline. Leur polarisation Th1 sous régime inuline suggère qu'ils sont des acteurs centraux dans l'élimination de cellules cancéreuses. Nous avons donc analysé leur capacité cytotoxique en évaluant l'expression de différents marqueurs à leur surface.

En plus d'annuler l'inhibition de la croissance tumorale, le blocage des $\gamma\delta$ TcR empêche la polarisation Th1 des LTs conventionnels CD4⁺ et CD8⁺. Cette observation suggère que les LTs $\gamma\delta$ pourraient aider à leur activation. En effet, il a été décrit que les LTs $\gamma\delta$ humains peuvent acquérir une fonction de cellules présentatrices d'antigènes (APC, Antigen Presenting Cell) une fois activés [222,223]. Ils surexpriment alors MHC I et II, afin de présenter des antigènes aux LTs conventionnels. Nous avons évalué la capacité des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux de souris nourries avec de l'inuline à acquérir une fonction APC.

METHODOLOGIE : EVALUATION DES CAPACITES CYTOTOXIQUES ET DE CELLULES PRESENTATRICES D'ANTIGENES DES LTs $\gamma\delta$ INTRA-TUMORAUX

Pour évaluer le rôle cytotoxique des LTs $\gamma\delta$ dans l'effet antitumoral du régime enrichi en inuline, nous avons injecté en sous-cutané des cellules de mélanome murin B16 OVA à des souris C57BL/6, après deux semaines de pré-conditionnement avec un régime standard ou enrichi en inuline. Après 2 semaines de suivi de la croissance tumorale, nous avons évalué l'expression de différents marqueurs impliqués dans la cytotoxicité (Tableau 9) et dans la capacité APC des LTs $\gamma\delta$ (Tableau 10) (Figure 93).

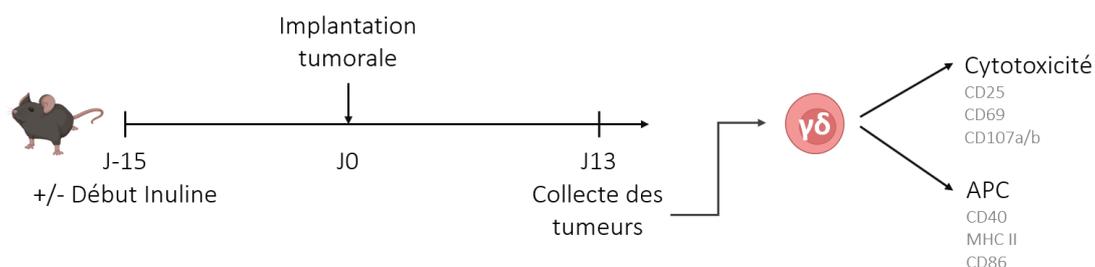


Figure 93 : Plan expérimental pour l'analyse des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux.

Tableau 9 : Marqueurs analysés à la surface des LTs $\gamma\delta$ pour évaluer leur capacité cytotoxique.

Marqueur	Rôle
CD25	CD25 est un marqueur des LTs activés. Dans le récepteur de haute affinité à l'IL-2, il correspond à la chaîne α du récepteur. L'IL-2 est impliquée dans la prolifération et la différenciation des LTs.
CD69	CD69 est un marqueur précoce d'activation des LTs, des LBs et des Natural Killers (NKs). En cancer, CD69 est également impliqué dans la régulation de l'épuisement fonctionnel des LTs.
CD107a/b	CD107a/b est un marqueur de dégranulation des LTs. L'expression en surface de CD107a/b montre que le LT marqué a relargué des granules cytotoxiques.

Tableau 10 : Marqueurs analysés à la surface des LTs $\gamma\delta$ pour évaluer leur capacité de cellule présentatrice d'antigènes.

Marqueur	Rôle
MHC II	MHC II permet la présentation d'antigènes internalisés aux LTs CD4 ⁺ . Il est exprimé à la surface des APCs.
CD40	CD40 est un marqueur classique des cellules APCs. Son activation via son ligand CD40-L permet la surexpression de molécules co-stimulatrices comme CD80/CD86, la production de cytokines et le déclenchement de la présentation d'antigènes.
CD86	CD86 est un marqueur de cellule dendritique mature. Il crée un signal de costimulation des LTs nécessaires pour leur activation et leur survie.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

CULTURE CELLULAIRE

Voir page 132. Uniquement la lignée B16 OVA a été utilisée dans cette partie.

IMPLANTATION TUMORALE

Voir page 133.

COLLECTE ET DIGESTION DES TUMEURS

Voir page 134.

CYTOMETRIE EN FLUX

Voir page 119. La liste des anticorps utilisés est présentée en Tableau 11 et en Tableau 12.

Tableau 11 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des TILs cytotoxiques

Fluorochrome	Cible
Laser bleu (488 nm)	
FITC	CD107a/b
PerCP-Cy TM 5.5	CD4
PE/Cy TM 7	CD25
Laser rouge (640 nm)	
APC	IFN γ
APC-Cy7	CD3
Laser Violet	
BD Horizon TM Brilliant Violet 421	CD69
BD Horizon TM V500	Marqueur de viabilité
BD Horizon TM Brilliant Violet 605	$\gamma\delta$ TcR
BD Horizon TM Brilliant Violet 786	CD45

Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des TILs APC

Fluorochrome	Cible
Laser bleu (488 nm)	
FITC	CD3
PerCP-Cy TM 5.5	CD4
PE/Cy TM 7	CD86
Laser rouge (640 nm)	
APC-Cy7	CD45
Laser Violet	
BD Horizon TM Brilliant Violet 421	CD40
BD Horizon TM V500	Marqueur de viabilité
BD Horizon TM Brilliant Violet 605	$\gamma\delta$ TcR
BD Horizon TM Brilliant Violet 711	MHC II
BD Horizon TM Brilliant Violet 786	IFN γ

RESULTATS

FONCTIONS CYTOTOXIQUES DES LTs $\gamma\delta$

Pour évaluer l'expression de différents marqueurs d'activation par les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux, des souris ont été nourries durant 2 semaines avec un régime enrichi en inuline avant l'implantation d'un mélanome B16 OVA. Deux semaines plus tard, toutes les tumeurs ont été collectées afin d'en analyser l'immunité. Les résultats obtenus suggèrent que la consommation d'inuline a entraîné une augmentation des proportions de LTs $\gamma\delta$ exprimant CD25, sans affecter la proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimant CD69 ou CD107a/b (Figure 94).

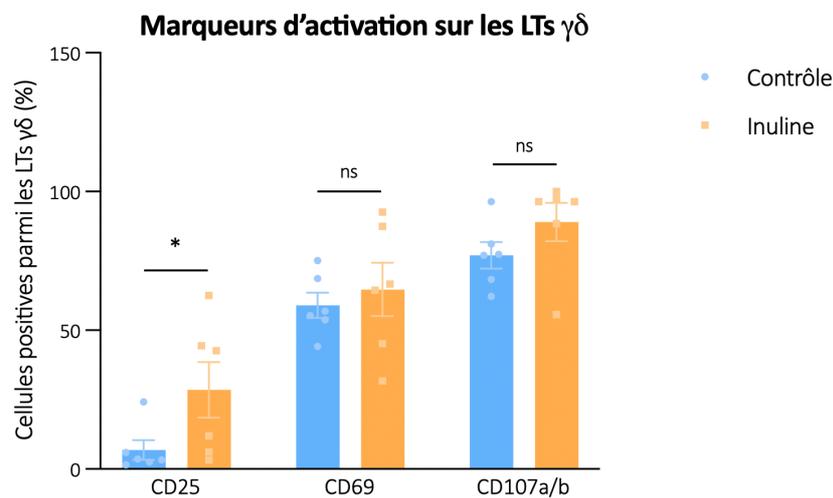


Figure 94 : LTs $\gamma\delta$ exprimant des marqueurs d'activation. Proportion des LTs exprimant CD25 ou CD69 ou CD107a/b, et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 par groupe). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM.

L'augmentation des proportions de LTs $\gamma\delta$ CD25⁺ suggère que les LTs $\gamma\delta$ de souris nourries avec un régime en inuline sont plus activés que lorsque les souris sont nourries avec un régime standard. De plus, il semblerait qu'une plus grande proportion de LTs $\gamma\delta$ expriment le marqueur CD107a/b après stimulation PMA/iono lorsque les souris sont nourries avec de l'inuline, même si cette différence n'est pas significative.

Pour étudier la capacité des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux à présenter des antigènes aux LTs conventionnels, nous avons analysé les marqueurs CD40, CD80 et MHC II à leur surface. Nous avons comparé l'expression de ces marqueurs dans des tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline. Le pourcentage de LTs $\gamma\delta$ exprimant le marqueur CD40 était similaire entre les groupes contrôle et inuline. En revanche, une plus grande proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimait le MHC II dans les tumeurs de souris nourries avec de l'inuline (Figure 95).

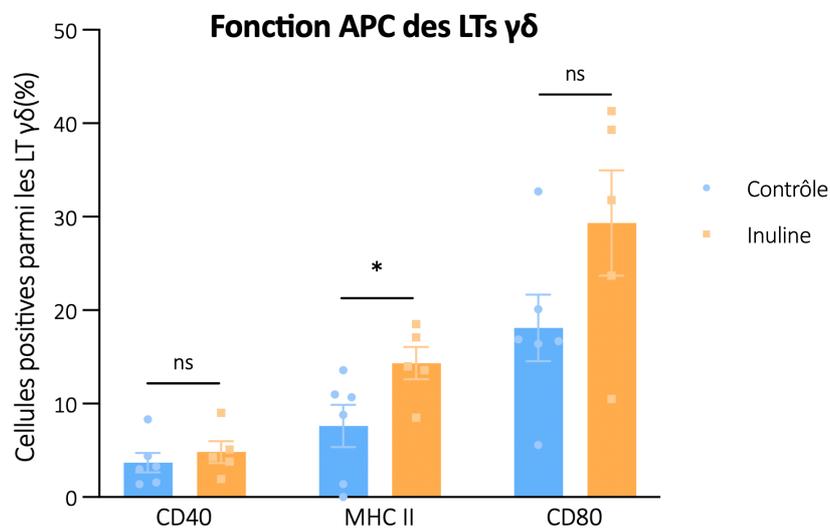


Figure 95 : LTs $\gamma\delta$ exprimant des marqueurs de APC. Proportion des LTs exprimant (A) CD40, (B) MHC II et (C) CD80, et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=5). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif, *p < 0,05 avec un test Mann Whitney.

La proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimant CD80 semblait être augmentée par la consommation d'inuline, mais de manière non-significative. Cependant, la proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimant CD80 et MHC II était significativement augmentée dans les tumeurs de souris nourries avec de l'inuline (Figure 96). L'ensemble de ces résultats suggère qu'une plus grande proportion des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux de souris nourries avec de l'inuline acquière une fonction de cellule présentatrice d'antigène.

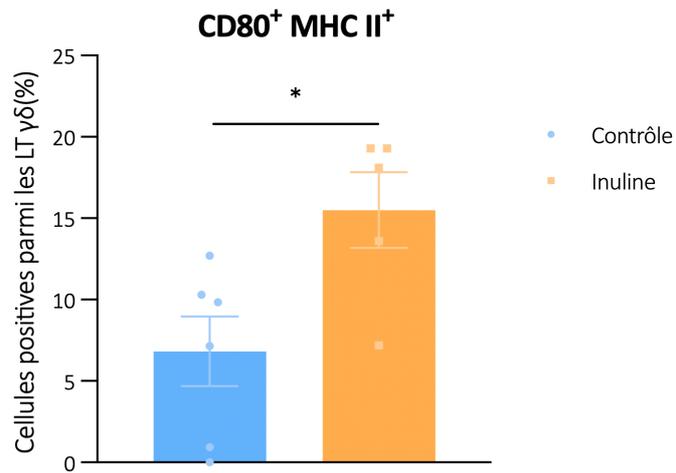


Figure 96 : LTs $\gamma\delta$ exprimant CD80 et MHC II. Proportion des LTs exprimant CD80 et MHC II, et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 par groupe). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. *p < 0,05 avec un test Mann Whitney

CONCLUSION

Nous avons précédemment montré que les LTs $\gamma\delta$ sont indispensables à l'effet antitumoral de l'inuline. Ceci peut s'expliquer par deux caractéristiques que pourrait acquérir les LTs $\gamma\delta$. Tout d'abord, l'augmentation de l'expression du marqueur CD25 suggère que sous régime inuline, une plus grande proportion des LTs $\gamma\delta$ est activée. L'augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimant CD107 suggère qu'ils pourraient jouer un rôle cytotoxique direct, en libérant des vésicules contenant des enzymes cytotoxiques. En plus de cette activité cytotoxique, les LTs $\gamma\delta$ acquièrent un phénotype de cellule présentatrice d'antigènes, qui pourrait leur permettre d'activer des LTs conventionnels (Figure 97).

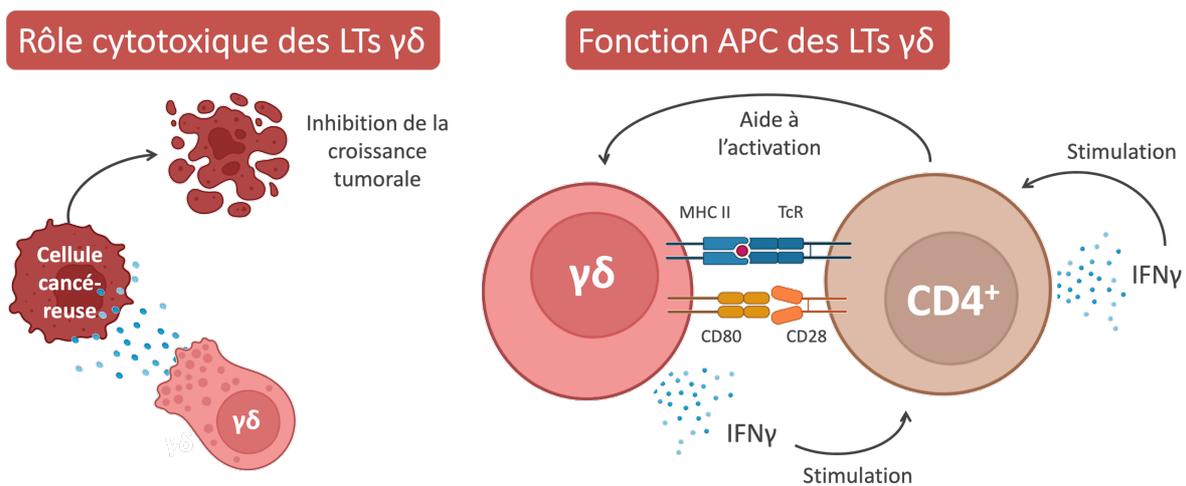


Figure 97 : Les divers rôles des LTs $\gamma\delta$ dans les tumeurs de souris nourries avec de l'inuline.

VI. COMMENT LES LYMPHOCYTES T $\gamma\delta$ REJOignent-ILS LA TUMEUR ?

En conditions physiologiques, le régime inuline renforce l'immunité de la muqueuse du côlon, et particulièrement les LTs $\gamma\delta$ producteurs d'IFN γ . En cas d'apparition de tumeur périphérique (sous-cutanée), cette même population immunitaire semble responsable de l'inhibition de la croissance tumorale sous régime inuline. Mais comment les LTs $\gamma\delta$ migrent-ils dans la tumeur ? Les deux voies de migration les plus évidentes sont la lymphe et le sang.

METHODOLOGIE : ANALYSE DES GANGLIONS ET DU SANG

Des souris C57BL/6 ont été nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline. Le volume de lymphe dans les souris étant trop faible pour être collecté et analysé en cytométrie en flux, nous avons analysé l'immunité dans leurs ganglions, drainés par les vaisseaux lymphatiques. Nous avons analysé l'immunité de deux chaînes ganglionnaires (Figure 98) :

- Les ganglions mésentériques : au centre de l'intestin, ils sont situés au plus proche du lieu de fermentation de l'inuline.
- Les ganglions drainants : en cas de tumeurs sous-cutanées, ces ganglions drainent le site tumoral en cellules immunitaires.

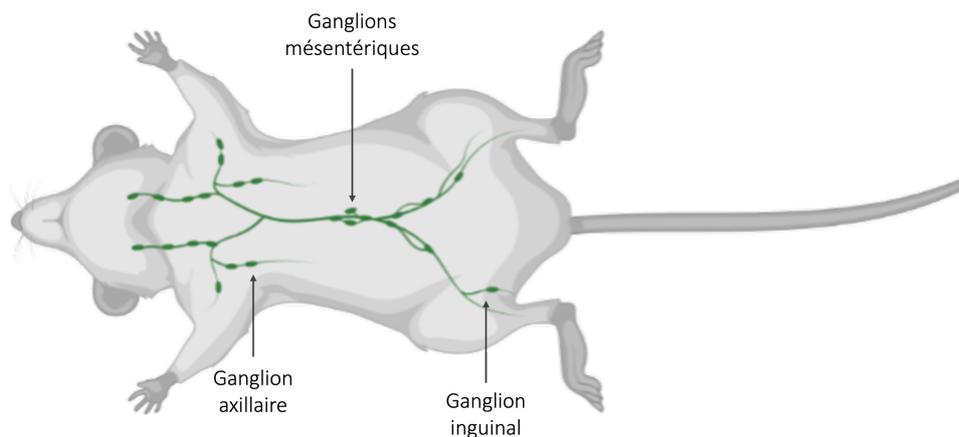


Figure 98 : Localisation des ganglions analysés

L'intestin est très vascularisé. Les LTs $\gamma\delta$ pourraient circuler de l'intestin à la tumeur via le sang. Pour étudier cette hypothèse, nous avons collecté le sang des animaux après 2 semaines de régime pour analyser l'immunité circulante (Figure 99).

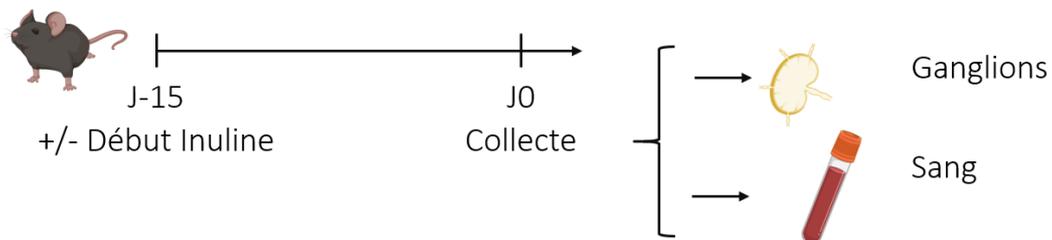


Figure 99 : Plan expérimental pour l'analyse de l'immunité circulante.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

PREPARATION D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE A PARTIR DE GANGLIONS

Les ganglions ont été collectés sur des souris euthanasiées, et directement placés dans un tube contenant 2 mL de RPMI complet stérile. Tous les ganglions mésentériques d'une souris ont été placés dans le même tube, de même pour les ganglions drainants (inguinal et axillaire). Le contenu du tube a ensuite été transféré sur un tamis cellulaire de 70 μm sur un tube de 50 mL. Les ganglions ont été écrasés sur le tamis, puis le tamis a été lavé avec 10 mL de RPMI complet 10% SVF. Les cellules obtenues ont été centrifugées 6 minutes à 600 g, puis suspendues dans 2 mL de RPMI 10% SVF. Cette suspension cellulaire a été séparée en 2 tubes de 1 mL.

PREPARATION DES ECHANTILLONS DE SANG

Les souris ont été anesthésiées avec de l'isoflurane 3,5% gazeux. Le sang a été prélevé par voie rétro-orbitaire sur souris anesthésiées avec un capillaire hépariné. Le sang collecté a été directement placé dans un tube K2E (BD Medical), contenant de 1 mg d'EDTA pour empêcher la coagulation. Une fois tous les échantillons collectés, les tubes contenant le sang ont été centrifugés 10 minutes à 800 g. Le sérum a été retiré à la pipette, et le culot a été suspendu dans du tampon de lyse des globules rouges (Invitrogen) et incubé 1 minute à température

ambiante. Afin de d'arrêter l'action du tampon de lyse, 2 mL de RPMI complet 10% SVF ont été ajoutés à chaque tube avant de les centrifuger 10 minutes à 800 g. Le surnageant a été éliminé à la pipette, puis les culots cellulaires ont été suspendus dans 1 mL de RPMI complet 10 % SVF.

CYTOMETRIE EN FLUX

Les échantillons de sang et les ganglions ont été traités comme décrit page 119, puis marqués suivant le protocole et la liste d'anticorps page 120 (Tableau 3).

RESULTATS

ANALYSE DES LTs $\gamma\delta$ DES GANGLIONS

Afin d'étudier dans les ganglions les modulations immunitaires induites par la consommation d'inuline, nous les avons analysés chez des souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline. Le régime enrichi en inuline n'a pas impacté les proportions de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺, ni dans les ganglions mésentériques (Figure 100A), ni dans les ganglions drainants (Figure 100B).

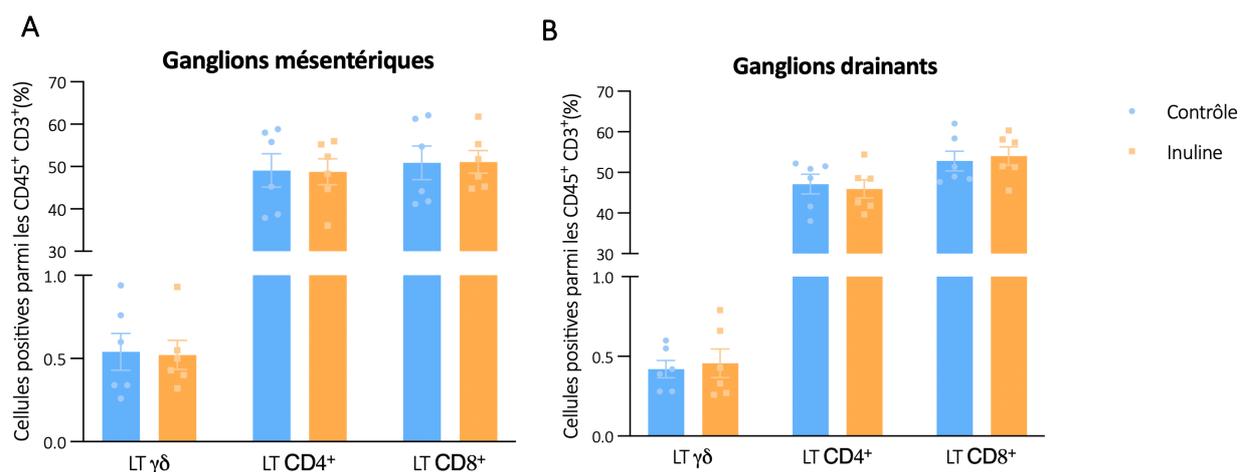


Figure 100 : LTs des ganglions drainants et drainants. Proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺, sélectionnés parmi les cellules CD45⁺, CD3⁺ dans les ganglions (A) mésentériques et (B) drainants de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

Dans l'intestin, le régime enrichi en inuline augmente la proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ . Cependant, le régime inuline n'a pas affecté cette population de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ dans les ganglions mésentériques (Figure 101A). Dans les ganglions drainants de souris nourries avec de l'inuline, la proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ semble légèrement diminuée comparé au groupe contrôle (Figure 101B).

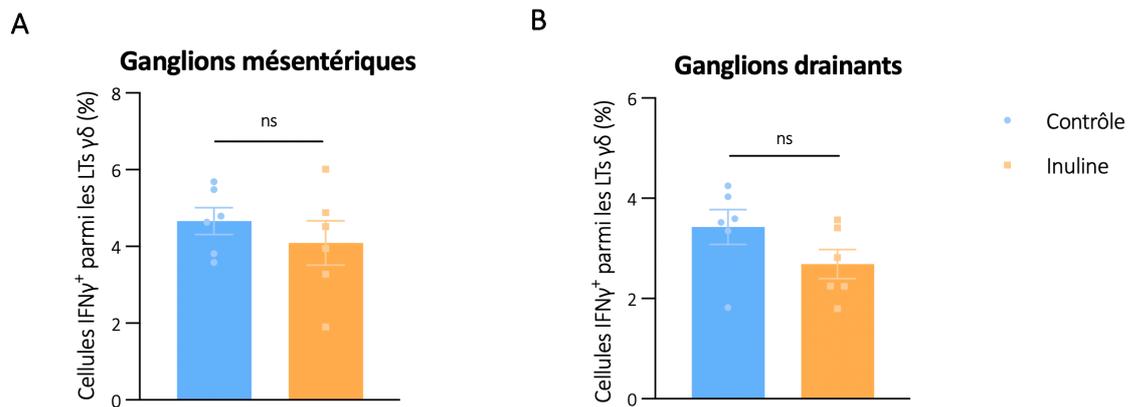


Figure 101 : LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ dans les ganglions drainants et mésentériques. Proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ dans les ganglions (A) mésentériques et (B) drainants de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

ANLAYSE DES LTs $\gamma\delta$ DANS LE SANG

Dans le sang, la proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ a été significativement augmentée chez les souris nourries durant 2 semaines avec de l'inuline (Figure 102).

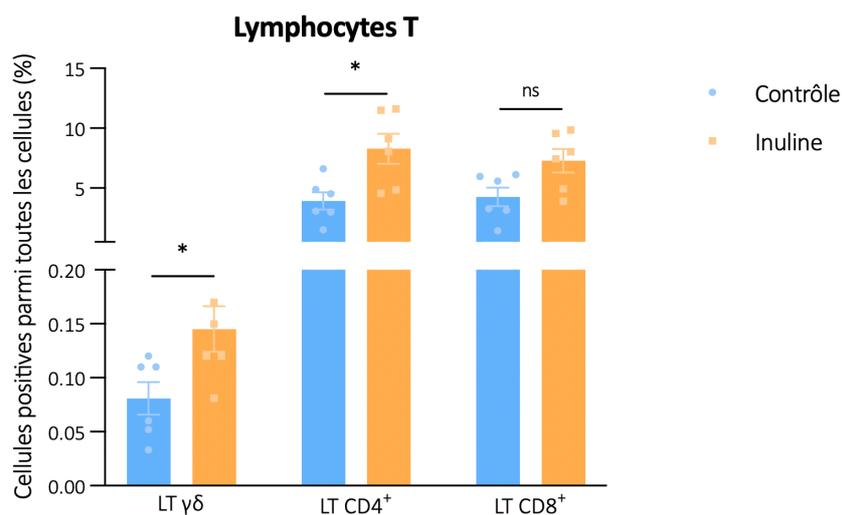


Figure 102 : LTs du sang. Proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺, sélectionnés parmi les cellules CD45⁺, CD3⁺ dans le sang de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif, *p < 0,05 avec un test Mann Whitney.

La proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ a été diminuée dans le sang de souris nourries avec de l'inuline (Figure 103).

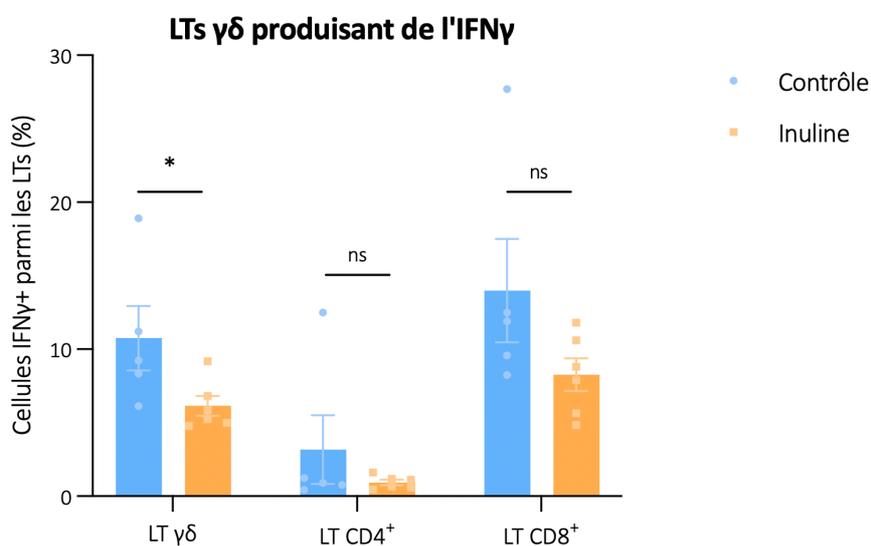


Figure 103 : LTs IFN γ ⁺ du sang. Proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ sélectionnés parmi les cellules CD45⁺, CD3⁺ dans le sang de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=5) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif, *p < 0,05 avec un test Mann Whitney.

CONCLUSION

Le régime enrichi en inuline ne semble pas avoir impacté l'immunité dans les ganglions drainants et mésentériques. En revanche, la proportion de LTs circulant dans le sang a été augmentée par la consommation d'inuline (Figure 104). Les LTs circulent probablement via le sang pour atteindre la tumeur.

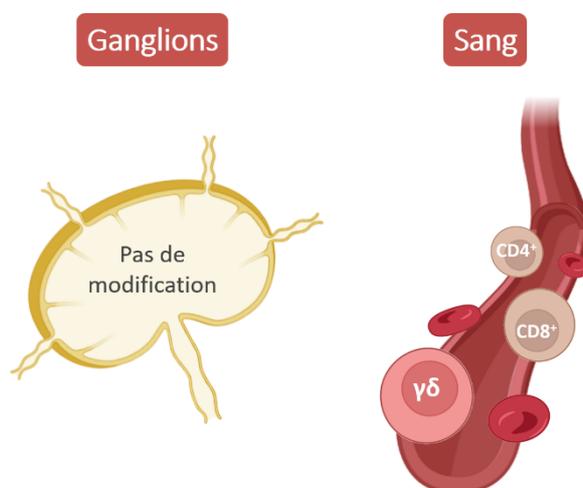


Figure 104 : Modulation de l'immunité circulante par la consommation d'inuline.

VII. ORIGINE DES LTs $\gamma\delta$ INTRA-TUMORAUX

Nous avons observé une augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$ intestinaux et intra-tumoraux produisant de l'IFN γ , ainsi qu'une augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$ circulant dans le sang. Ceci suggère que les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux proviennent de l'intestin et/ou du sang. Pour étudier ces 2 hypothèses, nous avons analysé les sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans ces trois sites immunitaires. En effet, les $\gamma\delta$ TcR des LTs $\gamma\delta$ sont différents (différentes chaînes γ et différentes chaînes δ) suivant leur origine dans l'organisme (Page 62, Figure 26). Chez la souris, les LTs intestinaux sont principalement composés du sous-type V γ 7, tandis qu'ils sont majoritairement V γ 1 dans le sang [106]. Ces sous-types résident dans les tissus depuis la naissance. Ainsi, la présence de V γ 7 ou V γ 1 dans les tumeurs de souris inuline pourrait indiquer l'origine de ces cellules.

METHODOLOGIE : ANALYSE DES SOUS-TYPES DE LTs $\gamma\delta$ DANS LE COLON, LE SANG ET LA TUMEUR

Pour comparer les sous-types de LTs $\gamma\delta$ présents dans le côlon, dans la tumeur et dans le sang, des souris C57BL/6 ont été nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline. A l'issue des 2 semaines de régime, la moitié des souris ont été euthanasiées afin de prélever leur sang et leur IELs du côlon, afin d'analyser les sous-types de LTs $\gamma\delta$ par cytométrie en flux.

Un mélanome B16 OVA a été implanté à l'autre moitié des animaux. Après 2 semaines de croissance du mélanome, les tumeurs ont été récupérées et analysées par cytométrie en flux (Figure 105).

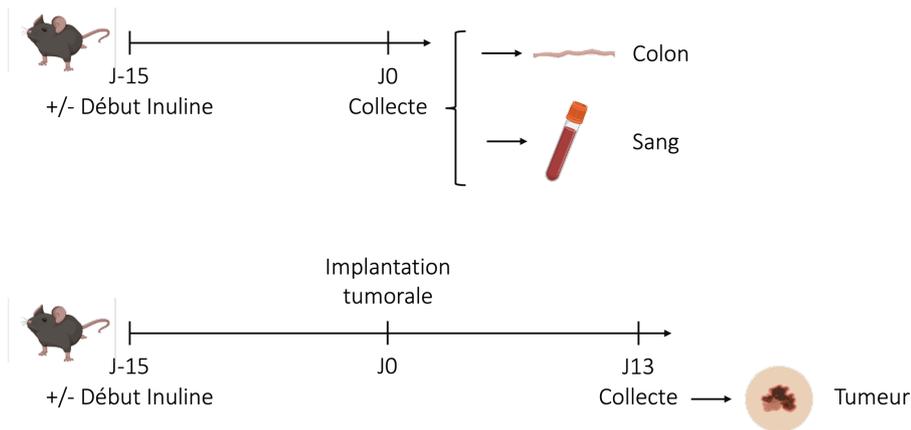


Figure 105 : Plan expérimental pour l'analyse des sous-types de LTs $\gamma\delta$.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

COLLECTE DE COLONS ET TRI DES LYMPHOCYTES INTRAEPITHÉLIAUX

Voir page 118.

PREPARATION DES ECHANTILLONS DE SANG.

Voir page 160.

CULTURE CELLULAIRE

Voir page 132. Uniquement la lignée B16 OVA a été utilisée dans cette partie.

IMPLANTATION TUMORALE

Voir page 133.

COLLECTE ET DIGESTION DES TUMEURS

Voir page 134.

CYTOMETRIE EN FLUX

Voir page 119. Les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux et coliques ont été analysés avec les anticorps listés dans le Tableau 13. Les LTs $\gamma\delta$ sanguins ont été analysés avec les anticorps listés dans le Tableau 14.

Tableau 13 : Listes de anticorps utilisés pour l'analyse des LTs $\gamma\delta$ coliques et intra-tumoraux.

Fluorochrome	Cible
Laser bleu (488 nm)	
FITC	V γ 1
PE	V γ 7
PE/Cy TM 7	$\gamma\delta$ TcR
Laser rouge (640 nm)	
APC	V γ 3
APC-Cy7, APC-H7	CD45
Laser Violet	
BD Horizon TM Brilliant Violet 421	V γ 2
BD Horizon TM V500	Marqueur de viabilité
BD Horizon TM Brilliant Violet 605	CD3
BD Horizon TM Brilliant Violet 786	IFN γ

Tableau 14 : Panels d'anticorps utilisés pour l'analyse des LTs $\gamma\delta$ sanguins.

Fluorochrome	Cible panel 1	Cible panel 2
Laser bleu (488 nm)		
FITC		V γ 1
PE	V γ 4	V γ 7
PE/Cy TM 7	$\gamma\delta$ TcR	$\gamma\delta$ TcR
Laser rouge (640 nm)		
APC, Alexa Fluor [®] 467		V γ 3
APC-Cy7, APC-H7	CD45	CD45
Laser Violet		
BD Horizon TM Brilliant Violet 421	V γ 2	
BD Horizon TM V500	Marqueur de viabilité	Marqueur de viabilité
BD Horizon TM Brilliant Violet 605	CD3	
BD Horizon TM Brilliant Violet 786	IFN γ	

LTs $\gamma\delta$ DANS LE COLON

Dans le côlon, les analyses par cytométrie en flux ont mis en évidence la présence des sous-types V γ 1, V γ 2, et V γ 7 (Figure 106). Le régime enrichi en inuline a augmenté la proportion des LTs V γ 7 dans le côlon, et semble avoir diminué la proportion de V γ 1.

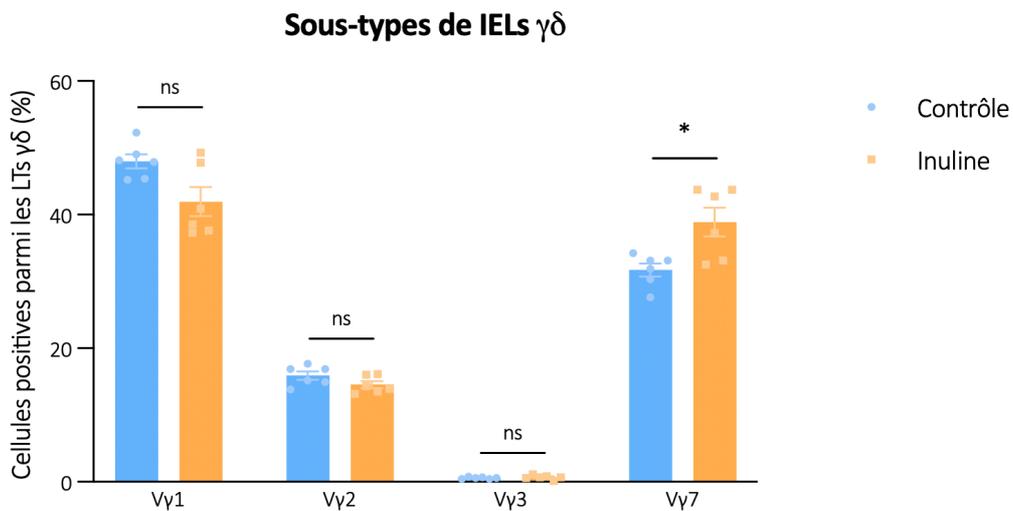


Figure 106 : Sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans les côlons de souris. Proportions des différents sous-types de LTs $\gamma\delta$ du côlon de souris C57BL/6 nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. *p < 0,05 en test de Mann-Whitney.

Comme montré précédemment, la consommation d'inuline semble avoir augmenté la proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ dans les IELs du côlon mais de manière non-significative (Figure 107A). Afin d'identifier des différences de fonction de ces cellules, les sous-types de LTs $\gamma\delta$ ont été analysés, suivant leur capacité à produire ou non de l'IFN γ . Parmi les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ , que ce soit dans les côlons de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline, 25% des LTs $\gamma\delta$ étaient des V γ 1, environ 20% étaient des V γ 2, et 30% étaient des V γ 7 (Figure 107B).

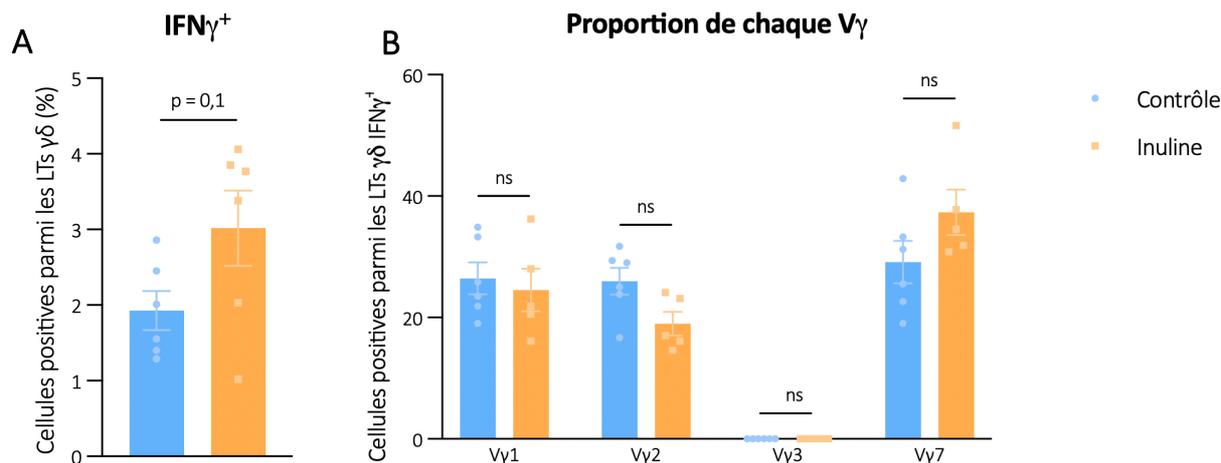


Figure 107 : Les LTs $\gamma\delta$ du côlon produisant de l'IFN γ . (A) Proportion LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ , et (B) proportions de chaque sous-type de LTs $\gamma\delta$ parmi ceux produisant de l'IFN γ , dans le côlon de souris C57BL/6 nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=5-6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

Le régime enrichi en inuline n'a pas significativement impacté les proportions des différents sous-types de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ .

LTs $\gamma\delta$ DANS LE SANG

Pour étudier les sous-types de LTs $\gamma\delta$ présents dans le sang de souris nourries ou non à l'inuline, ces cellules ont été analysées par cytométrie en flux. Dans le sang, les analyses par cytométrie en flux ont mis en évidence la présence des sous-types V γ 1, V γ 2, V γ 4 et V γ 7 (Figure 108). Les sous-types majoritaires dans le sang des souris étaient les V γ 1 et V γ 2, chacun comptant pour environ 40% des LTs $\gamma\delta$. Le régime enrichi en inuline a augmenté la proportion du sous-type de LTs $\gamma\delta$ V γ 7 dans le sang.

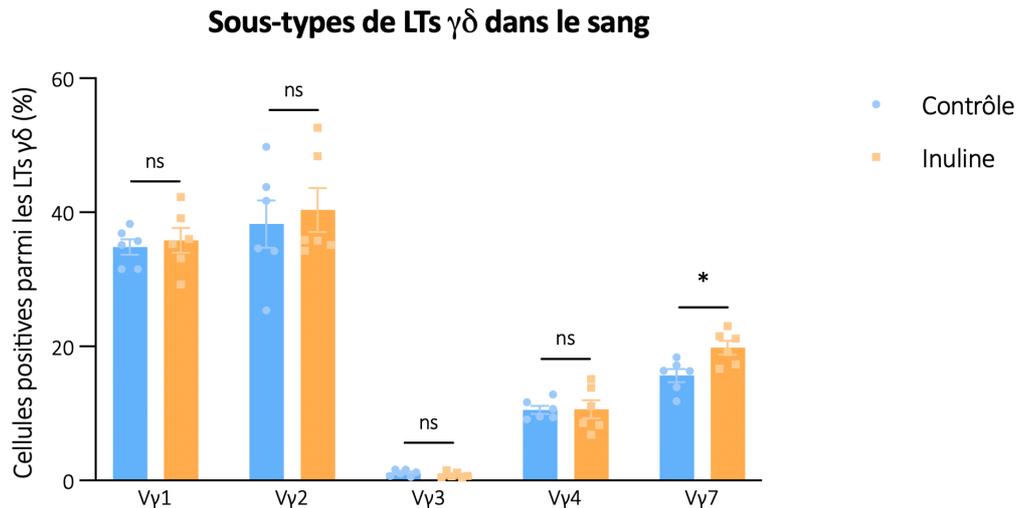


Figure 108 : Sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans le sang de souris. Proportions des différents sous-types de LTs $\gamma\delta$ du sang de souris C57BL/6 nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

La consommation d'inuline semble avoir légèrement augmenté la proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ dans le sang, mais de manière non-significative (Figure 109A). Afin d'identifier des différences de fonction de ces cellules, les sous-types de LTs $\gamma\delta$ ont été analysés, suivant leur capacité à produire de l'IFN γ . Parmi les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ , la majorité appartenait aux sous-types V γ 1, V γ 4 et V γ 7 (Figure 109B).

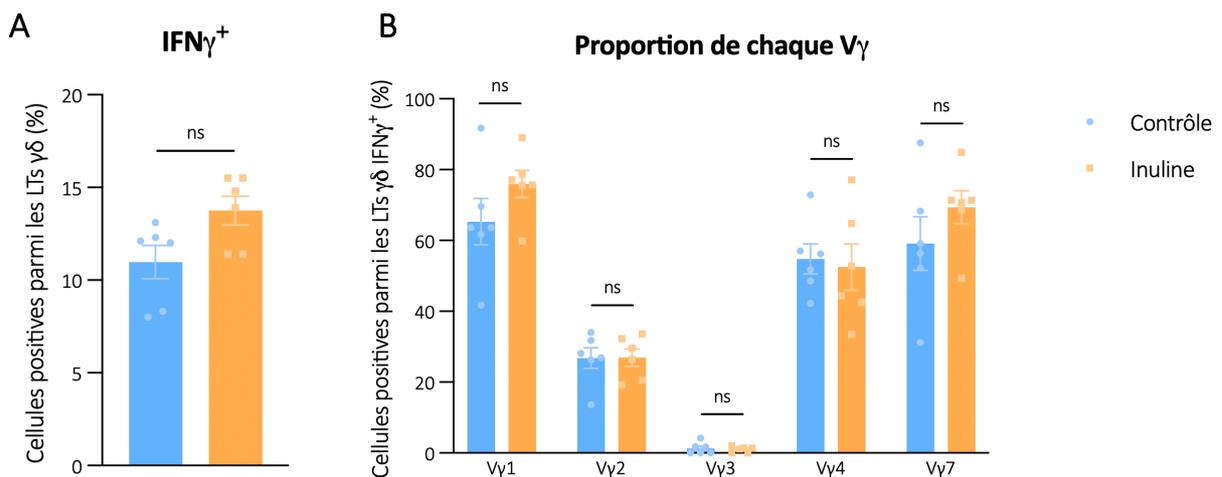


Figure 109 : Les LTs $\gamma\delta$ du sang produisant de l'IFN γ . (A) Proportion LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ , et (B) proportions de chaque sous-type de LTs $\gamma\delta$ parmi ceux produisant de l'IFN γ , dans le sang de souris C57BL/6 nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

Les proportions très élevées de chaque sous-type de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ dans le sang suggéraient que certains LTs $\gamma\delta$ expriment plusieurs chaînes V γ simultanément, car la somme des pourcentages de chaque sous-type est largement supérieure à 100. Nous avons donc quantifié la proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ , et exprimant plusieurs $\gamma\delta$ TcR. Cependant, les anticorps de cytométrie en flux utilisés pour cette expérience ne permettaient pas d'analyser toutes les combinaisons de $\gamma\delta$ TcR (les anticorps anti-V γ 5 et V γ 6 ne sont pas disponibles notamment). De plus, dans le sang, la chaîne V γ 3 semblait ne pas être exprimée par les LTs $\gamma\delta$. Ainsi, seules les combinaison V γ 2⁺V γ 4⁺, et V γ 1⁺V γ 7⁺ ont été analysées. Parmi les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ , environ 10% coexprimaient les chaînes V γ 2 et V γ 4, et plus de 50% coexprimaient les chaînes V γ 1 et V γ 7 (Figure 110B). Parmi tous les LTs $\gamma\delta$, indépendamment de leur capacité à produire de l'IFN γ , 2% coexprimaient les chaînes V γ 2 et V γ 4, et 8% coexprimaient les chaînes V γ 1 et V γ 7 (Figure 110A). Aucune différence significative n'a été observée entre les groupes contrôle et inuline.

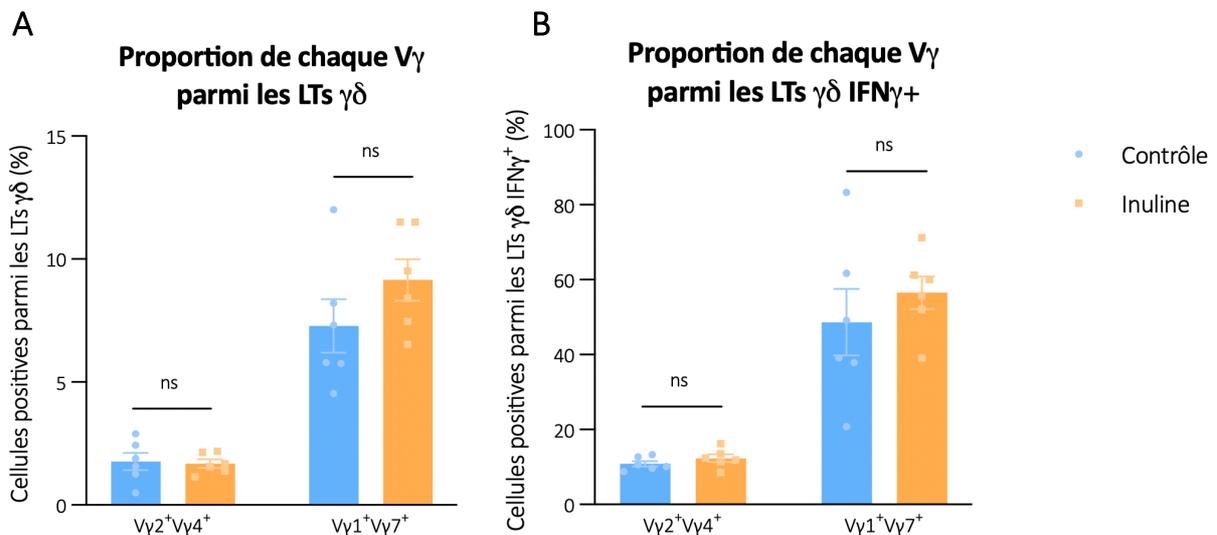


Figure 110 : LTs $\gamma\delta$ exprimant plusieurs chaînes V γ dans le sang. Proportions des différents sous-types de LTs $\gamma\delta$ parmi (A) tous les LTs $\gamma\delta$, ou parmi (B) les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ , dans le sang de souris C57BL/6 nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann-Whitney.

Dans le côlon, moins de 3% des LTs $\gamma\delta$ coexprimaient plusieurs chaînes V γ (Figure supplémentaire S4). La Figure 111 présente les nuages de points obtenus lors du marquage des

LTs $\gamma\delta$ coexprimant plusieurs chaînes V γ . Dans le côlon, le double marquage V γ 1, V γ 7 ne met en évidence aucune cellule doublement positive (Figure 111A). En revanche, dans le sang, le double marquage montre une population de LTs $\gamma\delta$ exprimant simultanément les 2 chaînes (Figure 111B). L'absence de cellule double-positives dans le côlon suggère qu'il n'y a pas de problème de spécificité d'anticorps ou de compensation de fluorochromes.

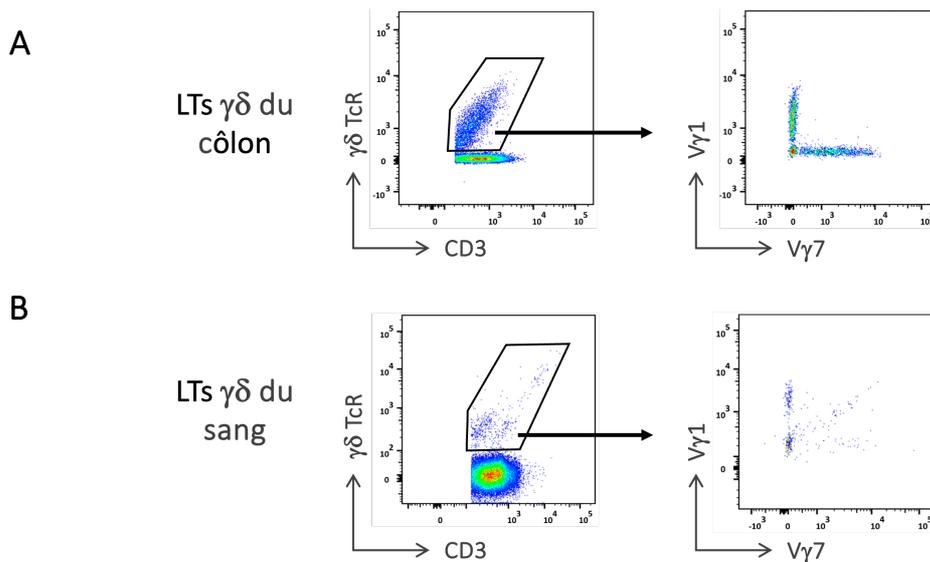


Figure 111 : Coexpression des chaînes V γ 1 et V γ 7. Nuage de points représentatif de la co-expression des chaînes V γ 1 et V γ 7 par les LTs $\gamma\delta$ (A) du côlon et (B) du sang de souris nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=1).

LTs $\gamma\delta$ DANS LA TUMEUR

Les sous-types de LTs $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs sont les V γ 1, V γ 2, V γ 3 et V γ 7. Parmi ceux-là, les sous-types majoritaires sont les LTs V γ 2 et V γ 3 (Figure 112). Aucune différence de proportion des différents sous-types n'a été observée entre les tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline.

Sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans les tumeurs

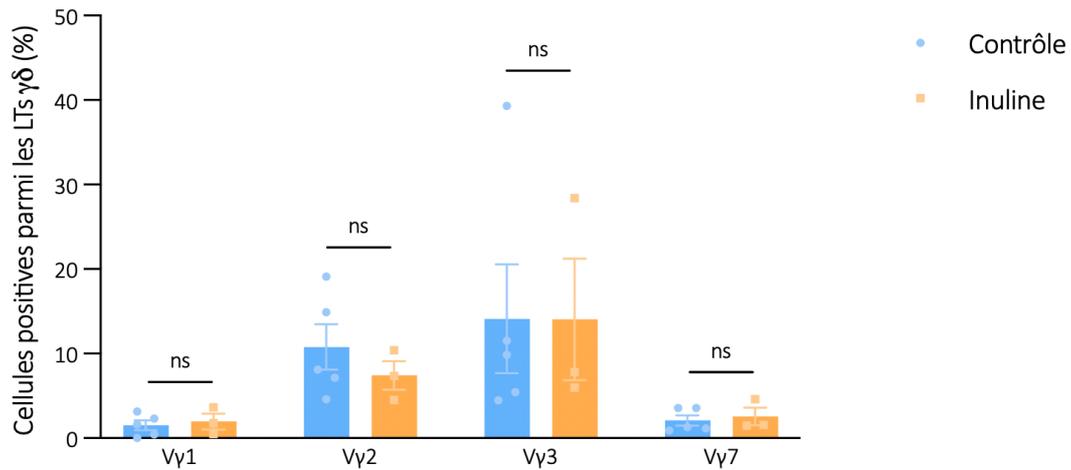


Figure 112 : Sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans les tumeurs de souris. Proportions des différents sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans les tumeurs B16 OVA de souris C57BL/6 nourries avec un régime standard (n=5) ou enrichi en inuline (n=3). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann-Whitney.

Cependant, comme 3% expriment la chaîne V γ 1, 10% expriment la chaîne V γ 2, 15% expriment la chaîne V γ 3 et 3% expriment la chaîne V γ 7, environ 70% des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux expriment une autre chaîne V γ . Etant donné le faible nombre de LTs $\gamma\delta$ présents dans les tumeurs, la possible coexpression de plusieurs chaînes V γ n'a pas pu être étudiée.

CONCLUSION

Les sous-types de LTs $\gamma\delta$ coliques, sanguins et intra-tumoraux ont été analysés par cytométrie en flux, afin de déterminer l'origine des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux. Cependant, et contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, chaque tissu ne contient pas un sous-type de LT $\gamma\delta$ en particulier. En effet, dans l'intestin, les LTs $\gamma\delta$ V γ 7 cohabitent au minimum avec des LTs $\gamma\delta$ V γ 1 et V γ 2 (Figure 113). Dans le sang, les sous-types V γ 1, V γ 2, V γ 4 et V γ 7 sont présents. De manière surprenante, dans le sang, les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ coexprimaient plusieurs $\gamma\delta$ TcR. La majorité d'entre eux coexprimaient les chaînes V γ 1 et V γ 7. Afin de confirmer ce résultat, il faudrait trier ces cellules par cytométrie en flux (FACS) et vérifier la co-expression de plusieurs chaînes V γ , par exemple par single cell RT-qPCR. Dans les tumeurs, les sous-types V γ 1, V γ 2, V γ 3 et V γ 7 sont présents, mais ne comptent que pour 30% des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux. Cela suggère que la majorité des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux sont parmi les sous-types V γ 4, V γ 5 ou V γ 6. Ces sous-types sont décrits comme majoritairement présents dans la peau, ce qui suggère que les LTs $\gamma\delta$ infiltrant les mélanomes de souris sont originaires de la peau. Les sous-types V γ 5 et V γ 6 n'ont pas pu être analysés, car les anticorps marqués avec des fluorochromes et ciblant ces chaînes V γ ne sont pas commercialisées en France. Une analyse par single cell RT-qPCR pourrait permettre d'analyser l'expression de ces chaînes.

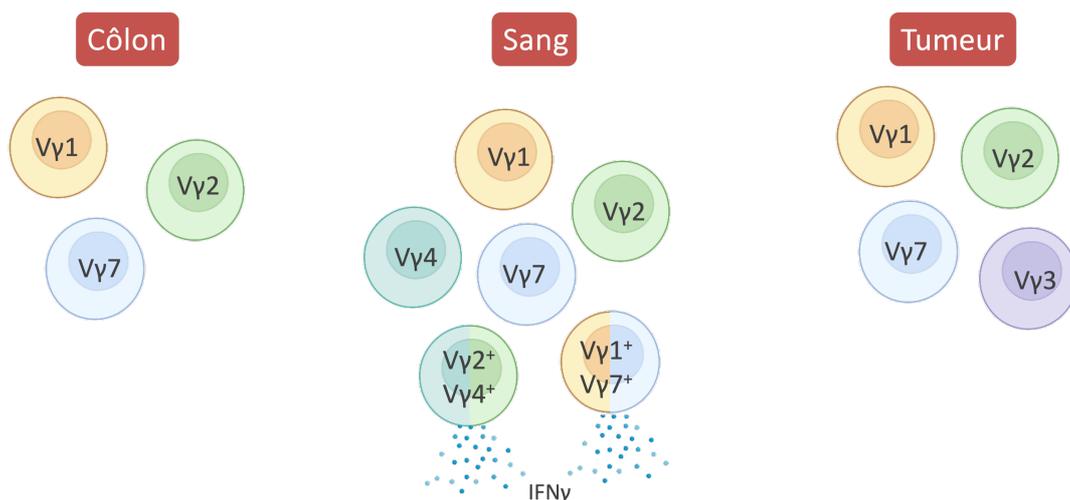


Figure 113 : Les sous-types de LTs $\gamma\delta$ majoritairement présents dans le sang, le côlon et les tumeurs de souris.

VIII. IMMUNOSURVEILLANCE ACCRUE : MODELE DE TUMEUR CHIMIO-INDUITE

Le régime enrichi en inuline renforce l'immunosurveillance, ce qui permet un fort effet antitumoral en cas de tumeur périphérique. Cependant, le modèle tumoral utilisé reste très éloigné de la carcinogénèse réelle, car les cellules tumorales implantées ont déjà suivi le phénomène d'immuno-édition (Page 71, Figure 33). Afin de tester l'effet préventif du régime inuline sur l'apparition de tumeur, nous avons utilisé le modèle de tumeur chimio-induite mis en place par le Pr. R Schreiber en 1998 [128]. Nous avons donc évalué la capacité du régime enrichi en inuline à prévenir l'apparition de tumeurs cutanées chez des animaux exposés à un cancérigène.

METHODOLOGIE : TUMEUR INDUITE PAR INJECTION DE METHYLCHOLANTRENE

Des souris C57BL/6 ont été nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline. A l'issue de ces 2 semaines, toutes les souris ont reçu une injection sous-cutanée d'un carcinogène, le Méthylcholantrene (MCA). Dans ce modèle, 20% des animaux contrôles doivent développer une tumeur cutanée (fibrosarcome) au site d'injection du MCA, entre 70 et 200 jours post-injection (Figure 114) [128]. Étant donné le faible pourcentage d'animaux contrôles développant une tumeur, nous avons dû utiliser un grand nombre d'animaux (n=48 souris par groupe), afin d'espérer observer une différence significative dans le groupe inuline. En effet, si la consommation d'inuline renforce l'immunosurveillance, nous devrions observer une plus faible proportion des souris du groupe inuline développant des fibrosarcomes.

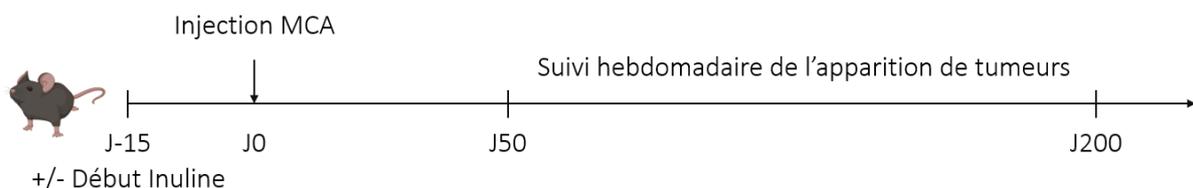


Figure 114 : Plan expérimental pour évaluer l'effet préventif de l'inuline sur l'apparition de tumeurs chimio-induites.

ANIMAUX

Voir page 99. Deux groupes de n=48 ont été utilisés.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#26300-2020070111383424.v3-v4

CREATION DU MODELE DE TUMEURS CHIMIO-INDUITES

Les souris ont reçu une injection sous cutanée de Méthylcholanthrène (25 µg dans 100 µL d'huile de maïs) (Sigma) dans le flanc droit (pour faciliter la manipulation, les souris étaient rasées la veille de l'injection). Pour favoriser la solubilisation du MCA, l'huile de maïs a préalablement été chauffée à 37°C. Entre 70 et 200 jours post-injection, 20% des souris ont développé un fibrosarcome cutané au point d'injection du MCA. Les souris ont donc été surveillées une fois par semaine, à partir de 50 jours post-injection du MCA. Pour cela, les souris étaient palpées au site d'injection et autour.

La taille des tumeurs (en mm²) a été mesurée suivant la formule suivante :

$$Taille_{tumeur} = longueur \times largeur$$

Dès qu'une tumeur atteignait la taille éthique de 150 mm², la souris porteuse était euthanasiée et comptabilisée comme morte pour l'établissement des courbes de survie. L'état général des animaux était évalué toutes les semaines. Si une souris devait présenter le moindre signe de souffrance, elle était placée sous surveillance accrue (évaluation de son état général tous les jours). Durant toute la durée de l'expérience, aucune souris n'a montré de signe de souffrance lié à l'injection de MCA.

Pour les représentations graphiques, les volumes des tumeurs (en mm³) ont été calculés, suivant la formule suivante, en accord avec la littérature :

$$Volume_{tumeur} = 0,5 \times (longueur \times largeur^2)$$

RESULTATS

Les premières tumeurs sont apparues 50 jours post-injection de MCA, dans les 2 groupes, et la fréquence d'apparition des tumeurs était très similaire entre les 2 groupes (Figure 115). En 200 jours et parmi 48 individus par groupe, 17% des souris nourries avec de l'inuline ont développé une tumeur contre 21% dans le groupe contrôle.

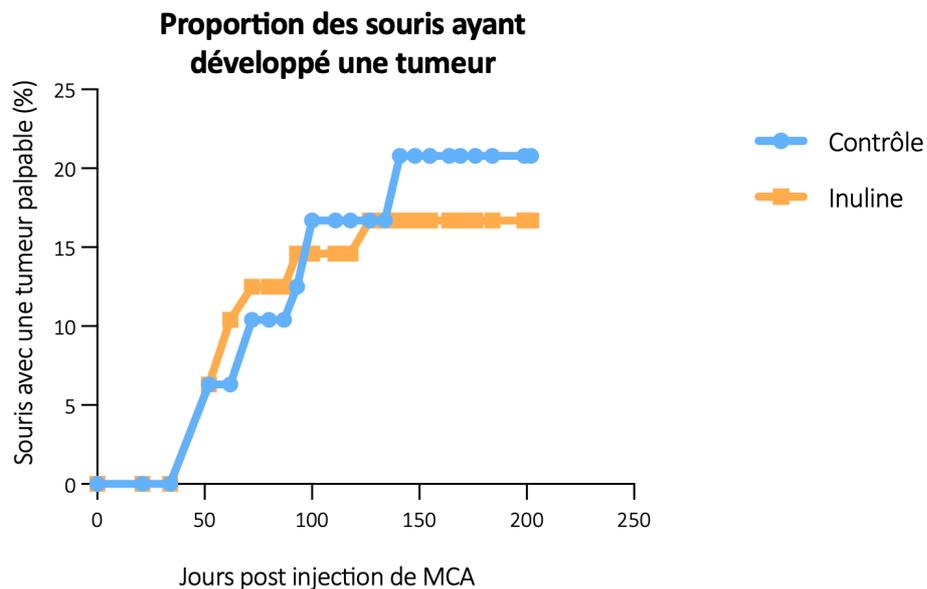


Figure 115 : Nombre de tumeurs cutanées post-injection de MCA. Les souris C57BL/6 ont été nourries durant 15 jours avec un régime standard ou enrichi en inuline avant l'injection sous-cutanée de MCA. Après l'injection, les régimes contrôle et inuline étaient maintenus pour toute la durée de l'expérience.

Afin de mettre en évidence des possibles différences de cinétique de croissance tumorale, nous avons représenté les résultats sous forme de courbes de survie (Figure 116A), et sous forme de croissances tumorales individuelles (Figure 116B). Ces 2 modes de représentation confirment les résultats représentés en Figure 115. En effet, ils ne montrent aucune différence significative entre les groupes de souris nourries avec de l'inuline ou non sur l'apparition de tumeurs ou sur leur cinétique de croissance à la suite de l'injection du cancérigène MCA.

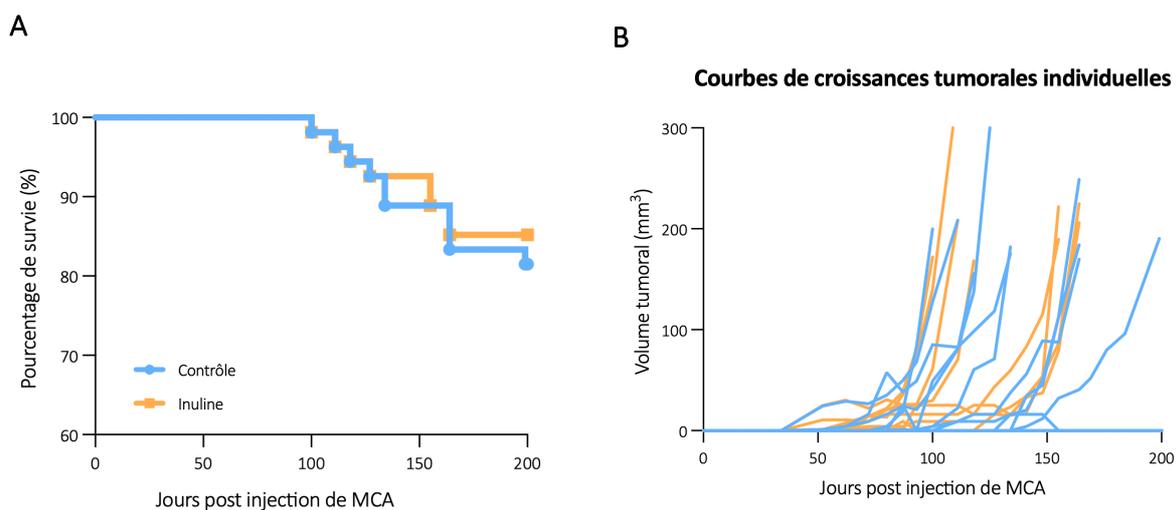


Figure 116 : Croissance des fibrosarcomes apparus post-injection de MCA. (A) Courbes de survie et (B) croissances tumorales individuelles des souris C57BL/6 nourries durant 15 jours avec un régime standard ou enrichi en inuline avant l’injection sous-cutanée de MCA. Après l’injection, les régimes contrôle et inuline étaient maintenus pour toute la durée de l’expérience.

CONCLUSION

Nous avons précédemment montré que la consommation d’inuline renforce l’immunité circulante et intestinale. Ces observations suggéraient que les souris nourries avec de l’inuline avaient une plus forte immunosurveillance des cancers et pourraient donc contrôler l’apparition de tumeurs induites par l’injection d’un cancérigène (MCA).

Le régime enrichi en inuline a permis une diminution légère mais non-significative du nombre de tumeurs apparues à la suite de l’injection d’un cancérigène cutané. Les tumeurs apparues chez les souris du groupe inuline croissaient de la même manière que les tumeurs des souris du groupe contrôle. Le renforcement de l’immunosurveillance induit par la consommation d’inuline n’a pas été suffisant pour contenir l’apparition des tumeurs dans ce modèle particulièrement virulent. En revanche, la faible diminution du nombre de tumeurs apparues soutient l’hypothèse d’un renforcement de l’immunosurveillance par la consommation d’inuline.

IX. L'EFFET ANTITUMORAL DE L'INULINE PEUT-IL SYNERGISER AVEC UNE IMMUNOTHERAPIE ANTI-PD-1 ?

De nombreuses études suggèrent que la présence de certaines bactéries immunostimulantes, comme *Bifidobacterium*, dans le microbiote intestinal, peut faciliter l'efficacité des immunothérapies inhibitrices de points de contrôle, comme ceux ciblant l'axe PD1/PD-L1 [155,224]. Nous avons montré qu'en plus d'exercer un effet antitumoral médié par l'immunité, le régime enrichi en inuline module le microbiote intestinal et favorise *Bifidobacterium*. Nous avons voulu tester un possible effet synergique de l'inuline et du traitement anti-PD-1.

METHODOLOGIE : COMBINAISON D'INULINE ET D'IMMUNOTHERAPIE ANTI-PD-1

Pour étudier une possible synergie des 2 traitements, nous avons traité par immunothérapie anti-PD-1 des souris nourries avec un régime contrôle ou inuline, porteuses de tumeurs B16 OVA, sensibles aux anti-PD-1 [225]. Le régime inuline a été initié 2 semaines avant l'implantation tumorale et maintenu tout le long de l'expérience. L'immunothérapie anti-PD-1 était injectée aux animaux aux jours 4, 7 et 10 post-implantation tumorale. Un suivi de la croissance tumorale a été mené et après 13 jours de croissance, toutes les tumeurs ont été collectées afin d'analyser l'immunité infiltrant la tumeur par cytométrie en flux (Figure 117).

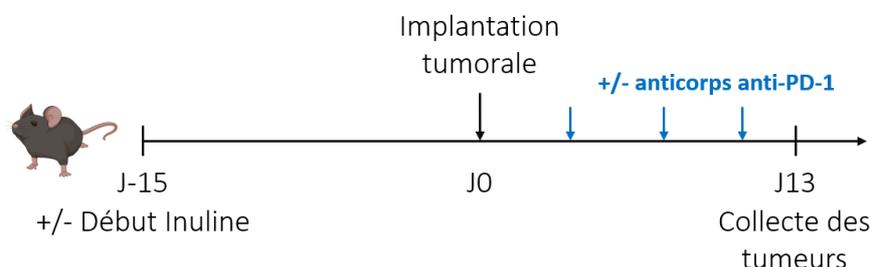


Figure 117 : Plan expérimental pour évaluer la combinaison de l'inuline et d'une immunothérapie anti-PD-1.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

INJECTION D'IMMUNOTHERAPIE ANTI-PD-1

Les souris reçurent 100 µL de PBS 1X contenant 100 µg d'anticorps monoclonal anti-PD-1 (clone RMP1-14, Bio X Cell) en intra-péritonéal. Les anticorps anti-PD-1 ont été injectés aux jours 4, 7 et 10 post-implantation tumorale.

CULTURE CELLULAIRE

Voir page 132.

IMPLANTATION TUMORALE

Voir page 133.

COLLECTE ET DIGESTION DES TUMEURS

Voir page 134.

CYTOMETRIE EN FLUX

Voir page 119 pour le protocole et les anticorps utilisés (Tableau 3) pour l'analyse des TILs. Pour l'analyse de l'expression de PD-1, les anticorps utilisés sont listés dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse de l'expression de PD-1.

Fluorochrome	Cible
Laser bleu (488 nm)	
FITC	CD3
PE	IL-10
PerCP-Cy TM 5.5	CD4
PE/Cy TM 7	γδ TcR
Laser rouge (640 nm)	
APC	IFNγ
APC-Cy7	CD45
Laser Violet	
BD Horizon TM Brilliant Violet 421	PD-1
BD Horizon TM V500	Marqueur de viabilité

RESULTATS

Comme attendu, l'immunothérapie seule a permis un contrôle fort de la croissance tumorale. Le régime enrichi en inuline a lui aussi permis une inhibition de la croissance tumorale, équivalente à celle obtenue grâce à l'immunothérapie. Que ce soit avec ou sans immunothérapie, les résultats sont identiques. Les effets des deux traitements n'ont donc pas synergisé (Figure 118).

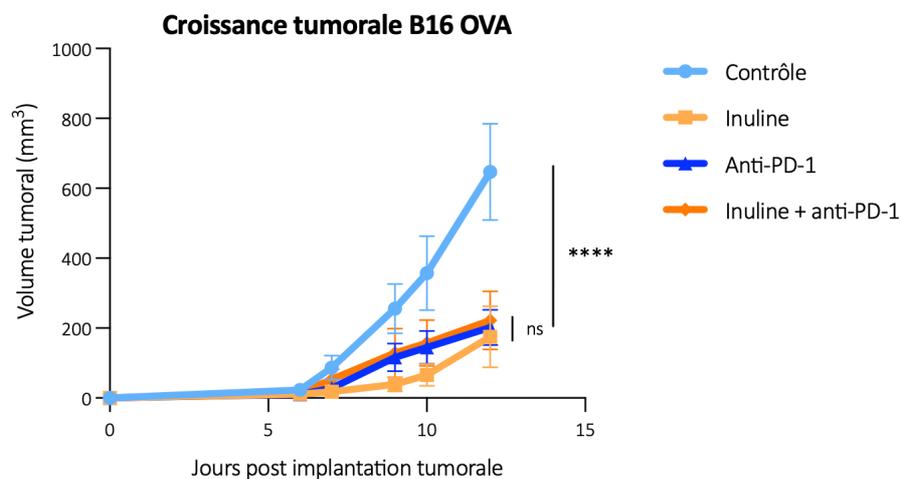


Figure 118 : Effet antitumoral de la combinaison de l'inuline et d'un anti-PD-1. Croissances tumorales de souris C57BL/6, nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et ayant reçu une injection sous-cutanée de 5×10^5 cellules de mélanome B16 OVA ($n=12$ par groupe). Aux jours 4, 7 et 10 post-implantation tumorale, un anticorps anti-PD-1 a été injecté à 6 animaux par groupe. Les courbes représentent les moyennes \pm SEM. ns = non-significatif, **** $p < 0,0001$, en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

Pour mieux comprendre cette absence de synergie entre les 2 traitements, nous avons analysé l'immunité infiltrant les tumeurs à la fin de la croissance tumorale, par cytométrie en flux. L'immunothérapie anti-PD-1, en ciblant la protéine PD-1 à la surface des LTs CD8⁺, prévient leur inactivation par les cellules cancéreuses. Sous anti-PD-1, les LTs CD8⁺ sont plus cytotoxiques, et une plus grande proportion d'entre eux est IFN γ ⁺ [226]. L'analyse des TILs conventionnels nous a confirmé cette augmentation de la proportion de LTs CD8⁺ IFN γ ⁺, dans les groupes traités par immunothérapie, ainsi que ceux traités à l'inuline, comme précédemment observé (Figure 119A). En revanche, seulement les groupes nourris avec de l'inuline ont vu leur proportion de

LTs CD4⁺ IFN γ ⁺ augmenter dans les tumeurs, suggérant un effet médié par les LTs $\gamma\delta$ (Figure 119B).

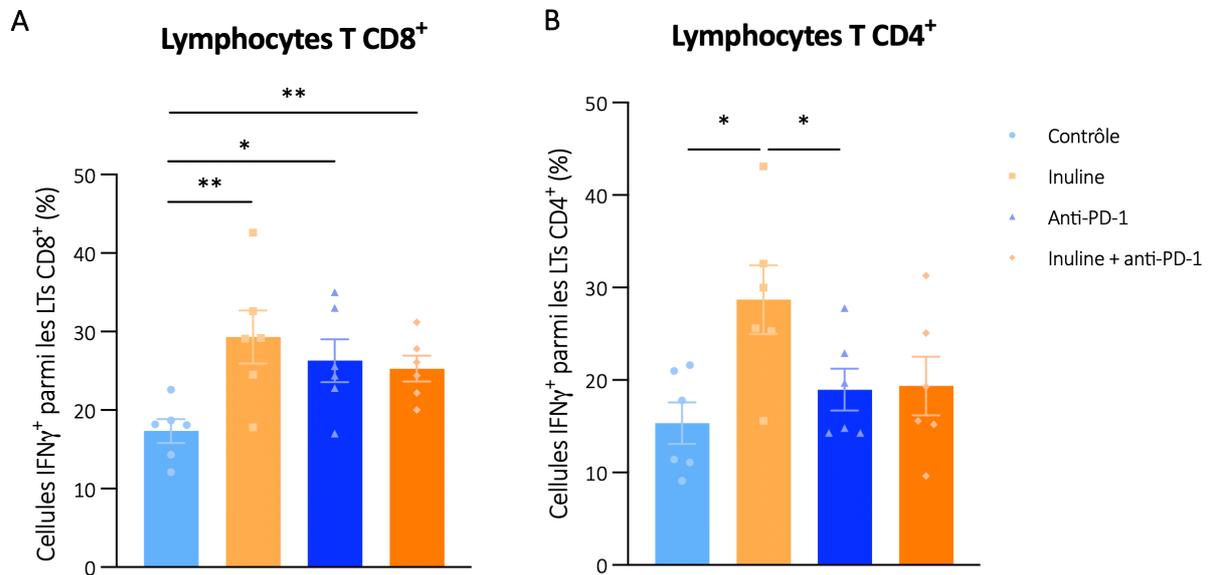


Figure 119 : LTs conventionnels produisant de l'IFN γ . Proportion des LTs (A) CD8⁺ et (B) CD4⁺ produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=12 par groupe) et traitées ou non avec une immunothérapie anti-PD-1 (n=6 par groupe). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. *p < 0,05, **p < 0,01, avec un test Mann Whitney.

La proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ n'a été augmentée que dans les 2 groupes nourris avec de l'inuline, et n'a pas été affectée par l'immunothérapie anti-PD-1 (Figure 120).

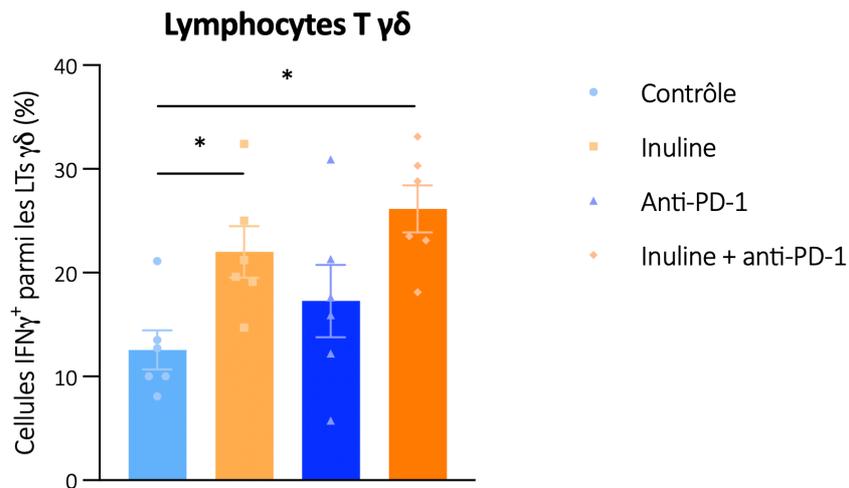


Figure 120 : LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ . Proportion des LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=12 par groupe) et traitées ou non avec une immunothérapie anti-PD-1 (n=6 par groupe). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. *p < 0,05, avec un test Mann Whitney.

Une différence d'expression de la protéine PD-1 par les LTs entre les groupes contrôle et inuline pourrait expliquer l'absence de synergie entre les 2 traitements. Cependant, le régime enrichi en inuline ne semble pas impacter ni la proportion de LTs PD-1⁺ (Figure 121A), ni le niveau d'expression de PD-1 par les LTs (Figure 121B).

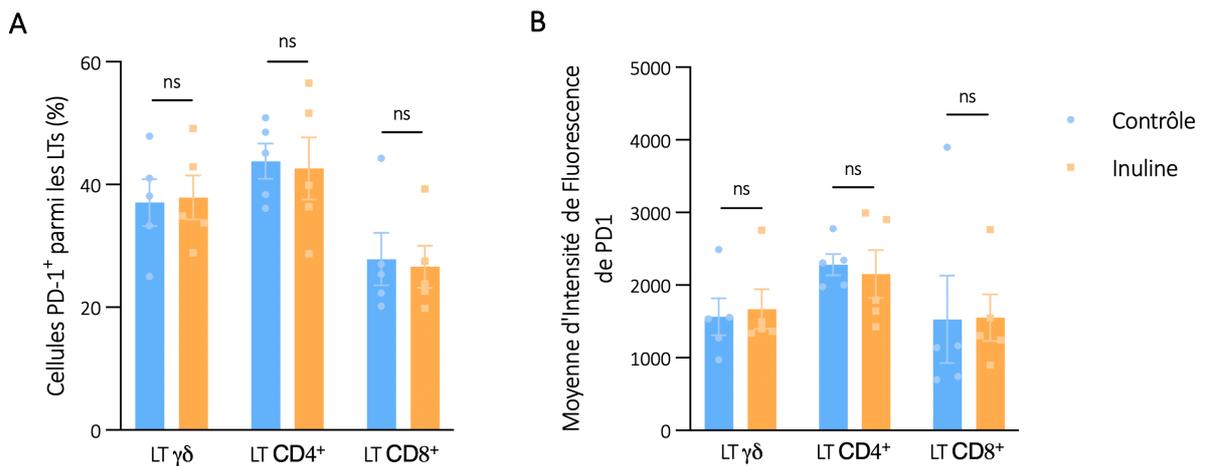


Figure 121 : Expression de PD-1 par les LTs. (A) Fréquences et (B) moyennes d'intensité de fluorescence de PD-1 par les LTs dans les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=5) ou enrichi en inuline (n=5). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

CONCLUSION

Le régime enrichi en inuline induit un effet antitumoral aussi efficace que l'immunothérapie anti-PD-1 seule. Cependant, la combinaison des deux traitements n'a pas montré de synergie des effets antitumoraux. Nous avons précédemment montré que la consommation d'inuline permet un renforcement de l'immunosurveillance dépendant des LTs $\gamma\delta$. Ces LTs $\gamma\delta$ supportent ensuite l'activation et la polarisation Th1 des LTs conventionnels $CD4^+$ et $CD8^+$. L'immunothérapie anti-PD-1 permet de prévenir l'inactivation des LTs $CD8^+$, ce qui se manifeste par une plus grande proportion de LTs produisant de l'IFN γ . *In fine*, le régime inuline, tout comme l'immunothérapie anti-PD-1, entraîne une plus grande infiltration tumorale en LTs $CD8^+$ produisant de l'IFN γ , en grande partie à l'origine de l'inhibition de la croissance tumorale (Figure 122).

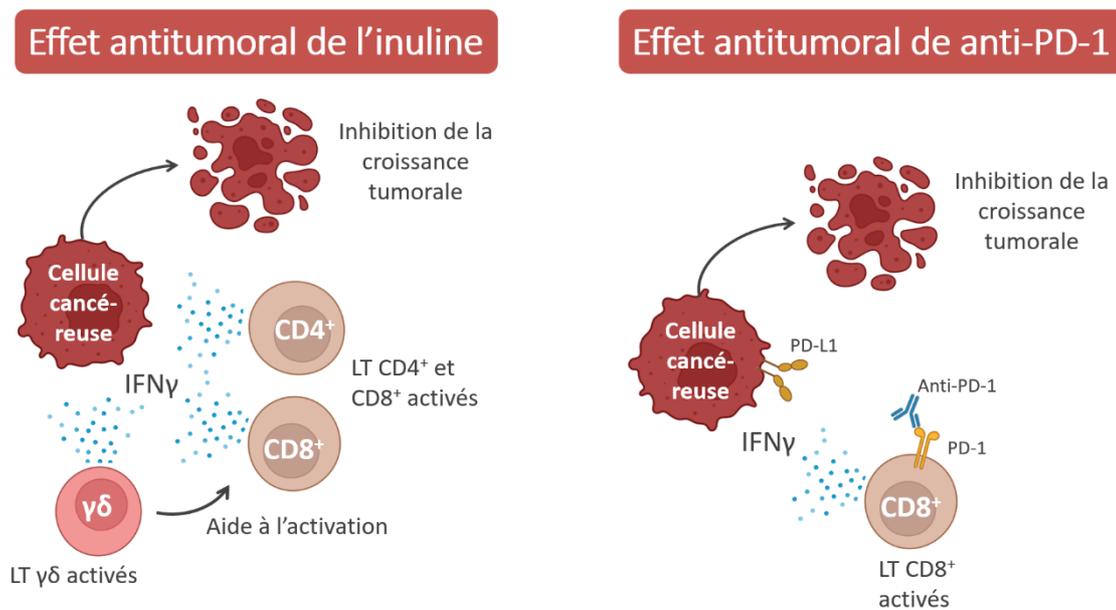


Figure 122 : Hypothèses de mécanismes d'action lymphocytaires de l'inuline et de l'immunothérapie anti-PD-1.

CONCLUSION DU CHAPITRE 1

Les résultats obtenus permettent de proposer un mécanisme d'action de l'inuline résumé en Figure 123, dans lequel l'inuline impacte grandement la composition et la fonction du microbiote intestinal, qui ensuite, renforcent l'immunité intestinale et circulante. Dans le cas d'un challenge tumoral périphérique, l'immunité intestinale et/ou circulante et/ou cutanée renforcée par l'inuline migre à la tumeur, où elle inhibe la croissance tumorale d'une manière dépendante des LTs, et plus particulièrement des LTs $\gamma\delta$.

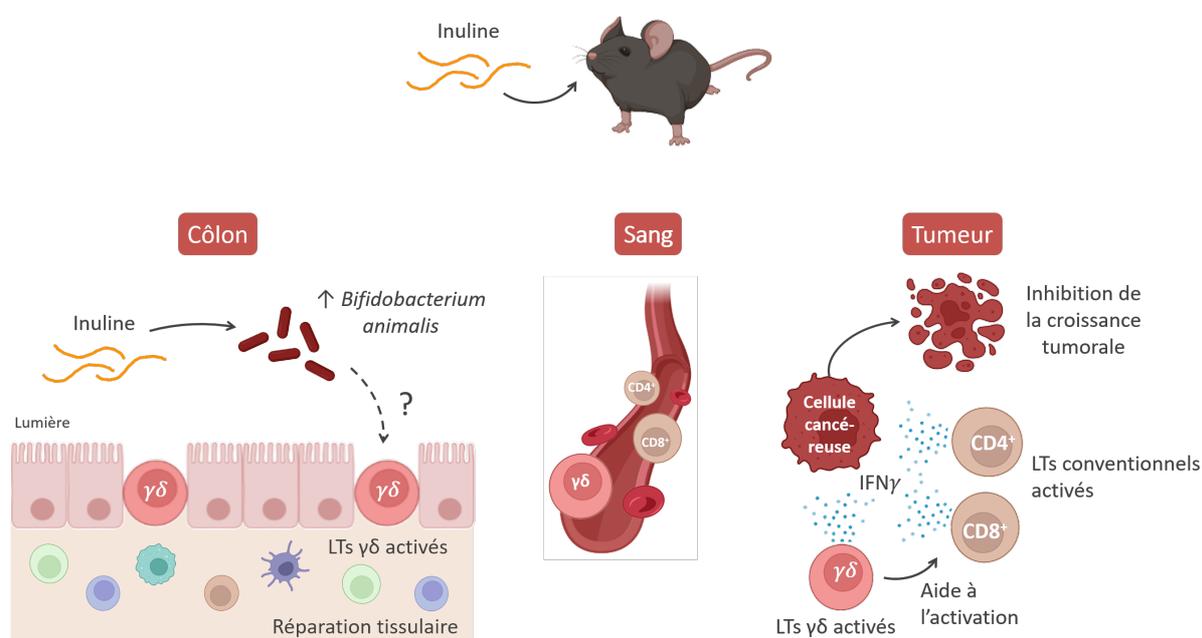


Figure 123 : Proposition de mécanisme d'action de l'inuline sur l'immunité intestinale, circulante, et antitumorale. Une fois ingérée, l'inuline se retrouve dans le côlon, où elle est fermentée par les bactéries commensales, et induit notamment une augmentation de l'abondance relative de *Bifidobacterium*. Dans la barrière intestinale, les IELs $\gamma\delta$ produisent de l'IFN γ . Dans le sang, une plus grande proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ circule chez les souris nourries avec de l'inuline. Chez des souris porteuses de tumeurs, la consommation d'inuline entraîne une augmentation de la proportion de LTs produisant de l'IFN γ , probablement à l'origine de la mort des cellules cancéreuses. L'inhibition de la croissance tumorale par la consommation d'inuline est médiée par les LTs $\gamma\delta$, pouvant acquérir un phénotype de cellule présentatrice d'antigènes afin d'activer les LTs conventionnels.

CHAPITRE 2 : COMMENT L'INULINE ACTIVE-T-ELLE L'IMMUNITÉ ?

L'inuline est un prébiotique, fermenté dans le côlon par le microbiote intestinal. Sa fermentation entraîne la production de nombreux métabolites, comme le fructose, les SCFAs et l'H₂. Dans ce chapitre, les capacités immunostimulantes de l'inuline directement, ou des métabolites issus de sa fermentation seront étudiés (Figure 124).

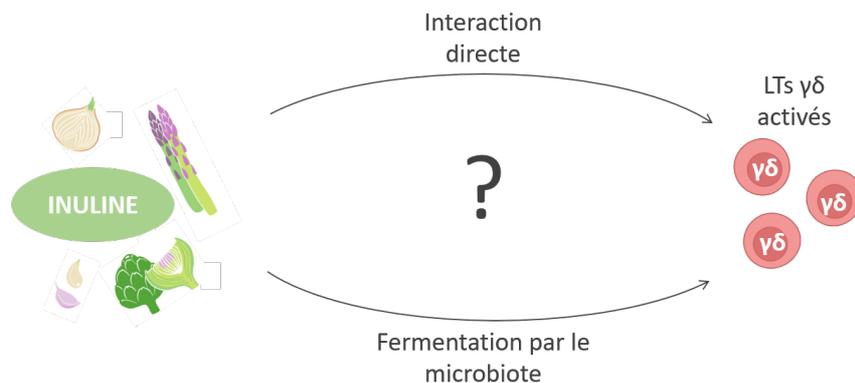


Figure 124 : Possibles voies d'activation de l'immunité par l'inuline.

I. IMPLICATION DU MICROBIOTE INTESTINAL BACTERIEN DANS L'EFFET ANTI-TUMORAL DE L'INULINE

Même si l'effet immunostimulant de la consommation d'inuline a été observé dans plusieurs études, son mécanisme reste encore à être élucidé [202,225]. Certains polysaccharides, comme l'inuline, peuvent activer les cellules immunitaires en étant détectés par leurs TLR-4. Nous avons tout d'abord étudié la possibilité que l'inuline active directement les LTs $\gamma\delta$ via leurs TLR-4 [227,228]. Chez l'homme, les LTs $\gamma\delta$ et les LTs CD8⁺ expriment TLR-4 et peuvent être activés par la détection de LPS [229]. Chez la souris, seulement les LTs $\gamma\delta$ expriment TLR-4, ce qui pourrait expliquer le fait que l'inuline n'active que les LTs $\gamma\delta$ intestinaux [230]. Nous avons donc évalué la capacité de l'inuline à directement activer l'immunité et entraîner un effet antitumoral, sans fermentation par le microbiote intestinal bactérien.

METHODOLOGIE : ELIMINATION DU MICROBIOTE INTESTINAL BACTERIEN PAR ANTIBIOTIQUES

Pour évaluer l'implication du microbiote intestinal bactérien dans l'effet immunostimulant et antitumoral de la consommation d'inuline, des souris C57BL/6 ont été traitées avec un cocktail d'antibiotiques à large spectre dilués dans leur eau de boisson, puis nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline durant 2 semaines, en continuant le traitement antibiotique (Figure 125). Après 2 semaines de régime, une tumeur B16 OVA a été implantée en sous-cutané dans le flanc droit des souris, puis la croissance tumorale a été suivie durant 2 semaines supplémentaires, tout en maintenant le régime inuline et les antibiotiques. A l'issue des 2 semaines de croissance tumorale, les tumeurs ont été collectées puis l'immunité les infiltrant les tumeurs a été analysée par cytométrie en flux.

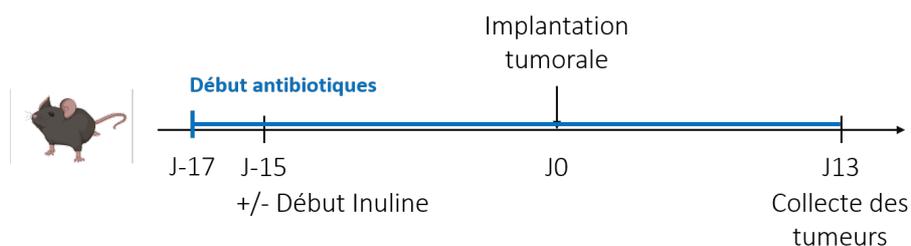


Figure 125 : Plan expérimental pour l'étude de l'implication du microbiote intestinal bactérien dans l'effet antitumoral de l'inuline.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

SUPPRESSION *IN VIVO* DU MICROBIOTE INTESTINAL BACTERIEN

Le microbiote intestinal bactérien des souris a été éliminé en ajoutant dans leur eau de boisson un mélange d'antibiotiques : 0,25 g/L de vancomycine (Mylan), 12×10^6 U/L de colimycine (Medac), 1 g/L d'ampicilline (Sigma) et 5 g/L de streptomycine (Sigma), comme précédemment décrit dans la littérature [231]. Ce cocktail d'antibiotiques a été ajouté dans l'eau de boisson des souris 2 jours avant le début du régime enrichi en inuline, puis maintenu durant toute la durée de l'expérience. Étant donnée la faible stabilité au cours du temps et la photosensibilité de certains antibiotiques, les biberons des animaux étaient renouvelés tous les 2 à 3 jours, et enveloppés dans des feuilles d'aluminium.

CULTURE CELLULAIRE

Voir page 132. Uniquement la lignée B16 OVA a été utilisée dans cette partie.

IMPLANTATION TUMORALE

Voir page 133.

COLLECTE ET DIGESTION DES TUMEURS

Voir page 134.

Voir page 119 pour le protocole et la liste des anticorps utilisés (Tableau 3).

RESULTATS

Lorsque les souris sont traitées par antibiotiques dilués dans leur eau de boisson, le régime enrichi en inuline ne permet plus aux souris de contrôler la croissance de leur tumeur implantée (Figure 126). En effet, en 13 jours, les tumeurs B16 OVA des 2 groupes atteignent plus de 500 mm³, ce qui est la taille classiquement atteinte par les tumeurs dans le groupe contrôle (Figure 76 page 136).

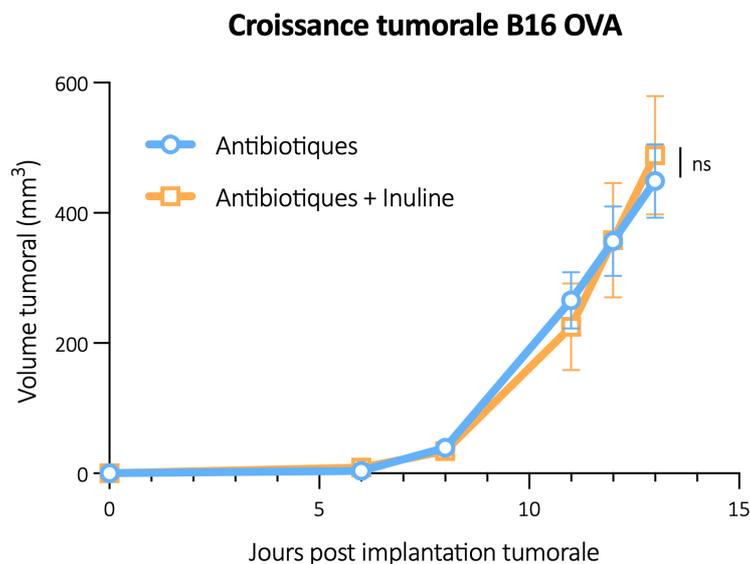


Figure 126 : Implication du microbiote intestinal bactérien dans l'effet antitumoral de l'inuline. Croissance tumorale chez des souris C57BL/6 traitées par antibiotiques et nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et ayant reçu en injection sous-cutanée 2×10^5 cellules de mélanome murin B16 OVA (n=6 par groupe). Les courbes représentent les moyennes \pm SEM. ns = non significatif en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

Dans le Chapitre 1, nous avons montré que l'effet antitumoral de l'inuline est médié par l'immunité, et principalement par les LTs. Pour vérifier que l'abrogation de l'effet antitumoral de l'inuline par la consommation d'antibiotiques est dépendante d'un phénomène immunitaire, les LTs $\gamma\delta$ et conventionnels intra-tumoraux ont été analysés par cytométrie en

flux. Lorsque les animaux sont traités avec des antibiotiques, les proportions de TILs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ sont identiques entre les tumeurs des souris contrôle et inuline (Figure 127).

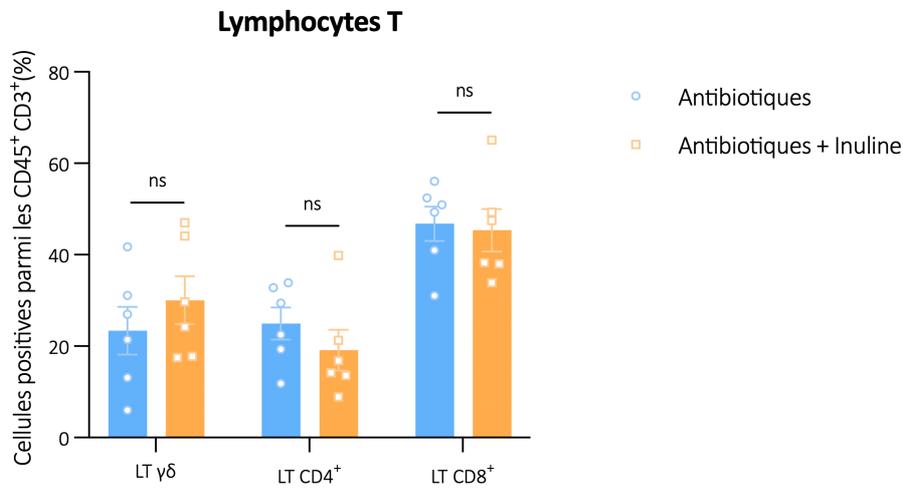


Figure 127 : Lymphocytes T infiltrant les tumeurs. Proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ parmi les cellules $CD45^+$, $CD3^+$ infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6) et traitées par antibiotiques. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

De plus, les proportions de ces LTs produisant de l'IFN γ étaient également similaires entre les 2 groupes (Figure 128).

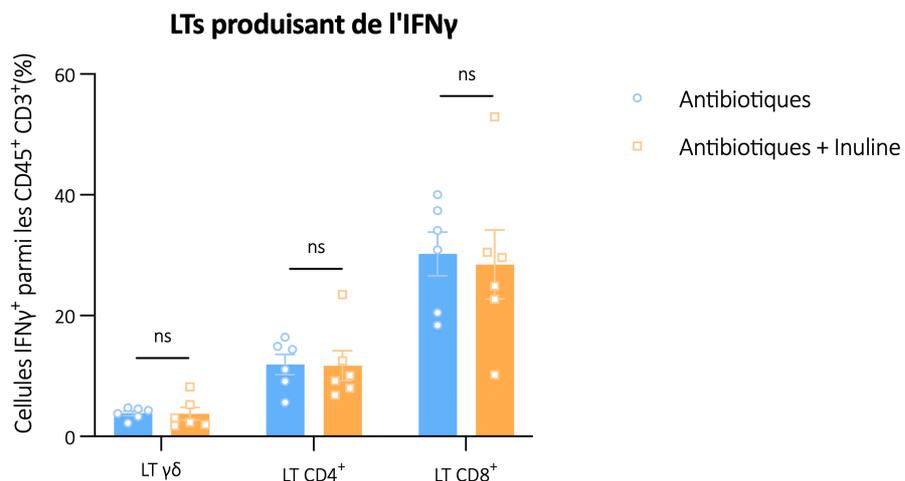


Figure 128 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ . Proportion des lymphocytes T produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6) et traitées par antibiotiques. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

CONCLUSION

En absence de bactéries dans le microbiote intestinal, le régime enrichi en inuline ne permet pas aux souris de contrôler la croissance tumorale. Si l'effet antitumoral de l'inuline était dû à sa capacité d'activer les LTs $\gamma\delta$ via leurs TLR-4, l'absence de microbiote n'aurait pas entravé cet effet. Ainsi, la fermentation de l'inuline par les bactéries est indispensable pour son effet antitumoral (Figure 129).

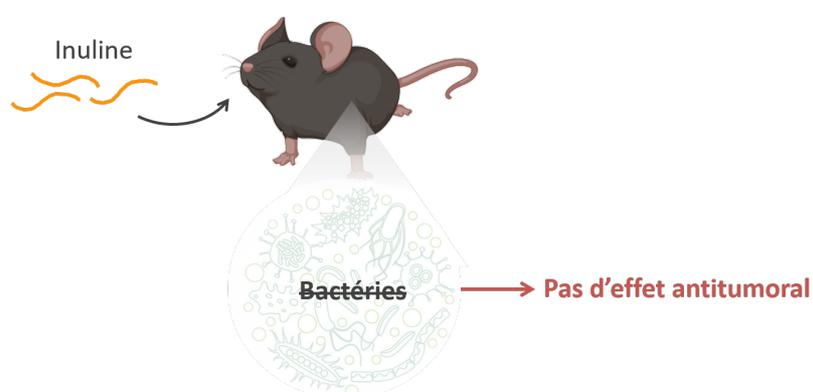


Figure 129 : L'inuline doit être fermentée par le microbiote intestinal pour exercer un effet antitumoral.

II. IMPLICATION DU MICROBIOTE FONGIQUE DANS L'EFFET ANTITUMORAL DE L'INULINE

Nous avons montré précédemment que les bactéries du microbiote intestinal sont indispensables à l'effet antitumoral de l'inuline. De plus, l'inuline impacte la composition du microbiote intestinal bactérien, en favorisant la présence de bactéries bénéfiques, comme les *Bifidobacteria*. Mais les bactéries ne sont pas les seuls colonisateurs du microbiote intestinal. En effet, elles cohabitent avec d'autres micro-organismes, dont des champignons. Bien moins abondants que les bactéries, ils participent tout de même à l'équilibre du microbiote intestinal. En favorisant la présence de certaines bactéries bénéfiques, l'inuline pourrait impacter certaines populations de champignons qui seraient alors impliqués dans l'effet antitumoral de l'inuline [232,233]. Nous avons évalué l'implication du mycobiote dans l'effet antitumoral de l'inuline, de manière directe ou en soutien aux autres populations de micro-organismes intestinaux.

METHODOLOGIE : ELIMINATION DU MICROBIOTE INTESTINAL FONGIQUE PAR ANTIFONGIQUE

Pour évaluer l'implication du microbiote intestinal fongique dans l'effet immunostimulant et antitumoral de la consommation d'inuline, des souris C57BL/6 ont été traitées avec un antifongique large spectre administré par gavage, puis maintenu dans leur eau de boisson pour toute la durée de l'expérience (Figure 130). Les souris ont ensuite été nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline, puis une tumeur B16 OVA leur a été implantée en sous-cutané dans le flanc droit. La croissance tumorale a été suivie durant 2 semaines, tout en maintenant le régime inuline et le traitement antifongique. A l'issue des 2 semaines de croissance tumorale, les tumeurs ont été collectées puis l'immunité les infiltrant a été analysée par cytométrie en flux.

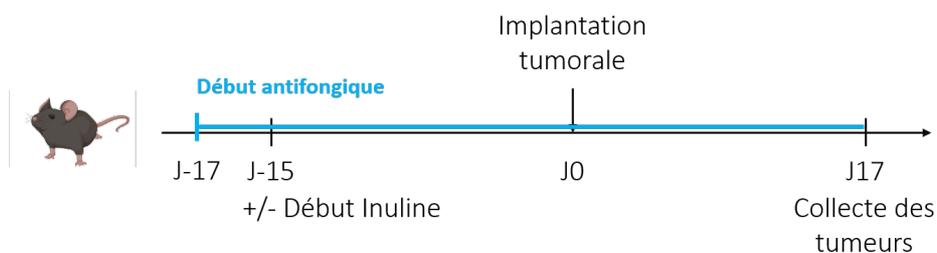


Figure 130 : Plan expérimental pour l'étude de l'implication du microbiote intestinal fongique dans l'effet antitumoral de l'inuline.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

SUPPRESSION *IN VIVO* DU MICROBIOTE INTESTINAL FONGIQUE

Le microbiote intestinal fongique des souris a été éliminé par gavage de 100 μ L d'amphotéricine B (10 mg/mL) (Fungizone), une fois par jour, durant 2 jours. Puis l'antifongique a été administrée par l'eau de boisson à la concentration de 0,25 g/L d'amphotéricine B. Les biberons étaient changés tous les 2 à 3 jours.

CULTURE CELLULAIRE

Voir page 132. Uniquement la lignée B16 OVA a été utilisée dans cette partie.

IMPLANTATION TUMORALE

Voir page 133.

COLLECTE ET DIGESTION DES TUMEURS

Voir page 134.

CYTOMETRIE EN FLUX

Voir page 119 pour le protocole et la liste des anticorps utilisés (Tableau 3).

RESULTATS

Les souris nourries avec de l'inuline contrôlent la croissance de leur tumeur, indépendamment de la présence de traitement antifongique (Figure 131). Cependant, le traitement antifongique seul a également permis d'inhiber la croissance tumorale.

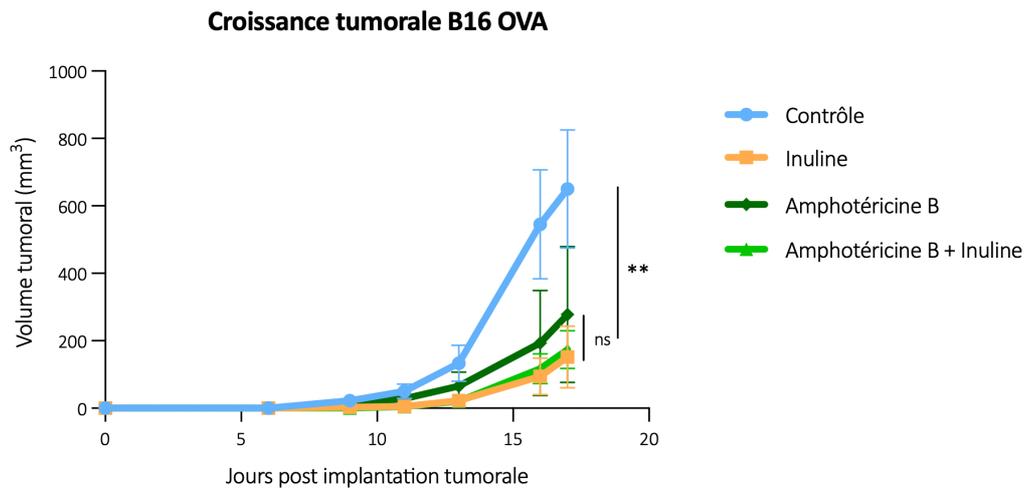


Figure 131 : Implication du microbiote intestinal fongique dans l'effet antitumoral de l'inuline. Croissance tumorale chez des souris C57BL/6 traitées ou non par antifongique et nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et ayant reçu en injection sous-cutanée 2×10^5 cellules de mélanome murin B16 OVA (n=6 par groupe). Les courbes représentent les moyennes \pm SEM. ns = non significatif, **p < 0,01 en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

Afin de mieux comprendre l'effet antitumoral similaires des 3 groupes traités, l'immunité infiltrant les tumeurs a été analysée par cytométrie en flux. Cependant, les tumeurs des groupes « Inuline », « Amphotéricine B » et « Amphotéricine B + Inuline » étaient si petites (Volume < 5 mm³), que certaines n'ont pas pu être prélevées et analysées. D'autres petites tumeurs ont pu être prélevées, mais comportaient trop peu de cellules pour être analysées par cytométrie en flux. Ainsi, l'immunité infiltrant les tumeurs les plus petites, donc celles ayant le mieux répondu aux traitements, n'ont pas pu être analysées. L'infiltration tumorale en LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ semble similaire entre les 4 groupes (Figure 132).

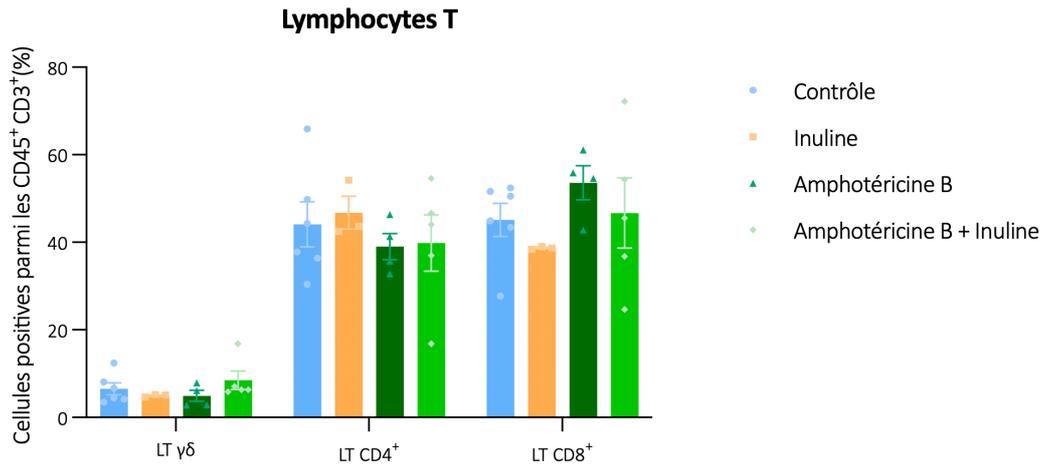


Figure 132 : Lymphocytes T infiltrant les tumeurs. Proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ parmi les cellules CD45⁺, CD3⁺ infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et traitées ou non par antifongique. Contrôle n=6 ; Inuline n=3 ; Amphotéricine B n=4 ; Amphotéricine B + Inuline n=5. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. Les groupes ont été comparés avec des tests Mann Whitney et aucune différence significative n'a été observée.

La production d'IFN γ par les TILs n'a pas pu être confirmée dans le groupe inuline, à cause du trop faible nombre de tumeurs analysables (n=3). En revanche, l'amphotéricine B seule a permis d'augmenter significativement la proportion de TILs CD8⁺ produisant de l'IFN γ (Figure 133).

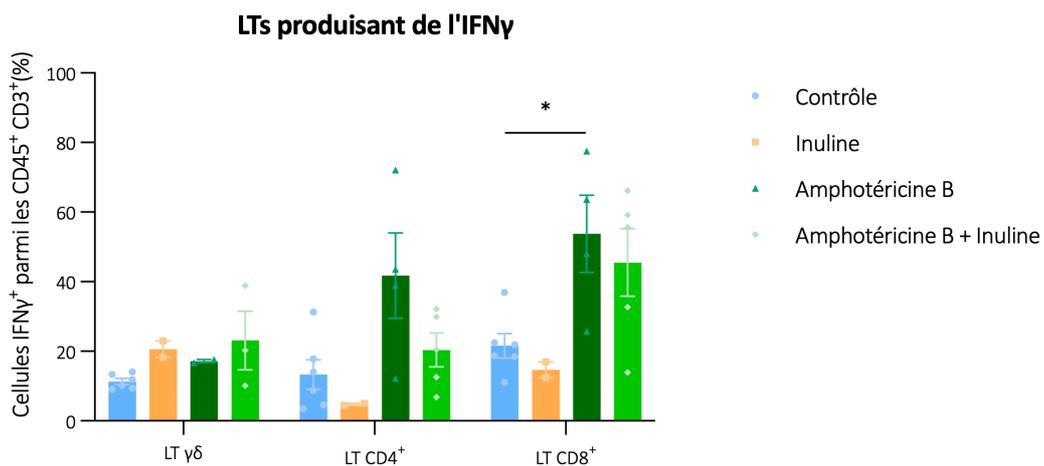


Figure 133 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ . Proportion des lymphocytes T produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et traitées ou non par antibiotiques. Contrôle n=6 ; Inuline n=2 ; Amphotéricine B n=4 ; Amphotéricine B + Inuline n=5. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. *p < 0,5 avec un test Mann Whitney.

CONCLUSION

En absence de champignons dans le microbiote intestinal, l'efficacité antitumorale du régime enrichi en inuline n'est pas impactée. De manière surprenante, en absence de microbiote fongique, les souris peuvent contrôler la croissance de leur tumeur, même sans consommation d'inuline. De plus, l'infiltration tumorale en LTs $CD8^+$ $IFN\gamma^+$ de ces souris est augmentée par rapport aux autres conditions testées. Il semblerait donc que les champignons soient délétères dans la réponse anticancer, et qu'ils n'aient pas de rôle dans l'effet antitumoral de l'inuline (Figure 134).

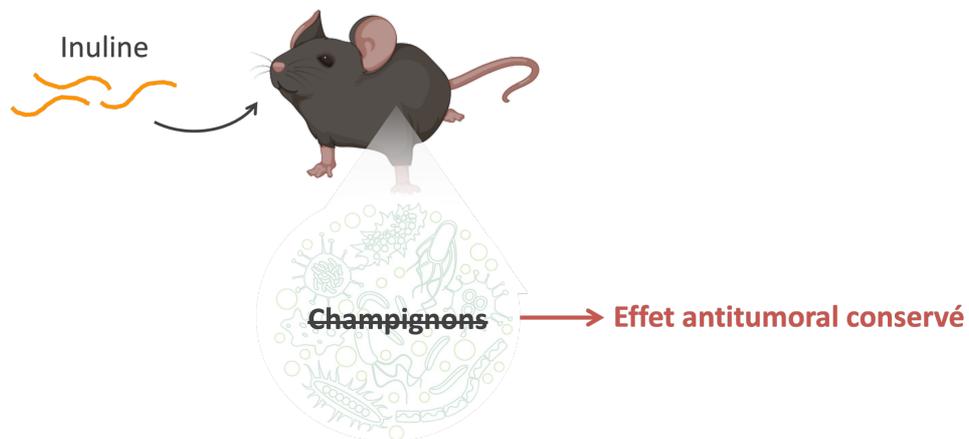


Figure 134 : Le mycobiote intestinal n'impacte l'effet antitumoral de l'inuline.

III. IMPORTANCE DU DEGRE DE POLYMERISATION DE L'INULINE

L'inuline est composée d'un monomère de glucose suivi d'un polymère de fructoses. La capacité prébiotique de l'inuline est contenue dans les liaisons entre les fructoses, qui ne sont pas digérables par les enzymes humaines. La liaison qui sépare le glucose de la chaîne de fructoses est hydrolysable par l'enzyme sucrase exprimée par les cellules humaines. Ainsi, elle libère un le monomère de glucose dès le début de la digestion de l'inuline. La longueur de la chaîne de fructose dépend du degré de polymérisation de l'inuline (Figure 135).



Figure 135 : Exemple d'inulines à chaînes longues ou courtes. DP = Degré de polymérisation ; G = Glucose ; F = Fructose.

Le glucose est utilisé comme source d'énergie par les cellules cancéreuses. C'est pourquoi certaines interventions nutritionnelles visent à diminuer l'apport en glucose directement assimilable par les cellules cancéreuses [170]. A masses égales, une inuline avec haut degré de polymérisation devrait exercer un effet antitumoral plus fort qu'une inuline avec un degré de polymérisation plus faible. Nous avons donc voulu vérifier l'importance du degré de polymérisation de l'inuline administrée pour observer un effet anticancer.

METHODOLOGIE : EVALUATION DE L'EFFET ANTITUMORAL D'UNE INULINE A CHAINE COURTE

Afin d'étudier l'importance du degré de polymérisation de l'inuline dans son effet antitumoral, des souris C57BL/6 ont été nourries durant 2 semaines avec un régime enrichi en inuline à chaîne courte ou à chaîne longue. Après 2 semaines de régime, les souris ont reçu une injection

sous-cutanée d'un carcinogène, le MCA (Figure 136). L'apparition des tumeurs a été contrôlée à partir de 70 jours après l'injection de MCA, puis jusqu'à 120 jours post-injection.

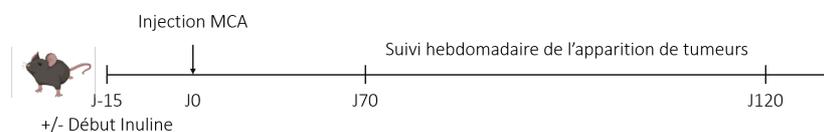


Figure 136 : Plan expérimental pour étudier l'importance du degré de polymérisation de l'inuline dans son effet antitumoral.

ANIMAUX

Voir page 99.

Deux inulines Orafti® de Beneo ont été administrées aux souris (Tableau 16). La même concentration (72 g/L) a été utilisée pour les 2 inulines, et les biberons ont été changés à la même fréquence (tous les 2 à 3 jours).

Tableau 16 : Comparaison des 2 inulines Orafti® testées. DP = Degré de polymérisation.

	Pureté	Sucrosité (% du saccharose)	Caractéristiques
Inuline GR	≈ 92%	10%	Grenelée. DP > 10
Inuline HSI	≈ 88%	30%	Hautement soluble. DP < 10

Numéros d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#26300-2020070111383424.v3-v4.

Pour l'inuline GR, 2 groupes (contrôle et inuline GR) de 48 souris ont été utilisés. Pour l'inuline HSI, 2 groupes (contrôle et inuline HSI) de 96 souris ont été utilisés.

CREATION DU MODELE DE TUMEURS CHIMIO-INDUITES

Voir page 176.

RESULTATS

Les données présentées sont le résultat de 2 expériences séparées. La première expérience compare la fréquence d'apparition des tumeurs entre des souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline GR (comme présenté page 177), et la deuxième expérience compare la fréquence d'apparition des tumeurs entre des souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline HSI. La consommation d'inuline GR n'a pas permis de diminuer significativement la proportion de souris développant une tumeur (Figure 137A). En effet, 21% des souris contrôle ont développé une tumeur, contre 17% dans le groupe inuline GR. Le régime enrichi en inuline HSI a entraîné l'effet opposé. Plus de 36% de souris nourries avec de l'inuline HSI ont développé une tumeur en moins de 120 jours, alors que 25% des souris contrôle en avaient développé une à ce moment (Figure 137B).

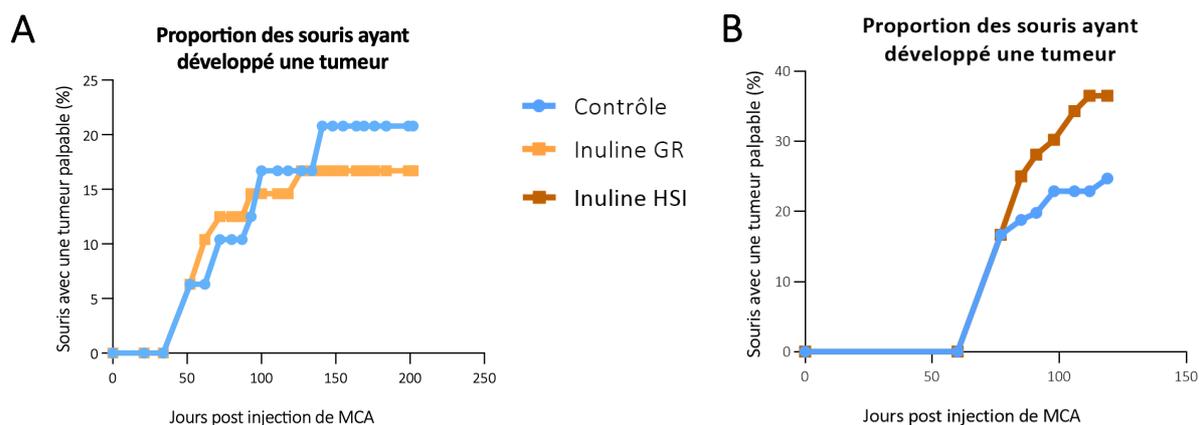


Figure 137 : Proportion des souris ayant développé une tumeur cutanée post-injection de MCA. Les souris C57BL/6 ont été nourries durant 15 jours avec un régime standard ou enrichi en inuline (A) GR, ou (B) HSI, avant l'injection sous-cutanée de MCA. Après l'injection, les régimes contrôle et inuline étaient maintenus pour toute la durée de l'expérience.

Lorsque la taille d'une tumeur atteignait 150 mm², la souris porteuse était euthanasiée. Afin de mettre en évidence des possibles différences de cinétique de croissance tumorale, les résultats ont aussi été représentés sous forme de courbe de survie (Figure 138). Ce mode de représentation permet d'illustrer uniquement les tumeurs ayant atteint une taille éthique maximale. Les courbes de survie ont confirmé les résultats représentés en Figure 137. En effet,

l'évolution de chaque groupe à la suite de l'injection de MCA est équivalente entre les 2 modes de représentation.

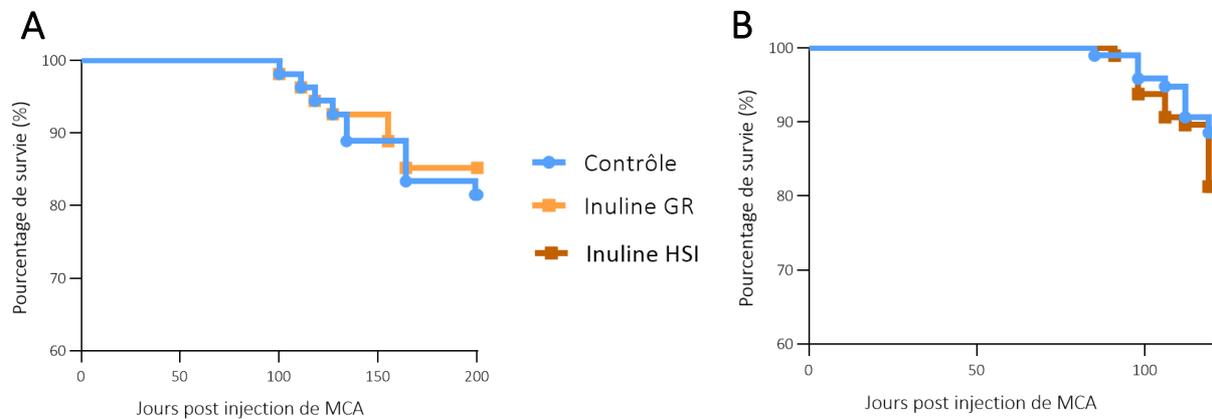


Figure 138 : Croissance des fibrosarcomes apparus post-injection de MCA. Courbes de survie des souris C57BL/6 nourries durant 15 jours avec un régime standard ou enrichi en inuline (A) GR ou (B) HSI, avant l'injection sous-cutanée de MCA. Après l'injection, les régimes contrôle et inuline étaient maintenus pour toute la durée de l'expérience.

Dans les 2 expériences, environ 21% des souris contrôle ont développé une tumeur 120 jours après l'injection du cancérigène MCA (Figure 139). La consommation d'inuline GR a permis de diminuer la proportion de souris développant une tumeur (15%), alors que la consommation d'inuline HSI a augmenté cette proportion (35%).

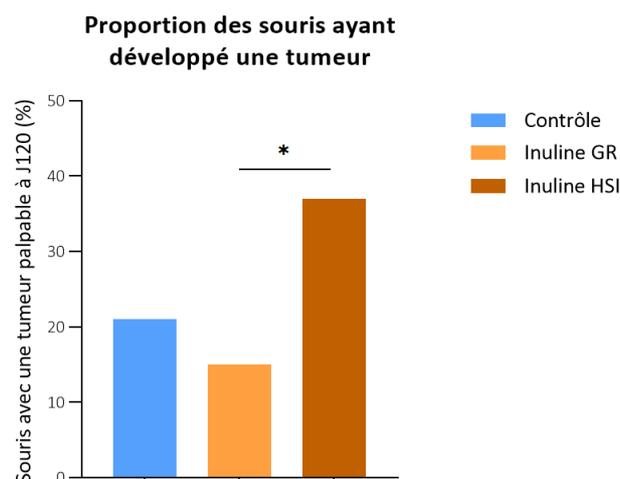


Figure 139 : Proportion des souris ayant développé une tumeur cutanée 120 jours post-injection de MCA. Les souris C57BL/6 ont été nourries durant 15 jours avec un régime standard ou enrichi en inuline GR ou HSI, avant l'injection sous-cutanée de MCA. Après l'injection, les régimes contrôle et inuline étaient maintenus pour toute la durée de l'expérience. * $p < 0,05$ en test de comparaison de fréquences χ^2 .

CONCLUSION

Le degré de polymérisation de l'inuline est primordial pour son effet anticancer. En effet, une inuline avec un degré de polymérisation supérieur à 10 (Inuline Orafti® GR) diminue légèrement mais de manière non-significative la proportion de souris développant une tumeur à la suite de l'injection d'un cancérigène cutané. En revanche, une inuline avec un degré de polymérisation inférieur à 10 (Inuline Orafti® HSI), présentant une plus faible pureté et un plus haut taux de sucrosité favorise l'apparition de tumeur dans le même contexte (Figure 140).



Figure 140 : Le degré de polymérisation de l'inuline affecte son impact sur l'apparition de cancers.
DP = Degré de polymérisation.

IV. LES METABOLITES

La fermentation de l'inuline et d'autres composés par le microbiote intestinal entraîne la production de nombreux métabolites. Ces métabolites, en contact direct avec les cellules immunitaires du côlon, pourraient être les médiateurs de l'effet immunostimulant et antitumoral de l'inuline. Nous avons ici testé la capacité des métabolites du microbiote intestinal à activer les LTs $\gamma\delta$.

METHODOLOGIE : ACTIVATION *IN VITRO* DE LTs $\gamma\delta$ HUMAINS DERIVES DU SANG

Afin de tester la capacité des métabolites microbiens à activer des LTs $\gamma\delta$, des eaux fécales ont été créées dans des fermenteurs à partir de selles humaines, puis déposés sur des LTs $\gamma\delta$ humains en culture (Figure 141). Ces expériences *in vitro* ont été réalisées à partir d'échantillons humains de sang, car elles nécessitaient beaucoup de LTs $\gamma\delta$, difficiles à récupérer en quantités suffisantes chez la souris. De plus, ces expériences à partir d'échantillons humains permettent un premier transfert chez l'homme de nos observations chez la souris.

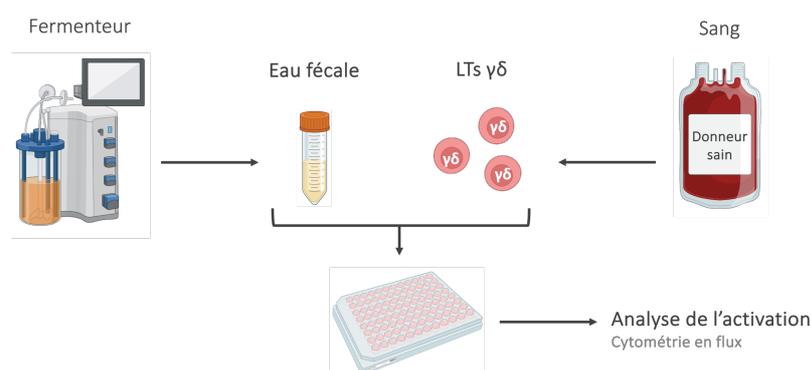


Figure 141 : Plan expérimental pour tester l'activation des LTs $\gamma\delta$ grâce aux métabolites microbiens.

Pour tester l'activation des LTs $\gamma\delta$, l'expression de marqueurs extracellulaires, ainsi que la production de cytokines seront analysées. Les marqueurs extracellulaires ciblés sont CD25, CD40, CD69 et CD107a/b, dont les rôles sont expliqués page 153.

Les échantillons d'eaux fécales ont été produits et fournis par le Pr. Stéphanie Blanquet-Diot de l'UMR454 MEDIS, Clermont Ferrand, France.

GENERATION DES ECHANTILLONS D'EAUX FECALES

L'équipe UMR454 MEDIS a développé un système de Côlon artificiel (ARCOL). Ce système récapitule les conditions intestinales *in vitro*, en contrôlant notamment le pH, la composition du milieu, les conditions anaérobies, et le péristaltisme. Des selles de donneurs sains ont étéensemencées dans le dispositif, et cultivées durant 13 jours. A l'issu des 13 jours, un échantillon de contenu de ce côlon artificiel a été prélevé et les bactéries ont été éliminées par centrifugation et filtration à 0,22 μm . Les échantillons ont ensuite été conservés à -80°C jusqu'à la mise en culture avec les LTs $\gamma\delta$.

ISOLEMENT DE LTs $\gamma\delta$ HUMAINS

SEPARATION DES CELLULES MONONUCLEEEES SANGUINES PERIPHERIQUES (PBMCs)

Une poche de sang d'un donneur sain (DS) a été récupérée à l'Établissement Français du Sang (EFS) de Grenoble. Les expérimentations ont été conduites en accord avec la Déclaration d'Helsinki. Toutes les procédures ont été approuvées pour les comités d'éthiques du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) de Grenoble et du Comité de Protection des Personnes (CPP) de l'EFS. Tous les donneurs ont signé un formulaire de consentement. Les PBMCs ont été isolés d'un échantillon de sang de 500 mL par gradient de densité avec du Ficoll (densité = 1,077).

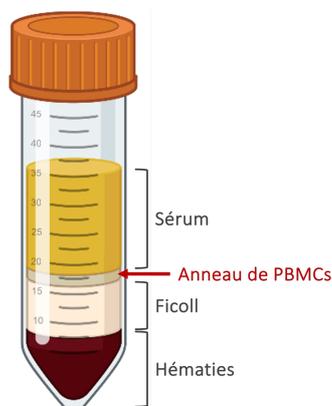


Figure 142 : Localisation de l'anneau de PBMCs après la centrifugation sur Ficoll.

Tous les anneaux de PBMC (Figure 142) ont été récupérés avec une pipette de 10 mL et ont été regroupés dans des nouveaux tubes de 50 mL. Les PBMCs ont ensuite été lavés 2 fois avec du PBS 1X par centrifugation à 400G à 4°C durant 10 minutes. Enfin, le culot a été suspendu dans du milieu de congélation contenant 37,5% de SVF et 10% de DMSO dans du milieu DMEM complet, puis stocké à -80°C. Le jour de l'analyse d'activation, les PBMCs ont été décongelés afin d'en isoler les LTs $\gamma\delta$. Le tri des LTs $\gamma\delta$ a été réalisé avec le kit EasySep™ Human Gamma/Delta T Cell Isolation Kit 19255, à sélection négative (Stemcell), en suivant les indications du fournisseur. Une fois purifiés, la suspension cellulaire a été déposée dans une plaque 96 puits, chaque puits contenant 2×10^5 LTs $\gamma\delta$.

ANALYSE DE L'ACTIVATION DES LTs $\gamma\delta$

Les LTs $\gamma\delta$ ont été incubés 24h à 37°C avec du milieu de culture DMEM complet, contenant ou non 10% d'eau fécale. Ensuite, les LTs $\gamma\delta$ ont été incubés 24h supplémentaires seuls, ou avec 0,1 UI/mL d'IL-2 (Preprotech) et 200 nM d'HMBPP (Sigma), un métabolite bactérien connu pour activer les LTs $\gamma\delta$, ou avec 20 ng/mL PMA et 1 μ g/mL ionomycine (contrôle positif). Durant les 4 dernières heures d'activation, du Golgi Stop™ (BD Biosciences) a été ajouté dans chaque puits.

CYTOMETRIE EN FLUX

Voir page 119. Les anticorps utilisés sont listés dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Liste des anticorps utilisés pour l'analyse des IELs et des LPCs

Fluorochrome	Cible
Laser bleu (488 nm)	
FITC	$\gamma\delta$ TcR
PE	CD107a + CD107b
PerCP-Cy™5.5	CD40
PE/Cy™7	CD3
Laser rouge (640 nm)	
APC	CD25
BD Horizon™ APC-R700	CD8
Laser Violet	
BD Horizon™ V450	IFN γ
BD Horizon™ V500	Marqueur de viabilité
BD Horizon™ Brilliant Violet 605	IL-17
BD Horizon™ Brilliant Violet 711	CD69

RESULTATS

Afin d'étudier la capacité des métabolites contenus dans l'eau fécale à activer les LTs $\gamma\delta$, différents marqueurs d'activation ont été analysés par cytométrie en flux sur les LTs $\gamma\delta$ cultivés en présence d'eau fécale ou d'activateurs spécifiques ou aspécifiques connus. L'ajout d'HMBPP, l'activateur spécifique des LTs $\gamma\delta$, a fortement augmenté l'expression de CD69, et a diminué l'expression de CD25 (Figure 143A et Figure 143C), mais n'a pas modifié l'expression de CD40 et CD107 (Figure 143B et Figure 143D). L'ajout de PMA et ionomycine, des activateurs aspécifiques des LTs $\gamma\delta$, a seulement augmenté la proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimant CD107 (Figure 143). L'eau fécale seule a permis d'augmenter la proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimant CD40, CD107a/b et CD69 (Figure 143B-D). L'ajout d'activateurs en plus de l'eau fécale n'a pas potentialisé l'effet activateur de l'eau fécale seule.

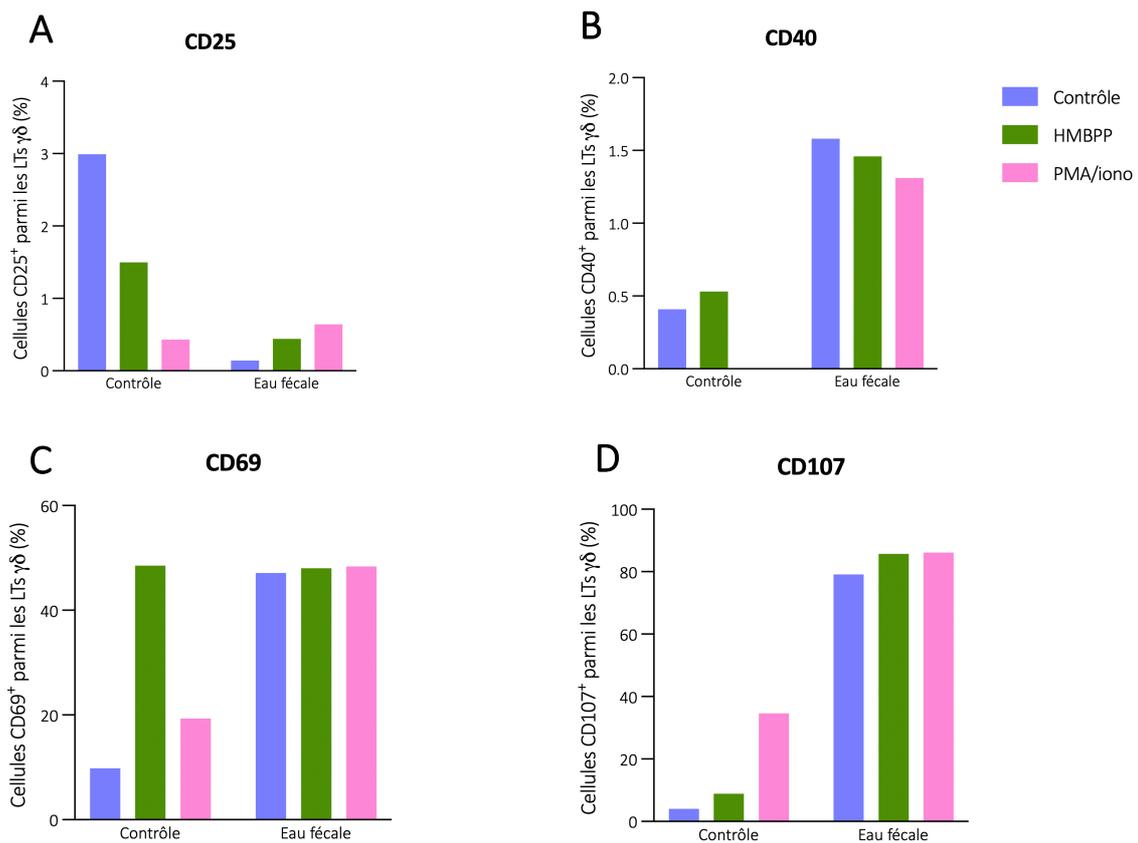


Figure 143 : Analyse de l'activation des LTs $\gamma\delta$ par de l'eau fécale. Des LTs $\gamma\delta$ isolés de sang d'un donneur sain ont été mis en culture avec ou sans eau fécale, et en présence ou non d'activateurs spécifiques (HMBPP) ou aspécifique (PMA/ionomycine) des LTs $\gamma\delta$. Les proportions de LTs $\gamma\delta$ exprimant les marqueurs d'activation (A) CD25, (B) CD40, (C) CD69 et (D) CD107 ont été analysées après 48h de culture, par cytométrie en flux. n=1

En revanche, l'eau fécale n'a pas augmenté l'expression du marqueur d'activation CD25 sur les LTs $\gamma\delta$ (Figure 143A).

Concernant la production de cytokines, le traitement des LTs $\gamma\delta$ avec de l'eau fécale sans activateur a permis d'augmenter la proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ de manière plus efficace que l'HMBPP ou le mélange de PMA et ionomycine (Figure 144A). De plus, l'eau fécale avec ou sans activateur, a légèrement augmenté la proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IL-17 (0,5%) en comparaison aux LTs $\gamma\delta$ non-traités (0,25%) (Figure 144B).

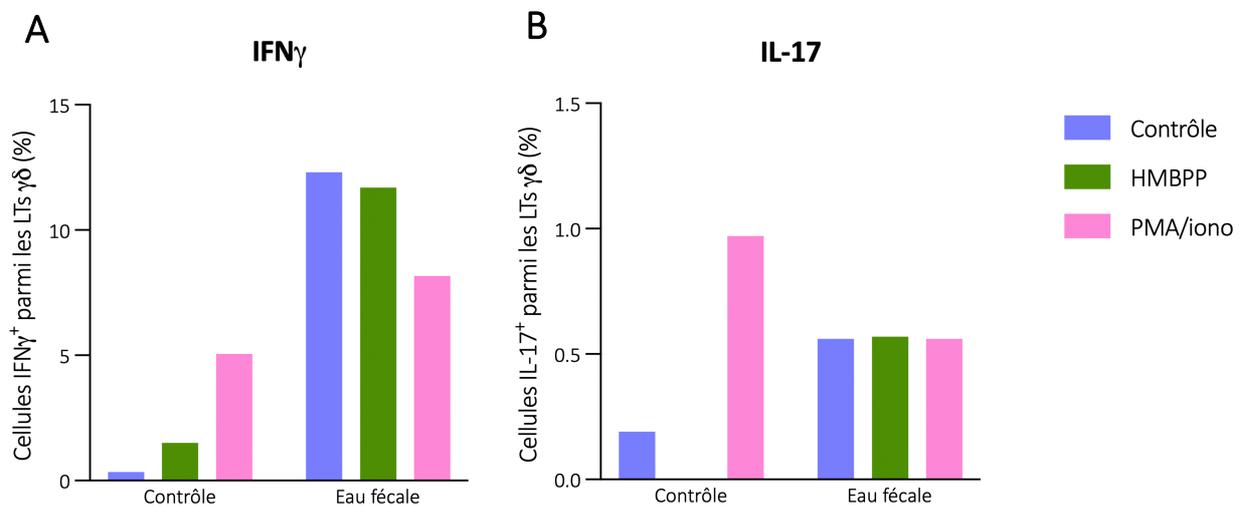


Figure 144 : Analyse de la production de cytokines par les LTs $\gamma\delta$ exposés à de l'eau fécale. Des LTs $\gamma\delta$ isolés de sang d'un donneur sain ont été mis en culture avec ou sans eau fécale, et en présence ou non d'activateurs spécifiques (HMBPP) ou aspécifique (PMA/ionomycine) des LTs $\gamma\delta$. Les proportions de LTs $\gamma\delta$ produisant les cytokines (A) IFN γ et (B) IL-17 ont été analysées après 48h de culture, par cytométrie en flux. n=1

CONCLUSION

Les métabolites contenus dans l'eau fécale peuvent induire l'activation des LTS $\gamma\delta$ *in vitro*. En effet, ce mélange de métabolite microbiens permet d'augmenter l'expression de marqueurs d'activation par les LTs $\gamma\delta$, comme CD40, CD69, CD107 et l'IFN γ . Ces résultats préliminaires suggèrent que les microorganismes du microbiote intestinal, via leurs métabolites, pourraient influencer l'activation des cellules immunitaires, notamment coliques (Figure 145). Pour confirmer ces observations, l'expérience devrait être reconduite sur des LTs $\gamma\delta$ de différents donneurs. Ensuite, l'effet activateur de l'eau fécale pourra être comparé avec celui d'une eau fécale produite dans un fermenteur contenant de l'inuline. Cette expérience mettra en évidence des activations immunitaires spécifiques des métabolites dérivés de la fermentation de l'inuline.

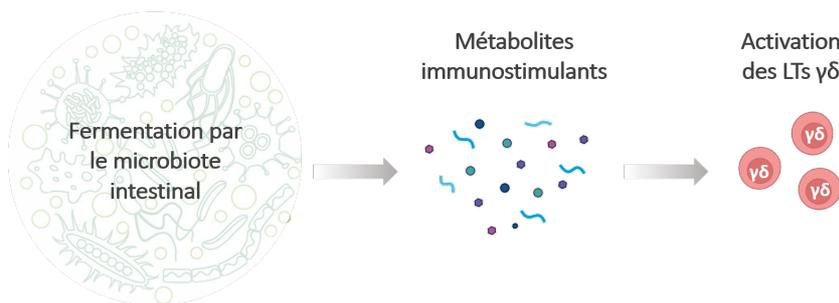


Figure 145 : Les métabolites produits par le microbiote intestinal peuvent activer les LTs $\gamma\delta$.

V. LE FRUCTOSE

Les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux utilisent différentes voies métaboliques comme source d'énergie suivant leur fonction. En effet, les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ utilisent principalement la glycolyse, alors que les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IL-17 utilisent plutôt l'oxydation des acides gras et des acides aminés [234]. Lors de la fermentation de l'inuline dans le côlon, différents métabolites sont libérés. Le premier métabolite à être produit est le fructose, qui compose la majorité de la molécule d'inuline. En situation physiologique normale, le fructose ingéré par l'hôte est directement absorbé dans le petit intestin, et n'atteint pas le côlon. En cas d'ingestion d'inuline, du fructose est rendu disponible et assimilable par les cellules épithéliales coliques. Une fois internalisé, le fructose peut rapidement être intégré dans la glycolyse pour permettre à la cellule de produire l'énergie nécessaire aux activités cellulaires.

La proportion de IELs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ est augmentée dans le côlon de souris nourries avec de l'inuline (Figure 69). Nous avons ici testé la capacité de l'inuline à entraîner une absorption de fructose par les lymphocytes intra-épithéliaux (IELs), et une reprogrammation métabolique de ceux-ci, vers la glycolyse, qui semble être la voie métabolique préférentielle des LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ .

METHODOLOGIE : SCENITH

Afin d'analyser le profil métabolique des IELs, des souris C57BL/6 ont été nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline, puis leurs côlons ont été prélevés et les IELs ont été isolés. Trois expériences ont été réalisées sur les IELs isolés (Figure 146).

- Sur une partie des IELs, les LTs $\gamma\delta$ ont été triés par cytométrie en flux (FACS, Fluorescence-Activated Cell Sorting), puis leur endométabolome a été analysé par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN), afin de déterminer la capacité des LTs $\gamma\delta$ à internaliser le fructose produit par la fermentation d'inuline.

- Sur une autre fraction des IELs, l'ARN a été extrait et purifié, afin d'analyser par RT-qPCR le niveau d'expression de GLUT2 et GLUT5, 2 transporteurs de fructose exprimés par les cellules coliques épithéliales [235,236].
- Enfin, le profil métabolique des IELs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ a été déterminé grâce à la méthode SCENITH™. Cette méthode permet de quantifier l'implication de plusieurs voies métaboliques dans l'activité des cellules par cytométrie en flux.

L'analyse RMN a été réalisée en collaboration avec le Dr. Bénédicte Elena-Herrmann de l'Institut for Advanced Biosciences (IAB), Grenoble, France.

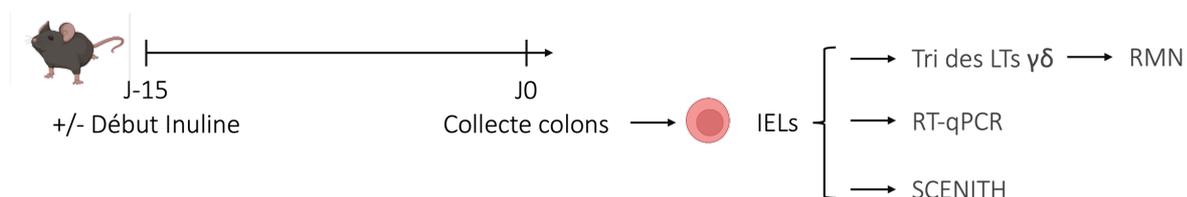


Figure 146 : Plan expérimental pour étudier le profil métabolique des IELs $\gamma\delta$ coliques.

ANIMAUX

Voir page 99.

Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#12905-2018010411002729.v7

COLLECTE DE COLONS ET TRI DES LYMPHOCYTES INTRAEPITHÉLIAUX

Voir page 118.

TRI CELLULAIRE INDUIT PAR FLUORESCENCE DES LTs $\gamma\delta$

Les IELs ont été marqués avec des anticorps marquant des protéines extracellulaires. Pour cela, les cellules ont été incubées avec 200 ng de chaque anticorps et un marqueur de viabilité (Live/Dead™, Invitrogen). Les anticorps utilisés pour les marquages extracellulaires sont listés dans le Tableau 18. A l'issue du marquage, les cellules ont été suspendues dans du PBS 2% SVF et les LTs $\gamma\delta$ ont été triés sur un FACS BD Aria IIu. Les cellules ont été collectées dans du milieu RPMI complet, puis lavées 3 fois dans 10 mL du PBS 1X à 4°C.

Tableau 18 : Liste des anticorps utilisés pour le tri des LTs $\gamma\delta$

Fluorochrome	Cible
Laser bleu (488 nm)	
FITC	CD3
PE	
PerCP-Cy TM 5.5	CD4
PE/Cy TM 7	$\gamma\delta$ TcR
Laser rouge (640 nm)	
APC	
APC-Cy7	CD45
Laser Violet	
BD Horizon TM Brilliant Violet 421	
BD Horizon TM V500	Marqueur de viabilité

RESONNANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Les culots cellulaires ont été regroupés suivant le régime des souris, puis ont été suspendus dans 1 mL de méthanol à -20°C afin de les déprotéiner, puis transférés dans des tubes en verre, et laissés 30 minutes sur de la glace. Les échantillons ont ensuite été récupérés dans 300 μ L d'une solution contenant 2/3 de méthanol et 1/3 de chloroforme et homogénéisés au vortex 1 minute. Les échantillons ont été incubés 15 minutes sur de la glace, puis ont suivi une étape d'ultrasonication avant d'être dilués dans 300 μ L d'une solution de chloroforme 0,5X. Les solutions obtenues ont été homogénéisées par vortex et centrifugées 20 minutes à 1500 G à 4°C. La phase aqueuse a été récupérée et transférée dans un tube Eppendorf de 1,5 mL propre, puis séchée à vide. Les extraits secs ont été gelé brusquement avec de l'azote liquide et conservés à -80°C jusqu'à l'acquisition des données. Le jour de l'analyse, les extraits secs ont été suspendus dans 600 μ L de tampon phosphate (pH = 7,2) dans de l'oxyde de deutérium (D₂O, ou « eau lourde ») contenant 0,1 mM de 3-trimethylsilylpropionate-2,2,3,3-d₄ (TSP), puis 500 μ L de cette solution aqueuse finale a été transférée dans des tubes conventionnels de 5mm pour la RMN. Enfin, les données ont été acquises sur un spectromètre Bruker Avance III.

RT-QPCR

Voir page 120. Les quantités d'ARN obtenues après extraction sont décrites dans le Tableau 19. Les amorces construites et utilisées sont listées en Tableau 20.

Tableau 19 : Quantification des ARNs purifiés.

Echantillon		[ARN] ng/μl	260/280	260/230	V _{ARN} (μL)	V _{eau} (μL)	Quantité d'ARN
Contrôle	1	46,6	2,04	1,62	10,7	1,3	500
	2	52,3	2,02	1,56	9,6	2,4	500
	3	47,2	1,75	0,77	10,6	1,4	500
	4	26,9	1,98	1,66	9,3	2,7	250
	5	38,2	2,04	1,58	6,5	5,5	250
	6	49,9	2,05	1,75	10	2	500
Inuline	7	15,6	2,02	1,30	9,6	2,4	150
	8	39,8	2,02	1,46	6,3	5,7	250
	9	51,5	2,05	1,81	9,7	2,3	500
	10	22,4	2,03	0,77	11,2	0,8	250
	11	66,3	2,04	1,95	7,5	4,5	500
	12	47,3	2,05	1,66	10,6	1,4	500

Tableau 20 : Liste des amorces utilisées pour la RT-qPCR. FW = séquence Forward (sens) ; RV = séquence Reverse (anti-sens).

Nom de l'amorce	Séquence (5' → 3')	Nom de l'amorce	Séquence (5' → 3')
GLUT2 FW	TGGGCCTTACGTGTTCTTCC	GAPDH FW	CCATCACCATCTTCCAGGAG
GLUT2 RV	TCCGGAATTCTGCAGCGATT	GAPDH RV	CCTGCTTCACCACCTTCTTG
GLUT5 FW	GACGTGCACCTAGAGATGGA		
GLUT5 RV	CGTTCACCTCCGACAGCT		

SCENITH™

La méthode SCENITH™ est basée sur la mesure de l'activité cellulaire, et plus particulièrement de la traduction, qui est l'activité cellulaire la plus énergivore et donc nécessite le plus d'activité métabolique [237]. L'énergie utilisée pour la traduction est l'ATP, produit via différentes voies métaboliques, dont les principales sont la glycolyse et l'oxydation des acides gras (FAO, Fatty Acid Oxydation) et des acides aminés (AAO, Amino Acid Oxydation). Il a été montré que la cinétique de production d'ATP est similaire à la cinétique de la traduction. La méthode SCENITH™ repose sur l'observation suivante : la cinétique de l'activité traductionnelle de la cellule traduit sa cinétique de production d'ATP.

STIMULATION DES LEUCOCYTES

Chaque culot de IELs obtenu a été suspendu dans 500 μL de RPMI complet, puis divisé en 5 puits dans une plaque 96 puits à fond en U, pour être incubé 4h à 37°C avec 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) et 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ionomycin (Sigma) dans un volume final de 200 μL . A l'issue des 4h, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et centrifugées 6 minutes à 600G.

INCUBATION AVEC LES INHIBITEURS

Chaque culot cellulaire a ensuite été incubé 30 minutes à 37°C avec différents inhibiteurs métaboliques. Pour chaque échantillon, les 5 conditions d'inhibition étaient les suivantes :

- **Sans inhibiteur** : 1/5000^{ème} de DMSO
- **Inhibiteur de la glycolyse** : 1/30,5^{ème} de 2-Déoxy-D-Glucose (DG)
- **Inhibiteur de la phosphorylation oxydative** : 1/5000^{ème} d'Oligomycine (O)
- **Inhibition de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative** : 1/30,5^{ème} DG et 1/5000^{ème} O
- **Inhibition de toutes les voies métaboliques** : 1/5000^{ème} Cycloheximide (CHX)

Ensuite, 1/1000^{ème} de puromycine a été ajouté à chaque puits pour 45 minutes d'incubation à 37°C. La puromycine est un antibiotique inhibiteur de la traduction, avec une structure moléculaire similaire à un nucléotide (Figure 147).

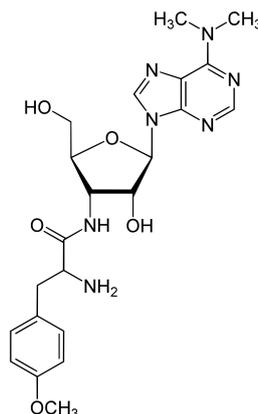


Figure 147 : Structure de la puromycine. (Wikipédia)

Ainsi, la puromycine est intégrée dans le polypeptide durant sa synthèse par le ribosome, et entraîne sa libération avant la fin de sa synthèse. Après les 45 minutes d'incubation, les cellules sont lavées 2 fois avec du PBS froid puis centrifugées 6 minutes à 600 G.

MARQUAGE EXTRA- ET INTRA-CELLULAIRE

Voir page 119. Les anticorps extracellulaires utilisés sont listés dans le Tableau 18. Le seul anticorps intracellulaire utilisé est un anti-puromycine, marqué avec le fluorochrome AlexaFluor® 647.

ANALYSE

Les LTs $\gamma\delta$, $CD4^+$ et $CD8^+$ ont été sélectionnés comme indiqué sur la Figure supplémentaire S1. La moyenne d'intensité de fluorescence (MFI, Mean Fluorescence Intensity) du marquage anti-puromycine pour chaque condition a été récupérée (Figure 148).

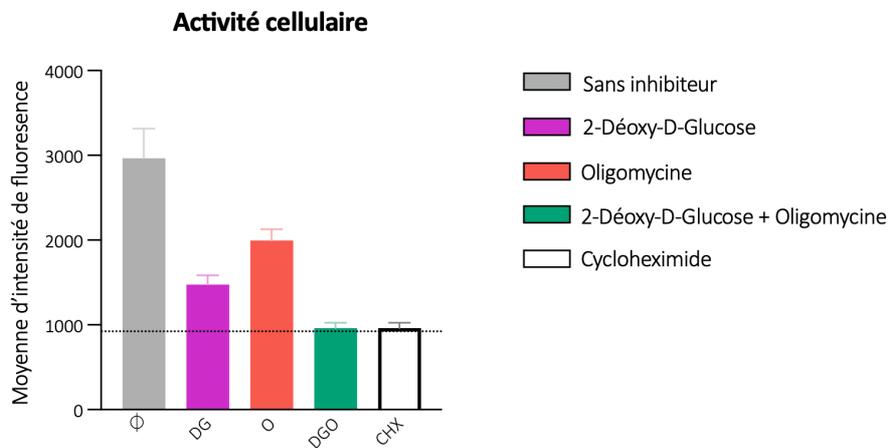


Figure 148 : Exemple de marquages de la puromycine obtenus.

A partir de ces données, les profils métaboliques de chaque population cellulaire peuvent être calculés selon les formules suivantes.

$$\text{Dépendance au glucose} = 100 \times ((\emptyset - DG) \div (\emptyset - DGO))$$

$$\text{Dépendance mitochondriale} = 100 \times ((\emptyset - O) \div (\emptyset - DGO))$$

$$\text{Capacité glycolitique} = 100 - 100 \times ((\emptyset - O) \div (\emptyset - DGO))$$

$$\text{Capacité FAO et AAO} = 100 - 100 \times ((\emptyset - DG) \div (\emptyset - DGO))$$

INTERNALISATION DU FRUCTOSE PAR LES LT_s $\gamma\delta$

Étant donné le trop faible nombre de LTs $\gamma\delta$ récupérés à l'issu du tri cellulaire par FACS, le spectre RMN du groupe contrôle n'a malheureusement pas pu être obtenu. Cependant, le spectre reflétant l'endométabolome des IELs $\gamma\delta$ des souris nourries avec de l'inuline montre la présence de fructose (Figure 149).

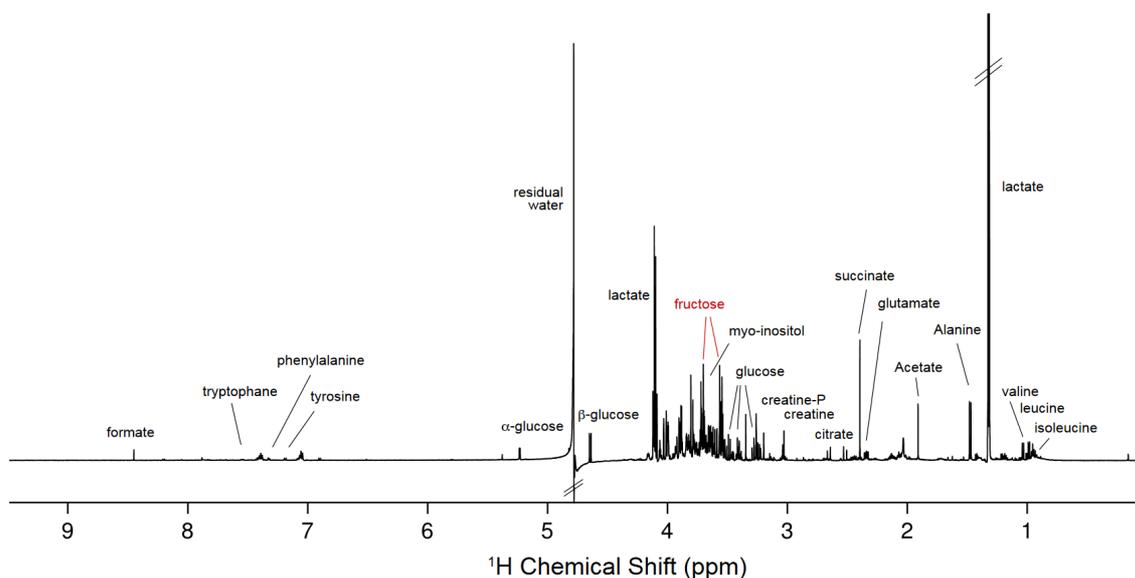


Figure 149 : Endométabolome des IELs $\gamma\delta$ des souris nourries avec de l'inuline. Des souris C57BL/6 ont été nourries avec un régime enrichi en inuline pendant 15 jours avant la collecte et le tri des LT $\gamma\delta$ intraépithéliaux du côlon (n=6 souris). Le graphique représente le spectre RMN de l'endométabolome des LT $\gamma\delta$ intraépithéliaux des 6 côlons groupés.

Comme il n'a pas été possible de comparer l'endométabolome des IELs $\gamma\delta$ de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline, l'expression des transporteurs de fructose GLUT2 et GLUT5 par les IELs a été analysée par RT-qPCR. Les niveaux d'expression de ces 2 transporteurs par les IELs n'ont pas été affectés par la consommation d'inuline (Figure 150).

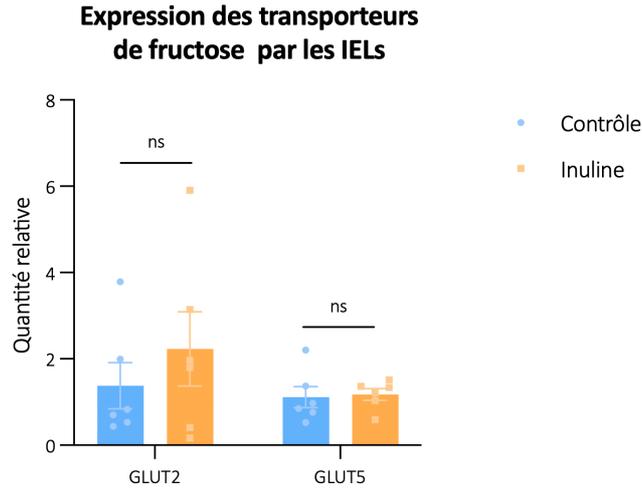


Figure 150 : Analyse de l'expression des transporteurs de fructose par les IELs du côlon. Niveaux d'expression de gènes codant pour GLUT2 et GLUT5, des transporteurs de fructose, dans les lymphocytes intra-épithéliaux coliques, de souris nourries avec un régime standard (n=6), ou enrichi en inuline (n=6). Le graphique représente les moyennes \pm SEM des valeurs RQ. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

PROFILS METABOLIQUES DES IELs

L'activité métabolique des IELs $\gamma\delta$ des souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline a été réduite à la suite de l'inhibition de la glycolyse, mais n'a pas été impactée par l'inhibition de la phosphorylation oxydative (Figure 151). L'inhibition complète de l'activité des cellules avec le cycloheximide a autant réduit l'activité métabolique que l'inhibition simultanée de la glycolyse et de la phosphorylation oxydative. Cela suggère que les IELs $\gamma\delta$ n'utilisent pas d'autre voie métabolique que la glycolyse et la phosphorylation oxydative pour leur synthèse d'ATP.

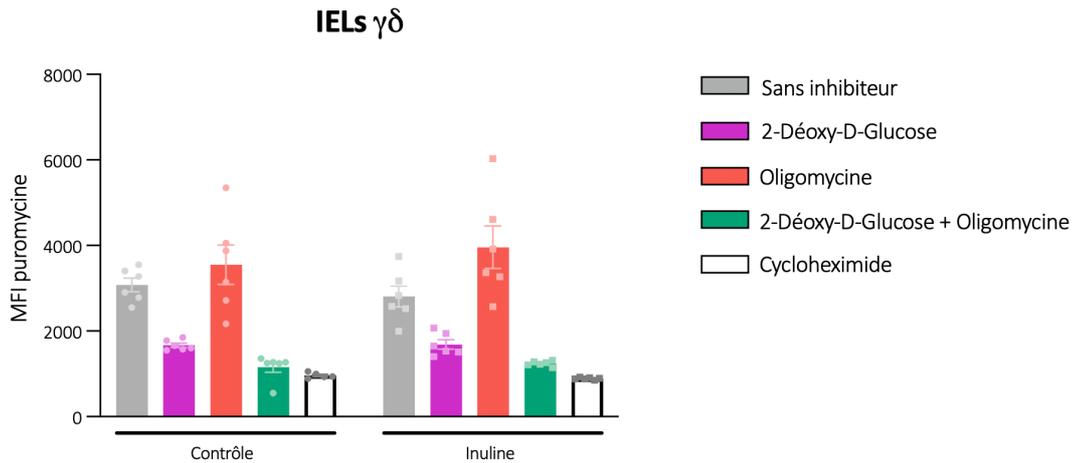


Figure 151 : Analyse de l'activité métabolique des IELs $\gamma\delta$ du côlon par SCENITH™. Moyennes d'intensité de fluorescence du marquage de la puromycine avec différentes conditions d'inhibition, dans les lymphocytes intra-épithéliaux $\gamma\delta$ coliques, de souris nourries avec un régime standard, ou enrichi en inuline (n=6 par groupe) durant 2 semaines. Les graphiques représentent les moyennes \pm SEM.

Le profil métabolique des IELs $\gamma\delta$ du côlon de souris est majoritairement glycolytique. Cette dépendance au glucose n'est pas impactée par la consommation d'inuline (Figure 152).

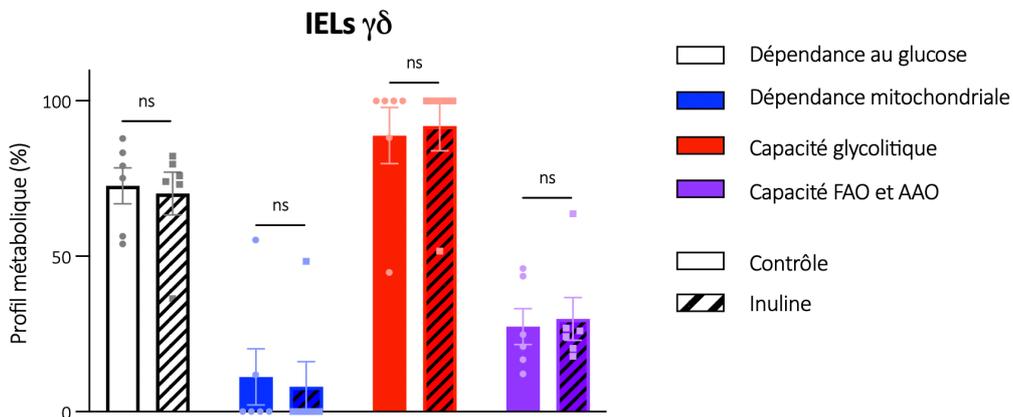


Figure 152 : Analyse des profils métaboliques des IELs $\gamma\delta$ du côlon par SCENITH™. Des souris C57BL/6 ont été nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 par groupe) pendant 15 jours avant l'analyse de leur immunité intestinale par SCENITH™. Le graphique représente les moyennes de profils métaboliques \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

Le profil métabolique des IELs CD4⁺ et CD8⁺ est similaire à celui des IELs $\gamma\delta$ et n'a pas été impacté par la consommation d'inuline (Figure Supplémentaire S5).

CONCLUSION

Le fructose est le premier métabolite issu de la fermentation de l'inuline par les micro-organismes du microbiote intestinal. Cependant, il ne semble pas impacter les lymphocytes T intra-épithéliaux. En effet, malgré un spectre RMN suggérant la présence de fructose dans de l'endométabolome des IELs $\gamma\delta$, les IELs n'expriment pas plus de transporteurs transmembranaires leur permettant d'internaliser le fructose. De plus, le profil métabolique des IELs du côlon de souris nourries avec un régime enrichi en inuline est similaire à celui de souris nourries avec un régime standard. Ces observations suggèrent que le fructose n'est pas le médiateur de l'effet immunostimulant de l'inuline.

VI. LE DIHYDROGENE

D'après la littérature, la fermentation de l'inuline entraîne la production de dihydrogène (H₂) par les bactéries du microbiote intestinal. L'H₂ a été étudié comme thérapeutique pour ses propriétés anti-inflammatoires et antioxydantes. Paradoxalement, une étude publiée en 2020 a montré la capacité anticancer de cette molécule, dans un effet médié par l'immunité [195,196]. Dans cette étude, 2 semaines de traitement par inhalation d'H₂ permettaient d'augmenter la proportion de LTs $\gamma\delta$ circulant dans le sang, et amélioraient la réponse clinique de patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'H₂ pourrait être le médiateur de l'effet immunostimulant de l'inuline.

METHODOLOGIE : COMPARAISON DES EFFETS DE L'INULINE ET DE L'H₂

Afin de tester l'hypothèse suivant laquelle l'H₂ serait le médiateur de l'effet immunostimulant de l'inuline, les effets immunostimulants et antitumoraux de la consommation d'inuline ont été comparés avec ceux d'une hydrogénothérapie (H₂T).

Pour cela, la durée de l'H₂T devait être similaire à la durée d'exposition à l'H₂ induite par la consommation d'inuline. Or, jusqu'à présent, l'inuline était administrée aux animaux *ad libitum*, dans leur eau de boisson. De cette manière, la fréquence des prises et la quantité d'inuline ingérée ne pouvait pas être contrôlées. Dans un premier temps, nous avons donc testé l'effet immunostimulant et antitumoral d'une faible quantité d'inuline, administrée par gavage plutôt que dans l'eau de boisson (Figure 153). En parallèle, le profil de production d'H₂ à la suite des gavages d'inuline a été déterminé, grâce à un dispositif de mesure développé par les équipes PRETA et Synabi du laboratoire TIMC. Enfin, le protocole d'H₂T a été établi suivant le profil de production d'H₂.

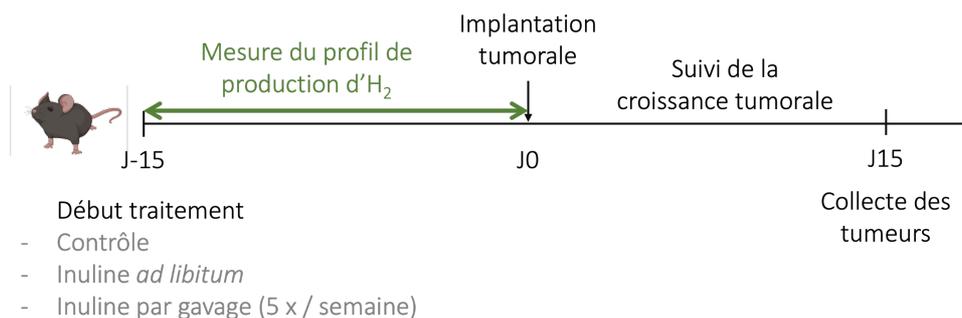


Figure 153 : Plan expérimental pour la détermination du profil de production d'H₂ à la suite de la consommation d'inuline.

Afin de comparer les effets de l'H₂T et de la consommation d'inuline, deux expériences ont été mises en place.

- **Effet antitumoral** : Les mêmes groupes de souris C57BL/6 que dans l'expérience précédente ont été constitués, puis des cellules de mélanome murin B16 OVA ont été injectées en sous-cutané dans le flanc droit des souris (Figure 154). La croissance tumorale a été suivie durant 2 semaines supplémentaires tout en maintenant les traitements, puis l'immunité infiltrant la tumeur a été analysée par cytométrie en flux.

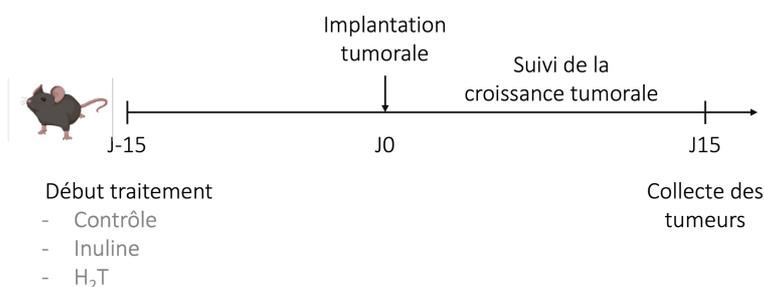


Figure 154 : Plan expérimental pour la comparaison des effets antitumoraux de l'inuline et de l'H₂T.

- **Effet immunostimulant** : Des souris C57/BL6 ont suivi deux semaines de pré-conditionnement avec un régime standard, ou enrichi en inuline, ou 2 semaines d'H₂T. L'immunité circulante a ensuite été comparée entre ces 3 groupes (Figure 155).



Figure 155 : Plan expérimental pour la comparaison des effets immunostimulants de l'inuline et de l'H₂T.

ANIMAUX

Voir page 99.

Lorsque les souris reçoivent l'inuline *ad libitum*, dans leur eau de boisson, nous estimons qu'elles boivent 5 mL par jour, et donc qu'elles ingèrent 360 mg d'inuline par jour. Étant donné le seuil de solubilité de l'inuline, il n'était pas possible d'administrer 360 mg d'inuline diluée dans moins de 200 µL d'eau. La concentration maximale que nous avons pu atteindre était de 450 g/L. Les souris recevant l'inuline par gavage oral ont donc été gavées avec 150 µL d'eau contenant 70 mg (450 g/L) d'inuline, 5 fois par semaine. Afin de s'assurer que le geste de gavage n'induit pas de biais dans l'expérience, les souris des groupes « contrôle », « inuline *ad libitum* » et « H₂T » étaient gavées avec de 150 µL d'eau, 5 fois par semaine. Numéro d'autorisation par le ministère de la recherche : APAFIS#39565-2022112413525573.v2.

MESURE DE L'H₂ PRODUIT PAR LA FERMENTATION D'INULINE

Un dispositif a été mis en place par les équipes PRETA et Synabi du laboratoire TIMC, afin de mesurer le dihydrogène exhalé par des rongeurs (Figure 156). Ce dispositif permet de placer les souris vigiles, par groupe de 6, dans une cage en plastique de 8,1 L (8100 cm³), dans un dessiccateur étanche en verre. La pression interne en dioxygène (O₂) et dioxyde de carbone (CO₂), ainsi que l'humidité et la température, sont mesurées, suivies, et contrôlées en continu durant toute la mesure, grâce à un détecteur de gaz et d'hygrométrie Dioxcare®. Afin d'assurer un apport constant et régulier en O₂, un sac Tedlar rempli avec de l'O₂ produit par un concentrateur d'O₂ (525 KS Drive Devilbiss) était connecté à une pompe péristaltique, elle-même connectée au dessiccateur. Pour éviter une accumulation de CO₂ expiré par les animaux durant les mesures, le fond du dessiccateur était recouvert avec 200 mL de verre sodo-calcique (soda lime) (sphasorb™ Intersurgical) pour capturer le CO₂. Le fond du dessiccateur

contenait également du gel de silice, afin d'empêcher une accumulation d'humidité. L'air dans le dessiccateur était homogénéisé en permanence, grâce à deux ventilateurs, situés au-dessus et au-dessous de la cage.

Le dihydrogène produit par les animaux était mesuré grâce à un dispositif spécialisé (ATO SKY 100 (0 à 100 ppm \pm 0,01)) connecté au dessiccateur. Pour chaque mesure, les souris étaient placées 15 minutes dans le dispositif, et n'avaient pas accès à l'eau et à la nourriture pour cette durée. Entre chaque mesure, elles étaient remises dans leur cage d'hébergement habituelle.

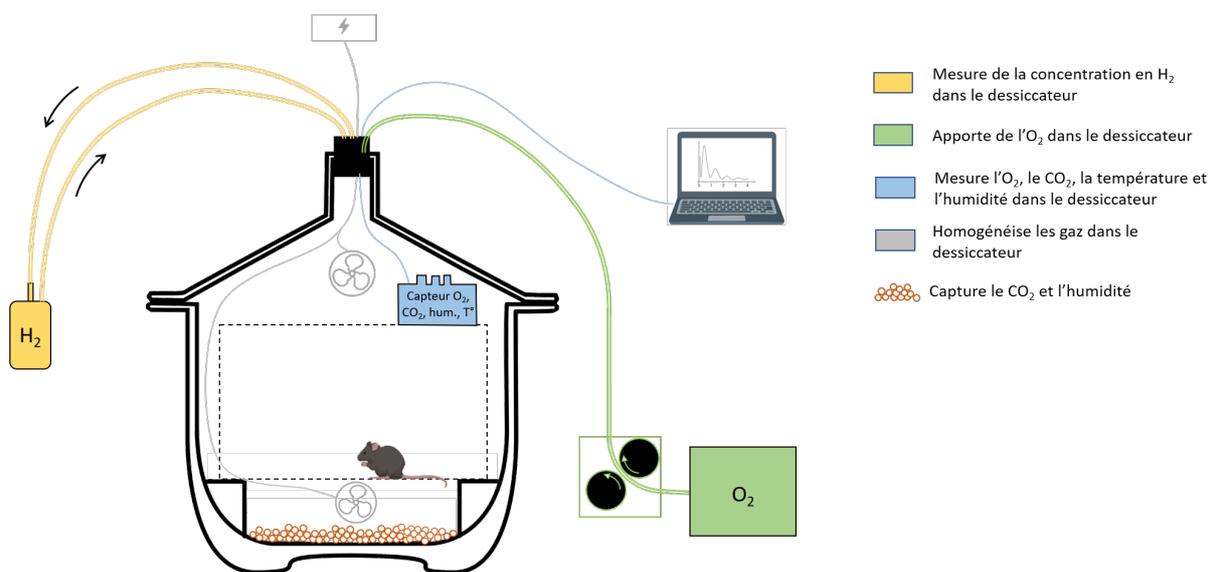


Figure 156 : Schéma simplifié du dispositif de mesure d'H₂. Hum = humidité, T° = température.

HYDROGENOTHERAPIE

L'H₂ a été administré par inhalation, grâce à un dispositif développé par les équipes PRETA et Synabi du laboratoire TIMC (Figure 157). Une bouteille de gaz contenant un mélange de diazote (N₂) et d'H₂ (96,4/3,6%) était connectée à un débitmètre de 2L/minute, et le flux d'air sortant était divisé en 2. L'O₂ était produit par un concentrateur d'O₂ Devilbiss®, et le flux était divisé en 2, puis connecté à un débitmètre de à 0,4L/minute. Le flux d'H₂ et le flux d'O₂ étaient mélangés à leur sortie, créant un mélange de gaz composé de 3% d'H₂, 77% d'N₂ and 20% d'O₂. Ce mélange de gaz était directement délivré dans les cages hermétiques des souris, dans leur environnement habituel, pour la durée de l'H₂T. Les H₂Ts duraient 2 ou 4 heures par jour, 5 jours par semaine.

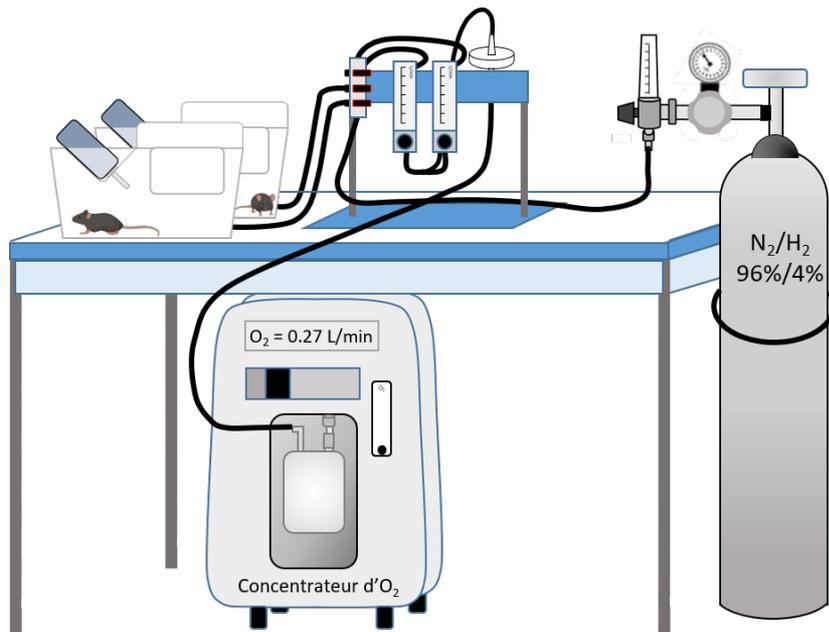


Figure 157 : Schéma du dispositif d'hydrogénéthérapie.

CULTURE CELLULAIRE

Voir page 132.

IMPLANTATION TUMORALE

Voir page 133.

COLLECTE ET DIGESTION DES TUMEURS

Voir page 134.

PREPARATION DES ECHANTILLONS DE SANG

Voir page 160.

CYTOMETRIE EN FLUX

Voir page 119 pour le protocole et la liste des anticorps utilisés (Tableau 3).

EFFET ANTITUMORAL D'UN GAVAGE D'INULINE

Pour mettre en place le protocole d'H₂T, l'inuline devait être administrée en gavage quotidien aux souris plutôt qu'*ad libitum*. Tout d'abord, nous avons vérifié que le gavage de 70 mg d'inuline, 5 fois par semaine suffisait à récapituler d'effet antitumoral de l'inuline *ad libitum*. Quel que soit son mode d'administration, l'inuline a inhibé la croissance tumorale (Figure 158). En effet, dans le groupe contrôle, les tumeurs ont atteint une moyenne de 150 mm³ en 14 jours, alors que les tumeurs des souris recevant de l'inuline, par gavage ou *ad libitum*, n'ont atteint que 60 mm³.

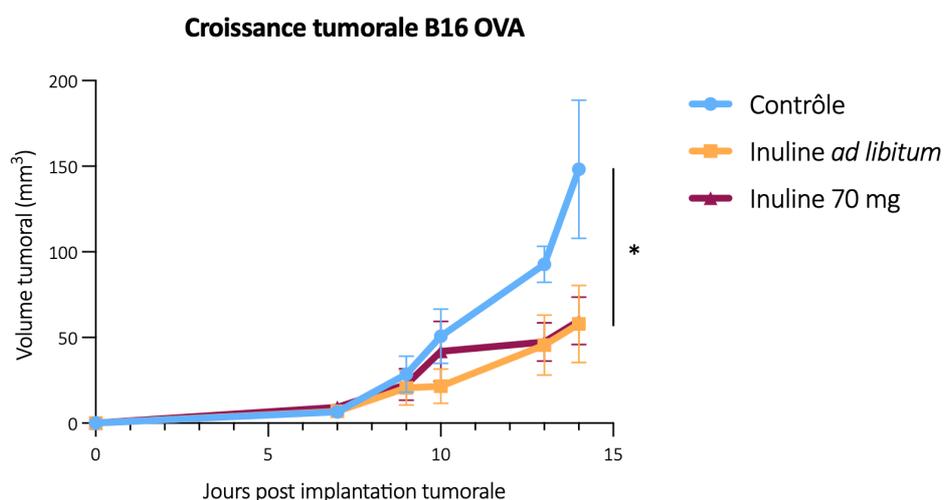


Figure 158 : Effet antitumoral de l'inuline administrée par gavage. Croissance tumorale chez des souris C57BL/6 nourries avec un régime standard, ou enrichi en inuline *ad libitum*, ou gavées avec 70 mg d'inuline 5 fois par semaine, et ayant reçu en injection sous-cutanée 2 x 10⁵ cellules de mélanome murin B16 OVA (n=6 par groupe). Les courbes représentent les moyennes ± SEM. ns = non significatif, *p < 0,05 en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

Pour vérifier que les effets immunostimulants des deux traitements étaient également similaires, l'immunité infiltrant les tumeurs a été analysée à la fin de croissance tumorale. Dans cette expérience, les tumeurs ont poussé relativement lentement en comparaison aux autres expériences. Après 14 jours de croissance tumorale, certaines tumeurs étaient trop petites, et contenaient donc trop peu de cellules pour analyser l'immunité infiltrant les tumeurs.

Cependant, les analyses ont mis en évidence une augmentation significative de la proportion de lymphocytes T $\gamma\delta$ et CD4⁺ produisant de l'IFN γ , à la suite de la consommation d'inuline par gavage (Figure 159). Cette augmentation semble également être présente pour les souris nourries avec de l'inuline *ad libitum*, mais cette observation n'est pas confirmée statistiquement.

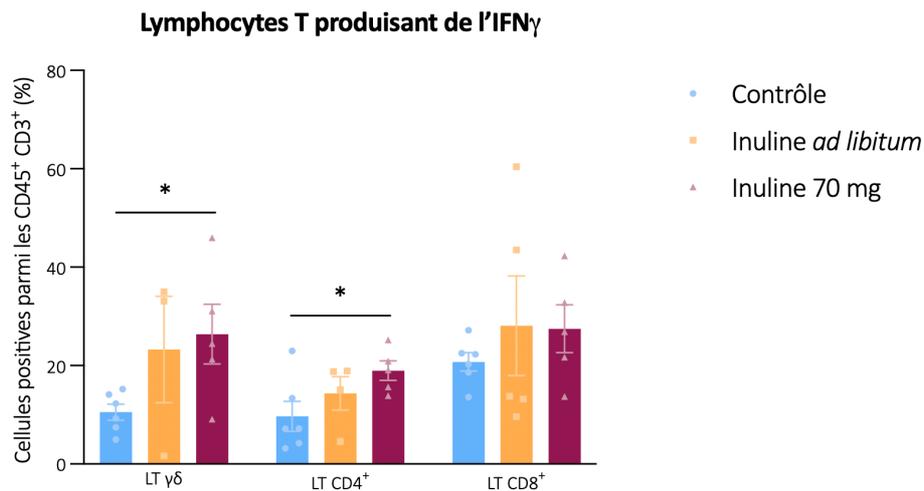


Figure 159 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ dans les tumeurs. Proportion des lymphocytes T produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris nourries avec un régime standard (n=5), ou enrichi en inuline (n=5), ou gavées avec 70 mg d'inuline 5 fois par semaines (n=5). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. *p < 0,5 avec un test Mann Whitney.

PROFIL DE PRODUCTION D'H₂ A LA SUITE DE LA CONSOMMATION D'INULINE

Le profil de production d'H₂ à la suite de la consommation d'inuline a été déterminé en mesurant l'accumulation d'H₂ exhalé par les souris pendant 15 minutes dans le dispositif de mesure. Cela a permis de déterminer le volume d'H₂ produit en 15 minutes et donc la cinétique de production d'H₂ par 6 souris simultanément, à différents moments après le gavage. Après 1h, les souris gavées avec de l'inuline semblaient déjà exhaler plus d'H₂ (4,1 μ L/minute) que les souris gavées avec de l'eau (2,2 μ L/minute), mais cette différence n'était pas significative (Figure 160). Un pic de production d'H₂ se distingue plus clairement et statistiquement à partir de 2h post-gavage d'inuline. Ce pic dure jusqu'à environ 2h30 post-gavage, et la production maximale est de 5,4 μ L/min 2h après le gavage, alors que la production maximum d'H₂ dans le

groupe gavé avec de l'eau est de 2,7 $\mu\text{L}/\text{min}$, 2h30 post-gavage. Le gavage de 70 mg d'inuline a entraîné un pic de production d' H_2 d'environ 1h30. Après le pic, la production d' H_2 par le groupe gavé avec de l'inuline est restée toujours plus élevée que le groupe contrôle, jusqu'à 4h post-gavage.

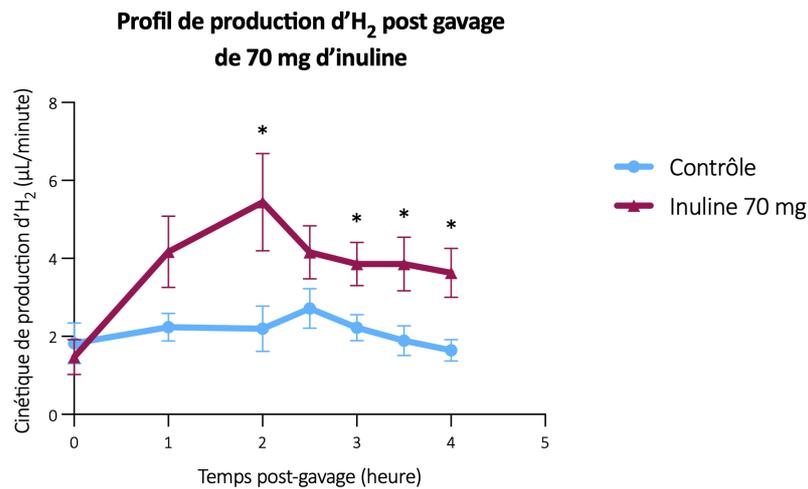


Figure 160 : Profil de production d' H_2 post gavage de 70 mg d'inuline. Des souris C57BL/6 ont été gavées 5 fois par semaine avec de l'eau (n=6) ou avec 70 mg d'inuline (n=6), et la production d' H_2 exhalé était mesurée à t=0, 1h, 2h, 2h30, 3h, 3h30 et 4h après le gavage. Les mesures ont été répétées 5 jours. Le graphique représente la moyenne des 5 mesures \pm SEM. *p < 0,5 avec un test Mann Whitney.

A partir de ces résultats, deux durées d' H_2T ont été déterminées et testées par la suite. Les animaux ont donc été exposés à l' H_2 2h ou 4h, deux temps correspondant aux durées minimales et maximales de production d' H_2 à la suite d'un gavage de 70 mg d'inuline.

COMPARAISON DE L'EFFET ANTITUMORAL DE L'INULINE ET DE L' H_2T

Afin de comparer l'effet antitumoral de l'inuline et de l' H_2T , des souris C57BL/6 ont été gavées 5 fois par semaine avec 70 mg d'inuline, ou exposées durant 2 ou 4h à 3,6% d' H_2 . Après 2 semaines de traitement, toutes les souris ont reçu une injection de cellules de mélanome murin B16 OVA, puis la croissance tumorale a été suivie durant 13 jours, tout en maintenant les traitements à l'inuline et à l' H_2 . Les traitements H_2T durant 2h et 4h, et les gavages de 70 mg

d'inuline ont inhibé de façons similaires la croissance des tumeurs B16 OVA (Figure 161). En 13 jours, les tumeurs contrôle mesuraient en moyenne 151,4 mm³, alors que les tumeurs des groupes traités étaient en moyenne 3 fois plus petites. En effet, les tumeurs du groupe « inuline 70 mg » ont atteint 39 mm³, les tumeurs du groupe « H₂T 2h » ont atteint 49,0 mm³ et les tumeurs du groupe H₂T 4h ont atteint 55,8 mm³.

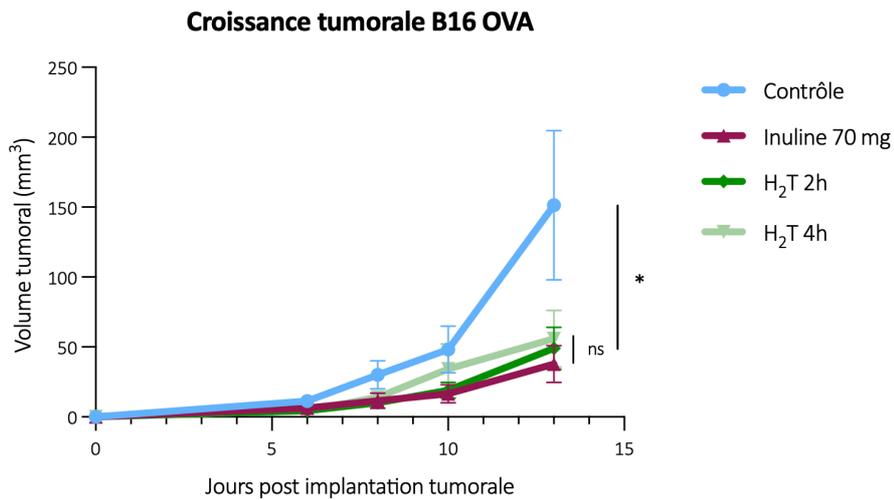


Figure 161 : Effet antitumoral d'une dose faible d'inuline et d'une hydrogénéothérapie. Croissance tumorale chez des souris C57BL/6 gavées avec de l'eau (n=6) ou gavées avec 70 mg d'inuline (n=6) 5 fois par semaine, ou traités par H₂T 2h (n=6) ou 4h (n=6) 5 fois par semaine, et ayant reçu en injection sous-cutanée 2 x 10⁵ cellules de mélanome murin B16 OVA. Les courbes représentent les moyennes ± SEM. ns = non significatif, *p < 0,05 en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

L'immunité infiltrant les tumeurs a été analysée par cytométrie en flux, afin de comparer le mode d'action antitumoral de l'inuline et de l'H₂T. Les gavages d'inuline, ainsi que les deux durées d'H₂T semblent avoir induit une augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ (Figure 162). Cependant, cette augmentation n'est pas significativement vérifiée. De plus, les gavages d'inuline et l'H₂T de 4h ont induit une augmentation significative de la proportion de LTs CD8⁺ produisant de l'IFN γ dans les tumeurs (Figure 162).

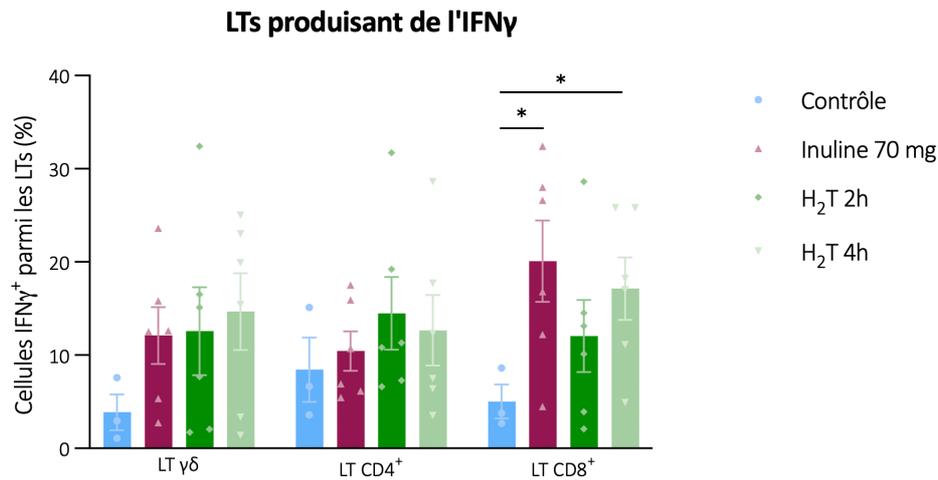


Figure 162 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ dans les tumeurs. Proportion des lymphocytes T produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris C57BL/6 gavées avec de l'eau (n=3) ou gavées avec 70 mg d'inuline (n=6) 5 fois par semaine, ou traitées par H₂T 2h (n=5) ou 4h (n=5) 5 fois par semaine. Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. *p < 0,5 avec un test Mann Whitney.

COMPARAISON DE L'EFFET IMMUNOSTIMULANT DE L'INULINE ET DE L'H₂T

Les résultats présentés ci-dessus suggèrent que l'inuline et l'H₂T (2h ou 4h), entraînent une augmentation de l'infiltration tumorale en LTs produisant de l'IFN γ . Afin de comparer les effets immunostimulants de l'inuline et de l'H₂T, nous avons analysé l'immunité circulant dans le sang de souris traitées avec de l'inuline ou une H₂T de 2h. Comme les H₂Ts de 2h et 4h ont induit un effet antitumoral similaire, nous n'avons utilisé que l'H₂T de 2h dans cette expérience.

L'H₂T durant 2h, 5 fois par semaine pendant 2 semaines, a permis d'augmenter la proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ dans le sang (Figure 163). Les gavages d'inuline semblent avoir induit la même augmentation, mais les résultats ne sont significatifs que pour l'augmentation de la proportion de LTs CD4⁺ produisant de l'IFN γ .

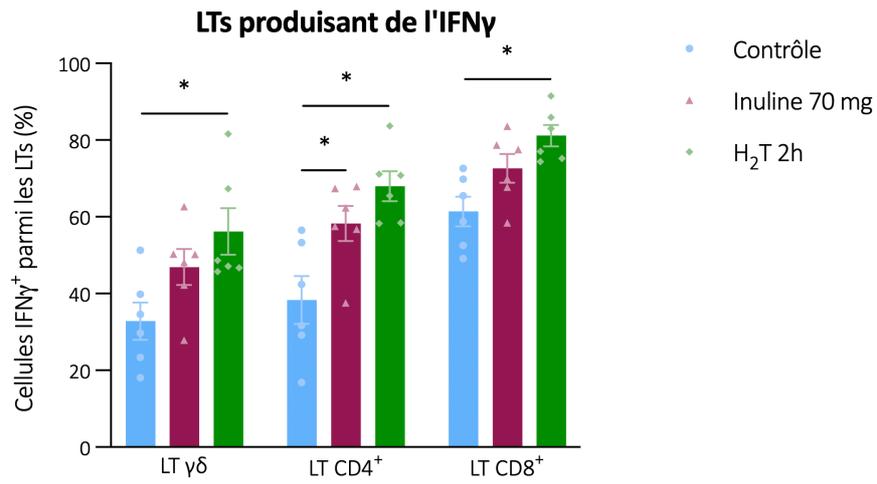


Figure 163 : Lymphocytes T produisant de l'IFN γ dans le sang. Proportion des lymphocytes T produisant de l'IFN γ et infiltrant les tumeurs de souris C57BL/6 gavées avec de l'eau, ou avec 70 mg d'inuline, 5 fois par semaine, ou traités par H₂T 2h 5 fois par semaine (n=6 par groupe). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. *p < 0,5 avec un test Mann Whitney.

CONCLUSION

Une faible dose d'inuline par gavage (70 mg, 5 fois par semaine) entraîne le même effet antitumoral que de lorsque l'inuline est ingérée *ad libitum* dans l'eau de boisson (72 g/L). Cela suggère qu'un apport excessif d'inuline n'exerce pas un effet antitumoral plus efficace qu'un apport en fibres suffisant. Cet effet antitumoral pourrait s'expliquer par la production d'H₂ à la suite de la consommation d'inuline. En effet, les souris ayant consommé 70 mg d'inuline produisent de l'H₂ durant au minimum 4h après l'ingestion d'inuline, avec un pic de production 2h après l'ingestion. L'administration d'H₂ durant 2h par jour, 5 jours par semaine, a induit le même effet antitumoral que le gavage de 70 mg d'inuline, à la même fréquence. De plus, les deux traitements semblent induire une augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ dans les tumeurs, et dans le sang. Ces résultats suggèrent que l'inuline et l'H₂ entraînent le même effet immunostimulant et antitumoral, soutenant l'hypothèse suivant laquelle l'H₂ pourrait être le médiateur de l'effet antitumoral de la consommation d'inuline (Figure 164).

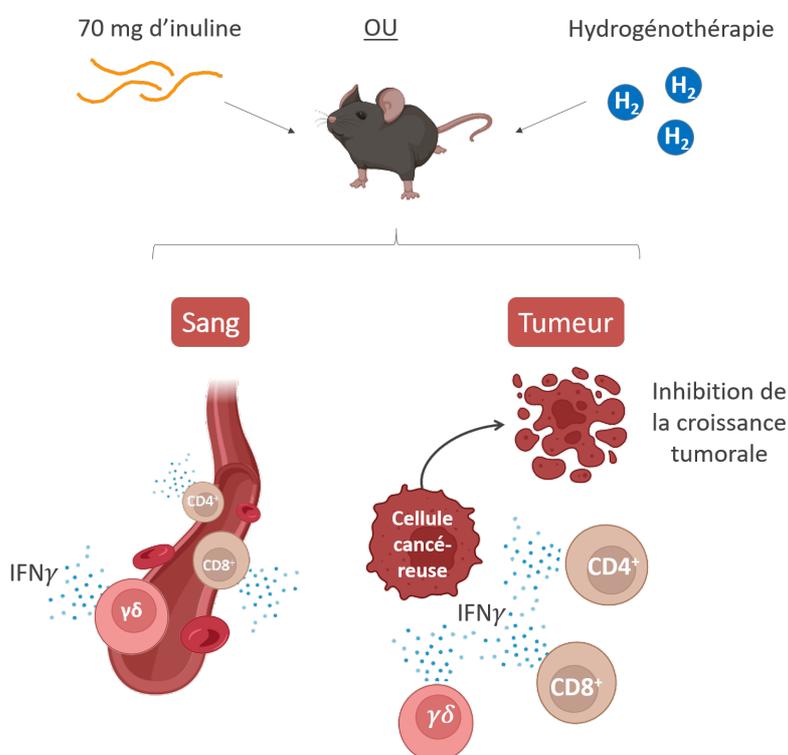


Figure 164 : La consommation d'inuline et l'hydrogénéothérapie entraînent le même effet antitumoral et immunostimulant dans le sang et dans les tumeurs.

CONCLUSION DU CHAPITRE 2

L'objectif de cette étude était de déterminer les phénomènes permettant à l'inuline d'exercer un effet antitumoral. Les résultats obtenus permettent de mettre en évidence le rôle crucial des bactéries du microbiote intestinal, et plus particulièrement des métabolites qu'elles produisent, dans l'effet antitumoral de l'inuline (Figure 165). Parmi ces métabolites, le fructose ne semble pas induire d'activation des LTs $\gamma\delta$ comme le fait l'inuline. En revanche, l' H_2 semble entraîner un effet immunostimulant et antitumoral très similaire à celui de l'inuline. Cela suggère que l' H_2 pourrait être un des médiateurs immunitaires de l'inuline. Cependant, d'autres métabolites non gazeux sont probablement impliqués dans l'effet immunostimulant de l'inuline, car l'eau fécale semble également avoir la capacité d'activer les LTs $\gamma\delta$. La capacité immuno-stimulatrice d'une eau fécale dérivée d'une fermentation d'inuline doit encore être testée.

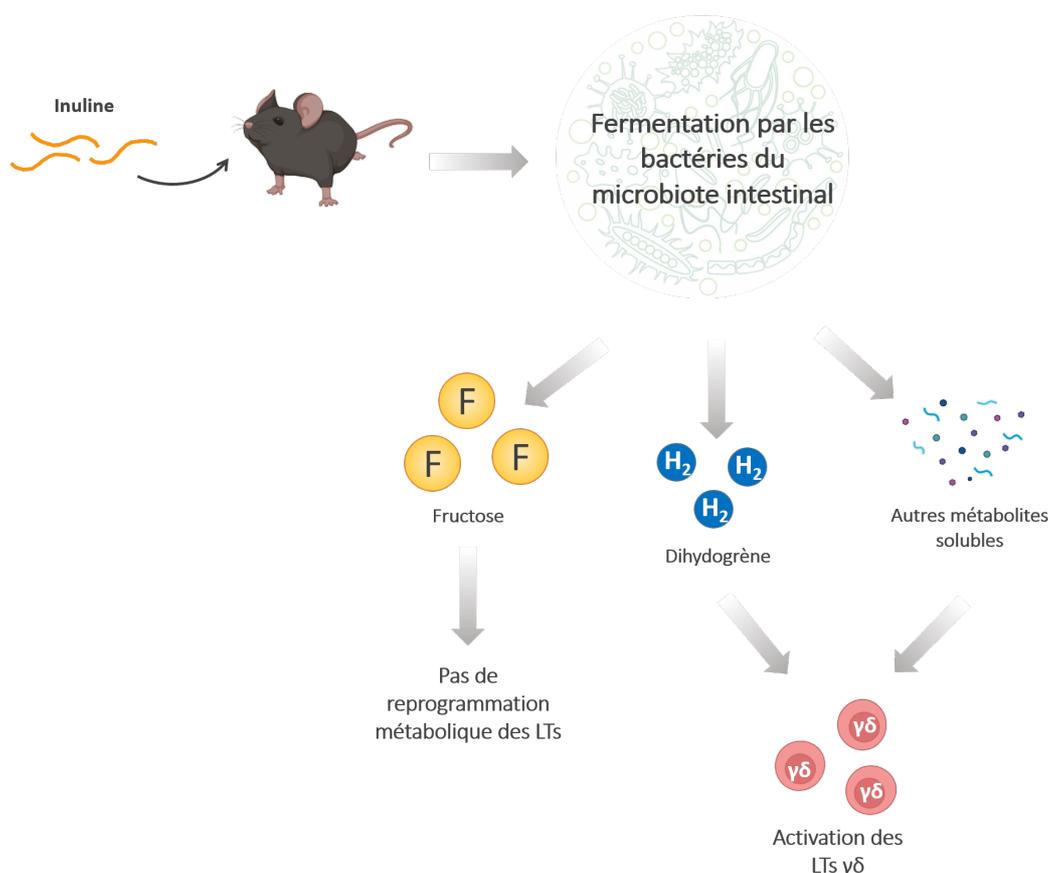


Figure 165 : Proposition de mécanisme d'action de l'inuline sur l'immunité.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet immunostimulant d'un régime enrichi en inuline, et sa capacité à exercer un effet antitumoral. Les résultats obtenus chez des souris saines montrent que la consommation d'inuline à chaîne longue durant 2 semaines entraîne plusieurs modifications :

- Dans le microbiote intestinal, la consommation d'inuline augmente la diversité- β bactérienne, et favorise la présence de la bactérie *Bifidobacterium animalis*.
- Dans l'immunité intestinale du côlon, l'inuline augmente la proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimant de l'IFN γ parmi les IELs. L'inuline entraîne une modulation immunitaire vers un profil pro-inflammatoire dans l'épithélium, et un profil anti-inflammatoire dans la LP.
- Dans le sang de souris consommant de l'inuline, la proportion de LTs est plus élevée que dans le sang de souris nourries avec un régime standard.

Chez des souris porteuses de tumeurs, la consommation d'inuline permet d'inhiber la croissance tumorale, d'une manière dépendante des LTs $\gamma\delta$, et renforce l'immunité infiltrant les tumeurs :

- La proportion de TILs produisant de l'IFN γ est supérieure dans les tumeurs de souris nourries avec de l'inuline.
- Chez les souris nourries avec de l'inuline, les TILs $\gamma\delta$ peuvent présenter un phénotype d'APCs.

L'effet antitumoral du régime enrichi en inuline est dépendant du microbiote intestinal bactérien. Parmi les métabolites produits par le microbiote intestinal durant la fermentation de l'inuline, l' H_2 entraîne un effet antitumoral et immunostimulant similaire à celui de l'inuline. D'autres métabolites solubles, retrouvés dans des eaux fécales, pourraient également être à l'origine de l'effet antitumoral du régime enrichi en inuline.

DISCUSSION

Ces dernières années, l'arsenal thérapeutique du cancer n'a cessé d'évoluer. Les thérapies ciblées et les immunothérapies ont révolutionné le traitement des cancers et la survie des patients, mais leur efficacité doit encore être améliorée. Le microbiote intestinal apparaît comme un modulateur immunitaire prometteur, qui pourrait être utilisé dans la prévention et le traitement des cancers. Des études ont mis en évidence des bactéries immunostimulantes, associées avec une bonne réponse des patients aux immunothérapies par blocage des points de contrôle [224,238]. Ces observations ont permis le développement de méthodes pour moduler le microbiote intestinal, dont la consommation de probiotiques, de prébiotiques, de postbiotiques, de synbiotiques, et les transplants de microbiote fécal. Parmi ces méthodes, l'alimentation semble être le moyen le plus stable et efficace au cours du temps. Plusieurs études ont déjà montré la promesse thérapeutique que représentent les régimes riches en fibres alimentaires sur la modulation du microbiote intestinal et sur la réponse anticancer, mais beaucoup reste à comprendre pour développer des thérapies efficaces [174]. Ainsi, il est crucial de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ces effets, afin de transférer ces découvertes en interventions thérapeutiques et préventives efficaces.

Dans ce projet de thèse, l'effet antitumoral de la consommation d'inuline a été étudié dans un modèle préclinique *in vivo*. L'inuline est un prébiotique déjà largement consommé, dans l'alimentation ou en supplément [239]. La consommation d'inuline impacte profondément la composition du microbiote intestinal, et favorise la présence de bactéries *Bifidobacteria*, connues pour leurs propriétés immunostimulantes. Récemment, l'effet antitumoral de l'inuline, médié par les LTs conventionnels CD8⁺ a été montré dans un modèle murin de mélanome transplanté [202]. Dans mon projet de thèse, nous avons montré que l'inuline entraîne non-seulement une activation des LTs conventionnels, mais également une accumulation des LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux. Nous avons mis en évidence le rôle crucial de ces LTs $\gamma\delta$ dans l'augmentation de la proportion de LTs CD4⁺ CD8⁺ produisant de l'IFN γ et dans l'effet antitumoral de l'inuline. De plus, l'inuline renforce les rôles variés des LTs $\gamma\delta$. En effet, les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux jouent un rôle cytotoxique direct sur les cellules cancéreuses, et de soutien

aux autres cellules immunitaires, notamment via leur capacité de présentation d'antigènes. Chez des souris non porteuses de tumeur, la consommation d'inuline a induit une augmentation de la proportion de IELs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ dans le côlon, et favorisé l'expression de gènes impliqués dans la réparation tissulaire et donc le maintien de la barrière intestinale. La consommation d'inuline a également entraîné l'augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ dans le sang, chez des souris non-porteuses de tumeur. Ce renforcement de l'immunosurveillance suggérait que les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux pourraient provenir du côlon et/ou du sang. Chez la souris, les sous-types de LTs $\gamma\delta$ sont définis suivant la chaîne γ formant leur $\gamma\delta$ TcR. D'après la littérature, chaque sous-type se situe dans un ou des organes particuliers [122]. Cependant, notre analyse du sang et du côlon ont mis en évidence plusieurs sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans ces tissus. Dans le côlon, les V γ 7, décrits comme le sous-type majoritaire à cet endroit, ne représentaient que 35% des LTs $\gamma\delta$. Dans le sang, les LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ peuvent exprimer plusieurs chaînes V γ simultanément. C'est le cas des LTs V γ 1⁺V γ 7⁺, qui représentent 50% des LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IFN γ . Plusieurs sous-types de LTs $\gamma\delta$ infiltrent les tumeurs, comme les V γ 1, V γ 2, V γ 3 et les V γ 7. Cependant, ces sous-types ne représentent que 30% des LTs $\gamma\delta$ infiltrant les tumeurs. Cela suggère que le sous-type majoritaire est parmi les V γ 4, V γ 5 ou V γ 6. Les V γ 4 sont des cellules antitumorales efficaces, grâce à leur production de perforine et d'IFN γ [240]. Les V γ 5 et V γ 6 résident dans le derme et peuvent être impliqués dans des phénomènes inflammatoires cutanés, comme psoriasis ou la dermatite [241]. Dans nos modèles de tumeurs cutanées transplantées, les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux pourraient être majoritairement d'un de ces 3 sous-types. Pour vérifier cette hypothèse, il faudrait analyser par cytométrie en flux l'expression des chaînes V γ 4, V γ 5 et V γ 6 par les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux. Il faudrait aussi comparer les proportions de ces sous-types de LTs $\gamma\delta$ dans le derme et dans le sang de souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline. En effet, l'inuline pourrait renforcer les LTs $\gamma\delta$ cutanées, qui recirculeraient via le sang jusqu'à la tumeur.

Dans ce projet, nous avons montré que chez des souris saines, la consommation d'inuline augmente la proportion de LTs circulants dans le sang. En cas d'apparition de tumeur périphérique, les LTs circulant dans le sang, et renforcés par l'inuline pourraient être recrutés dans la tumeur, où ils peuvent exercer leur effet antitumoral. Cela suggère que l'effet

antitumoral de l'inuline serait moins efficace dans des cancers faiblement vascularisés. Nous avons montré que la consommation d'inuline inhibe la croissance tumorale de 3 modèles tumoraux : le mélanome, le cancer colorectal, et le fibrosarcome. Cependant, l'effet antitumoral et l'efficacité de l'inuline à augmenter l'infiltration tumorale en cellules immunitaires n'étaient pas équivalents dans les 3 modèles. L'inuline a inhibé la croissance de mélanome B16 OVA de manière bien plus efficace que pour le cancer colorectal MC38 OVA et le fibrosarcome MCA205 OVA. De plus, la consommation d'inuline a permis d'augmenter significativement la proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ dans le mélanome B16 OVA, mais pas dans le cancer colorectal MC38 OVA ni dans le fibrosarcome MCA205 OVA. Cependant, la proportion de LTs $\gamma\delta$ était significativement augmentée dans les 3 tumeurs par la consommation d'inuline, ce qui a tout de même permis une inhibition de la croissance tumorale. Ces 3 modèles de tumeurs ont été implantés à des souris en sous-cutané, dans le flanc droit. La variation d'infiltration immunitaire ne peut donc pas s'expliquer par la localisation de l'implantation tumorale. En revanche, ces 3 tumeurs proviennent de cellules différentes et ont donc des structures distinctes. Le mélanome B16 OVA forme des tumeurs très vascularisées, et d'aspect liquide et aux contours peu définis. Le cancer colorectal MC38 OVA forme des tumeurs légèrement plus compactes que le mélanome B16 OVA, avec les contours plus définis et moins vascularisés [242]. Le fibrosarcome MCA205 OVA est le plus solide des 3 modèles. Il forme des tumeurs rondes, très compactes et peu vascularisées. Ces caractéristiques morphologiques suggèrent que le mélanome peut être plus facilement atteint par les cellules immunitaires que le fibrosarcome et le cancer colorectal. Ainsi, la consommation d'inuline permettrait de renforcer l'immunité circulante, particulièrement requise dans les tumeurs vascularisées. Néanmoins, les caractéristiques morphologiques de ces tumeurs murines ne sont pas décrites. Afin de les confirmer, il faudrait mesurer et comparer la vascularisation, la densité cellulaire, l'hypoxie et la capacité des cellules immunitaires à infiltrer ces tumeurs.

Les modèles de tumeurs transplantées sont relativement éloignés de la cancérogénèse naturelle. En effet, ce modèle artificiel ne tient pas compte de l'immuno-édition et de la pression immunitaire que subissent les cellules cancéreuses donnant lieu à une tumeur. Nous avons donc testé la capacité d'un régime enrichi en inuline à prévenir l'apparition de fibrosarcomes cutanés à la suite de l'injection d'un cancérigène, le MCA. Nous avons observé

une légère diminution, mais non significative, de la proportion de souris ayant développé une tumeur à la suite de l'injection de MCA, lorsque celles-ci étaient nourries avec de l'inuline. Il est intéressant de noter que le modèle de tumeur transplantée pour lequel l'inuline a permis la plus faible inhibition de la croissance tumorale est le fibrosarcome MCA205 OVA. Cette lignée cellulaire a été obtenue grâce à la mise en culture de cellules cancéreuses issues de l'injection du cancérigène MCA chez des souris. Ainsi, les tumeurs induites par l'injection de MCA sont de morphologie similaire aux tumeurs MCA205 OVA. Cela peut expliquer que le régime inuline n'ait que faiblement prévenu l'apparition de tumeurs induites par l'injection de MCA. Cette hypothèse pourrait être vérifiée dans un modèle de mélanome chimiquement induit [243]. Par exemple, les composés chimiques 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) et 12-O-tetradecanoylphorbol-1,3-acetate (TPA) peuvent induire des mélanomes chez la souris [244].

Etant donné le renforcement de l'immunosurveillance induit par la consommation d'inuline, nous avons testé la capacité de l'effet antitumoral de l'inuline à synergiser avec celui d'une immunothérapie anti-PD-1. Plusieurs études avaient auparavant montré l'importance du microbiote intestinal dans la réponse des patients atteints de cancers aux immunothérapies ciblant l'axe PD-1/PD-L1 [155,224]. Notamment, la présence de la bactérie *Bifidobacterium* dans le microbiote intestinal des patients était liée avec un meilleur taux de réponse des patients traités par immunothérapie anti-PD-1. Des études préliminaires, confirmées dans ce projet, montrent que la consommation d'inuline favorise la présence de cette bactérie dans le microbiote intestinal chez l'homme [245]. Nous avons donc évalué la capacité du régime enrichi en inuline, via sa modulation du microbiote intestinal, à renforcer l'effet antitumoral d'une immunothérapie anti-PD-1. Nous avons montré que dans notre modèle, un régime prophylactique enrichi en inuline inhibe aussi bien la croissance tumorale qu'une immunothérapie anti-PD-1, et que l'expression de PD-1 était équivalente entre les souris contrôle et inuline. Cependant, l'expression de PD-1 ne permet de définir des LTs en épuisement fonctionnel seulement lorsque d'autres points de contrôle sont exprimés, comme TIM-3 ou LAG-3 [246]. Ainsi, il est possible que les LTs intratumoraux PD-1⁺ des souris inuline ne soient pas en épuisement fonctionnel, contrairement aux LTs intratumoraux des souris contrôle. De plus, dans notre expérience, les TILs ont été analysés 13 jours après l'implantation tumorale. Il est possible que la combinaison d'inuline et d'immunothérapie anti-PD-1 retarde l'échappement tumoral en comparaison avec l'immunothérapie seule dans ce modèle murin.

Pour adresser cette hypothèse, l'épuisement fonctionnel des TILs devrait être caractérisée plus en détail, et la croissance tumorale devrait être suivie plus longtemps. Un autre modèle de tumeur transplantée pourrait être utilisé. En effet, d'après les caractéristiques morphologiques des tumeurs B16 OVA, MCA205 OVA et MC38 OVA décrites plus haut, les tumeurs B16 OVA pourraient être décrites comme des tumeurs « chaudes », et les tumeurs MC38 OVA et MCA205 OVA comme des tumeurs plus « froides » que les mélanomes B16 OVA. Les tumeurs chaudes sont caractérisées par une forte infiltration immunitaire, tandis que les tumeurs froides ne sont pas infiltrées par les cellules immunitaires [129]. Les tumeurs chaudes sont les plus susceptibles d'être sensibles aux immunothérapies. A l'inverse, les tumeurs froides sont généralement non-éligible ou résistantes aux immunothérapies. Il pourrait être intéressant de tester la capacité de l'inuline à synergiser avec une immunothérapie par ICI chez des souris porteuses de tumeurs « froides ». En effet, en renforçant l'immunosurveillance et l'immunité circulante, l'inuline pourrait accroître l'infiltration tumorale en LTs, tandis que l'immunothérapie préviendrait leur épuisement fonctionnel. L'inuline aurait également pu être testée en complément d'autres immunothérapies. Nous avons montré que la consommation d'inuline entraîne une augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$ exprimant CD80, ce qui suggère que l'inuline pourrait avoir un impact sur l'axe CD80/CTLA-4. Ainsi, il serait intéressant d'évaluer la capacité du régime enrichi en inuline à accroître l'effet antitumoral d'une immunothérapie anti-CTLA-4 seule, ou combinée avec une immunothérapie anti-PD-1. En effet, plusieurs études ont montré l'importance du microbiote intestinal dans l'efficacité des immunothérapies anti-CTLA-4 [238,247]. Une modulation du microbiote intestinal pourrait donc renforcer l'effet antitumoral de cette thérapie.

A ce jour, les mécanismes cellulaires et moléculaires permettant à l'inuline d'activer les LTs $\gamma\delta$ restent peu connus. Nous avons montré que la fermentation de l'inuline par le microbiote intestinal, et plus particulièrement par les bactéries, est indispensable à l'effet immunostimulant et antitumoral du régime enrichi en inuline. En effet, nous avons montré que l'effet antitumoral de l'inuline est complètement abrogé lorsque les souris sont préalablement traitées avec un mélange d'antibiotiques à large spectre. En revanche, le traitement par antifongique à large spectre n'a pas impacté l'effet antitumoral de l'inuline, suggérant que les champignons ne sont pas impliqués dans cet effet. Cependant, le traitement par antifongique à large spectre seul, indépendamment du régime enrichi en inuline, a permis d'exercer un fort

effet antitumoral. Cet effet peut être d'origine pharmacologique, si l'antifongique utilisé peut inhiber la croissance des cellules cancéreuses. Une autre hypothèse est que certains champignons du microbiote intestinal seraient délétères, induisant des effets pro-tumoraux ou anti-inflammatoires. Par exemple, une infection buccale à *Candida albicans* peut entraîner l'apparition de cancers de la bouche [248]. L'analyse du mycobiote par séquençage d'ADNg ITS2 a montré que la consommation d'inuline diminue l'abondance relative du champignon *Claviceps*. Ce champignon est aussi appelé ergot du seigle, et infecte les fleurs de diverses céréales [249]. Une grande partie des champignons du mycobiote colonisent le microbiote intestinal de manière transitoire, et sont d'origine alimentaire [90]. L'ADNg du champignon *Claviceps* détecté dans les fèces de souris pourrait être d'origine alimentaire, contenu dans les granulés des souris. Pour tester cette hypothèse, un séquençage ITS2 pourrait être réalisé sur les granulés des souris, ou un nouveau séquençage ITS2 pourrait être réalisé sur des fèces de souris hébergées dans une autre animalerie et nourries avec une alimentation différente.

La fermentation de l'inuline par le microbiote intestinal entraîne la libération de plusieurs métabolites, qui pourraient être des médiateurs immunitaires [250]. Parmi ces métabolites, les candidats potentiels sont le fructose, les SCFAs et l'H₂. Le fructose aurait pu entraîner une reprogrammation métabolique des LTs $\gamma\delta$ dans l'épithélium du côlon. Cependant, aucune reprogrammation métabolique potentiellement activatrice de ces cellules n'a été observée. Cependant, l'effet de l'inuline sur les IELs $\gamma\delta$ est assez minime, en comparaison avec celui sur les LTs $\gamma\delta$ intra-tumoraux. Il aurait été intéressant d'étudier la programmation métabolique des LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ intra-tumoraux des souris nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline. Un autre moyen de tester la capacité immunostimulante du fructose serait de cultiver des LTs $\gamma\delta$ isolés de sang de donneurs sains, en présence ou non de fructose. Si le fructose exerçait un effet immunostimulant, cette méthode le mettrait rapidement en évidence. Les SCFAs constituent un autre médiateur immunitaire potentiel. En effet, ils sont décrits comme des immunomodulateurs efficaces, principalement anti-inflammatoires. Ils préviennent la production de cytokines pro-inflammatoires et induisent la production de cytokines anti-inflammatoires [251]. Dans le côlon, ils augmentent l'expression de gènes impliqués dans l'intégrité de la barrière intestinale, comme ZO-1, l'occludine, et l'IL-22 [76,252]. Dans le modèle murin utilisé dans notre étude, la consommation d'inuline permet d'augmenter l'expression d'IL-22 par les cellules de la lamina propria du côlon. Cet effet pourrait être médié

par les SCFAs produit lors de la fermentation de l'inuline. L'effet antitumoral du régime enrichi en inuline ne peut probablement pas être attribué aux SCFAs, qui sont décrits comme possédant des propriétés principalement anti-inflammatoires. Cependant, il serait intéressant de tester la capacité des SCFAs à activer les LTs $\gamma\delta$ *in vitro*, afin de confirmer cette hypothèse. En effet, le butyrate est un exemple de SCFA, qui favorise la génération de LTs CD8⁺ mémoires [253]. Certains SCFAs pourraient avoir d'autres propriétés pro-inflammatoires, pouvant exercer un effet anticancer.

Ce travail de thèse identifie l'H₂ comme le meilleur candidat de l'effet immunostimulant de l'inuline. Les vertus thérapeutiques de cette molécule se limitaient jusqu'à récemment à ses effets antioxydant, anti-inflammatoires et anti-apoptotique. Ces propriétés ne laissaient pas supposer d'effet bénéfique en cas de cancer. Cependant, en 2020, Chen *et al.* ont mis en évidence l'effet anticancer d'une H₂T chez des patients atteints de cancer bronchique non à petites cellules [195,196]. Cet effet médié par l'immunité, reposait principalement sur les LTs $\gamma\delta$ circulants et intra-tumoraux. Dans notre projet, nous avons comparé les effets immunostimulants et anticancer d'une H₂T et du régime enrichi en inuline. Chez des souris porteuses de mélanome transplanté, une H₂T de 2h et un gavage de 70 mg d'inuline ont entraîné la même inhibition de la croissance tumorale. De plus l'immunité infiltrant les tumeurs présentait une augmentation de LTs $\gamma\delta$ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ similaire entre les groupes inuline et H₂T. Chez des souris saines, les 2 traitements ont induit une augmentation de la proportion de LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺ produisant de l'IFN γ dans le sang. Cette similitude des 2 traitements suggère que l'H₂ pourrait être le médiateur immunitaire de l'effet anticancer de l'inuline.

Si l'inuline apparaît comme un prébiotique immunostimulant aux propriétés anticancères efficaces, toutes les inulines ne se valent pas. En effet, la consommation d'une inuline à chaîne courte exerce un effet pro-tumoral dans un modèle murin de tumeur induite chimiquement. A l'inverse, dans ce même modèle, une inuline à chaîne longue prévient légèrement l'apparition de tumeur. Ces résultats montrent que le degré de polymérisation de l'inuline joue un rôle important dans son effet antitumoral. Cette observation suggère que toutes les fibres alimentaires n'ont pas le même effet sur l'immunité et sur la cancérogénèse. En particulier, la

longueur des chaînes semble être déterminante dans la capacité de la fibre à être fermentée et à moduler le microbiote intestinal et ses fonctions, et *in fine* l'immunité de l'hôte.

Les données obtenues permettent de proposer un mécanisme d'action de l'inuline, dans lequel ce prébiotique, en impactant fortement le microbiote intestinal, renforcerait l'immunité intestinale et systémique. Dans le cas d'un challenge tumoral périphérique, les cellules immunitaires activées migrent vers la tumeur, où elles inhibent considérablement la croissance tumorale. Ces premiers résultats sont extrêmement prometteurs car ils suggèrent que l'inuline peut renforcer l'immunosurveillance des cancers d'une façon particulièrement efficace, par l'intermédiaire de la modulation du microbiote intestinal. Sur un plan socio-économique, l'inuline pourrait donc trouver sa place à la fois dans les stratégies de prévention des cancers, mais également dans la prise en charge des patients en amont de, ou en association avec, des immunothérapies chez des patients ne répondant habituellement pas aux traitements. Ce travail de thèse, associé à d'autres études sur les liens entre l'alimentation et le développement de cancers, représente une preuve de concept préclinique que l'alimentation est un paramètre majeur de régulation de l'immunosurveillance antitumorale. Ces observations soutiennent l'importance des régimes riches en fibres alimentaires pour la santé de l'hôte, et notamment pour la prévention des cancers.

FIGURES SUPPLEMENTAIRES

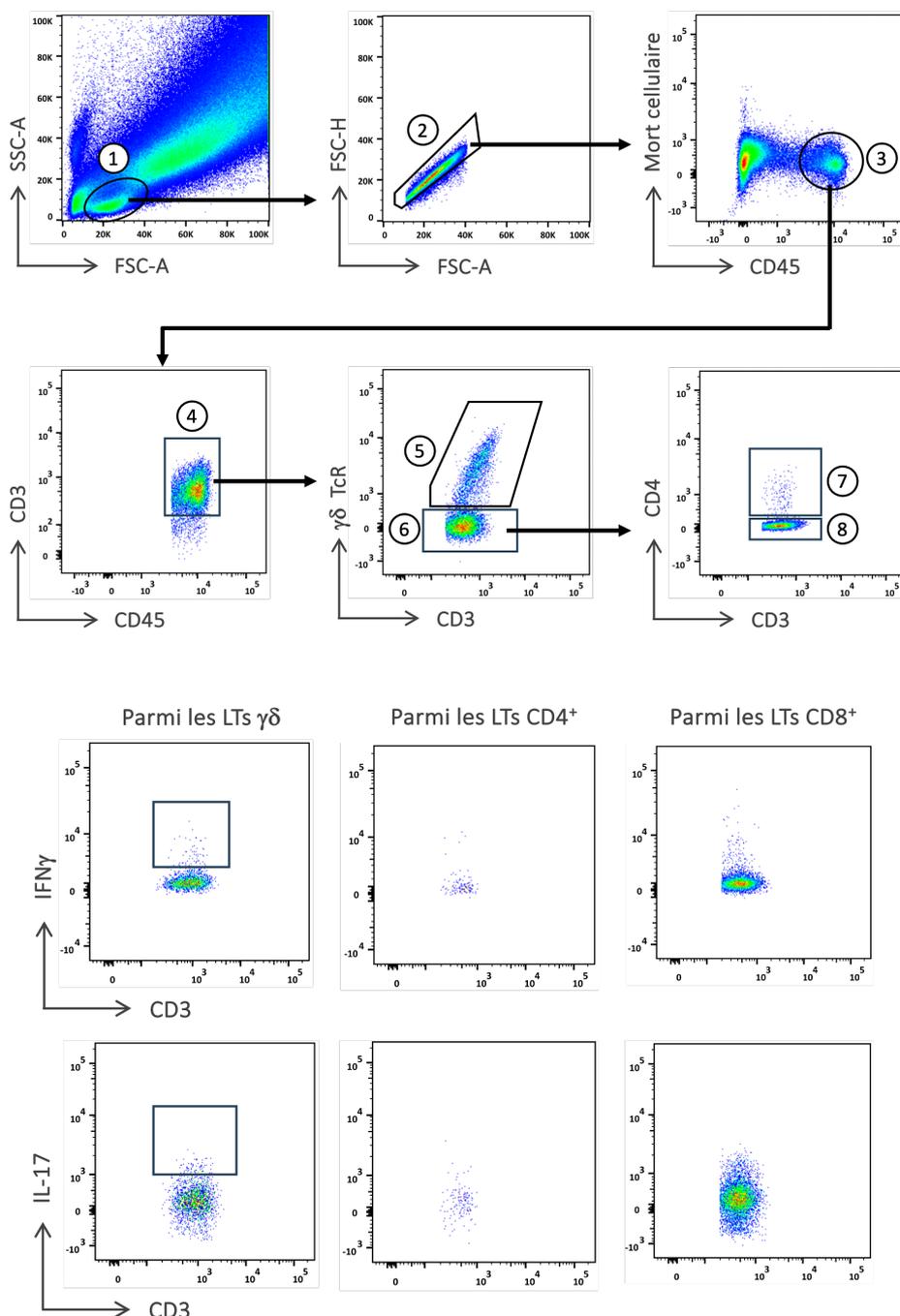


Figure supplémentaire S1 : Sélection des lymphocytes T pour les analyses de cytométrie en flux. Nuages de points illustrant la stratégie de sélection des LTs $\gamma\delta$, CD4⁺ et CD8⁺. La même stratégie a été utilisée, indépendamment de l'organe analysé. ① Lymphocytes, en fonction de leur taille et granulométrie. ② Singulets. Expulsion des cellules doubles (attachées entre elles). ③ Cellules immunitaires vivantes. ④ Lymphocytes T. ⑤ Lymphocytes T $\gamma\delta$. ⑥ Lymphocytes T conventionnels. ⑦ Lymphocytes T CD4⁺. ⑧ Lymphocytes T CD8⁺.

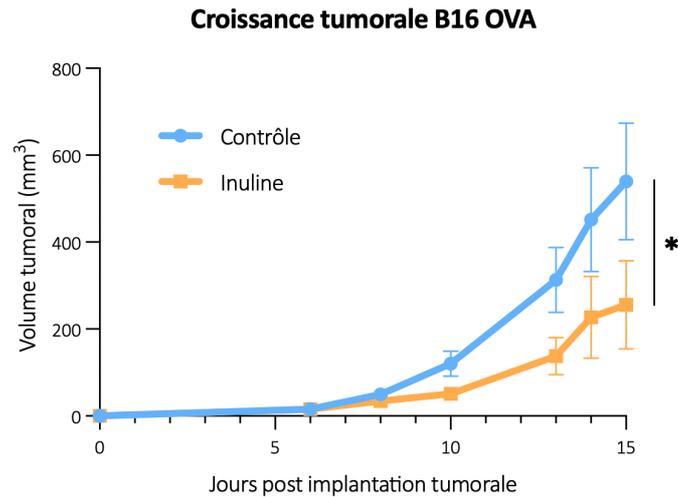


Figure supplémentaire S2 : Effet antitumoral du régime inuline chez des souris mâles. Croissance tumorale chez des souris C57BL/6 mâles nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline et ayant reçu en injection sous-cutanée 2×10^5 cellules de mélanome murin B16 OVA (n=6 par groupe). Les courbes représentent les moyennes \pm SEM. *p < 0,05 en test de two-way ANOVA avec une correction Geisser Greenhouse.

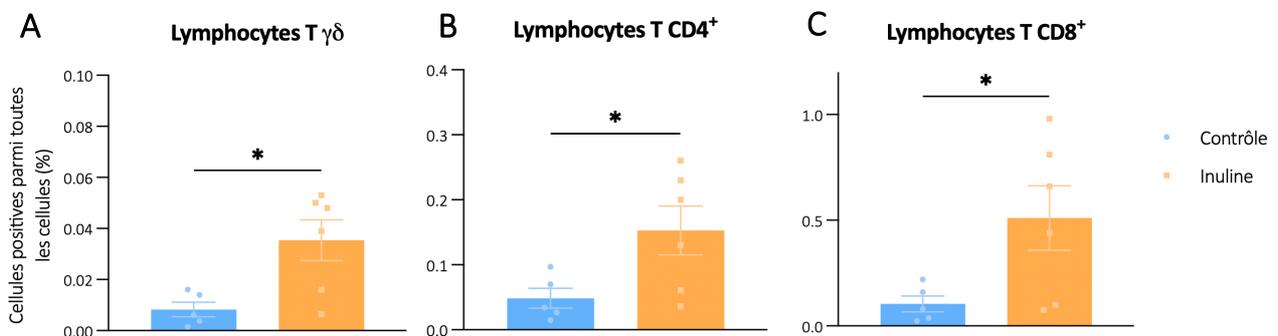


Figure supplémentaire S3 : Lymphocytes T infiltrant les tumeurs de souris mâles. Proportion de lymphocytes T (A) $\gamma\delta$, (B) CD4⁺ et (C) CD8⁺ parmi toutes les cellules infiltrant les tumeurs de souris mâles nourries avec un régime standard (n=5) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM. ns = non-significatif, *p < 0,05 avec un test Mann Whitney.

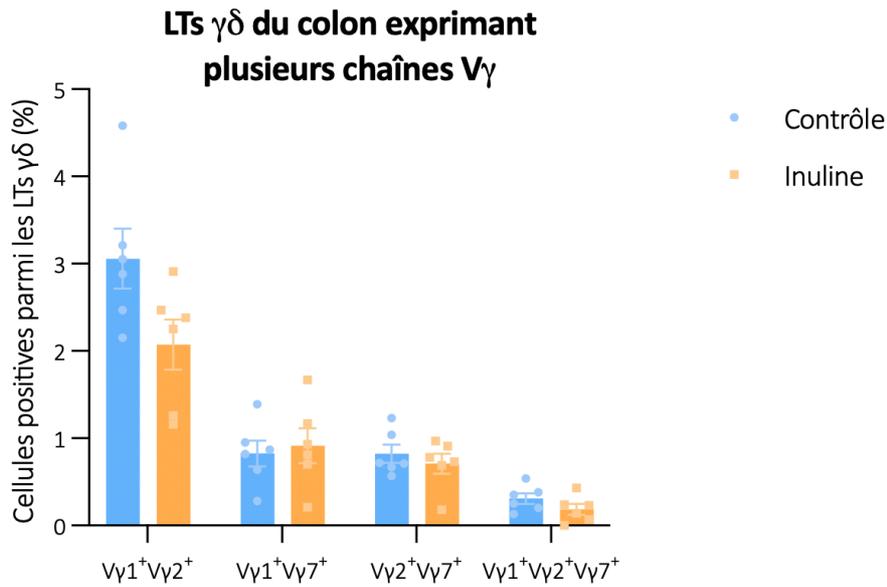


Figure supplémentaire S4 : LTs $\gamma\delta$ exprimant plusieurs chaînes V γ dans le côlon. Proportions des différents sous-types de IELs $\gamma\delta$ dans le côlon de souris C57BL/6 nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=6) ou enrichi en inuline (n=6). Les histogrammes représentent la moyenne \pm SEM.

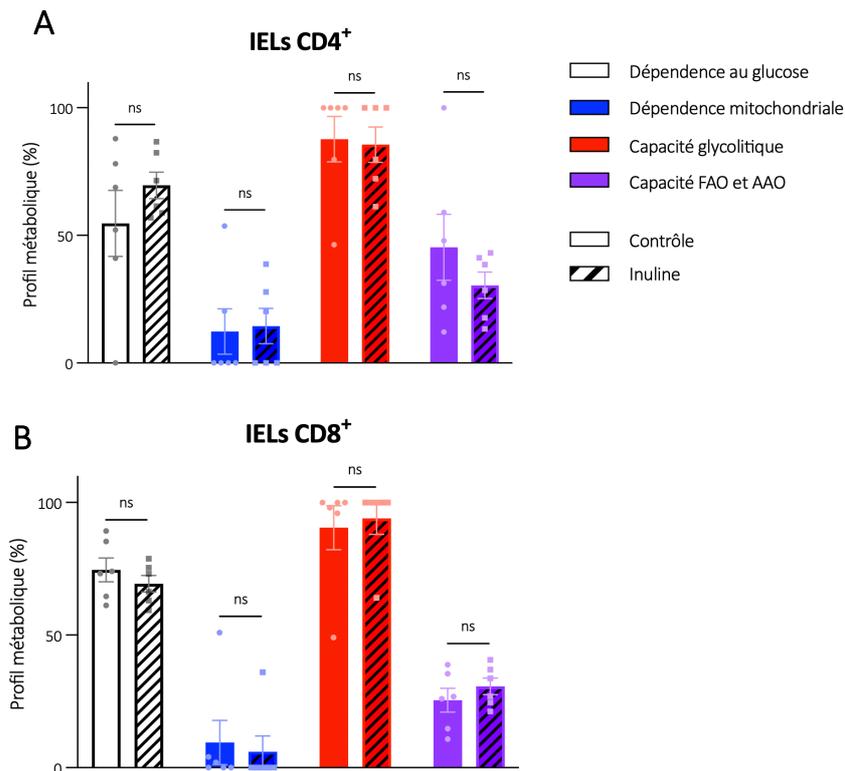


Figure supplémentaire S5 : Analyse des profils métaboliques des IELs CD4⁺ et CD8⁺ du côlon par SCENITH™. Des souris C57BL/6 ont été nourries avec un régime standard ou enrichi en inuline (n=6 par groupe) pendant 15 jours avant l'analyse de leur immunité intestinale par SCENITH™. Le graphique représente les moyennes de profils métaboliques \pm SEM. ns = non-significatif avec un test Mann Whitney.

RÉFÉRENCES

1. World Health Organization *All Cancers*; 2020;
2. Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Dyba, T.; Randi, G.; Bettio, M.; Gavin, A.; Visser, O.; Bray, F. Cancer Incidence and Mortality Patterns in Europe: Estimates for 40 Countries and 25 Major Cancers in 2018. *Eur J Cancer* **2018**, *103*, 356–387, doi:10.1016/j.ejca.2018.07.005.
3. Memon, A.; Bannister, P.; Rogers, I.; Sundin, J.; Al-Ayadhy, B.; James, P.W.; McNally, R.J.Q. Changing Epidemiology and Age-Specific Incidence of Cutaneous Malignant Melanoma in England: An Analysis of the National Cancer Registration Data by Age, Gender and Anatomical Site, 1981–2018. *The Lancet Regional Health - Europe* **2021**, *2*, doi:10.1016/j.lanepe.2021.100024.
4. Robert J. Friedman, Darrel S. Rigel, A.W.K. Early Detection of Malignant Melanoma of the Skin. *CA-ACANCERJOURNALFORCLINICIANS* **1985**, *35*, 130–151, doi:10.1007/978-1-4471-3044-4_5.
5. Wu, Y.; Chen, B.; Zeng, A.; Pan, D.; Wang, R.; Zhao, S. Skin Cancer Classification With Deep Learning: A Systematic Review. *Front Oncol* **2022**, *12*, 1–20, doi:10.3389/fonc.2022.893972.
6. Wu, Y.; Chen, B.; Zeng, A.; Pan, D.; Wang, R.; Zhao, S. Skin Cancer Classification With Deep Learning: A Systematic Review. *Front Oncol* **2022**, *12*, 1–20, doi:10.3389/fonc.2022.893972.
7. Liu, Y.; Sheikh, M.S. Melanoma: Molecular Pathogenesis and Therapeutic Management. *Mol Cell Pharmacol* **2014**, *6*, 31–44, doi:10.4255/mcpharmacol.14.03.
8. Elder, D.E.; Bastian, B.C.; Cree, I.A.; Massi, D.; Scolyer, R.A. The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Arch Pathol Lab Med* **2020**, *144*, 500–522, doi:10.5858/arpa.2019-0561-RA.
9. DeWane, M.E.; Kelsey, A.; Oliviero, M.; Rabinovitz, H.; Grant-Kels, J.M. Melanoma on Chronically Sun-Damaged Skin: Lentigo Maligna and Desmoplastic Melanoma. *J Am Acad Dermatol* **2019**, *81*, 823–833, doi:10.1016/j.jaad.2019.03.066.
10. Dessinioti, C.; Geller, A.C.; Whiteman, D.C.; Garbe, C.; Grob, J.J.; Kelly, J.W.; Scolyer, R.A.; Rawson, R. V.; Lallas, A.; Pellacani, G.; et al. *Not All Melanomas Are Created Equal: A Review and Call for More Research into Nodular Melanoma*; 2021; Vol. 185; ISBN 0000000325639.
11. Goydos, J.S.; Shoen, S.L. Acral Lentiginous Melanoma. *Cancer Treat Res* **2016**, *167*, 321–329, doi:10.1007/978-3-319-22539-5_14.

12. Wu, S.; Han, J.; Laden, F.; Qureshi, A.A. Long-Term Ultraviolet Flux, Other Potential Risk Factors, and Skin Cancer Risk: A Cohort Study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **2014**, *23*, 1080–1089, doi:10.1158/1055-9965.EPI-13-0821.
13. Dzwierzynski, W.W. Melanoma Risk Factors and Prevention. *Clin Plast Surg* **2021**, *48*, 543–550, doi:10.1016/j.cps.2021.05.001.
14. Shain, A.H.; Bastian, B.C. From Melanocytes to Melanomas. *Nat Rev Cancer* **2016**, *16*, 345–358, doi:10.1038/nrc.2016.37.
15. Papageorgiou, C.; Apalla, Z.; Manoli, S.; Lallas, K. Dermatology Practical & Conceptual Melanoma : Staging and Follow-Up. *Dermatol Pract Conceptual* **2021**, *11*, 1–9.
16. Yu, R.; Zhu, B.; Chen, D. Type I Interferon-Mediated Tumor Immunity and Its Role in Immunotherapy. *Cellular and Molecular Life Sciences* **2022**, *79*, 1–24, doi:10.1007/s00018-022-04219-z.
17. Avruch, J. MAP Kinase Pathways: The First Twenty Years. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **2007**, *1773*, 1150–1160, doi:10.1016/j.bbamcr.2006.11.006.
18. Davies, H.; Bignell, G.R.; Cox, C.; Stephens, P.; Edkins, S.; Clegg, S.; Teague, J.; Woffendin, H.; Garnett, M.J.; Bottomley, W.; et al. Mutations of the BRAF Gene in Human Cancer. *Nature* **2002**, *417*, 949–954, doi:10.1038/nature00766.
19. Pollock, P.M.; Harper, U.L.; Hansen, K.S.; Yudt, L.M.; Stark, M.; Robbins, C.M.; Moses, T.Y.; Hostetter, G.; Wagner, U.; Kakareka, J.; et al. High Frequency of BRAF Mutations in Nevi. *Nat Genet* **2003**, *33*, 19–20, doi:10.1038/ng1054.
20. Hepner, A.; Salgues, A.; Dos Anjos, C.A.; Sahade, M.; Camargo, V.P.; Garicochea, B.; Shoushtari, A.N.; Postow, M.A.; Fernandes, G.S.; Munhoz, R.R. Treatment of Advanced Melanoma - A Changing Landscape. *Rev Assoc Med Bras* **2017**, *63*, 814–823, doi:10.1590/1806-9282.63.09.814.
21. Hepner, A.; Salgues, A.; Dos Anjos, C.A.; Sahade, M.; Camargo, V.P.; Garicochea, B.; Shoushtari, A.N.; Postow, M.A.; Fernandes, G.S.; Munhoz, R.R. Treatment of Advanced Melanoma - A Changing Landscape. *Rev Assoc Med Bras* **2017**, *63*, 814–823, doi:10.1590/1806-9282.63.09.814.
22. Garbe, C.; Eigentler, T.K. Vemurafenib. *Recent Results in Cancer Research* **2018**, *211*, 77–89, doi:10.1007/978-3-319-91442-8.
23. Kainthla, R.; Kim, K.B.; Falchook, G.S. Dabrafenib. *Recent Results in Cancer Research* **2014**, *201*, 227–240, doi:10.1007/978-3-642-54490-3_14.
24. Gdc-, C.; Andrlová, H.; Zeiser, R.; Meiss, F. Cobimetinib (GDC-0973, XL518). *Recent Results in Cancer Research* **2018**, *212*, 177–186, doi:10.1007/978-3-319-91442-8.
25. Robert Zeiser, H.A. and F.M. Trametinib (GSK1120212). *Recent Results in Cancer Research* **2018**, *211*, 91–100, doi:10.1007/978-3-319-91442-8.

26. Okazaki, T.; Honjo, T. PD-1 and PD-1 Ligands: From Discovery to Clinical Application. *Int Immunol* **2007**, *19*, 813–824, doi:10.1093/intimm/dxm057.
27. Akiyama, M.; Matsuda, Y.; Arai, T.; Saeki, H. PD-L1 Expression in Malignant Melanomas of the Skin and Gastrointestinal Tract. *Oncol Lett* **2020**, *19*, 2481–2488, doi:10.3892/ol.2020.11325.
28. Yavar Shiravand ¹, Faezeh Khodadadi ², Seyyed Mohammad Amin Kashani ³, Seyed Reza Hosseini-Fard ⁴, Shadi Hosseini ⁵, Habib Sadeghirad ⁶, Rahul Ladwa ⁷, K.O. ⁷ and A.K. ⁶ Immune Checkpoint Inhibitors in Cancer. *Current Oncology* **2022**, *29*, 3044–3060, doi:10.1016/C2016-0-05251-8.
29. Robert, C.; Schachter, J.; Long, G. V.; Arance, A.; Grob, J.J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M.S.; McNeil, C.; Lotem, M.; et al. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2015**, *372*, 2521–2532, doi:10.1056/nejmoa1503093.
30. Weber, J.S.; D’Angelo, S.P.; Minor, D.; Hodi, F.S.; Gutzmer, R.; Neyns, B.; Hoeller, C.; Khushalani, N.I.; Miller, W.H.; Lao, C.D.; et al. Nivolumab versus Chemotherapy in Patients with Advanced Melanoma Who Progressed after Anti-CTLA-4 Treatment (CheckMate 037): A Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 3 Trial. *Lancet Oncol* **2015**, *16*, 375–384, doi:10.1016/S1470-2045(15)70076-8.
31. Robert, C.; Long, G. V.; Brady, B.; Dutriaux, C.; Maio, M.; Mortier, L.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; McNeil, C.; Kalinka-Warzocha, E.; et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation. *New England Journal of Medicine* **2015**, *372*, 320–330, doi:10.1056/nejmoa1412082.
32. Śmiech, M.; Leszczyński, P.; Kono, H.; Wardell, C.; Taniguchi, H. Emerging Braf Mutations in Cancer Progression and Their Possible Effects on Transcriptional Networks. *Genes (Basel)* **2020**, *11*, 1–14, doi:10.3390/genes11111342.
33. Asher, N.; Ben-Betzalel, G.; Lev-Ari, S.; Shapira-Frommer, R.; Steinberg-Silman, Y.; Gochman, N.; Schachter, J.; Meirson, T.; Markel, G. Real World Outcomes of Ipilimumab and Nivolumab in Patients with Metastatic Melanoma. *Cancers (Basel)* **2020**, *12*, 1–18, doi:10.3390/cancers12082329.
34. Nicholson, L.B. The Immune System. *Essays Biochem* **2016**, *60*, 275–301, doi:10.1042/EBC20160017.
35. Dranoff, G. Cytokines in Cancer Pathogenesis and Cancer Therapy. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4*, 11–22, doi:10.1038/nrc1252.
36. Riera Romo, M.; Pérez-Martínez, D.; Castillo Ferrer, C. Innate Immunity in Vertebrates: An Overview. *Immunology* **2016**, *148*, 125–139, doi:10.1111/imm.12597.
37. Geering, B.; Stoeckle, C.; Conus, S.; Simon, H.U. Living and Dying for Inflammation: Neutrophils, Eosinophils, Basophils. *Trends Immunol* **2013**, *34*, 398–409, doi:10.1016/j.it.2013.04.002.

38. Veronique Witko-Sarsat, Philippe Rieu, Beatrice Descamps-Latscha, Philippe Lesavre, and L.H.-M. Neutrophils : Molecules , Functions And. *Laboratory Investigation* **2000**, *80*, 617–653.
39. Wechsler, M.E.; Munitz, A.; Ackerman, S.J.; Drake, M.G.; Jackson, D.J.; Wardlaw, A.J.; Dougan, S.K.; Berdnikovs, S.; Schleich, F.; Matucci, A.; et al. Eosinophils in Health and Disease: A State-of-the-Art Review. *Mayo Clin Proc* **2021**, *96*, 2694–2707, doi:10.1016/j.mayocp.2021.04.025.
40. Min, B.; Brown, M.A.; Legros, G. Understanding the Roles of Basophils: Breaking Dawn. *Immunology* **2012**, *135*, 192–197, doi:10.1111/j.1365-2567.2011.03530.x.
41. Krystel-Whittemore, M.; Dileepan, K.N.; Wood, J.G. Mast Cell: A Multi-Functional Master Cell. *Front Immunol* **2016**, *6*, 1–12, doi:10.3389/fimmu.2015.00620.
42. Shapouri-Moghaddam, A.; Mohammadian, S.; Vazini, H.; Taghadosi, M.; Esmaeili, S.A.; Mardani, F.; Seifi, B.; Mohammadi, A.; Afshari, J.T.; Sahebkar, A. *Macrophage Plasticity, Polarization, and Function in Health and Disease*; 2018; Vol. 233; ISBN 9177948564.
43. Liu, K. Dendritic Cells. *Encyclopedia of Cell Biology* **2016**, *3*, 741–749, doi:10.1016/B978-0-12-394447-4.30111-0.
44. Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S. Functions of Natural Killer Cells. *Nat Immunol* **2008**, *9*, 503–510, doi:10.1038/ni1582.
45. Silva-Santos, B.; Mensurado, S.; Coffelt, S.B. $\gamma\delta$ T Cells: Pleiotropic Immune Effectors with Therapeutic Potential in Cancer. *Nat Rev Cancer* **2019**, *19*, 392–404, doi:10.1038/s41568-019-0153-5.
46. Bonilla, F.A.; Oettgen, H.C. Adaptive Immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2010**, *125*, S33–S40, doi:10.1016/j.jaci.2009.09.017.
47. Carter, R.H. B Cells in Health and Disease. *Mayo Clin Proc* **2006**, *81*, 377–384, doi:10.4065/81.3.377.
48. Yuseff, M.I.; Pierobon, P.; Reversat, A.; Lennon-Duménil, A.M. How B Cells Capture, Process and Present Antigens: A Crucial Role for Cell Polarity. *Nat Rev Immunol* **2013**, *13*, 475–486.
49. Kumar, B. V; Connors, T.; Farber, D.L. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity* **2019**, *48*, 202–213, doi:10.1016/j.immuni.2018.01.007.Human.
50. van Beek, J.J.P.; Rescigno, M.; Lugli, E. A Fresh Look at the T Helper Subset Dogma. *Nat Immunol* **2021**, *22*, 104–105, doi:10.1038/s41590-020-00858-1.
51. Qureshi, O.S.; Zheng, Y.; Nakamura, K.; Attridge, K.; Manzotti, C.; Schmidt, E.M.; Baker, J.; Jeffery, L.E.; Kaur, S.; Briggs, Z.; et al. Trans-Endocytosis of CD80 and CD86 : A Molecular Basis for the Cell Extrinsic Function of CTLA-4. *Science (1979)* **2011**, *332*, 600–603.

52. Tekguc, M.; Wing, J.B.; Osaki, M.; Long, J.; Sakaguchi, S. Treg-Expressed CTLA-4 Depletes CD80/CD86 by Trogocytosis, Releasing Free PD-L1 on Antigen-Presenting Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, doi:10.1073/pnas.2023739118.
53. St. Paul, M.; Ohashi, P.S. The Roles of CD8+ T Cell Subsets in Antitumor Immunity. *Trends Cell Biol* **2020**, *30*, 695–704, doi:10.1016/j.tcb.2020.06.003.
54. Wu, L.; Kaer, L. Van Natural Killer T Cells in Health and Disease. *Frontiers in Bioscience - Scholar* **2011**, *3 S*, 236–251, doi:10.2741/s148.
55. Gribble, F.M.; Reimann, F. Function and Mechanisms of Enteroendocrine Cells and Gut Hormones in Metabolism. *Nat Rev Endocrinol* **2019**, *15*, 226–237, doi:10.1038/s41574-019-0168-8.
56. Barker, N. Adult Intestinal Stem Cells: Critical Drivers of Epithelial Homeostasis and Regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2014**, *15*, 19–33, doi:10.1038/nrm3721.
57. Parigi, S.M.; Eldh, M.; Larssen, P.; Gabrielsson, S.; Villablanca, E.J. Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. *Front Immunol* **2015**, *6*, 1–21, doi:10.3389/fimmu.2015.00415.
58. Gorfu, G.; Rivera-Nieves, J.; Ley, K. Role of β 7 Integrins in Intestinal Lymphocyte Homing and Retention. *Curr Mol Med* **2009**, *9*, 836–850, doi:10.2174/156652409789105525.
59. Williams, I.R. Chemokine Receptors and Leukocyte Trafficking in the Mucosal Immune System. *Immunol Res* **2004**, *29*, 283–291, doi:10.1385/IR:29:1-3:283.
60. Kunkel, E.J.; Campbell, J.J.; Haraldsen, G.; Pan, J.; Boisvert, J.; Roberts, A.I.; Ebert, E.C.; Vierra, M.A.; Goodman, S.B.; Genovese, M.C.; et al. Lymphocyte Cc Chemokine Receptor 9 and Epithelial Thymus-Expressed Chemokine (Teck) Expression Distinguish the Small Intestinal Immune Compartment. *Journal of Experimental Medicine* **2000**, *192*, 761–768, doi:10.1084/jem.192.5.761.
61. Chassaing, B.; Kumar, M.; Baker, M.T.; Singh, V.; Vijay-Kumar, M. Mammalian Gut Immunity. *Biomed J* **2014**, *37*, 246–258, doi:10.4103/2319-4170.130922.
62. Pascal, V.; Hiblot, M.; Wehbi, B.; Aldigier, J.-C.; Cogné, M. Homéostasie de La Réponse IgA et Microbiote. *Médecine/Sciences* **2021**, *37*, 35–40, doi:10.1051/medsci/2020258.
63. Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the Human Gut Microbiota. *Biochemical Journal* **2017**, *474*, 1823–1836, doi:10.1042/BCJ20160510.
64. Galland, L. The Gut Microbiome and the Brain. *J Med Food* **2014**, *17*, 1261–1272, doi:10.1089/jmf.2014.7000.
65. Sam, Q.H.; Chang, M.W.; Chai, L.Y.A. The Fungal Mycobiome and Its Interaction with Gut Bacteria in the Host. *Int J Mol Sci* **2017**, *18*.

66. Rinninella, E.; Raoul, P.; Cintoni, M.; Franceschi, F.; Miggiano, G.A.D.; Gasbarrini, A.; Mele, M.C. What Is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms* **2019**, *7*, doi:10.3390/microorganisms7010014.
67. Faith, J.J.; Guruge, J.L.; Charbonneau, M.; Subramanian, S.; Seedorf, H.; Goodman, A.L.; Clemente, J.C.; Knight, R.; Heath, A.C.; Leibel, R.L.; et al. The Long-Term Stability of the Human Gut Microbiota. *Science (1979)* **2013**, *341*, doi:10.1126/science.1237439.
68. Kastl, A.J.; Terry, N.A.; Wu, G.D.; Albenberg, L.G. The Structure and Function of the Human Small Intestinal Microbiota: Current Understanding and Future Directions. *Cmgh* **2020**, *9*, 33–45, doi:10.1016/j.jcmgh.2019.07.006.
69. Contijoch, E.J.; Britton, G.J.; Yang, C.; Mogno, I.; Li, Z.; Ng, R.; Llewellyn, S.R.; Hira, S.; Johnson, C.; Rabinowitz, K.M.; et al. Gut Microbiota Density Influences Host Physiology and Is Shaped by Host and Microbial Factors. *Elife* **2019**, *8*, 1–26, doi:10.7554/eLife.40553.
70. Jovel, J.; Patterson, J.; Wang, W.; Hotte, N.; O’Keefe, S.; Mitchel, T.; Perry, T.; Kao, D.; Mason, A.L.; Madsen, K.L.; et al. Characterization of the Gut Microbiome Using 16S or Shotgun Metagenomics. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 1–17, doi:10.3389/fmicb.2016.00459.
71. Boer, C.G.; Radjabzadeh, D.; Medina-Gomez, C.; Garmaeva, S.; Schiphof, D.; Arp, P.; Koet, T.; Kurilshikov, A.; Fu, J.; Ikram, M.A.; et al. Intestinal Microbiome Composition and Its Relation to Joint Pain and Inflammation. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1–9, doi:10.1038/s41467-019-12873-4.
72. Zhu, B.; Wang, X.; Li, L. Human Gut Microbiome: The Second Genome of Human Body. *Protein Cell* **2010**, *1*, 718–725, doi:10.1007/s13238-010-0093-z.
73. Morrison, D.J.; Preston, T. Formation of Short Chain Fatty Acids by the Gut Microbiota and Their Impact on Human Metabolism. *Gut Microbes* **2016**, *7*, 189–200, doi:10.1080/19490976.2015.1134082.
74. Mutuyemungu, E.; Singh, M.; Liu, S.; Rose, D.J. Intestinal Gas Production by the Gut Microbiota: A Review. *J Funct Foods* **2023**, *100*, 105367, doi:10.1016/j.jff.2022.105367.
75. Lutgendorff, F.; Akkermans, L.; Soderholm, J. The Role of Microbiota and Probiotics in Stress-Induced Gastrointestinal Damage. *Curr Mol Med* **2008**, *8*, 282–298, doi:10.2174/156652408784533779.
76. Ma, X.; Fan, P.X.; Li, L.S.; Qiao, S.Y.; Zhang, G.L.; Li, D.F. Butyrate Promotes the Recovering of Intestinal Wound Healing through Its Positive Effect on the Tight Junctions. *J Anim Sci* **2012**, *90*, 266–268, doi:10.2527/jas.50965.
77. Jandhyala, S.M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Reddy, D.N. Role of the Normal Gut Microbiota. *World J Gastroenterol* **2015**, *21*, 8836–8847, doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787.

78. Scanlan, P.D.; Marchesi, J.R. Micro-Eukaryotic Diversity of the Human Distal Gut Microbiota: Qualitative Assessment Using Culture-Dependent and -Independent Analysis of Faeces. *ISME Journal* **2008**, *2*, 1183–1193, doi:10.1038/ismej.2008.76.
79. Underhill, D.M.; Iliev, I.D. The Mycobiota: Interactions between Commensal Fungi and the Host Immune System. *Nat Rev Immunol* **2014**, *14*, 405–416.
80. Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J.L.; Levesque, C.A.; Chen, W.; Bolchacova, E.; Voigt, K.; Crous, P.W.; et al. Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2012**, *109*, 6241–6246, doi:10.1073/pnas.1117018109.
81. Motooka, D.; Fujimoto, K.; Tanaka, R.; Yaguchi, T.; Gotoh, K.; Maeda, Y.; Furuta, Y.; Kurakawa, T.; Goto, N.; Yasunaga, T.; et al. Fungal ITS1 Deep-Sequencing Strategies to Reconstruct the Composition of a 26-Species Community and Evaluation of the Gut Mycobiota of Healthy Japanese Individuals. *Front Microbiol* **2017**, *8*, 1–12, doi:10.3389/fmicb.2017.00238.
82. Hallen-Adams, H.E.; Suhr, M.J. Fungi in the Healthy Human Gastrointestinal Tract. *Virulence* **2017**, *8*, 352–358, doi:10.1080/21505594.2016.1247140.
83. Richard, M.L.; Sokol, H. The Gut Mycobiota: Insights into Analysis, Environmental Interactions and Role in Gastrointestinal Diseases. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2019**, *16*, 331–345, doi:10.1038/s41575-019-0121-2.
84. Fiers, W.D.; Gao, I.H.; Iliev, I.D. Gut Mycobiota under Scrutiny: Fungal Symbionts or Environmental Transients? *Curr Opin Microbiol* **2019**, *50*, 79–86, doi:10.1016/j.mib.2019.09.010.
85. Mayer, F.L.; Kronstad, J.W. Disarming Fungal Pathogens: *Bacillus Safensis* Inhibits Virulence Factor Production and Biofilm Formation by *Cryptococcus Neoformans* and *Candida Albicans*. *mBio* **2017**, *8*, 1–22, doi:10.1128/mBio.01537-17.
86. Downward, J.R.E.; Falkowski, N.R.; Mason, K.L.; Muraglia, R.; Huffnagle, G.B. Modulation of Post-Antibiotic Bacterial Community Reassembly and Host Response by *Candida Albicans*. *Sci Rep* **2013**, *3*, 1–11, doi:10.1038/srep02191.
87. Salminen, G; Gibson, A.L.M. and E.I. Influence of Mode of Delivery on Gut Microbiota Composition in Seven Year Old Children. *Gut* **2015**, 1388–1389, doi:10.1136/gut.2004.041640.
88. Tanaka, M.; Nakayama, J. Development of the Gut Microbiota in Infancy and Its Impact on Health in Later Life. *Allergology International* **2017**, *66*, 515–522, doi:10.1016/j.alit.2017.07.010.
89. Leeming, E.R.; Johnson, A.J.; Spector, T.D.; Roy, C.I.L. Effect of Diet on the Gut Microbiota: Rethinking Intervention Duration. *Nutrients* **2019**, *11*, 1–28, doi:10.3390/nu11122862.

90. David, L.A.; Maurice, C.F.; Carmody, R.N.; Gootenberg, D.B.; Button, J.E.; Wolfe, B.E.; Ling, A. V.; Devlin, A.S.; Varma, Y.; Fischbach, M.A.; et al. Diet Rapidly and Reproducibly Alters the Human Gut Microbiome. *Nature* **2014**, *505*, 559–563, doi:10.1038/nature12820.
91. Monda, V.; Villano, I.; Messina, A.; Valenzano, A.; Esposito, T.; Moscatelli, F.; Viggiano, A.; Cibelli, G.; Chieffi, S.; Monda, M.; et al. Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxid Med Cell Longev* **2017**, *2017*, doi:10.1155/2017/3831972.
92. Vich Vila, A.; Collij, V.; Sanna, S.; Sinha, T.; Imhann, F.; Bourgonje, A.R.; Mujagic, Z.; Jonkers, D.M.A.E.; Masclee, A.A.M.; Fu, J.; et al. Impact of Commonly Used Drugs on the Composition and Metabolic Function of the Gut Microbiota. *Nat Commun* **2020**, *11*, 1–11, doi:10.1038/s41467-019-14177-z.
93. Hrnčir, T. Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. *Microorganisms* **2022**, *10*, doi:10.3390/microorganisms10030578.
94. Sameer, A.S.; Nissar, S. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *Biomed Res Int* **2021**, *2021*, doi:10.1155/2021/1157023.
95. Bourgeois, C.; Kuchler, K. Fungal Pathogens-a Sweet and Sour Treat for Toll-like Receptors. *Front Cell Infect Microbiol* **2012**, *2*, 142, doi:10.3389/fcimb.2012.00142.
96. Franchi, L.; Warner, N.; Viani, K.; Nuñez, G. Function of Nod-like Receptors in Microbial Recognition and Host Defense. *Immunol Rev* **2009**, *227*, 106–128, doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00734.x.Function.
97. Caffaratti, C.; Plazy, C.; Mery, G.; Tidjani, A.R.; Fiorini, F.; Thiroux, S.; Toussaint, B.; Hannani, D.; Le Gouellec, A. What We Know so Far about the Metabolite-Mediated Microbiota-Intestinal Immunity Dialogue and How to Hear the Sound of This Crosstalk. *Metabolites* **2021**, *11*, 1–37, doi:10.3390/metabo11060406.
98. Licciardi, P. V.; Ververis, K.; Karagiannis, T.C. Histone Deacetylase Inhibition and Dietary Short-Chain Fatty Acids. *ISRN Allergy* **2011**, *2011*, 1–8, doi:10.5402/2011/869647.
99. Carretta, M.D.; Quiroga, J.; López, R.; Hidalgo, M.A.; Burgos, R.A. Participation of Short-Chain Fatty Acids and Their Receptors in Gut Inflammation and Colon Cancer. *Front Physiol* **2021**, *12*.
100. Li, M.; van Esch, B.C.A.M.; Henricks, P.A.J.; Folkerts, G.; Garssen, J. The Anti-Inflammatory Effects of Short Chain Fatty Acids on Lipopolysaccharide- or Tumor Necrosis Factor α -Stimulated Endothelial Cells via Activation of GPR41/43 and Inhibition of HDACs. *Front Pharmacol* **2018**, *9*, 1–12, doi:10.3389/fphar.2018.00533.
101. Ang, Z.; Ding, J.L. GPR41 and GPR43 in Obesity and Inflammation - Protective or Causative? *Front Immunol* **2016**, *7*, 1–5, doi:10.3389/fimmu.2016.00028.

102. Yoshii, K.; Hosomi, K.; Sawane, K.; Kunisawa, J. Metabolism of Dietary and Microbial Vitamin b Family in the Regulation of Host Immunity. *Front Nutr* **2019**, *6*, 1–12, doi:10.3389/fnut.2019.00048.
103. Rothhammer, V.; Quintana, F.J. The Aryl Hydrocarbon Receptor: An Environmental Sensor Integrating Immune Responses in Health and Disease. *Nat Rev Immunol* **2019**, *19*, 184–197, doi:10.1038/s41577-019-0125-8.
104. Asseri, A.H.; Bakhsh, T.; Abuzahrah, S.S.; Ali, S.; Rather, I.A. The Gut Dysbiosis-Cancer Axis : Illuminating Novel Insights and Implications for Clinical Practice. *Front Pharmacol* **2023**, 1–12, doi:10.3389/fphar.2023.1208044.
105. Zhang, M.; Lu, X.; Wei, C.; Li, X. Association between A β and $\Gamma\delta$ T-cell Subsets and Clinicopathological Characteristics in Patients with Breast Cancer. *Oncol Lett* **2020**, *20*, 1–8, doi:10.3892/OL.2020.12188.
106. Qu, G.; Wang, S.; Zhou, Z.; Jiang, D.; Liao, A.; Luo, J. Comparing Mouse and Human Tissue-Resident $\Gamma\delta$ T Cells. *Front Immunol* **2022**, *13*, 1–7, doi:10.3389/fimmu.2022.891687.
107. Lawand, M.; Déchanet-Merville, J.; Dieu-Nosjean, M.C. Key Features of Gamma-Delta T-Cell Subsets in Human Diseases and Their Immunotherapeutic Implications. *Front Immunol* **2017**, *8*, doi:10.3389/fimmu.2017.00761.
108. Wu, D.; Wu, P.; Qiu, F.; Wei, Q.; Huang, J. Human $\Gamma\delta$ T-Cell Subsets and Their Involvement in Tumor Immunity. *Cell Mol Immunol* **2017**, *14*, 245–253, doi:10.1038/cmi.2016.55.
109. Sun, D.; Chan, N.; Shao, H.; Born, W.K.; Kaplan, H.J. $\Gamma\delta$ T Cells Activated in Different Inflammatory Environments Are Functionally Distinct. *The Journal of Immunology* **2022**, *208*, 1224–1231, doi:10.4049/jimmunol.2100967.
110. Ryan, P.L.; Sumaria, N.; Holland, C.J.; Bradford, C.M.; Izotova, N.; Grandjean, C.L.; Jawad, A.S.; Bergmeier, L.A.; Pennington, D.J.; Born, W.K. Heterogeneous yet Stable V δ 2(+) T-Cell Profiles Define Distinct Cytotoxic Effector Potentials in Healthy Human Individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2016**, *113*, 14378–14383, doi:10.1073/pnas.1611098113.
111. Zarobkiewicz, M.K.; Wawryk-Gawda, E.; Kowalska, W.; Janiszewska, M.; Bojarska-Junak, A. $\Gamma\delta$ T Lymphocytes in Asthma: A Complicated Picture. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **2021**, *69*.
112. Khan, M.W.A.; Curbishley, S.M.; Chen, H.C.; Thomas, A.D.; Pircher, H.; Mavilio, D.; Steven, N.M.; Eberl, M.; Moser, B. Expanded Human Blood-Derived $\Gamma\delta$ T Cells Display Potent Antigen-Presentation Functions. *Front Immunol* **2014**, *5*, 1–13, doi:10.3389/fimmu.2014.00344.
113. Himoudi, N.; Morgenstern, D.A.; Yan, M.; Vernay, B.; Saraiva, L.; Wu, Y.; Cohen, C.J.; Gustafsson, K.; Anderson, J. Human $\Gamma\delta$ T Lymphocytes Are Licensed for Professional Antigen Presentation by Interaction with Opsonized Target Cells. *The Journal of Immunology* **2012**, *188*, 1708–1716, doi:10.4049/jimmunol.1102654.

114. Cheng, L.; Cui, Y.; Shao, H.; Han, G.; Zhu, L.; Huang, Y.; O'Brien, R.L.; Born, W.K.; Kaplan, H.J.; Sun, D. Mouse $\Gamma\delta$ T Cells Are Capable of Expressing MHC Class II Molecules, and of Functioning as Antigen-Presenting Cells. *J Neuroimmunol* **2008**, *203*, 3–11, doi:10.1016/j.jneuroim.2008.06.007.
115. Kierkels, G.J.J.; Scheper, W.; Meringa, A.D.; Johanna, I.; Beringer, D.X.; Janssen, A.; Schiffler, M.; Aarts-Riemens, T.; Kramer, L.; Straetemans, T.; et al. Identification of a Tumor-Specific Allo-HLA–Restricted GdTCR. *Blood Adv* **2019**, *3*, 2870–2882, doi:10.1182/bloodadvances.2019032409.
116. Uldrich, A.P.; Le Nours, J.; Pellicci, D.G.; Gherardin, N.A.; Mcpherson, K.G.; Lim, R.T.; Patel, O.; Beddoe, T.; Gras, S.; Rossjohn, J.; et al. CD1d-Lipid Antigen Recognition by the $\Gamma\delta$ TCR. *Nat Immunol* **2013**, *14*, 1137–1145, doi:10.1038/ni.2713.
117. Deseke, M.; Prinz, I. Ligand Recognition by the $\Gamma\delta$ TcR and Discrimination between Homeostasis and Stress Conditions. *Cell Mol Immunol* **2020**, *17*, 914–924.
118. Rust, C.J.J.; Verreck, F.; Vietor, H.; Koning, F. Specific Recognition of Staphylococcal Enterotoxin A by Human T Cells Bearing Receptors with the Vgamma9 Region. *Nature* **1990**, *374*, 685–689.
119. Xi, X.; Han, X.; Li, L.; Zhao, Z. Identification of a New Tuberculosis Antigen Recognized by $\Gamma\sigma$ T Cell Receptor. *Clinical and Vaccine Immunology* **2013**, *20*, 530–539, doi:10.1128/CVI.00584-12.
120. Vavassori, S.; Kumar, A.; Wan, G.S.; Ramanjaneyulu, G.S.; Cavallari, M.; El Daker, S.; Beddoe, T.; Theodossis, A.; Williams, N.K.; Gostick, E.; et al. Butyrophilin 3A1 Binds Phosphorylated Antigens and Stimulates Human $\Gamma\delta$ T Cells. *Nat Immunol* **2013**, *14*, 908–916, doi:10.1038/ni.2665.
121. Rigau, M.; Ostrouska, S.; Fulford, T.S.; Johnson, D.N.; Woods, K.; Ruan, Z.; McWilliam, H.E.G.; Hudson, C.; Tutuka, C.; Wheatley, A.K.; et al. Butyrophilin 2A1 Is Essential for Phosphoantigen Reactivity by Gd T Cells. *Science (1979)* **2020**, *367*, 1–24, doi:10.1126/science.aay5516.
122. Papotto, P.H.; Yilmaz, B.; Silva-Santos, B. Crosstalk between $\Gamma\delta$ T Cells and the Microbiota. *Nat Microbiol* **2021**, *6*, 1110–1117, doi:10.1038/s41564-021-00948-2.
123. Breton, J.; Galmiche, M.; Déchelotte, P. Dysbiotic Gut Bacteria in Obesity: An Overview of the Metabolic Mechanisms and Therapeutic Perspectives of Next-Generation Probiotics. *Microorganisms* **2022**, *10*, doi:10.3390/microorganisms10020452.
124. Li, F.; Hao, X.; Chen, Y.; Bai, L.; Gao, X.; Lian, Z.; Wei, H.; Sun, R.; Tian, Z. The Microbiota Maintain Homeostasis of Liver-Resident $\Gamma\delta$ T-17 Cells in a Lipid Antigen/CD1d-Dependent Manner. *Nat Commun* **2017**, *7*, doi:10.1038/ncomms13839.
125. Gentles, A.J.; Newman, A.M.; Liu, C.L.; Bratman, S. V.; Feng, W.; Kim, D.; Nair, V.S.; Xu, Y.; Khuong, A.; Hoang, C.D.; et al. The Prognostic Landscape of Genes and Infiltrating

- Immune Cells across Human Cancers. *Nat Med* **2015**, *21*, 938–945, doi:10.1038/nm.3909.
126. Ehrlich P. Über Den Jetzigen Stand Der Karzinomforschung. *Ned Tijdschrift Geneeskunde* **1909**, *5*, 273–290.
127. Burnet, F.M. The Concept of Immunological Surveillance against Neoplasia. *Prog Tumor Res* **1970**, *13*, 1–27, doi:10.1111/j.1600-065X.1976.tb00189.x.
128. Kaplan, D.H.; Shankaran, V.; Dighe, A.S.; Stockert, E.; Aguet, M.; Old, L.J.; Schreiber, R.D. Demonstration of an Interferon γ -Dependent Tumor Surveillance System in Immunocompetent Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1998**, *95*, 7556–7561, doi:10.1073/pnas.95.13.7556.
129. Gubin, M.M.; Vesely, M.D. Cancer Immunoediting in the Era of Immuno-Oncology. *Clin Cancer Research* **2023**.
130. Rähni, A.; Jaago, M.; Sadam, H.; Pupina, N.; Pihlak, A.; Tuvikene, J.; Annuk, M.; Mägi, A.; Timmusk, T.; Ghaemmaghami, A.M.; et al. Melanoma-Specific Antigen-Associated Antitumor Antibody Reactivity as an Immune-Related Biomarker for Targeted Immunotherapies. *Communications Medicine* **2022**, *2*, doi:10.1038/s43856-022-00114-7.
131. Anderson, N.M.; Simon, M.C. Tumor Microenvironment. *Current Biology* **2020**, *30*, 920–925, doi:10.4049/jimmunol.1801473.The.
132. Schreiber, R.D.; Old, L.J.; Smyth, M.J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. *Science (1979)* **2011**, *331*, 1565–1570, doi:10.1126/science.1203486.
133. Vesely, M.D.; Kershaw, M.H.; Schreiber, R.D.; Smyth, M.J. Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. *Annu Rev Immunol* **2011**, *29*, 235–271, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101324.
134. Guo, Z.; Zhang, R.; Yang, A.G.; Zheng, G. Diversity of Immune Checkpoints in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* **2023**, *14*.
135. Mellman, I.; Coukos, G.; Dranoff, G. Cancer Immunotherapy Comes of Age. *Nature* **2011**, *480*, 480–489, doi:10.1038/nature10673.
136. Wolf, Y.; Anderson, A.C.; Kuchroo, V.K. TIM3 Comes of Age as an Inhibitory Receptor. *Nat Rev Immunol* **2020**, *20*, 173–185.
137. Im, E.; Sim, D.Y.; Lee, H.J.; Park, J.E.; Park, W.Y.; Ko, S.G.; Kim, B.; Shim, B.S.; Kim, S.H. Immune Functions as a Ligand or a Receptor, Cancer Prognosis Potential, Clinical Implication of VISTA in Cancer Immunotherapy. *Semin Cancer Biol* **2022**, *86*, 1066–1075, doi:10.1016/j.semcancer.2021.08.008.
138. Herndon, T.M.; Demko, S.G.; Jiang, X.; He, K.; Gootenberg, J.E.; Cohen, M.H.; Keegan, P.; Pazdur, R. U.S. Food and Drug Administration Approval: Peginterferon-Alfa-2b for the

- Adjuvant Treatment of Patients with Melanoma. *Oncologist* **2012**, *17*, 1323–1328, doi:10.1634/theoncologist.2012-0123.
139. Wagner, K.; Schulz, P.; Scholz, A.; Wiedenmann, B.; Menrad, A. The Targeted Immunocytokine L19-IL2 Efficiently Inhibits the Growth of Orthotopic Pancreatic Cancer. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14*, 4951, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0157.
 140. Akhurst, R.J.; Hata, A. Targeting the TGF β Signalling Pathway in Disease. *Nat Rev Drug Discov* **2012**, *11*, 790–811.
 141. Meadows, K.L.; Hurwitz, H.I. Anti-VEGF Therapies in the Clinic. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2012**, *4*.
 142. Risso, V.; Lafont, E.; Le Gallo, M. Therapeutic Approaches Targeting CD95L/CD95 Signaling in Cancer and Autoimmune Diseases. *Cell Death Dis* **2022**, *13*, 1–32, doi:10.1038/s41419-022-04688-x.
 143. Younes, A.; Vose, J.M.; Zelenetz, A.D.; Smith, M.R.; Burris, H.A.; Ansell, S.M.; Klein, J.; Halpern, W.; Miceli, R.; Kumm, E.; et al. A Phase 1b/2 Trial of Mapatumumab in Patients with Relapsed/Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma. *Br J Cancer* **2010**, *103*, 1783–1787, doi:10.1038/sj.bjc.6605987.
 144. Zlatareva, I.; Wu, Y. Local $\Gamma\delta$ T Cells: Translating Promise to Practice in Cancer Immunotherapy. *Br J Cancer* **2023**, *38–43*, doi:10.1038/s41416-023-02303-0.
 145. De Gassart, A.; Le, K.S.; Brune, P.; Agaugué, S.; Sims, J.; Goubard, A.; Castellano, R.; Joalland, N.; Scotet, E.; Collette, Y.; et al. Development of ICT01, a First-in-Class, Anti-BTN3A Antibody for Activating V γ 9V δ 2 T Cell-Mediated Antitumor Immune Response. *Sci Transl Med* **2021**, *13*, doi:10.1126/SCITRANSLMED.ABJ0835.
 146. Gober, H.J.; Kistowska, M.; Angman, L.; Jenö, P.; Mori, L.; De Libero, G. Human T Cell Receptor $\Gamma\delta$ Cells Recognize Endogenous Mevalonate Metabolites in Tumor Cells. *Journal of Experimental Medicine* **2003**, *197*, 163–168, doi:10.1084/jem.20021500.
 147. Wang, H.; Sarikonda, G.; Puan, K.-J.; Tanaka, Y.; Feng, J.; Giner, J.-L.; Cao, R.; Mönkkönen, J.; Oldfield, E.; Morita, C.T. Indirect Stimulation of Human V γ 2V δ 2 T Cells through Alterations in Isoprenoid Metabolism. *The Journal of Immunology* **2011**, *187*, 5099–5113, doi:10.4049/jimmunol.1002697.
 148. Lang, J.M.; Kaikobad, M.R.; Wallace, M.; Staab, M.J.; Horvath, D.L.; Wilding, G.; Liu, G.; Eickhoff, J.C.; McNeel, D.G.; Malkovsky, M. Pilot Trial of Interleukin-2 and Zoledronic Acid to Augment $\Gamma\delta$ T Cells as Treatment for Patients with Refractory Renal Cell Carcinoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy* **2011**, *60*, 1447–1460, doi:10.1007/s00262-011-1049-8.
 149. Lin, M.; Zhang, X.; Liang, S.; Luo, H.; Alnaggar, M.; Liu, A.; Yin, Z.; Chen, J.; Niu, L.; Jiang, Y. Irreversible Electroporation plus Allogenic V γ 9V δ 2 T Cells Enhances Antitumor Effect for Locally Advanced Pancreatic Cancer Patients. *Signal Transduct Target Ther* **2020**, *5*, doi:10.1038/s41392-020-00260-1.

150. Brandes, M.; Willimann, K.; Lang, A.B.; Nam, K.H.; Jin, C.; Brenner, M.B.; Morita, C.T.; Moser, B. Flexible Migration Program Regulates $\Gamma\delta$ T-Cell Involvement in Humoral Immunity. *Blood* **2003**, *102*, 3693–3701, doi:10.1182/blood-2003-04-1016.
151. Schadendorf, D.; Hodi, F.S.; Robert, C.; Weber, J.S.; Margolin, K.; Hamid, O.; Patt, D.; Chen, T.T.; Berman, D.M.; Wolchok, J.D. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data from Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology* **2015**, *33*, 1889–1894, doi:10.1200/JCO.2014.56.2736.
152. Robert, C.; Long, G. V.; Brady, B.; Dutriaux, C.; Maio, M.; Mortier, L.; Hassel, J.C.; Rutkowski, P.; McNeil, C.; Kalinka-Warzocho, E.; et al. Nivolumab in Previously Untreated Melanoma without BRAF Mutation . *New England Journal of Medicine* **2015**, *372*, 320–330, doi:10.1056/nejmoa1412082.
153. Larkin, J.; Chiarion-Sileni, V.; Gonzalez, R.; Grob, J.-J.; Rutkowski, P.; Lao, C.D.; Cowey, C.L.; Schadendorf, D.; Wagstaff, J.; Dummer, R.; et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2019**, *381*, 1535–1546, doi:10.1056/nejmoa1910836.
154. Gopalakrishnan, V.; Spencer, C.N.; Nezi, L.; Reuben, A.; Andrews, M.C.; Karpnits, T. V.; Prieto, P.A.; Vicente, D.; Hoffman, K.; Wei, S.C.; et al. Gut Microbiome Modulates Response to Anti-PD-1 Immunotherapy in Melanoma Patients. *Science (1979)* **2018**, *359*, 97–103, doi:10.1126/science.aan4236.
155. Sivan, A.; Corrales, L.; Hubert, N.; Williams, J.B.; Aquino-Michaels, K.; Earley, Z.M.; Benyamin, F.W.; Lei, Y.M.; Jabri, B.; Alegre, M.L.; et al. Commensal Bifidobacterium Promotes Antitumor Immunity and Facilitates Anti-PD-L1 Efficacy. *Science (1979)* **2015**, *350*, 1084–1089, doi:10.1126/science.aac4255.
156. Tsikala-Vafea, M.; Belani, N.; Vieira, K.; Khan, H.; Farmakiotis, D. Use of Antibiotics Is Associated with Worse Clinical Outcomes in Patients with Cancer Treated with Immune Checkpoint Inhibitors: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Infectious Diseases* **2021**, *106*, 142–154, doi:10.1016/j.ijid.2021.03.063.
157. Derosa, L.; Hellmann, M.D.; Spaziano, M.; Halpenny, D.; Fidelle, M.; Rizvi, H.; Long, N.; Plodkowski, A.J.; Arbour, K.C.; Chaft, J.E.; et al. Negative Association of Antibiotics on Clinical Activity of Immune Checkpoint Inhibitors in Patients with Advanced Renal Cell and Non-Small-Cell Lung Cancer. *Annals of Oncology* **2018**, *29*, 1437–1444, doi:10.1093/annonc/mdy103.
158. Pham, F.; Moinard-Butot, F.; Coutzac, C.; Chaput, N. Cancer and Immunotherapy: A Role for Microbiota Composition. *Eur J Cancer* **2021**, *155*, 145–154.
159. Fuller, R. Probiotics in Man and Animals. *Journal of Applied Bacteriology* **1989**, *66*, 365–378.
160. Derrien, M.; Vaughan, E.E.; Plugge, C.M.; de Vos, W.M. Akkermansia Muncipihila Gen. Nov., Sp. Nov., a Human Intestinal Mucin-Degrading Bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **2004**, *54*, 1469–1476, doi:10.1099/ijs.0.02873-0.

161. Derosa, L.; Routy, B.; Thomas, A.M.; Iebba, V.; Zalcman, G.; Friard, S.; Mazieres, J.; Audigier-Valette, C.; Moro-Sibilot, D.; Goldwasser, F.; et al. Intestinal Akkermansia Muciniphila Predicts Clinical Response to PD-1 Blockade in Patients with Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer. *Nat Med* **2022**, *28*, 315–324, doi:10.1038/s41591-021-01655-5.
162. Biazzo, M.; Deidda, G. Fecal Microbiota Transplantation as New Therapeutic Avenue for Human Diseases. *J Clin Med* **2022**, *11*.
163. Jain, N.; Umar, T.P.; Fahner, A.F.; Gibietis, V. Advancing Therapeutics for Recurrent Clostridioides Difficile Infections: An Overview of Vowst’s FDA Approval and Implications. *Gut Microbes* **2023**, *15*, 2232137, doi:10.1080/19490976.2023.2232137.
164. Davar, D.; Dzutsev, A.K.; Mcculloch, J.A.; Rodrigues, R.R.; Chauvin, M.; Morrison, R.M.; Deblasio, R.N.; Menna, C.; Pagliano, O.; Zidi, B.; et al. Therapy in Melanoma Patients. *Science (1979)* **2022**, *371*, 595–602, doi:10.1126/science.abf3363.Fecal.
165. Routy, B.; Lenehan, J.G.; Miller, W.H.; Jamal, R.; Messaoudene, M.; Daisley, B.A.; Hes, C.; Al, K.F.; Martinez-Gili, L.; Punčochář, M.; et al. Fecal Microbiota Transplantation plus Anti-PD-1 Immunotherapy in Advanced Melanoma: A Phase I Trial. *Nat Med* **2023**, doi:10.1038/s41591-023-02453-x.
166. Khan, R.; Roy, N.; Ali, H.; Naeem, M. Fecal Microbiota Transplants for Inflammatory Bowel Disease Treatment: Synthetic- and Engineered Communities-Based Microbiota Transplants Are the Future. *Gastroenterol Res Pract* **2022**, *2022*, doi:10.1155/2022/9999925.
167. Marcella, C.; Cui, B.; Kelly, C.R.; Ianiro, G.; Cammarota, G.; Zhang, F. Systematic Review: The Global Incidence of Faecal Microbiota Transplantation-Related Adverse Events from 2000 to 2020. *Aliment Pharmacol Ther* **2021**, *53*, 33–42.
168. Blot, W.J.; Tarone, R.E. Doll and Peto’s Quantitative Estimates of Cancer Risks: Holding Generally True for 35 Years. *J Natl Cancer Inst* **2015**, *107*.
169. Jia, W.; Xie, G.; Jia, W. Bile Acid–Microbiota Crosstalk in Gastrointestinal Inflammation and Carcinogenesis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* **2018**, *15*, 111–128.
170. Taylor, S.R.; Falcone, J.N.; Cantley, L.C.; Goncalves, M.D. Developing Dietary Interventions as Therapy for Cancer. *Nat Rev Cancer* **2022**, *22*, 452–466.
171. Hall, K.D.; Guo, J.; Courville, A.B.; Boring, J.; Brychta, R.; Chen, K.Y.; Darcey, V.; Forde, C.G.; Gharib, A.M.; Gallagher, I.; et al. Effect of a Plant-Based, Low-Fat Diet versus an Animal-Based, Ketogenic Diet on Ad Libitum Energy Intake. *Nat Med* **2021**, *27*, 344–353, doi:10.1038/s41591-020-01209-1.
172. Chlebowski, R.T.; Aragaki, A.K.; Anderson, G.L.; Thomson, C.A.; Manson, J.E.; Simon, M.S.; Howard, B. V; Rohan, T.E.; Snetselar, L.; Lane, D.; et al. Low-Fat Dietary Pattern and Breast Cancer Mortality in the Women’s Health Initiative Randomized Controlled Trial. *J Clin Oncol* **2017**, *35*, 2919–2926, doi:10.1200/JCO.

173. Gibson, G.; Roberfroid, M.B. *Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics*; 1995; Vol. 125;.
174. Spencer, C.N.; McQuade, J.L.; Gopalakrishnan, V.; McCulloch, J.A.; Vetizou, M.; Cogdill, A.P.; Wadud Khan, M.A.; Zhang, X.; White, M.G.; Peterson, C.B.; et al. *Dietary Fiber and Probiotics Influence the Gut Microbiome and Melanoma Immunotherapy Response*;
175. Liu, X.; Wang, L.; Jing, N.; Jiang, G.; Liu, Z. Biostimulating Gut Microbiome with Bilberry Anthocyanin Combo to Enhance Anti-PD-L1 Efficiency against Murine Colon Cancer. *Microorganisms* **2020**, *8*, doi:10.3390/microorganisms8020175.
176. Simpson, R.C.; Shanahan, E.R.; Scolyer, R.A.; Long, G. V. Towards Modulating the Gut Microbiota to Enhance the Efficacy of Immune-Checkpoint Inhibitors. *Nat Rev Clin Oncol* **2023**.
177. Mager, L.F.; Burkhard, R.; Pett, N.; Cooke, N.C.A.; Brown, K.; Ramay, H.; Paik, S.; Stagg, J.; Groves, R.A.; Gallo, M.; et al. Microbiome-Derived Inosine Modulates Response to Checkpoint Inhibitor Immunotherapy. *Science (1979)* **2020**, *369*, 1481–1489, doi:10.1126/SCIENCE.ABC3421.
178. Maia, A.; Toussaint, H.; Magalhaes, J.G.; Reardon, D.; IDBAIH, A.; Vieito, M.; Tabatabai, G.; Stradella, A.; Ghiringhelli, F.; Burger, M.C.; et al. Strong Immune Response to Therapeutic Vaccination with EO2401 Microbiome Derived Therapeutic Vaccine + Nivolumab: Interim Report of the EOGBM1–18/ROSALIE Study. *J Immunother Cancer* **2022**, 641–641, doi:10.1136/jitc-2022-sitc2022.0641.
179. Femia Angelo Pietro; Luceri Cristina; Dolaro Piero; Giannini Augusto; Biggeri Annibale; Salvadori Maddalena; Clune Yvonne; Collins Kevin J.; Paglierani Milena; Caderni Giovanna Antitumorigenic Activity of the Prebiotic Inulin Enriched with oligofructose in Combination with the Probiotics Lactobacillus and Bifidobacterium Lactis on Azoxymethane-Induced Carcinogenesis in Rats. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 1953–1960.
180. Zheng, D.W.; Li, R.Q.; An, J.X.; Xie, T.Q.; Han, Z.Y.; Xu, R.; Fang, Y.; Zhang, X.Z. Prebiotics-Encapsulated Probiotic Spores Regulate Gut Microbiota and Suppress Colon Cancer. *Advanced Materials* **2020**, *32*, doi:10.1002/adma.202004529.
181. Van Loo, J.; Coussement, P.; De Leenheer, L.; Hoebreg, H.; Smits, G. On the Presence of Inulin and Oligofructose as Natural Ingredients in the Western Diet. *Crit Rev Food Sci Nutr* **1995**, *35*, 525–552, doi:10.1080/10408399509527714.
182. Zhu, Y.; Liu, J.; Lopez, J.M.; Mills, D.A. Inulin Fermentation by Lactobacilli and Bifidobacteria from Dairy Calves. *Appl Environ Microbiol* **2021**, *87*, 1–12.
183. Chikkerur, J.; Samanta, A.K.; Dhali, A.; Kolte, A.P.; Roy, S.; Maria, P. In Silico Evaluation and Identification of Fungi Capable of Producing Endo-Inulinase Enzyme. *PLoS One* **2018**, *13*, doi:10.1371/journal.pone.0200607.

184. Basso, A.; Spizzo, P.; Ferrario, V.; Knapic, L.; Savko, N.; Braiuca, P.; Ebert, C.; Ricca, E.; Calabrò, V.; Gardossi, L. Endo- and Exo-Inulinases: Enzyme-Substrate Interaction and Rational Immobilization. *Biotechnol Prog* **2010**, *26*, 397–405, doi:10.1002/btpr.334.
185. Singh, R.S.; Singh, R.P. Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential. *Article in Food Technology and Biotechnology* **2010**, *48*, 435–450.
186. Chikkerur, J.; Samanta, A.K.; Dhali, A.; Kolte, A.P.; Roy, S.; Maria, P. In Silico Evaluation and Identification of Fungi Capable of Producing Endo-Inulinase Enzyme. *PLoS One* **2018**, *13*, 1–19, doi:10.1371/journal.pone.0200607.
187. Yang, F.; Liu, Z.C.; Wang, X.; Li, L.L.; Yang, L.; Tang, W.Z.; Yu, Z.M.; Li, X. Invertase Suc2-Mediated Inulin Catabolism Is Regulated at the Transcript Level in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microb Cell Fact* **2015**, *14*, 1–10, doi:10.1186/s12934-015-0243-3.
188. Zhu, Y.; Liu, J.; Lopez, J.M.; Mills, D.A. Inulin Fermentation by Lactobacilli and Bifidobacteria from Dairy Calves. *Appl Environ Microbiol* **2020**, *87*, 1–12, doi:10.1128/AEM.01738-20.
189. Li, J.; Chroumpi, T.; Garrigues, S.; Kun, R.S.; Meng, J.; Salazar-Cerezo, S.; Aguilar-Pontes, M.V.; Zhang, Y.; Tejomurthula, S.; Lipzen, A.; et al. The Sugar Metabolic Model of *Aspergillus Niger* Can Only Be Reliably Transferred to Fungi of Its Phylum. *Journal of Fungi* **2022**, *8*, 1315, doi:10.3390/jof8121315.
190. Wu, C. wen; Wu, X.; Wen, C.; Peng, B.; Peng, X. xian; Chen, X.; Li, H. Fructose Promotes Growth and Antifungal Activity of *Penicillium Citrinum*. *Protein Cell* **2016**, *7*, 527–532, doi:10.1007/s13238-016-0280-7.
191. Wang, Y.; Qi, W.; Song, G.; Pang, S.; Peng, Z.; Li, Y.; Wang, P. High-Fructose Diet Increases Inflammatory Cytokines and Alters Gut Microbiota Composition in Rats. *Mediators Inflamm* **2020**, *2020*, doi:10.1155/2020/6672636.
192. Goncalves, M.D.; Lu, C.; Tutnauer, J.; Hartman, T.E.; Hwang, S.-K.; Murphy, C.J.; Pauli, C.; Morris, R.; Taylor, S.; Bosch, K.; et al. *High-Fructose Corn Syrup Enhances Intestinal Tumor Growth in Mice*;
193. Deleu, S.; Machiels, K.; Raes, J.; Verbeke, K.; Vermeire, S. Short Chain Fatty Acids and Its Producing Organisms: An Overlooked Therapy for IBD? *EBioMedicine* **2021**, *66*.
194. Ohsawa, I.; Ishikawa, M.; Takahashi, K.; Watanabe, M.; Nishimaki, K.; Yamagata, K.; Katsura, K.I.; Katayama, Y.; Asoh, S.; Ohta, S. Hydrogen Acts as a Therapeutic Antioxidant by Selectively Reducing Cytotoxic Oxygen Radicals. *Nat Med* **2007**, *13*, 688–694, doi:10.1038/nm1577.
195. Chen, J.B.; Chen, J.B.; Kong, X.F.; Mu, F.; Lu, T.Y.; Lu, T.Y.; Lu, Y.Y.; Xu, K.C.; Xu, K.C. Hydrogen Therapy Can Be Used to Control Tumor Progression and Alleviate the Adverse Events of Medications in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *Med Gas Res* **2020**, *10*, 75–80, doi:10.4103/2045-9912.285560.

196. Chen, J.B.; Kong, X.F.; Qian, W.; Mu, F.; Lu, T.Y.; Lu, Y.Y.; Xu, K.C. Two Weeks of Hydrogen Inhalation Can Significantly Reverse Adaptive and Innate Immune System Senescence Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer: A Self-Controlled Study. *Med Gas Res* **2020**, *10*, 149–154, doi:10.4103/2045-9912.304221.
197. McKeown, N.M.; Fahey, G.C.; Slavin, J.; Van Der Kamp, J.W. Fibre Intake for Optimal Health: How Can Healthcare Professionals Support People to Reach Dietary Recommendations? *The BMJ* **2022**, 1–8, doi:10.1136/bmj-2020-054370.
198. Wang, L.; Yang, H.; Huang, H.; Zhang, C.; Zuo, H.X.; Xu, P.; Niu, Y.M.; Wu, S.S. Inulin-Type Fructans Supplementation Improves Glycemic Control for the Prediabetes and Type 2 Diabetes Populations: Results from a GRADE-Assessed Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis of 33 Randomized Controlled Trials. *J Transl Med* **2019**, *17*, doi:10.1186/s12967-019-02159-0.
199. Micka, A.; Siepelmeyer, A.; Holz, A.; Theis, S.; Schön, C. International Journal of Food Sciences and Nutrition Deniz Makale. *Int J Food Sci Nutr* **2017**, *68*, 82–89.
200. Holscher, H.D.; Bauer, L.L.; Gourineni, V.; Pelkman, C.L.; Fahey, G.C.; Swanson, K.S. Agave Inulin Supplementation Affects the Fecal Microbiota of Healthy Adults Participating in a Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *Journal of Nutrition* **2015**, *145*, 2025–2032, doi:10.3945/jn.115.217331.
201. Yanckello, L.M.; Fanelli, B.; Mcculloch, S.; Xing, X.; Sun, M.; Hammond, T.C. *Inulin Supplementation Mitigates Gut Dysbiosis and Brain Impairment Induced by Mild Traumatic Brain Injury during Chronic Phase*; 2022; Vol. 4;.
202. Li, Y.; Elmén, L.; Segota, I.; Xian, Y.; Tinoco, R.; Feng, Y.; Fujita, Y.; Segura Muñoz, R.R.; Schmaltz, R.; Bradley, L.M.; et al. Prebiotic-Induced Anti-Tumor Immunity Attenuates Tumor Growth. *Cell Rep* **2020**, *30*, 1753-1766.e6, doi:10.1016/j.celrep.2020.01.035.
203. Boucher, E.; Plazy, C.; Richard, M.L.; Suau, A.; Mangin, I.; Cornet, M.; Aldebert, D.; Toussaint, B.; Hannani, D. Inulin Prebiotic Reinforces Host Cancer Immunosurveillance via $\gamma\delta$ T Cell Activation. *Frontiers Immunology* **2023**, *14*, doi:10.3389/fimmu.2023.1104224.
204. Selak, M.; Rivière, A.; Moens, F.; Van den Abbeele, P.; Geirnaert, A.; Rogelj, I.; Leroy, F.; De Vuyst, L. Inulin-Type Fructan Fermentation by Bifidobacteria Depends on the Strain Rather than the Species and Region in the Human Intestine. *Appl Microbiol Biotechnol* **2016**, *100*, 4097–4107, doi:10.1007/s00253-016-7351-9.
205. Pujari, R.; Banerjee, G. Impact of Prebiotics on Immune Response: From the Bench to the Clinic. *Immunol Cell Biol* **2021**, *99*, 255–273, doi:10.1111/imcb.12409.
206. Singh, A.; Zapata, R.C.; Pezeshki, A.; Reidelberger, R.D.; Chelikani, P.K. Inulin Fiber Dose-Dependently Modulates Energy Balance, Glucose Tolerance, Gut Microbiota, Hormones and Diet Preference in High-Fat-Fed Male Rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2018**, *59*, 142–152, doi:10.1016/j.jnutbio.2018.05.017.

207. Beresford-Jones, B.S.; Forster, S.C.; Stares, M.D.; Notley, G.; Viciani, E.; Browne, H.P.; Boehmler, D.J.; Soderholm, A.T.; Kumar, N.; Vervier, K.; et al. The Mouse Gastrointestinal Bacteria Catalogue Enables Translation between the Mouse and Human Gut Microbiotas via Functional Mapping. *Cell Host Microbe* **2022**, *30*, 124-138.e8, doi:10.1016/j.chom.2021.12.003.
208. Johnson, J.S.; Spakowicz, D.J.; Hong, B.Y.; Petersen, L.M.; Demkowicz, P.; Chen, L.; Leopold, S.R.; Hanson, B.M.; Agresta, H.O.; Gerstein, M.; et al. Evaluation of 16S rRNA Gene Sequencing for Species and Strain-Level Microbiome Analysis. *Nat Commun* **2019**, *10*, 1–11, doi:10.1038/s41467-019-13036-1.
209. Chase, M.W.; Fay, M.F. Barcoding of Plants and Fungi. *Science (1979)* **2009**, *325*, 682–683, doi:10.1126/science.1176906.
210. Godon, J.J.; Zumstein, E.; Dabert, P.; Habouzit, F.; Moletta, R. Molecular Microbial Diversity of an Anaerobic Digester as Determined by Small-Subunit rDNA Sequence Analysis. *Appl Environ Microbiol* **1997**, *63*, 2802–2813, doi:10.1128/aem.63.7.2802-2813.1997.
211. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME Allows Analysis of High-Throughput Community Sequencing Data Intensity Normalization Improves Color Calling in SOLiD Sequencing. *Nat Methods* **2010**, *7*, 335–336, doi:10.1038/nmeth0510-335.
212. Escudié, F.; Auer, L.; Bernard, M.; Mariadassou, M.; Cauquil, L.; Vidal, K.; Maman, S.; Hernandez-Raquet, G.; Combes, S.; Pascal, G. FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 1287–1294, doi:10.1093/bioinformatics/btx791.
213. Bernard, M.; RuCrossed D sign©, O.; Mariadassou, M.; Pascal, Gc.D. sign©raldine FROGS: A Powerful Tool to Analyse the Diversity of Fungi with Special Management of Internal Transcribed Spacers. *Brief Bioinform* **2021**, *22*, doi:10.1093/bib/bbab318.
214. McMurdie, P.J.; Holmes, S. Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* **2013**, *8*, doi:10.1371/journal.pone.0061217.
215. Edgar, R.C. Search and Clustering Orders of Magnitude Faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461, doi:10.1093/bioinformatics/btq461.
216. Kõljalg, U.; Nilsson, R.H.; Abarenkov, K.; Tedersoo, L.; Taylor, A.F.S.; Bahram, M.; Bates, S.T.; Bruns, T.D.; Bengtsson-Palme, J.; Callaghan, T.M.; et al. Towards a Unified Paradigm for Sequence-Based Identification of Fungi. *Mol Ecol* **2013**, *22*, 5271–5277, doi:10.1111/mec.12481.
217. Belkaid, Y.; Harrison, O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* **2017**, *46*, 562–576, doi:10.1016/j.immuni.2017.04.008.
218. Ganusov, V. V.; De Boer, R.J. Do Most Lymphocytes in Humans Really Reside in the Gut? *Trends Immunol* **2007**, *28*, 514–518, doi:10.1016/j.it.2007.08.009.

219. Wang, J.; Lin, C.; Li, H.; Li, R.; Wu, Y.; Liu, H.; Zhang, H.; He, H.; Zhang, W.; Xu, J. Tumor-Infiltrating $\gamma\delta$ T Cells Predict Prognosis and Adjuvant Chemotherapeutic Benefit in Patients with Gastric Cancer. *Oncoimmunology* **2017**, *6*, doi:10.1080/2162402X.2017.1353858.
220. Girard, P.; Charles, J.; Cluzel, C.; Degeorges, E.; Manches, O.; Plumas, J.; De Fraipont, F.; Leccia, M.T.; Mouret, S.; Chaperot, L.; et al. The Features of Circulating and Tumor-Infiltrating $\gamma\delta$ T Cells in Melanoma Patients Display Critical Perturbations with Prognostic Impact on Clinical Outcome. *Oncoimmunology* **2019**, *8*, 1–16, doi:10.1080/2162402X.2019.1601483.
221. Nguyen, S.; Chevalier, M.F.; Benmerzoug, S.; Cesson, V.; Schneider, A.K.; Rodrigues-Dias, S.C.; Dartiguenave, F.; Lucca, I.; Jichlinski, P.; Roth, B.; et al. $V\delta 2$ T Cells Are Associated with Favorable Clinical Outcomes in Patients with Bladder Cancer and Their Tumor Reactivity Can Be Boosted by BCG and Zoledronate Treatments. *J Immunother Cancer* **2022**, *10*, 1–10, doi:10.1136/jitc-2022-004880.
222. Brandes, M.; Willimann, K.; Moser, B. Immunology: Professional Antigen-Presentation Function by Human $\gamma\delta$ Cells. *Science (1979)* **2005**, *309*, 264–268, doi:10.1126/science.1110267.
223. Ne Brandes, M.; Willimann, K.; Bioley, G.; Lévy C, N.; Eberl, M.; Luo, M.; Tampé, R.; Déric Lévy, F.; Romero, P.; Moser, B. Cross-Presenting Human T Cells Induce Robust CD8 T Cell Responses. *PNAS* **2009**, *106*, 2307–2312.
224. Routy, B.; Le Chatelier, E.; Derosa, L.; Duong, C.P.M.; Alou, M.T.; Daillère, R.; Fluckiger, A.; Messaoudene, M.; Rauber, C.; Roberti, M.P.; et al. Gut Microbiome Influences Efficacy of PD-1-Based Immunotherapy against Epithelial Tumors. *Science (1979)* **2018**, *359*, 91–97, doi:10.1126/science.aan3706.
225. Han, K.; Nam, J.; Xu, J.; Sun, X.; Huang, X.; Animasahun, O.; Achreja, A.; Jeon, J.H.; Pursley, B.; Kamada, N.; et al. Generation of Systemic Antitumour Immunity via the in Situ Modulation of the Gut Microbiome by an Orally Administered Inulin Gel. *Nat Biomed Eng* **2021**, doi:10.1038/s41551-021-00749-2.
226. Xiong, Y.; Neskey, D.M.; Horton, J.D.; Paulos, C.M.; Knochelmann, H.M.; Armeson, K.E.; Young, M.R.I. Immunological Effects of Nivolumab Immunotherapy in Patients with Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *BMC Cancer* **2020**, *20*, 1–10, doi:10.1186/s12885-020-06726-3.
227. Skwarczynski, M. Inulin: A New Adjuvant With Unknown Mode of Action. *EBioMedicine* **2017**, *15*, 8–9, doi:10.1016/j.ebiom.2016.11.019.
228. Rosales-Mendoza, S.; Salazar-González, J.A.; Decker, E.L.; Reski, R. Implications of Plant Glycans in the Development of Innovative Vaccines. *Expert Rev Vaccines* **2016**, *15*, 915–925, doi:10.1586/14760584.2016.1155987.
229. Pallett, L.J.; Swadling, L.; Diniz, M.; Maini, A.A.; Schwabenland, M.; Gasull, A.D.; Davies, J.; Kucykowicz, S.; Skelton, J.K.; Thomas, N.; et al. Tissue CD14+CD8+ T Cells

- Reprogrammed by Myeloid Cells and Modulated by LPS. *Nature* **2023**, *614*, 334–342, doi:10.1038/s41586-022-05645-6.
230. Komia-Koma, M.; Gildchrist, D.S.; Xu, D. Direct Recognition of LPS by Human but Not Murine CD8+ T Cells via TLR4 Complex. *Eur J Immunol* **2009**, *39*, 1564–1572, doi:10.1002/eji.200838866.
231. Viaud, S.; Saccheri, F.; Mignot, G.; Yamazaki, T.; Daillère, R.; Hannani, D.; Enot, D.P.; Pfirschke, C.; Engblom, C.; Pittet, M.J.; et al. The Intestinal Microbiota Modulates the Anticancer Immune Effects of Cyclophosphamide. *Science (1979)* **2013**, *342*, 971–976, doi:10.1126/science.1240537.
232. Ricci, L.; Mackie, J.; Donachie, G.E.; Chapuis, A.; Mezerová, K.; Lenardon, M.D.; Brown, A.J.P.; Duncan, S.H.; Walker, A.W. Human Gut Bifidobacteria Inhibit the Growth of the Opportunistic Fungal Pathogen *Candida Albicans*. *FEMS Microbiol Ecol* **2022**, *98*, 1–15, doi:10.1093/femsec/fiac095.
233. Fernandez-Julia, P.; Black, G.W.; Cheung, W.; Van Sinderen, D.; Munoz-Munoz, J. Fungal β -Glucan-Facilitated Cross-Feeding Activities between *Bacteroides* and *Bifidobacterium* Species. *Commun Biol* **2023**, *6*, doi:10.1038/s42003-023-04970-4.
234. Lopes, N.; McIntyre, C.; Martin, S.; Raverdeau, M.; Sumaria, N.; Kohlgruber, A.C.; Fiala, G.J.; Agudelo, L.Z.; Dyck, L.; Kane, H.; et al. Distinct Metabolic Programs Established in the Thymus Control Effector Functions of $\Gamma\delta$ T Cell Subsets in Tumor Microenvironments. *Nat Immunol* **2021**, *22*, 179–192, doi:10.1038/s41590-020-00848-3.
235. Douard, V.; Ferraris, R.P. Regulation of the Fructose Transporter GLUT5 in Health and Disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **2008**, *295*, doi:10.1152/ajpendo.90245.2008.
236. Jones, H.F.; Butler, R.N.; Brooks, D.A. Intestinal Fructose Transport and Malabsorption in Humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2011**, *300*, 202–206, doi:10.1152/ajpgi.00457.2010.-Fructose.
237. Argüello, R.J.; Combes, A.J.; Char, R.; Gigan, J.P.; Baaziz, A.I.; Bousiquot, E.; Camosseto, V.; Samad, B.; Tsui, J.; Yan, P.; et al. SCENITH: A Flow Cytometry-Based Method to Functionally Profile Energy Metabolism with Single-Cell Resolution. *Cell Metab* **2020**, *32*, 1063-1075.e7, doi:10.1016/j.cmet.2020.11.007.
238. Chaput, N.; Lepage, P.; Coutzac, C.; Soularue, E.; Le Roux, K.; Monot, C.; Boselli, L.; Routier, E.; Cassard, L.; Collins, M.; et al. Baseline Gut Microbiota Predicts Clinical Response and Colitis in Metastatic Melanoma Patients Treated with Ipilimumab. *Annals of Oncology* **2017**, *28*, 1368–1379, doi:10.1093/annonc/mdx108.
239. Shoab, M.; Shehzad, A.; Omar, M.; Rakha, A.; Raza, H.; Sharif, H.R.; Shakeel, A.; Ansari, A.; Niazi, S. Inulin: Properties, Health Benefits and Food Applications. *Carbohydr Polym* **2016**, *147*, 444–454.
240. He, W.; Hao, J.; Dong, S.; Gao, Y.; Tao, J.; Chi, H.; Flavell, R.; O'Brien, R.L.; Born, W.K.; Craft, J.; et al. Naturally Activated $\gamma\delta$ T Cells Play a Protective Role in Tumor Immunity

- through Expression of Eomesodermin. *The Journal of Immunology* **2010**, *185*, 126–133, doi:10.4049/jimmunol.0903767.
241. Castillo-González, R.; Cibrian, D.; Sánchez-Madrid, F. Dissecting the Complexity of $\Gamma\delta$ T-Cell Subsets in Skin Homeostasis, Inflammation, and Malignancy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2021**, *147*, 2030–2042.
242. Saida, Y.; Brender, J.R.; Yamamoto, K.; Mitchell, J.B.; Krishna, M.C.; Kishimoto, S. Multimodal Molecular Imaging Detects Early Responses to Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Res* **2021**, *81*, 3693–3705, doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-3182.
243. Madhunapantula, S. V.; Patel, T.N.; Annageldiyev, C.; Sharma, A. Animal (Mouse) Models of Melanoma. In *Animal Models in Cancer Drug Discovery*; Elsevier, 2019; pp. 401–417 ISBN 9780128147054.
244. Neagu, M.; Caruntu, C.; Constantin, C.; Boda, D.; Zurac, S.; Spandidos, D.A.; Tsatsakis, A.M. Chemically Induced Skin Carcinogenesis: Updates in Experimental Models (Review). *Oncol Rep* **2016**, *35*, 2516–2528.
245. Le Bastard, Q.; Chapelet, G.; Javaudin, F.; Lepelletier, D.; Batard, E.; Montassier, E. The Effects of Inulin on Gut Microbial Composition: A Systematic Review of Evidence from Human Studies. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **2020**, *39*, 403–413.
246. Simon, S.; Labarriere, N. PD-1 Expression on Tumor-Specific T Cells: Friend or Foe for Immunotherapy? *Oncoimmunology* **2018**, *7*.
247. Vétizou, M.; Pitt, J.M.; Daillère, R.; Lepage, P.; Waldschmitt, N.; Flament, C.; Rusakiewicz, S.; Routy, B.; Roberti, M.P.; Duong, C.P.M.; et al. Anticancer Immunotherapy by CTLA-4 Blockade Relies on the Gut Microbiota. *Science (1979)* **2015**, *350*, 1079–1084, doi:10.1126/science.aad1329.
248. Wang, X.; Wu, S.; Wu, W.; Zhang, W.; Li, L.; Liu, Q.; Yan, Z. Candida Albicans Promotes Oral Cancer via IL-17A/IL-17RA-Macrophage Axis. *mBio* **2023**, *14*, doi:10.1128/mbio.00447-23.
249. Oeser, B.; Kind, S.; Schurack, S.; Schmutzer, T.; Tudzynski, P.; Hinsch, J. Cross-Talk of the Biotrophic Pathogen *Claviceps Purpurea* and Its Host *Secale Cereale*. *BMC Genomics* **2017**, *18*, doi:10.1186/s12864-017-3619-4.
250. Sheng, W.; Ji, G.; Zhang, L. Immunomodulatory Effects of Inulin and Its Intestinal Metabolites. *Front Immunol* **2023**, *14*, doi:10.3389/fimmu.2023.1224092.
251. Sun, M.; Wu, W.; Chen, L.; Yang, W.; Huang, X.; Ma, C.; Chen, F.; Xiao, Y.; Zhao, Y.; Ma, C.; et al. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote Th1 Cell IL-10 Production to Maintain Intestinal Homeostasis. *Nat Commun* **2018**, *9*, doi:10.1038/s41467-018-05901-2.

252. Yang, W.; Yu, T.; Huang, X.; Bilotta, A.J.; Xu, L.; Lu, Y.; Sun, J.; Pan, F.; Zhou, J.; Zhang, W.; et al. Intestinal Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Regulation of Immune Cell IL-22 Production and Gut Immunity. *Nat Commun* **2020**, *11*, doi:10.1038/s41467-020-18262-6.
253. Bachem, A.; Makhlouf, C.; Binger, K.J.; de Souza, D.P.; Tull, D.; Hochheiser, K.; Whitney, P.G.; Fernandez-Ruiz, D.; Dähling, S.; Kastenmüller, W.; et al. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8+ T Cells. *Immunity* **2019**, *51*, 285-297.e5, doi:10.1016/j.immuni.2019.06.002.
254. Boucher, E.; Plazy, C.; Gouellec, A. Le; Toussaint, B.; Hannani, D. Inulin Prebiotic Protects against Lethal *Pseudomonas Aeruginosa* Acute Infection via $\Gamma\delta$ T Cell Activation. *Nutrients* **2023**, *15*, 1–11.
255. Besson, S.; Boucher, E.; Laurin, D.; Manches, O.; Aspor, C.; Hannani, D.; Fender, P. Stimulation of the Immune System by a Tumor Antigen-Bearing Adenovirus-Inspired VLP Allows Control of Melanoma Growth. *Mol Ther Methods Clin Dev* **2023**, *28*, 76–89, doi:10.1016/j.omtm.2022.12.003.

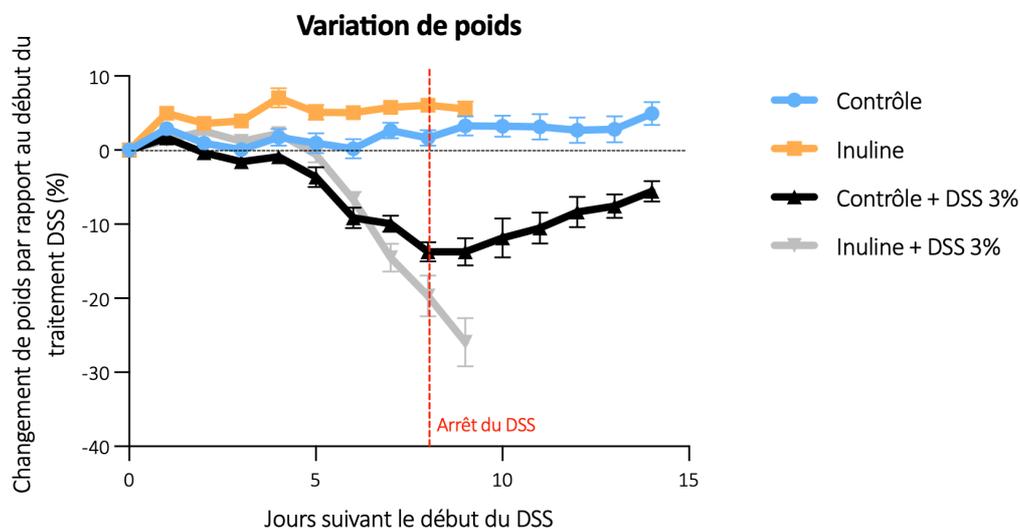
PROJETS ANNEXES

L'INULINE PROTEGE CONTRE UNE INFECTION LETHALE A *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Dans ce travail de thèse, il a été montré que la consommation d'inuline renforce les populations intestinales et systémiques de LTs $\gamma\delta$, notamment en augmentant leur capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires. Dans des modèles murins d'infection pulmonaire à la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, des études ont montré le rôle crucial de l'immunité pulmonaire dans l'élimination du pathogène, et plus particulièrement des LTs $\gamma\delta$. Étant donné le rôle protecteur des LTs $\gamma\delta$ dans les infections à *P. aeruginosa*, nous avons émis l'hypothèse qu'un régime enrichi en inuline, en entraînant l'activation des LTs $\gamma\delta$ systémiques, pourrait protéger contre une infection létale à *P. aeruginosa*. Pour tester cette hypothèse, des souris ont été nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline, puis infectées avec une dose létale de *P. aeruginosa* administrée par voie intranasale. Le régime enrichi en inuline a permis de protéger un tiers de animaux infectés, d'une manière dépendante des LTs $\gamma\delta$ produisant de l'IL-17. Les résultats de cette étude, publiés dans le journal Nutrients (Annexe 2) [254], montre que l'effet immunostimulant de la consommation d'inuline peut être bénéfique dans plusieurs pathologies nécessitant une réponse immunitaire pro-inflammatoire.

EFFET DE L'INULINE DANS UN MODELE DE COLITE INFLAMMATOIRE

Lors de sa fermentation, l'inuline libère des SCFAs, permettant de renforcer l'intégrité de la barrière intestinale, et de favoriser une immunité locale anti-inflammatoire. Dans ce contexte, nous avons testé la capacité thérapeutique de l'inuline dans un modèle murin de colite intestinale inflammatoire. Des souris C57BL/6 ont été nourries durant 2 semaines avec un régime standard ou enrichi en inuline. A l'issue des 2 semaines, 3% de Dextran Sulfate Sodium (DSS) ont été ajoutés dans l'eau de boisson de la moitié des animaux, pendant 8 jours. Dans ce modèle murin de colite inflammatoire induite chimiquement, l'état clinique des animaux se mesure principalement par la perte de poids. Le poids des souris a donc été suivi tous les jours à partir de l'ajout de DSS dans l'eau de boisson, tout en maintenant le régime standard ou enrichi en inuline. Dès qu'un animal perdait 20% de son poids initial, il était euthanasié. Les variations de poids des animaux à la suite de l'ajout de DSS dans leur eau de boisson sont présentées sur la figure ci-dessous.



Variation de poids des souris dans un modèle de colite inflammatoire. Des souris C57BL/6 ont été nourries durant 2 semaines avec un régime standard (n=12) ou enrichi en inuline (n=12). A l'issue des 2 semaines, 3% de Dextran Sulfate Sodium (DSS) ont été ajoutés dans l'eau de boisson de la moitié des animaux (n=6 par groupe) pendant 8 jours. Le poids des souris a été mesuré tous les jours, tout en maintenant le régime standard ou enrichi en inuline. Dès qu'un animal perdait 20% de son poids initial, il était euthanasié. Les courbes représentent les moyennes \pm SEM.

Chez les animaux nourris avec un régime standard, le DSS a induit jusqu'à 15% de perte de poids. A partir de l'arrêt du DSS, les animaux reprennent progressivement du poids. Chez les animaux nourris avec un régime enrichi en inuline, le DSS a entraîné plus 15% de perte de poids. Malgré l'arrêt du DSS, les animaux ont continué à perdre du poids (jusqu'à 20%) et ont dû être euthanasiés.

Le régime enrichi en inuline n'a pas protégé les animaux de la perte de poids induite par la colite intestinale, mais a aggravé leur état clinique. Ainsi, la consommation d'inuline, et de fibres alimentaires de manière plus générale, doit se faire dans un cadre précis et défini.

Nos observations dans différents modèles pathologiques suggèrent que la consommation d'inuline serait bénéfique dans des situations nécessitant une réponse pro-inflammatoire forte, et serait à l'inverse délétère dans des pathologies pro-inflammatoires, voire auto-immunes.

COLLABORATION AVEC L'ÉQUIPE ADENOVIRUS DE L'INSTITUT DE BIOLOGIE STRUCTURALE

L'équipe de recherche Adénovirus de l'Institut de biologie Structural UMR5075 à Grenoble a développé une technologie vaccinale anti-cancéreuse basée sur un vecteur adénoviral. Ce vaccin utilise la technologie des particules pseudovirales non-infectieuses, inspirée des adénovirus. Ces particules dodécaédriques, appelées ADDomers (Adenovirus Dodecamer), ont été créées pour exprimer des épitopes particuliers d'antigènes tumoraux, voire des fragments complets, qui sont reconnus par les LTs CD4⁺ et CD8⁺. Dans cette étude, des particules présentant des fragments d'ovalbumine (OVA) ont été générées. J'ai été chargée de tester ces vaccins *in vivo*, dans un modèle murin. Pour cela, des cellules de mélanome murin B16 OVA ont été implantées en sous-cutané à des souris C57BL/6. Après l'implantation tumorale, les souris étaient vaccinées tous les 2 jours avec le vaccin mis au point par l'équipe Adénovirus. Le vaccin thérapeutique a entraîné une forte inhibition de la croissance tumorale, en augmentant la proportion de LTs CD8⁺ spécifiques de l'ovalbumine dans les tumeurs. Afin de tester l'effet préventif de ce traitement, des souris ont été vaccinées 34 jours avant l'implantation tumorale, ce qui a complètement prévenu l'apparition de mélanome. Cette collaboration a donné lieu à un article publié dans le journal *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*, et présenté en Annexe 3 [255]. Ces résultats montrent que la technologie ADDomer est prometteuse dans la génération de vaccins préventifs et thérapeutiques anticancers.

COMMUNICATION

PUBLICATIONS

- **Boucher E**, Plazy C, Le Gouellec A, Toussaint B, Hannani D. Inulin Prebiotic Protects against Lethal *Pseudomonas aeruginosa* Acute Infection via $\gamma\delta$ T Cell Activation. *Nutrients*. 2023;15(3037):1-11.
- **Boucher E**, Plazy C, Richard ML, et al. Inulin prebiotic reinforces host cancer immunosurveillance via $\gamma\delta$ T cell activation. *Frontiers Immunology*. 2023;14.
- Besson S, **Boucher E**, Laurin D, et al. Stimulation of the immune system by a tumor antigen-bearing adenovirus-inspired VLP allows control of melanoma growth. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2023;28:76-89.

PRESENTATIONS ORALES

- Mai 2023 ○ Journée scientifique du Groupement des Animaleries de Grenoble (GAG) – « Le microbiote mis en lumière » dans l'expérimentation animale.
- Mai 2023 ○ IMMUNOLOGY2023™ – Congrès annuel de l'American Association of Immunologists (AAI)
- Juin 2022 ○ Journée CNRS Bio-Techno Santé – Présentation à des enseignants du secondaires, sur le thème « Microbiote et Santé: Comprendre et contrôler la part microbienne qui est en nous », *CNRS Alpes, Grenoble*
- Juin 2022 ○ Journée de la recherche médicale, *Université Grenoble Alpes - Secteur Santé*
1^{er} prix de présentation
- Juin 2022 ○ Journée de l'Ecole Doctorales EDISCE, *Université Grenoble Alpes*
1^{er} prix de présentation
- Avr. 2022 ○ Journée des doctorants TIMC, *Laboratoire TIMC UMR 5525 CNRS-UGA*.
1^{er} prix de présentation
- Juin 2021 ○ Young Researcher in biology of Aura region congrès – *Congrès de la région Auvergne Rhône Alpes*.
1^{er} prix de présentation

PRESENTATIONS DE POSTERS

- Mai 2023 ○ IMMUNOLOGY2023™ – Congrès annuel de l’American Association of Immunologists (AAI)
- Déc. 2022 ○ Congrès annuel de la Société Française d’Immunologie (SFI), *Nice*.
- Juin 2022 ○ Journée de la recherche médicale, *Université Grenoble Alpes - Secteur Santé*
- Juin 2022 ○ Journée de l’Ecole Doctorales EDISCE, *Collège Doctoral de l’Université Grenoble Alpes*

VULGARISATION SCIENTIFIQUE

- Juin 2023 ○ Concours « Ma Thèse en 180 Secondes », Finale Nationale, *Rennes*.
1^{er} prix du jury lors de la finale régionale
- Mai 2023 ○ Pint of Science – Présentation en duo avec Dalil HANNANI sur le thème « Comment chouchouter son microbiote intestinal ? », *Grenoble*.
- Mai 2023 ○ Les métiers de la recherche – Présentation des métiers de la recherche et de mon projet de thèse pour des élèves de 2^{nde}, *Lycée Champollion, Grenoble*.
- Avr. 2023 ○ Entretien pour le journal régional « Le Dauphiné Libéré » – Présentation de mon projet de thèse, et discussion sur l’importance de la vulgarisation de la recherche scientifique.
- Avr. 2023 ○ Émission « JT 12/13 – Alpes » – Présentation de mon projet de recherche, *France 3 Alpes, Grenoble*.
- Jan. 2023 ○ Les métiers de la recherche – Présentation des métiers de la recherche et de mon projet de thèse pour des élèves de 3^{ème}, suivi d’un débat sur la place des femmes en sciences « dures », *Collège St François de Sales, Chambéry*.
- Nov. 2022 ○ Émission « Le 13-14 » sur la radio France Inter – Invitation à participer à l’émission « Nouvelles Voix » animée par Bruno Duvic, sur la place des femmes en sciences, *CEA, Grenoble*.
- Mai 2022 ○ Soirée grand public « Alimentation et Cancer » – Présentation d’un poster vulgarisé à destination d’associations de patient(e)s atteint(e)s de cancer, *Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes, Mai 2022*



OPEN ACCESS

EDITED BY
Fabiana Ourique,
Universidade Federal de Juiz de Fora, Brazil

REVIEWED BY
Shubhada Vivek Chiplunkar,
Research and Education in Cancer, India
Dieter Kabelitz,
University of Kiel, Germany

*CORRESPONDENCE
Dalil Hannani
✉ Dalil.Hannani@univ-grenoble-alpes.fr

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Cancer Immunity
and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 21 November 2022
ACCEPTED 06 February 2023
PUBLISHED 17 February 2023

CITATION
Boucher E, Plazy C, Richard ML, Suau A,
Mangin I, Cornet M, Aldebert D,
Toussaint B and Hannani D (2023) Inulin
prebiotic reinforces host cancer
immunosurveillance via $\gamma\delta$ T cell activation.
Front. Immunol. 14:1104224.
doi: 10.3389/fimmu.2023.1104224

COPYRIGHT
© 2023 Boucher, Plazy, Richard, Suau,
Mangin, Cornet, Aldebert, Toussaint and
Hannani. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The
use, distribution or reproduction in other
forums is permitted, provided the original
author(s) and the copyright owner(s) are
credited and that the original publication in
this journal is cited, in accordance with
accepted academic practice. No use,
distribution or reproduction is permitted
which does not comply with these terms.

Inulin prebiotic reinforces host cancer immunosurveillance via $\gamma\delta$ T cell activation

Emilie Boucher¹, Caroline Plazy², Mathias L. Richard^{3,4},
Antonia Suau^{1,5}, Irène Mangin⁵, Muriel Cornet²,
Delphine Aldebert¹, Bertrand Toussaint² and Dalil Hannani^{1*}

¹Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, Grenoble, France, ²Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC, Grenoble, France, ³Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, Jouy-en-Josas, France, ⁴Paris Center for Microbiome Medicine, Fédération Hospitalo-Universitaire, Paris, France, ⁵USC Cnam-ANSES Metabiot, Conservatoire National des Arts et Métiers, Paris, France

The gut microbiota is now recognized as a key parameter affecting the host's anti-cancer immunosurveillance and ability to respond to immunotherapy. Therefore, optimal modulation for preventive and therapeutic purposes is very appealing. Diet is one of the most potent modulators of microbiota, and thus nutritional intervention could be exploited to improve host anti-cancer immunity. Here, we show that an inulin-enriched diet, a prebiotic known to promote immunostimulatory bacteria, triggers an enhanced Th1-polarized CD4⁺ and CD8⁺ $\alpha\beta$ T cell-mediated anti-tumor response and attenuates tumor growth in three preclinical tumor-bearing mouse models. We highlighted that the inulin-mediated anti-tumor effect relies on the activation of both intestinal and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells that are indispensable for $\alpha\beta$ T cell activation and subsequent tumor growth control, in a microbiota-dependent manner. Overall, our data identified these cells as a critical immune subset, mandatory for inulin-mediated anti-tumor immunity *in vivo*, further supporting and rationalizing the use of such prebiotic approaches, as well as the development of immunotherapies targeting $\gamma\delta$ T cells in cancer prevention and immunotherapy.

KEYWORDS

$\gamma\delta$ T cells, immunosurveillance, microbiota, prebiotic, inulin

1 Introduction

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the second leading cause of death globally, and the increasing cancer incidence is a major public health issue worldwide (1). Despite the development of innovative treatments, such as immunotherapy, including immune checkpoint blockers (ICB), which have recently revolutionized patient care, quality of life, and survival, huge efforts are still needed to prevent and treat cancers. It is worth noting that between 30% and 50% of cancer deaths can be prevented by modifying or avoiding major risk factors and implementing existing evidence-based prevention strategies, including eating a healthy diet, primarily fruits and vegetables (2). A healthy

diet helps prevent the development of cancer in several ways that may be synergistic. It limits host cell oxidation and metabolism as well as genetic instability and chronic inflammation. It also affects gut microbiota composition and functions, and subsequently, host immune functions (3).

Indeed, the host immune tonus is a key parameter in cancer prevention through immunosurveillance, which relies on the ability of different immune cell subsets to patrol, recognize, and eliminate transformed cells (4). Both innate and adaptive immunity participate in this process and prevent cancer development by recognizing stress-induced ligands, dysregulation of tumor cell metabolism, or peptides derived from tumor antigens. Effector CD8⁺ T cells are among the most important subsets involved in cancer surveillance and are key targets in immunotherapy. Furthermore, $\gamma\delta$ T cells are unconventional T cells representing a unique population displaying multiple functions, including potent anti-tumor activity (5, 6). Indeed, $\gamma\delta$ T cells are key players in cancer immunosurveillance, as they can recognize transformed cells expressing stress-ligands *via* innate receptors (e.g. NKG2D) or metabolic products derived from dysregulated tumors (e.g. mevalonate pathway). When activated, $\gamma\delta$ T cells produce pro-inflammatory cytokines, such as interferon γ (IFN γ), which in turn promote anti-cancer CD8⁺ T cell immunity. They can also directly kill cancer cells *via* perforin/granzyme mediated cytotoxicity. Therefore, $\gamma\delta$ T cell infiltration within the tumor bed is a favorable prognostic marker in several human cancers (7, 8) and represents a promising target in cancer immunotherapy (9, 10).

A growing body of evidence has also highlighted that the gut microbiota may have a positive impact on cancer prevention or treatment, especially *via* improved host immunosurveillance of cancer (11, 12) as well as patients' ability to respond to chemotherapy (13) or immunotherapy (11, 14–16). These seminal studies have identified certain families, genera, or species of bacteria associated with the gut microbiota that appear to correlate with a strong host immune status and a subsequent favorable response to cancer therapy. For instance, *Bifidobacterium*, *Ruminococcaceae*, *Akkermansia muciniphila*, *Enterococcus irae*, and *Allistipes* have all been positively associated with ICB responses. As preclinical proof of concept, it has been shown that either Fecal Microbiota Transplantation (FMT) from responding patients or direct supplementation with immunostimulatory bacteria can restore the ability to respond to ICB in mice (14, 15). Taken together, these studies strongly suggest that modulation of the gut microbiota may represent a major strategy to prevent and/or treat cancers by optimizing host immunity and subsequent anti-tumor responses.

It is noteworthy, 70% of host immune cells are located within the gut, close to microbiota-derived signals (17). Among the Intra Epithelial Lymphocytes (IELs) in the gut, the $\gamma\delta$ T cells represent the largest immune subset. Interestingly, their early development is largely dependent on gut microbiota after birth (18). Unlike conventional $\alpha\beta$ TcR⁺ CD4⁺ or CD8⁺ T cells, which recognize antigen-derived peptides, these cells recognize metabolic products derived from bacteria or tumor cells (19, 20).

Diet is probably the most powerful microbiota modulator, in terms of both its composition and metabolic functions (21). Thus, modulation of the gut microbiota by nutritional intervention,

particularly *via* prebiotics, could be of great interest in optimizing host immune responses, including cancer immunosurveillance. Prebiotics are defined as non-digestible food ingredients that benefit the host by selectively stimulating the growth and activity of one species or a limited number of bacterial species in the colon (22). Among the prebiotics, inulin, a Fructo-Oligo Saccharide derived from chicory roots, is well known to promote some colonic bacteria, including *Bifidobacterium*, which has been associated with optimal host immunity in the context of cancer immunosurveillance and immunotherapy (11, 23). Recently, the use of inulin to stimulate immunosurveillance was confirmed by Li et al., who showed that an inulin diet attenuated tumor growth in a CD8⁺ T cell-dependent manner in mice (24). To date, the effect of nutritional intervention on systemic immunity, including the anti-tumor CD8⁺ T cell response, remains largely unknown.

Since an inulin-enriched diet is known to alter the metabolic activity of the gut microbiota (25), we hypothesized that intestinal and systemic $\gamma\delta$ T cells might subsequently be altered. In the present study, we examined the role of $\gamma\delta$ T cells in inulin-mediated anti-tumor effects and highlighted their pivotal role in CD8⁺ T cell-mediated immunosurveillance in several transplantable mouse tumor models.

2 Results

2.1 Inulin-enriched diet leads to potent tumor growth control and enhanced $\gamma\delta$ Tumor Infiltrated Lymphocytes activity

Inulin has been described as a promoter of immunostimulatory bacteria associated with strong anti-tumor immunity (11, 26). Therefore, we evaluated whether 15 days of preconditioning in WT mice by adding inulin to drinking water could promote host anti-tumor immunity after subcutaneous injection of a syngeneic B16-OVA melanoma tumor (Figure 1A). Consistent with a previous study in another tumor model (24), inulin strongly attenuated aggressive B16-OVA melanoma tumor growth (Figure 1B left panel). Notably, the inulin-mediated anti-tumor effect was also confirmed in other tumor models (i.e., MCA205 fibrosarcoma and MC38 colorectal cancer cell lines, Figure 1B middle and right panel). To better understand the mechanisms behind these observations, we analyzed the Tumor Infiltrating Lymphocytes (TILs) when the control diet group reached maximum ethical tumor size (day 13 post B16-OVA tumor inoculation, Figure 1A). Flow cytometry analyses revealed that inulin triggered greater infiltration of immune cells (CD45⁺ cells) within the tumor bed (Figure 1C) as well as greater tumor infiltration of dendritic cells (Figure S1). Consistent with the anti-tumor activity observed (Figure 1B), we found that the inulin-enriched diet triggered a potent Th1 anti-tumor response, as illustrated by the greater amount of IFN γ -producing CD4⁺ and CD8⁺ TILs (Figures 1D, E). In agreement with this, immunization with OVA protein adjuvanted with PolyI:C (a Th1 polarizing adjuvant) led to a higher frequency of OVA-specific CD8⁺ T cells in the lymph nodes of inulin-supplemented mice (Figure S2). This suggests that inulin potentiated the Th1 polarizing activity of PolyI:C.

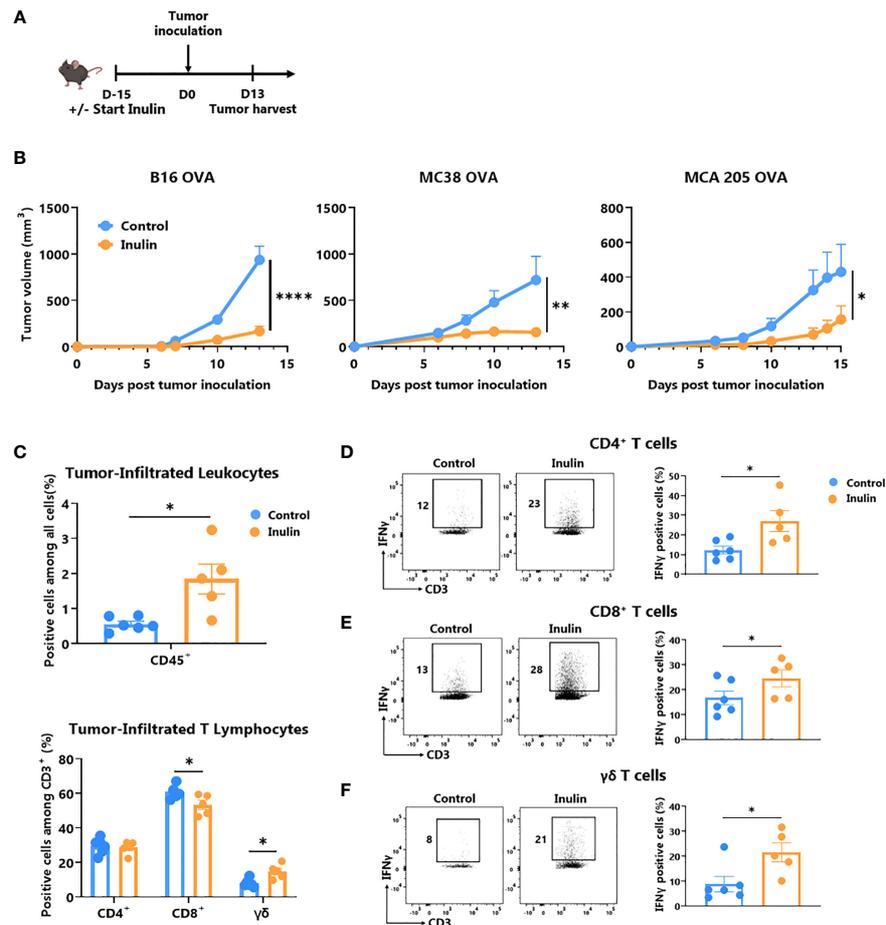


FIGURE 1
Inulin-enriched diet inhibits tumor growth and reinforces tumor-infiltrated immunity. **(A)** Experimental schedule. C57BL/6 mice were fed with a control or an inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) ($n=6$ mice per group) starting 15 days before subcutaneous (s.c.) inoculation of 2×10^5 B16 OVA melanoma cells, or 5×10^5 MC38 OVA colorectal cancer cells, or 2×10^5 MCA 205 OVA fibrosarcoma cells ($n=6$ mice per group). **(B)** Tumor growth curves of mice treated as described in **(A)** and implanted with indicated tumors. **(C)** Frequency of B16 OVA tumor-infiltrated total CD45⁺ and effector CD4⁺, CD8⁺ or $\gamma\delta$ TcR⁺ T Lymphocytes from mice treated as described in **(A)** when control tumors reached the maximal ethic size. **(D–F)** Frequency of B16 OVA tumor-infiltrated IFN γ -producing cells gated on CD45⁺ CD3⁺ $\gamma\delta$ TcR⁺ CD4⁺, defined as CD4⁺ T cells **(D)**, CD45⁺ CD3⁺ $\gamma\delta$ TcR⁺ CD4⁻, defined as CD8⁺ T cells **(E)** or CD45⁺ CD3⁺ $\gamma\delta$ TcR⁺, defined as $\gamma\delta$ T cells **(F)** from mice treated as in **(A)**. Graphs show the mean \pm SEM. Statistically significant results are indicated by: * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$ by two-way ANOVA with Geisser Greenhouse's correction **(B)** or by Mann-Whitney tests **(C–F)**.

In addition, we assessed the frequency and activity of $\gamma\delta$ TILs, and found that inulin-enriched diet also promoted $\gamma\delta$ TIL infiltration (Figure 1C) and IFN γ -production in residual tumors (Figure 1F). Notably, among both MCA205 and MC38 TILs, only $\gamma\delta$ T cells infiltration was significantly increased under the inulin diet (Figure S3). Taken together, these data indicate that inulin triggered greater tumor infiltration by immune cells, potent Th1-polarized anti-tumor immunity, and in particular, high IFN γ production by conventional T cells as well as $\gamma\delta$ TILs, which may ultimately lead to tumor growth control.

2.2 Inulin-mediated anti-tumor immunity relies on $\gamma\delta$ T cell

$\gamma\delta$ T cells are unconventional T cells recognizing metabolic-related molecules such as phosphoantigens, and represent an

interesting target/tool in cancer immunotherapy because they exhibit potent anti-tumor activity (6). As tumor infiltration and IFN γ production are enhanced by an inulin-enriched diet, we evaluated whether these cells could play a central role in inulin-mediated anti-tumor immunity. To assess their contribution, we used repeated injections of $\gamma\delta$ TcR-blocking antibody starting the day before the tumor implantation (Figure 2A). Of note, while inulin-treated mice well-controlled tumor growth at day 13, after implantation, administration of $\gamma\delta$ TcR-blocking antibody completely abrogated the inulin-mediated anti-tumor effect (Figure 2B). Interestingly, analysis of TILs revealed that under systemic $\gamma\delta$ T cell blockade, the inulin-enriched diet failed to trigger greater IFN γ -production by CD4⁺ and CD8⁺ TILs (Figures 2C, D). Furthermore, under $\gamma\delta$ TcR blockade and despite the inulin diet, the frequency of IFN γ -producing $\gamma\delta$ TILs was similar to that of the control group, suggesting that $\gamma\delta$ TcR

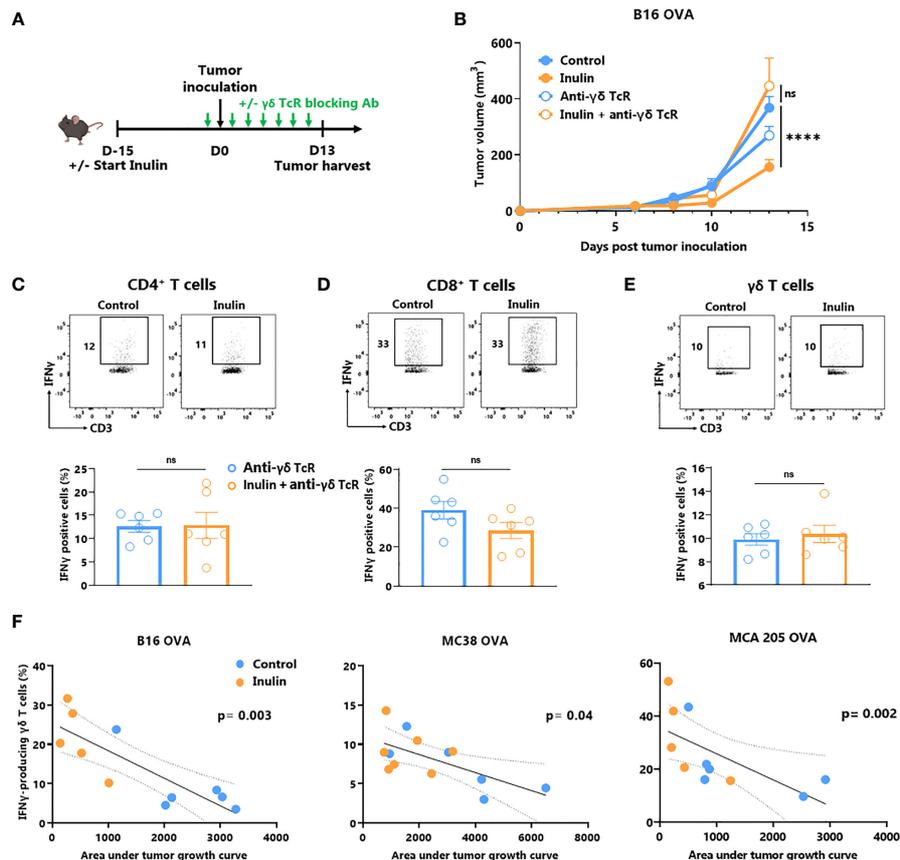


FIGURE 2

Inulin-triggered anti-tumor effect depends on $\gamma\delta$ T lymphocytes. (A) Experimental schedule. C57BL/6 mice were fed with a control diet or inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) ($n=12$ mice per group) starting 15 days before s.c. inoculation of 2×10^5 B16 OVA melanoma cells. Anti- $\gamma\delta$ TcR antibodies were injected intraperitoneally (i.p.) to 6 mice per group every two days starting the day before tumor inoculation. (B) Tumor growth curves of mice treated as described in (A). (C–E) Frequency of B16 OVA tumor-infiltrated IFN γ -producing cells gated on CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR- CD4+, defined as CD4 $^+$ T cells (C), CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR- CD4-, defined as CD8 $^+$ T cells (D) or CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR+, defined as $\gamma\delta$ T cells (E) from mice treated as described in (A) when control tumors reached the maximal ethic size. (F) Correlation between IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cell infiltration in tumors and the tumor growth in mice fed on a control or inulin-enriched diet ($n=6$ mice per group), bearing the indicated tumor. (A–E) Graphs show the mean \pm SEM, and (F) IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cell infiltration in the tumor depending to the tumor growth. ns = not-significant, **** $p < 0.0001$ by two-way ANOVA with Geisser greenhouse's correction (B), by Mann-Whitney tests (C–E), or Spearman test (F).

signaling is required in inulin-mediated immunostimulation (Figure 2E). Taken together, these data indicate that $\gamma\delta$ T cells, and most likely their TcR engagement, are mandatory for inulin-mediated anti-tumor effects. In addition, we observed a significant correlation between the level of tumor infiltration of IFN γ -producing $\gamma\delta$ T cells and tumor growth in all three tumor models (Figure 2F), confirming their pivotal role in inulin-mediated anti-tumor effects.

2.3 Inulin-enriched diet leads to gut-associated $\gamma\delta$ T cell activation and gut inflammation

It is well known that the gut microbiota affects local (gut) and systemic immune tone (27). Since $\gamma\delta$ T cells represent the most abundant immune cell population within the gut epithelium (28), we evaluated the impact of the inulin diet on IFN γ -production by

gut-associated immune cells as well as on the level of gut epithelium inflammation. For this purpose, we collected intestines from mice following a 15-day inulin diet (Figure 3A). The fractions of Intra Epithelial Lymphocytes (IELs) and Lamina Propria Cells (LPCs) were analyzed using flow cytometry. Under inulin, while the frequency of IFN γ -producing CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T cells was comparable to that of the control group in IELs and LPCs (Figures 3B, C; Figure S4A, respectively), $\gamma\delta$ T cell IELs showed a higher proportion of IFN γ -producing cells (Figure 3D).

To further characterize inulin-mediated intestinal inflammation, we sorted the epithelial (CD45-) fraction from LPCs (CD45 $^+$) to perform RT-qPCR on genes involved in inflammation, tissue repair, and tight junctions (Figures 3E–G; Figure S5; Table S2). Of the 19 analyzed genes, three inflammation-related genes were significantly upregulated under the inulin regime in epithelial cells, namely Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , Cyclo-Oxygenase (Cox)-2 and Matrix Metalloprotease (MMP)-9 (Figure 3F). In the CD45 $^+$ compartment (LPCs), inulin

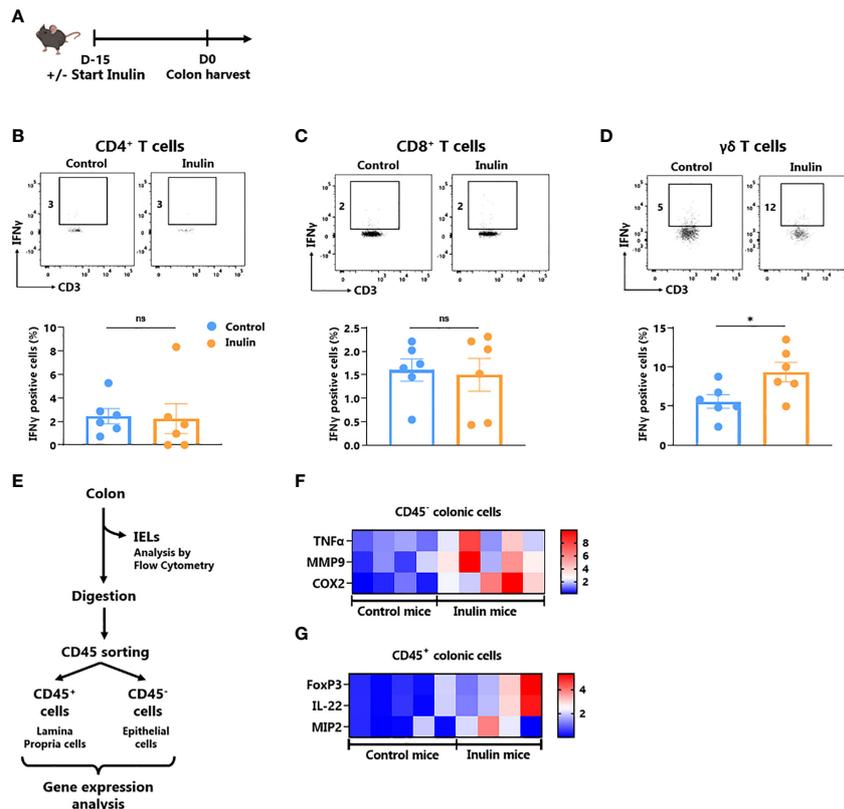


FIGURE 3
Inulin consumption promotes $\gamma\delta$ T IELs and mucosa cell activation in the colon (A) Experimental schedule. C57BL/6 mice were fed with a control diet or inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) ($n=12$ mice per group) for 15 days before the analysis of their gut immunity. (B–D) Frequency of IFN γ -producing IntraEpithelial Lymphocytes (IELs) gated on CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR- CD4+, defined as CD4 $^+$ T cells (B), CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR- CD4-, defined as CD8 $^+$ T cells (C) or CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR+, defined as $\gamma\delta$ T cells (D) from mice treated as described in (A). (E) Experimental plan of colon treatment after harvest. After isolation of IELs, remaining colon pieces were digested before sorting of CD45 $^-$ and CD45 $^+$ cells for further analysis. (F, G) qRT-PCR analysis of inflammation, tissue repair and tight junction -related genes in (F) CD45 $^-$ and (G) CD45 $^+$ colon cells sorted as described in (E). (B–D) Graphs show the mean \pm SEM. ns = not-significant, * $p < 0.05$ by Mann-Whitney tests (B–D). (F, G) Graphs show the expression levels of significantly increased genes ($p < 0.05$ by Mann-Whitney test).

triggered significant overexpression of Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-2, Interleukin (IL)-22 and the transcriptional factor Forkhead Box P (FoxP)-3 (Figure 3G). Similarly, we observed a trend toward higher IL-10 production, although not significant, by LPC-associated T cells (Figure S4B). Altogether, these results indicate that inulin diet triggered both targeted $\gamma\delta$ T cell activation in IELs and inflammation in gut epithelial cells, in parallel with tissue repair signaling and tolerance induction in the lamina propria.

2.4 Inulin-enriched diet alters the gut microbiota and promotes *Bifidobacterium* growth

To establish a link between the observed intestinal immune activation (Figure 3) and the inulin-enriched diet, we characterized the composition of fecal bacterial microbiota after inulin administration using 16S rDNA sequencing. Metagenomic analysis indicated that five phyla composed the microbiota of these mice: *Firmicutes* (58% of the sequences), *Bacteroidota* (37%

of the sequences), *Desulfobacterota* (1.3% of the sequences), *Proteobacteria* (1.2% of the sequences), and *Actinobacteriota* (2.4% of the sequences). A 15-day inulin diet profoundly altered the gut microbiota composition, as revealed by the relative abundance of these bacterial phyla observed in inulin-treated mice compared to control mice (Figure 4A), with a visible increase in bacteria of the *Actinobacteriota* phylum, and more precisely to the genus *Bifidobacterium*. This diet altered the alpha diversity; the total number of species was not significantly different (387 ± 53 Operational Taxonomic Units (OTUs) for the control group and 378 ± 43 for the inulin group), but the distribution of sequences within the OTUs was significantly different (Shannon index, $p = 0.00582$). A Bray-Curtis β -diversity analysis illustrated by Principal Component Analysis (PCoA) representation confirmed a significant clustering of the overall bacterial microbiota with a p -value < 0.001 (Figure 4B). To identify whether particular bacteria were potentially involved in anti-tumor immunity, we performed differential abundance correlation using a linear discriminant analysis (LDA) effect size algorithm (LEfSe; see Material and Methods). The LDA scores plotted in a phylogenetic cladogram showed significant differences across several taxonomic ranks

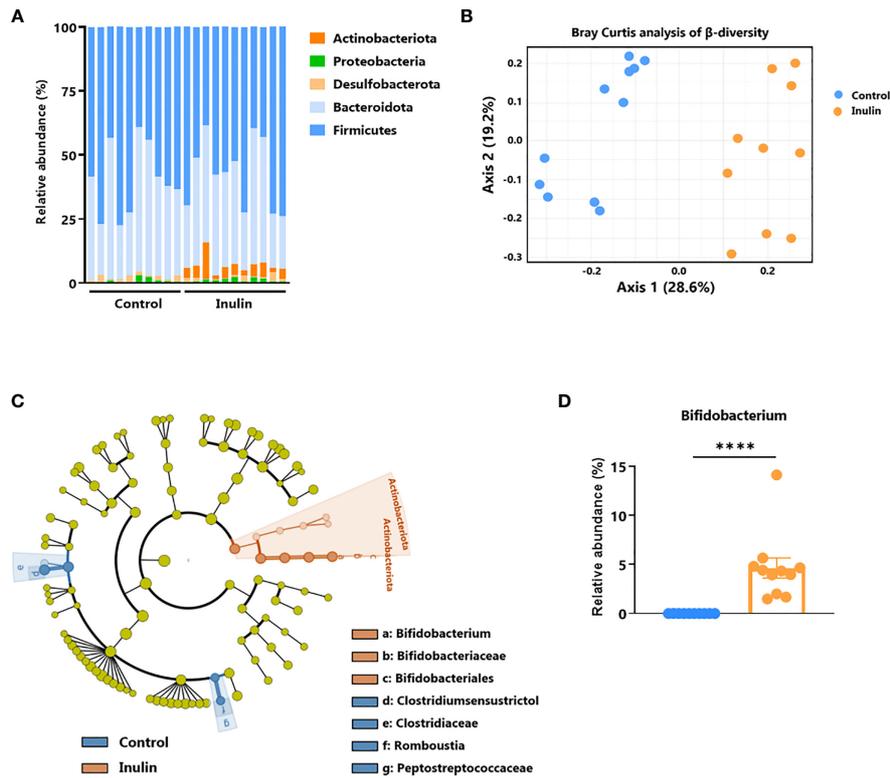


FIGURE 4

Inulin modulates gut microbiota and promotes *Bifidobacterium* growth. Feces from C57BL/6 mice fed with a control (n=10 mice) or an inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) (n=11 mice) for 15 days were collected and analysed by 16S rDNA sequencing. (A) Relative abundance of bacterial phyla (B) Bray-Curtis analysis of β -diversity, (C) cladogram representation of Linear discriminant analysis Effect Size (LEfSe) analysis, and (D) relative abundance of *Bifidobacterium* genus. The graph shows the mean \pm SEM. ****p < 0.00001 by Mann-Whitney test.

(Figure 4C). One of the strongest signals, LDA score >4, was the increase in *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis*, a member of the *Actinobacteriota* phylum, in inulin treated mice (4.67%), compared with control mice (0.03%) (Figure 4D; Table S1). Importantly, consistent with our results, *Bifidobacterium* has been shown to exhibit immunostimulatory properties in the context of cancer immunosurveillance and immunotherapy (11, 23). Therefore, *Bifidobacterium* may be involved in the stimulation of inulin-mediated anti-tumor immunity. The second most significant signal concerned the family Clostridiaceae, and in particular, the genus *Clostridium sensu stricto 1*. Our sequences were close to those of *Clostridium saudiense*, *Clostridium disporicum*, and *Clostridium celatum* (these species have nearly identical 16S rDNA sequences). This OTU statistically decreased in the mice microbiota due to treatment, from 6% in the control group to 0.09% in the inulin group (data not shown).

2.5 Inulin-mediated increased anti-tumor immunity relies on gut microbiota

Inulin, a polysaccharide molecule, has been shown to possess adjuvant properties *in vivo* (29, 30). Such direct immune activation may be responsible for the anti-tumor immunity observed under

the inulin regime. To address this issue, we administered a broad-spectrum antibiotic cocktail to the mice 2 days before the inulin diet to significantly reduce the number of bacteria in their gut, as previously described (13) (Figure 5A). After tumor implantation, we observed that concomitant antibiotic treatment completely abolished the ability of inulin to attenuate tumor growth (Figure 5B). Furthermore, inulin failed to trigger a higher frequency of IFN γ -producing $\gamma\delta$ TILs and subsequent CD4 $^{+}$ and CD8 $^{+}$ TILs (Figures 5C–E). Altogether, these findings indicate that inulin-mediated anti-tumor activity cannot be attributed to a direct adjuvant effect; rather, it relies on host immune activation mediated by the gut microbiota.

Because $\gamma\delta$ T cells are obligatory for inulin-mediated anti-tumor immunity (Figure 2), and that $\gamma\delta$ T IELs are the only T cell subset activated by inulin diet in the gut (Figure 3), we hypothesized that $\gamma\delta$ TILs could have an intestinal origin. To address this question, we analyzed the expression of the gut-homing chemokine receptor CCR9 in circulating δ T and $\gamma\delta$ TILs. Whereas the number of CCR9-expressing $\gamma\delta$ T decreased in the blood (Figure 5F), their frequency tended to increase in the tumor bed, despite a possible loss of expression in this environment (Figure 5G). Notably, under a concomitant inulin diet and antibiotic treatment, $\gamma\delta$ TILs expressed similar levels of CCR9 compared with the control group (Figure 5H). Taken together,

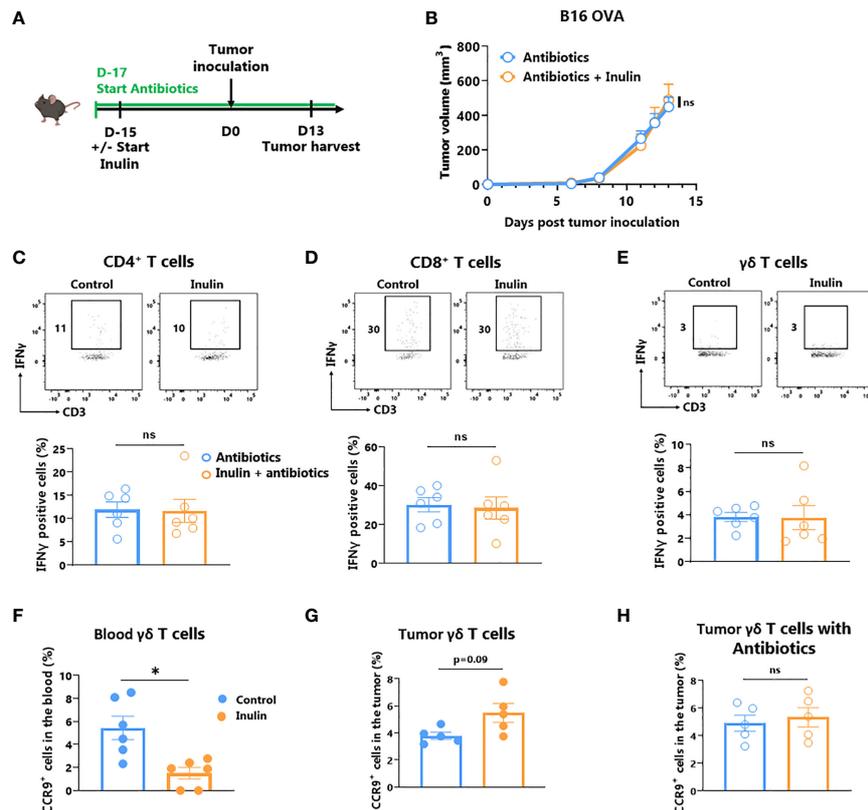


FIGURE 5

Inulin-triggered anti-tumor effect relies on intact bacterial gut microbiota. (A) Experimental schedule. C57BL/6 mice were fed with a control diet or inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) ($n=6$ mice per group) starting 15 days before s.c. inoculation of 2×10^5 B16 OVA melanoma cells. Microbial gut microbiota was depleted from 2 days before the beginning of the diet by adding vancomycin (0.25 g/L), colimycin (12×10^6 U/L), ampicillin (1 g/L) and streptomycin (5 g/L) to drinking water. (B) Tumor growth curves of mice treated as described in (A). (C–E) Frequency of B16 OVA tumor-infiltrated IFN γ -producing cells gated on CD45 $^+$ CD3 $^+$ $\gamma\delta$ TcR $^-$ CD4 $^+$, defined as CD4 $^+$ T cells (C), CD45 $^+$ CD3 $^+$ $\gamma\delta$ TcR $^-$ CD4 $^-$, defined as CD8 $^+$ T cells (D) or CD45 $^+$ CD3 $^+$ $\gamma\delta$ TcR $^+$, defined as $\gamma\delta$ T cells (E) from mice treated as described in (A). (F, G) Frequency of CCR9 $^+$ cells among CD45 $^+$ CD3 $^+$ $\gamma\delta$ TcR $^+$ in (F) the blood and in (G) the tumor of mice fed with a control diet or inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) ($n=6$ mice per group) starting 15 days before s.c. inoculation of B16 OVA melanoma cells. (H) Frequency of CCR9 $^+$ cells among CD45 $^+$ CD3 $^+$ $\gamma\delta$ TcR $^+$ in tumor of mice treated as described in (A). Graphs show the mean \pm SEM. ns = not-significant, * $p < 0.05$ by two-way ANOVA with Geisser greenhouse's correction (B) or by Mann-Whitney tests (C–H).

these data suggest that inulin-induced activated $\gamma\delta$ TILs may be of intestinal origin.

2.6 Inulin-enriched regimen is as efficient as α PD-1 Immunotherapy

A large body of evidence suggests that certain immunostimulatory bacteria, including *Bifidobacterium*, may facilitate the efficacy of immune checkpoint inhibitors, including those targeting the anti-PD1/PD-L1 axis (11, 14–16). Because the inulin diet altered the gut microbiota (Figure 5) and favored *Bifidobacterium* (Figure 4), we evaluated whether this diet could be synergistic with anti-PD1 treatment (Figure 6A). Tumor growth monitoring indicated that inulin alone allowed tumor growth control to the same extent as anti-PD-1 alone or in combination (Figure 6B). The individual mouse curves clearly showed that inulin alone triggered the strongest anti-tumor effect compared with anti-PD1 alone or in combination (Figure 6C). TILs analysis revealed

that inulin led to a greater IFN γ production by $\gamma\delta$ T cells (Figure 6D) and CD4 $^+$ cells (Figure 6E), compared with anti-PD1 alone. The combination did not potentiate this effect despite similar PD-1 expression among the TILs (Figure S6). Anti-PD1 immunotherapy reinvigorates CD8 $^+$ TILs and increases their ability to produce IFN γ (31). In agreement with this, anti-PD1 treatment led to a higher proportion of IFN γ -producing CD8 $^+$ TILs within the tumor bed (Figure 6F). Interestingly, inulin alone triggered the activation of CD8 $^+$ TILs, at least to a similar extent.

3 Discussion

Gut microbiota is emerging as a powerful host immune modulator that can be exploited for both cancer prevention and treatment. Consequently, there is an urgent need to understand the cellular and molecular mechanisms that govern this modulation to rapidly translate these findings into innovative preventive or therapeutic strategies.

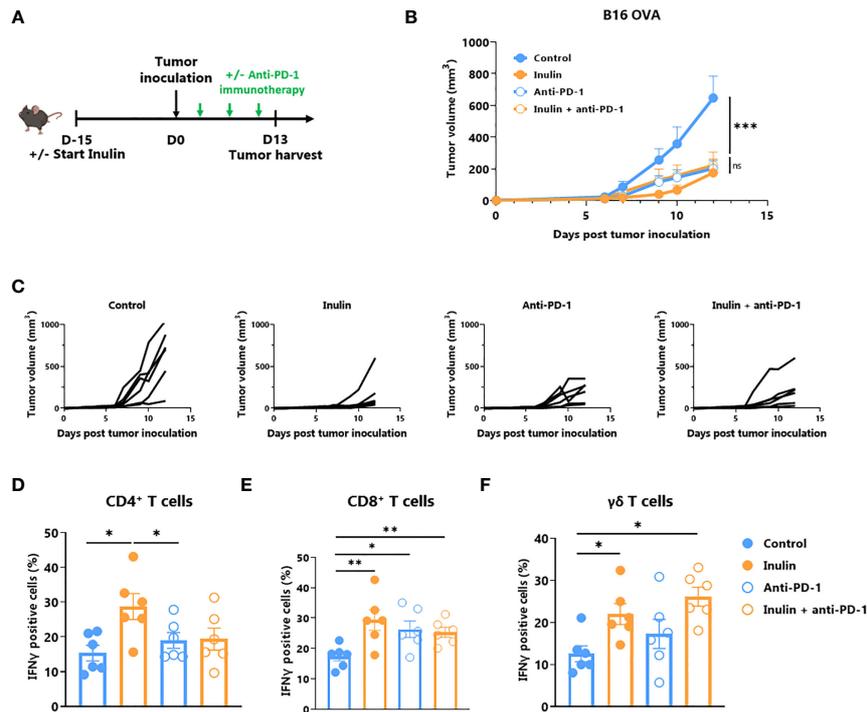


FIGURE 6
 Inulin treatment is as efficient as anti-PD-1 immunotherapy. **(A)** Experimental schedule. C57BL/6 mice were fed with a control diet or inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) (n=12 mice per group) starting 15 days before s.c. inoculation of 2×10^5 B16 OVA melanoma cells. Anti-PD-1 immunotherapy was injected i.p. to 6 mice per group on days 4, 7 and 10 post-tumor inoculation. **(B)** Mean and **(C)** individual tumor growth curves of mice treated as described in **(A)**. **(D–F)** Frequency of B16 OVA tumor-infiltrated IFN γ -producing cells gated on CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR- CD4+, defined as CD4 $^+$ T cells **(C)**, CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR- CD4-, defined as CD8 $^+$ T cells **(D)** or CD45+ CD3+ $\gamma\delta$ TcR+, defined as $\gamma\delta$ T cells **(E)** from mice treated as described in **(A)**. Graphs show the mean \pm SEM. ns = not-significant, *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.001 by two-way ANOVA with Geisser greenhouse's correction **(B)** or by Mann-Whitney tests **(D–F)**.

Prebiotics contribute to the modification of the composition and functions of the microbiota, and subsequently, to the modification of host immunity. The importance of a prebiotic-enriched diet was recently highlighted in humans by Spencer et al., who reported that a fiber-enriched diet positively influenced the response to immunotherapy in melanoma patients (32).

Inulin is a widely consumed prebiotic, either in the diet or as a supplement. Recently, inulin was reported to attenuate transplantable melanoma tumor growth (24) in a CD8 $^+$ T cell-dependent manner. In the current study, we reported that inulin-enriched diet triggers not only potent $\alpha\beta$ T cell anti-tumor immunity, but also the accumulation and activation of intratumoral $\gamma\delta$ T cell in a microbiota-dependent manner. We emphasized that these cells are indispensable for the increase of IFN γ -producing CD4 $^+$ and CD8 $^+$ TILs and subsequent tumor growth control. We also reported that an inulin-enriched diet remarkably alters the composition of the microbiota and, as expected, significantly promotes the selective growth of *Bifidobacterium* species, which are known to be immunostimulatory. Consistent with this, such a diet promotes the activation of $\gamma\delta$ T IELs in the gut and we found that the frequency of CCR9 $^+$ tumor-infiltrating cells tends to increase, suggesting a possible intestinal origin of $\gamma\delta$ TILs. Interestingly, CCR9-expressing T cells have been shown to contribute to anti-tumor immunity, and their recruitment into the tumor-bed (by CCL25 intratumoral delivery) (33) improves immunotherapy

efficacy. It is now required to study the $\gamma\delta$ T cell subsets that are recruited within the tumor bed, in order to fully understand their origin.

Regarding a possible synergy with immunotherapy, we found that a prophylactic inulin diet was as effective as anti-PD-1 immunotherapy in our setting and that PD-1 expression was equivalent between groups. Because PD-1 expression identifies exhausted T cells only when combined with other inhibitory receptors such as Tim-3, LAG-3, or TIGIT (34), it is possible that PD-1 $^+$ TILs under inulin were not in an exhausted state, in contrast to TILs in the control group. Furthermore, in our experiment, we only harvested the tumors 13 days after inoculation to characterize the functionality of the TILs, so it is possible that the combination of inulin and anti-PD-1 treatment would prevent later tumor escape compared to anti-PD-1 alone in the B16 melanoma model. To fully address this question, further phenotyping of TILs and prolonged monitoring of tumor growth are required.

To date, how intestinal and/or systemic $\gamma\delta$ T cells are activated by an inulin-enriched diet remains unclear. Since polysaccharides, as inulin, can activate immune cells in a Toll-like Receptor (TLR)-4-dependent manner (29, 30) we first hypothesized that our observations could rely on such recognition. Indeed, TLR agonists are part of strategies used for harnessing $\gamma\delta$ T cells in cancer immunotherapy (35). Of note, while both human $\gamma\delta$ and CD8 $^+$ T

cells do express TLR-4 and have been shown to respond to LPS stimulation (36), only $\gamma\delta$ T cells actually express TLR-4 in mice (37), where TLR-4 signaling participates to their development (38). Thus, to evaluate if inulin was able to directly trigger $\gamma\delta$ T cells activation and subsequent tumor growth control, we used a large spectral antibiotics cocktail for altering profoundly the microbiota composition, concomitantly to inulin enrichment. Antibiotics totally abrogated inulin-mediated anti-tumor effect, demonstrating that inulin fails to directly activate $\gamma\delta$ T cells *via* TLR-4, rather, its effect is microbiota-mediated. In addition, in this study, we did not use $\gamma\delta$ TcR deficient mice, rather, we choose to use an antibody-mediated $\gamma\delta$ TcR blockade as first line strategy. This appears more “physiological” than KO mice that can develop some compensatory immune mechanisms. Importantly, we observed that $\gamma\delta$ TcR blockade abrogated inulin-mediated enhanced immunosurveillance. Beyond demonstrating that $\gamma\delta$ T cells are obligate mediators, these data highlighted that their activation was TcR-dependent and thus that microbiota-derived $\gamma\delta$ T cell activation signals could be metabolite-mediated. Altogether, these data allow us to propose a scenario in which intestinal $\gamma\delta$ T cells could be activated in a TcR-dependent manner, most likely by metabolites derived from inulin-mediated remodeling of the microbiota and then recirculated to the tumor to promote CD8⁺ T cell anti-tumor activity. If such scenario is validated in mice, a direct translation to humans could appear difficult due to the differences among mouse and human $\gamma\delta$ T cell subsets. However, in humans, blood-circulating $\gamma\delta$ T cells (V γ 9V δ 2) represent a unique subset able to sense metabolic products. We anticipate that they may represent the human target of inulin-mediated immunomodulation.

In this study, we report three transplantable tumor models in which inulin triggered anti-tumor immune responses. As a result, the growth of melanoma, colorectal and fibrosarcoma tumors were attenuated and accompanied by an increased in $\gamma\delta$ T cell infiltration. To fully investigate the impact of nutritional intervention on cancer immunosurveillance mediated by $\gamma\delta$ T cells, the use of more physiological models, such as genetically engineered mouse models or chemically induced cutaneous tumor models (4), may be useful as they allow for the establishment of proper immunoeediting, unlike transplantable tumors. Our study reveals the pivotal role of $\gamma\delta$ T cell in inulin-mediated anti-tumor activity; however, their features could be further investigated. Indeed, it would be of great interest to study their activation phenotype, as well as $\gamma\delta$ T cell subset(s) recruited within the tumor bed under inulin diet. Moreover, to better characterize their anti-tumor activity, one can determine if they directly participate in tumor cell lysis (cytotoxic function) and/or provide a help to effector CD8⁺ T cells either as IFN γ -producing cells and/or as APC-like cells.

Despite these limitations, our data provide a proof of concept that intestinal and systemic $\gamma\delta$ T cell functions can be modulated by nutritional intervention. In particular, we identified these cells as a critical immune subset that is mandatory for inulin-mediated anti-tumor immunity and subsequent control of tumor growth *in vivo*. These results further support and rationalize the use of such prebiotic approaches as well as the development of immunotherapies targeting $\gamma\delta$ T cells in cancer prevention and immunotherapy. Notably, determining which bacteria-derived

metabolite(s) is responsible for this activation would be of great interest in developing future postbiotic immunotherapeutic approaches and rapidly translating these findings for cancer prevention and treatment in humans.

4 Material and methods

4.1 Animals

Female C57Bl/6 mice (5 to 6 weeks aged) were provided by Janvier SA Laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed at “Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA)” UGA core facility (Grenoble, France), EU0197, Agreement C38-51610006, under specific pathogen-free conditions, temperature-controlled environment with a 12-h light/dark cycle and ad libitum access to water and diet. Animal housing and procedures were conducted in accordance with the recommendations from the Direction des Services Vétérinaires, Ministry of Agriculture of France, according to European Communities Council Directive 2010/63/EU and according to recommendations for health monitoring from the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Protocols involving animals were reviewed by the local ethic committee “Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale no.#12, Cometh-Grenoble” and approved by the Ministry of Research (APAFIS#12905-2018010411002729-v5). Mice were distributed in groups according to their diet. For inulin treatment, mice received standard diet and drinking water supplemented with 7.2% inulin starting 15 days before tumor inoculation. Drinking bottles supplemented with inulin were renewed 3 times a week.

4.2 Cell lines

Ovalbuminexpressing B16 melanoma (B16-OVA), MCA 205 fibrosarcoma cell lines (MCA 205 OVA), and MC38 colorectal cancer cell line (MC38 OVA) were kindly provided by Pr. L. Zitvogel, Gustave Roussy (B16-OVA, MCA205-OVA) and C. Fournier, Inserm U1209 (MC38-OVA). B16-OVA and MC38-OVA cell lines were cultured in 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Gibco) Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) (Gibco) complete medium (supplemented with 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/mL penicillin, and 50 μ g/mL streptomycin (all from Gibco)). MCA 205 OVA cell line was cultured in 10% FBS Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complete medium (Gibco). For plasmid selection, G418 (500 μ g/ml, Sigma) and hygromycin B (50 μ g/ml, Sigma) antibiotics were added to B16-OVA/MC38-OVA and MCA 205-OVA cultures, respectively. All cell lines were tested as mycoplasma-free.

4.3 Tumor implantation

Mice received subcutaneous implantation of either 2×10^5 B16-OVA cells, 2×10^5 MCA 205-OVA cells, or 5×10^5 MC38-OVA cells in 100 μ L PBS in the right flank. Once palpable, tumors were

measured using a caliper, and tumor volume was determined using the following formula: $V_{\text{tumor}} = 0.5 \times (\text{width} \times \text{length}^2)$.

4.4 *In vivo* injection of anti- $\gamma\delta$ TCR and anti-PD-1 antibodies

Mice received 100 μg of the monoclonal antibody anti- $\gamma\delta$ TcR (clone UC7-13D5, Bio X Cell) or anti-PD-1 (clone RMP1-14, Bio X Cell) intraperitoneally, in PBS. Anti- $\gamma\delta$ TcR antibodies were injected the day before tumor implantation and then every 2 days until the end of the experiment. Anti-PD-1 immunotherapy was administered on days 4, 7, and 10 after tumor implantation.

4.5 *In vivo* bacterial microbiota depletion

Mouse gut microbiota was depleted using a cocktail of antibiotics diluted in drinking water: Vancomycin 0.25 g/L (Mylan), Colimycin 12 $\times 10^6$ U/L (Medac), Ampicillin 1 g/L (Sigma) and Streptomycin 5 g/L (Sigma), as previously described (13).

4.6 Tumor digestion

Tumors were collected in complete RPMI medium, lacerated with scalpels, and digested with LiberaseTM 2.5 mg/mL (Roche). Finally, tumors were crushed through a 70 μm cell strainer, washed, and resuspended in 10% FBS complete RPMI.

4.7 Colonic IELs and LPCs isolation and CD45⁺/⁻ cell sorting

Colons were collected in Hank's Balanced Salt Solution without Ca^{2+} and Mg^{2+} (HBSS⁻) (Gibco), then digested twice with 5 mM HEPES, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, and 5% FBS, for IELs isolation. remaining colon pieces were then lacerated with scalpels and digested with collagenase VIII 0.5 mg/mL, DNase I 10 U/mL (Sigma), and 5% FBS in complete RPMI for LPCs isolation. Finally, digested colon pieces were crushed through a 70 μm cell strainer, and cells were resuspended in 10% FBS complete RPMI. CD45⁺ and CD45⁻ cells from the LPCs cell fraction were sorted using MACS (Miltenyi Biotec) with CD45 microbeads, according to the manufacturer's protocol.

4.8 Lymph node digestion

Lymph nodes were collected in complete RPMI and then crushed through a 70 μm cell strainer. Cells were later suspended in 10% FBS complete RPMI.

4.9 Blood sample preparation

Blood was collected *via* retro-orbital sampling in K2E tubes (BD Medical). After centrifugation, blood pellets were resuspended in 1

mL Red Blood Cell Lysis buffer 1X (Sigma) and washed with 10% FBS complete RPMI.

4.10 Flow cytometry

To allow intracellular labelling of cytokines, cell suspensions were stimulated 4 h at 37°C with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ionomycin (Sigma), and Golgi StopTM (BD Biosciences). For extracellular labelling, cells were incubated with 200 ng of each antibody. Antibodies targeting extracellular proteins were CD45 (30-F11), PD-1 (RMP1-30) (BD Biosciences), CD3 (17A2), CD4 (GK1.5), CD44 (IM7), CCR9 (9B1), CD11c (N418), CD8a (53-6.7), PD-L2 (24F.10C12), PD-L1 (10F.9G2), MHC-class II (M5/114.5.2), CD80 (16-10A1), CD40 (3/23) (Biolegend), $\gamma\delta$ -TcR (eBioGL3 (GL-3, GL3), and OVA-dextramer (H-2 Kb) (Immudex) (Table S2).

To allow intracellular labelling, cells were first permeabilized using a FoxP3 staining buffer kit (eBioscience). Antibodies targeting intracellular cytokines were IFN γ (XMG1.2) (Biolegend), IL-10 (JES5-16E3) (Thermo Fisher Scientific), and IL-17A (TC11-18H10) (BD Biosciences) (Table S2). After intracellular labelling, cells were fixed and stored using FACS Lysing Solution 1X (BD Biosciences). All data were collected using a BD Biosciences FACSCanto II or Lyric and analyzed using FlowJo software.

4.11 Bacterial DNA extraction and 16S sequencing from mouse feces

Fecal samples were collected and stored at -80°C. DNA was extracted from feces following optimized JJ Godon protocole (39). After nucleic acid precipitation with isopropanol, DNA suspensions were incubated overnight at 4°C and centrifuged at 20,000 \times g for 30 min. The supernatants were transferred to a new tube containing 2 μL of RNase (RNase A, 10 mg/ml; EN0531; Fermentas, Villebon sur Yvette, France) and incubated at 37°C for 30 min. Nucleic acids were precipitated by the addition of 1 ml of absolute ethanol and 50 μL of 3 M sodium acetate and centrifuged at 20,000 \times g for 10 min. The DNA pellets were washed with 70% ethanol 3 times, dried, and resuspended in 100 μL of Tris-EDTA (TE) buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, adjusted pH 8). The DNA suspensions were stored at -20°C for 16S rDNA sequence analysis.

4.12 16S sequencing data processing

Bacterial diversity was determined for each sample by targeting a portion of the ribosomal genes. PCR was performed to prepare amplicons using V3-V4 oligonucleotides (PCR1F_460: 5' CTTT CCCTACACGACGCTCTTCCGATCTACGGGAGGCAGCAG 3', PCR1R_460: 5' GGAGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT TACCAGGGTATCTAATCCT 3'), with 30 amplification cycles at an annealing temperature of 65°C. Amplicon quality was verified by gel electrophoresis, and PCR products were sent to the @BRIDGE platform for sequencing on an Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

The 16S sequences were demultiplexed and quality-filtered using the QIIME version 2.1.0 software package (40). Sequences were analyzed and normalized using the pipeline FROGS (Find Rapidly OTU with Galaxy Solution) (41, 42). PCR primers were removed and sequences with sequencing errors in the primers were excluded. The reads were clustered into Operational Taxonomic Units (OTUs) using the Swarm clustering method. Chimerae were removed, and 580 OTUs were assigned at different taxonomic levels (from phylum to species) using the RDP classifier and NCBI Blast+ on the Silva_138.1_16S database. When needed, the phylogeny was checked using the Phylogeny browser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>).

35538 reads were randomly selected from each sample to normalize the data. Raw reads were deposited into the SRA database (ID: PRJNA888063). The R packages “Biom” and “Phyloseq” were used for data analysis and plotting (43). Rarefaction analysis was performed to compare the relative abundance of OTUs across samples. Alpha diversity was measured using Observed, Chao1, Shannon, Simpson, and Inverse Simpson indexes. Beta diversity was measured using the Bray-Curtis distance matrix and used to construct principal coordinate analysis (PCoA) plots. The linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) algorithm was used to identify taxa specific to diet and/or treatment (41, 42).

4.13 Real-time quantitative reverse transcription

Total RNA was extracted from IELs and LPCs using the RNEASY-QIAGEN kit, according to the manufacturer’s protocol. The purity and concentration of the extracted RNA were determined by reading the absorbance at 260 and 280 nm using a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher). The extracted RNA was then retrotranscribed using the Superscript II kit (Invitrogen). qRT-PCR analysis was performed using SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and the StepOne™ RealTime PCR system (Thermo Fischer). PCR conditions were: 2 min at 95°C, then 40 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C. The sequence-specific primers used are shown in Table S3 (GAPDH and β 2M primers were from Eurofins Scientific; other primers were from Merck). The expression levels were normalized to GAPDH and β 2M endogenous gene levels, and each value was then compared to a reference sample named the calibrator. Finally, relative quantification (RQ) values were calculated.

Data availability statement

The data presented in the study are deposited in the SRA repository (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>), accession number PRJNA888063.

Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by “Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale no.#12, Cometh-

Grenoble” and approved by the Ministry of Research (APAFIS#12905-2018010411002729-v7).

Author contributions

DH contributed to conception and design of the study, acquisition and analysis of the data, and grants acquisition. EB contributed to the design of the study and acquisition and analysis of the data. CP contributed to the acquisition and analysis of the data. MR, IM, AS contributed to the analysis and interpretation of the data. DH wrote the first draft of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

Funding

This work (DH) was supported by GEFLUC Dauphiné-Savoie, Ligue contre le Cancer Comité Isère, Ligue contre le Cancer Comité Savoie, Université Grenoble Alpes IDEX Initiatives de Recherche Stratégiques. EB is supported by a grant salary from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. The funders had no role in study design, data collection or analysis.

Acknowledgments

We would like to thank Sylvie Berthier (Cytometry Platform, CHUGA), Dr. Hervé Lerat, Kevin Escot and Laurie Arnaud (PHTA Animal Facility), Clément Caffaratti and Hélène Coradin (TIMC Lab), and Théo Ziegelmeyer (Inserm U1209) for their technical assistance. This work benefited from the facilities and expertise of @BRIDGe for 16S sequencing (Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, 78350 Jouy-en-Josas, France).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher’s note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2023.1104224/full#supplementary-material>

References

- World Health Organization - Cancer. Available at: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
- Fadnes LT, Økland J-M, Haaland ØA, Johansson KA. Estimating impact of food choices on life expectancy: A modeling study. *Fontana L editor PloS Med* (2022) 19(2): e1003889. doi: 10.1371/journal.pmed.1003889
- Kapsetaki SE, Marquez Alcaraz G, Maley CC, Whisner CM, Aktipis A. Diet, microbes, and cancer across the tree of life: a systematic review. *Curr Nutr Rep* (2022) 11(3):508–25. doi: 10.1007/s13668-022-00420-5
- Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* (2011) 29(1):235–71. doi: 10.1146/annurev-immunol-031210-101324
- Liu Z, Eltoum I-EA, Guo B, Beck BH, Cloud GA, Lopez RD. Protective immunosurveillance and therapeutic antitumor activity of $\gamma\delta$ T cells demonstrated in a mouse model of prostate cancer. *J Immunol* (2008) 180(9):6044–53. doi: 10.4049/jimmunol.180.9.6044
- Hayday AC. $\gamma\delta$ T cell update: Adaptate orchestrators of immune surveillance. *J Immunol* (2019) 203(2):311–20. doi: 10.4049/jimmunol.1800934
- Girard P, Charles J, Cluzel C, Degeorges E, Manches O, Plumaz J, et al. The features of circulating and tumor-infiltrating $\gamma\delta$ T cells in melanoma patients display critical perturbations with prognostic impact on clinical outcome. *Oncimmunology* (2019) 8(8):e1601483 1–16. doi: 10.1080/2162402X.2019.1601483
- Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman SV, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* (2015) 21(8):938–45. doi: 10.1038/nm.3909
- Saura-Esteller J, de Jong M, King LA, Ensing E, Winograd B, de Grujil TD, et al. Gamma delta T-cell based cancer immunotherapy: Past-Present-Future. *Front Immunol* (2022) 13:915837/full. doi: 10.3389/fimmu.2022.915837/full
- Yazdanifar M, Barbarito G, Bertaina A, Airolidi I. $\gamma\delta$ T cells: The ideal tool for cancer immunotherapy. *Cells* (2020) 9(5):1305. doi: 10.3390/cells9051305
- Sivan A, Corrales L, Hubert N, Williams JB, Aquino-Michaels K, Earley ZM, et al. Commensal bifidobacterium promotes antitumor immunity and facilitates anti-PD-L1 efficacy. *Science* (2015) 350(6264):1084–9. doi: 10.1126/science.aac4255
- Zitvogel L, Ayyoub M, Routy B, Kroemer G. Microbiome and anticancer immunosurveillance. *Cell* (2016) 165(2):276–87. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.001
- Viaud S, Saccheri F, Mignot G, Yamazaki T, Daillère R, Hannani D, et al. The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide. *Science* (2013) 342(6161):971–6. doi: 10.1126/science.1240537
- Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (2017) 359(6371):91–7. doi: 10.1126/science.aan3706
- Gopalakrishnan V, Spencer CN, Nezi L, Reuben A, Andrews MC, Karpinetz TV, et al. Gut microbiome modulates response to anti-PD-1 immunotherapy in melanoma patients. *Sci* (80-) (2017) 359(6371):97–103. doi: 10.1126/science.aan4236
- Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre M-L, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* (2018) 359(6371):104–8. doi: 10.1126/science.aao3290
- Ganusov VV, De Boer RJ. Do most lymphocytes in humans really reside in the gut? *Trends Immunol* (2007) 28(12):514–8. doi: 10.1016/j.it.2007.08.009
- Constantinides MG, Belkaid Y. Early-life imprinting of unconventional T cells and tissue homeostasis. *Science* (2021) 374(6573):p1338-1338. doi: 10.1126/science.abf0095
- Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: Unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol* (2013) 13(2):88–100. doi: 10.1038/nri3384
- Willcox BE, Willcox CR. $\gamma\delta$ TCR ligands: The quest to solve a 500-million-year-old mystery. *Nat Immunol* (2019) 20(2):121–8. doi: 10.1038/s41590-018-0304-y
- Holmes E, Li JV, Marchesi JR, Nicholson JK. Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab* (2012) 16(5):559–64. doi: 10.1016/j.cmet.2012.10.007
- Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* (2017) 14(8):491–502. doi: 10.1038/nrgastro.2017.75
- Matson V, Fessler J, Bao R, Chongsuwat T, Zha Y, Alegre M-L, et al. The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* (2018) 359(6371):104–8. doi: 10.1126/science.aao3290
- Li Y, Elmén L, Segota I, Xian Y, Tinoco R, Feng Y, et al. Prebiotic-induced anti-tumor immunity attenuates tumor growth. *Cell Rep* (2020) 30(6):1753–1766.e6. doi: 10.1016/j.celrep.2020.01.035
- Uerlings J, Schroyen M, Willems E, Tanghe S, Bruggeman G, Bindelle J, et al. Differential effects of inulin or its fermentation metabolites on gut barrier and immune function of porcine intestinal epithelial cells. *J Funct Foods* (2020) 67:103855. doi: 10.1016/j.jff.2020.103855
- Meyer D, Stasse-Wolthuis M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr* (2009) 63(11):1277–89. doi: 10.1038/ejcn.2009.64
- Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic immunity and the microbiota. *Immunity* (2017) 46(4):562–76. doi: 10.1016/j.immuni.2017.04.008
- Nielsen MM, Witherden DA, Havran WL. $\gamma\delta$ T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat Rev Immunol* (2017) 17(12):733–45. doi: 10.1038/nri.2017.101
- Skwarczynski M. Inulin: A new adjuvant with unknown mode of action. *EBioMedicine* (2017) 15:8–9. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.11.019
- Rosales-Mendoza S, Salazar-González JA, Decker EL, Reski R. Implications of plant glycans in the development of innovative vaccines. *Expert Rev Vaccines* (2016) 15(7):915–25. doi: 10.1586/14760584.2016.1155987
- Ribas A, Shin DS, Zaretsky J, Frederiksen J, Cornish A, Avramis E, et al. PD-1 blockade expands intratumoral memory T cells. *Cancer Immunol Res* (2016) 4(3):194–203. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0210
- Spencer CN, McQuade JL, Gopalakrishnan V, McCulloch JA, Vetizou M, Cogdill AP, et al. Dietary fiber and probiotics influence the gut microbiome and melanoma immunotherapy response. *Science* (2021) 374(6575):1632–40. doi: 10.1126/science.aaz7015
- Chen H, Cong X, Wu C, Wu X, Wang J, Mao K, et al. Intratumoral delivery of CCL25 enhances immunotherapy against triple-negative breast cancer by recruiting CCR9 + T cells. *Sci Adv* (2020) 6(5). doi: 10.1126/sciadv.aax4690
- Simon S, Labarriere N. PD-1 expression on tumor-specific T cells: Friend or foe for immunotherapy? *Oncimmunology* (2018) 7(1):e1364828. doi: 10.1080/2162402X.2017.1364828
- Hannani D, Ma Y, Yamazaki T, Déchanet-Merville J, Kroemer G, Zitvogel L. Harnessing $\gamma\delta$ T cells in anticancer immunotherapy. *Trends Immunol* (2012) 33(5):199–206. doi: 10.1016/j.it.2012.01.006
- Pallett LJ, Swadling L, Diniz M, Maini AA, Schwabenland M, Gasull AD, et al. Tissue CD14+CD8+ T cells reprogrammed by myeloid cells and modulated by LPS. *Nature* (2023) 614:334–42. doi: 10.1038/s41586-022-05645-6
- Komai-Koma M, Gildchrist DS, Xu D. Direct recognition of LPS by human but not murine CD8+ T cells via TLR4 complex. *Eur J Immunol* (2009) 39(6):1564–72. doi: 10.1002/eji.200838866
- Papotto PH, Yilmaz B, Silva-Santos B. Crosstalk between $\gamma\delta$ T cells and the microbiota. *Nat Microbiol* (2021) 6(9):1110–7. doi: 10.1038/s41564-021-00948-2
- Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Haboubiz F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* (1997) 63(7):2802–13. doi: 10.1128/aem.63.7.2802-2813.1997
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* (2010) 7(5):335–6. doi: 10.1038/nmeth.f.303
- Escudié F, Auer L, Bernard M, Mariadassou M, Cauquil L, Vidal K, et al. FROGS: Find, rapidly, OTUs with galaxy solution. *Berger B editor Bioinf* (2018) 34(8):1287–94. doi: 10.1093/bioinformatics/btx791
- Bernard M, Rué O, Mariadassou M, Pascal G. FROGS: a powerful tool to analyse the diversity of fungi with special management of internal transcribed spacers. *Brief Bioinform* (2021) 22(6). doi: 10.1093/bib/bbab318/6354026
- McMurdie PJ, Holmes S. Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data, in: (2013). Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061217>.

Article

Inulin Prebiotic Protects against Lethal *Pseudomonas aeruginosa* Acute Infection via $\gamma\delta$ T Cell Activation

Emilie Boucher ^{1,†} , Caroline Plazy ^{2,†}, Audrey Le Gouellec ² , Bertrand Toussaint ² and Dalil Hannani ^{1,*} 

¹ Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France; emilie.boucher@univ-grenoble-alpes.fr

² Univ. Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, CHU Grenoble Alpes, TIMC, 38000 Grenoble, France; cplazy@chu-grenoble.fr (C.P.); alegouellec@chu-grenoble.fr (A.L.G.); btoussaint@chu-grenoble.fr (B.T.)

* Correspondence: dalil.hannani@univ-grenoble-alpes.fr

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) causes harmful lung infections, especially in immunocompromised patients. The immune system and Interleukin (IL)-17-producing $\gamma\delta$ T cells ($\gamma\delta$ T) are critical in controlling these infections in mice. The gut microbiota modulates host immunity in both cancer and infection contexts. Nutritional intervention is a powerful means of modulating both microbiota composition and functions, and subsequently the host's immune status. We have recently shown that inulin prebiotic supplementation triggers systemic $\gamma\delta$ T activation in a cancer context. We hypothesized that prophylactic supplementation with inulin might protect mice from lethal *P. aeruginosa* acute lung infection in a $\gamma\delta$ T-dependent manner. C57Bl/6 mice were supplemented with inulin for 15 days before the lethal *P. aeruginosa* lung infection, administered intranasally. We demonstrate that prophylactic inulin supplementation triggers a higher proportion of $\gamma\delta$ T in the blood, accompanied by a higher infiltration of IL-17-producing $\gamma\delta$ T within the lungs, and protects 33% of infected mice from death. This observation relies on $\gamma\delta$ T, as in vivo $\gamma\delta$ TcR blocking using a monoclonal antibody completely abrogates inulin-mediated protection. Overall, our data indicate that inulin supplementation triggers systemic $\gamma\delta$ T activation, and could help resolve lung *P. aeruginosa* infections. Moreover, our data suggest that nutritional intervention might be a powerful way to prevent/reduce infection-related mortality, by reinforcing the microbiota-dependent immune system.

Keywords: prebiotic; inulin; $\gamma\delta$ T cells; *Pseudomonas aeruginosa*; immunity; gut–lung axis



Citation: Boucher, E.; Plazy, C.; Le Gouellec, A.; Toussaint, B.; Hannani, D. Inulin Prebiotic Protects against Lethal *Pseudomonas aeruginosa* Acute Infection via $\gamma\delta$ T Cell Activation. *Nutrients* **2023**, *15*, 3037. <https://doi.org/10.3390/nu15133037>

Academic Editor: Ping Zhang

Received: 7 June 2023

Revised: 30 June 2023

Accepted: 2 July 2023

Published: 5 July 2023



Copyright: © 2023 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

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is a common gram-negative environmental bacterium. This opportunistic bacterium causes nosocomial infections and is highly virulent in immunodeficient patients. Indeed, pulmonary infection with *P. aeruginosa* is one of the leading causes of death in ventilator-associated pneumonia (VAP), cystic fibrosis, and chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients [1–3]. Due to its adaptability, *P. aeruginosa* strains have become increasingly more resistant to antibiotics [4,5]. As a result, in 2017, the World Health Organization classified *P. aeruginosa* as an antibiotic-resistant “critical priority pathogen” among the bacteria species causing the greatest menace to the global population [6].

In an acute *P. aeruginosa* infection mouse model, several studies support the idea that the immune system, especially pulmonary $\gamma\delta$ T lymphocytes, plays a key role in fighting such infection [7–9]. $\gamma\delta$ T cells are unconventional innate T cells, primarily activated during *P. aeruginosa* infection [10]. This early activation makes them the first pulmonary producers of interleukin 17 (IL-17), and highly protective cells, during *P. aeruginosa* infection. In addition, lung $\gamma\delta$ T cell infiltration is a good prognostic marker in the lethal *P. aeruginosa* acute infection mouse model and might, therefore, be an attractive therapeutic target [7–10].

Indeed, an active immune system is crucial for eliminating this opportunistic pathogen that has many virulence factors and easily acquires many antibiotic resistance determinants [5]. In immunodeficient patients, therapies and interventions reinforcing host immunity are therefore urgently required.

The modulation of the immune system can be achieved in several ways, including the use of recombinant cytokines or monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies can either act as agonists, activating receptors, or antagonists, inhibiting receptors or cytokines. These therapeutic strategies are currently being investigated in bacterial lung infections caused by *Mycobacterium tuberculosis* or *P. aeruginosa*, for example [11–13]. While vaccine approaches for *P. aeruginosa* infections have been ineffective so far, some immunotherapies, particularly monoclonal antibodies, are currently under investigation [14]. For over a decade, the gut microbiota has been shown to play a fundamental role in the induction, education, and function of the mammalian immune system [15]. The gut microbiota is composed of bacteria, fungi, archaea, and viruses that are in constant interaction with their host. Among these, bacteria have been the most extensively studied and have been shown to interact with host gut immunity [16,17]. Immune system modulation is balanced between pro- and anti-inflammatory signals produced by bacteria [17]. These signals include microorganisms-associated molecular patterns (MAMPs) and metabolites. Some metabolites derived from the gut microbiota can act as potent immune modulators [18]. These metabolites not only act on local (gut) immunity but also have an impact on distal, systemic immunity [15]. For instance, gut microbiota-derived aryl hydrocarbon receptor (AhR) ligands can influence the function of dendritic epidermal T cells, a type of T cell residing in the skin epidermis [19]. Additionally, short-chain fatty acids (SCFAs), which are metabolites produced through fiber fermentation by commensal bacteria, can directly modulate the function of various immune cells [20]. SCFAs can also enhance host hematopoiesis, promoting the generation of macrophage and dendritic cell (DC) precursors in the blood [21]. Consequently, they facilitate the migration of DCs with high phagocytic capacity to the lung [21]. These findings illustrate the gut–lung axis, where the gut microbiota and its derived metabolites potentially regulate lung immunity under homeostatic conditions [22]. Since some studies have implicated the gut microbiome in certain bacterial pulmonary infection-associated diseases, targeting it could represent a promising therapeutic approach, particularly through nutritional interventions [23]. For example, COPD patients have an altered gut microbiome that correlates with disease features [24]. In the nontuberculous mycobacterial pulmonary disease (NTM-PDs) mouse model, modulation of the gut microbiome through L-arginine administration has shown a protective effect, even against multi-drug resistant *Mycobacterium abscessus* [25].

Based on these studies, the development of optimal strategies for modulating the composition and function of the gut microbiota for therapeutic purposes is highly appealing. As diet is one of the most potent modulators of the microbiota, nutritional intervention could significantly improve host anti-bacterial immunity [26]. A promising nutritional intervention approach involves diet supplementation with dietary fibers that exhibit prebiotic activity. Prebiotics are indigestible compounds found in vegetables, fermented by commensal bacteria of the gut microbiota [27]. A diet rich in prebiotics promotes the growth and metabolic activity of beneficial bacteria in the colon, thus favorizing gut-associated benefits [28,29]. Among prebiotics, inulin is a fructooligosaccharide (FOS) primarily found in chicory roots, composed of a fructosyl chain ending with a glucosyl moiety. Dietary supplementation with inulin has shown beneficial effect in several pathologies. In Type 2 diabetes patients, inulin consumption helps to regulate the glycemia [30]. In addition, dietary supplementation with inulin showed anti-tumor effect in several tumor-bearing mouse models [31]. Inulin is known to enhance the colonization of the gut by profitable bacteria, including *Bifidobacterium*, which has been described as an immuno-stimulatory species [32,33]. However, its biological mode of action still remains unknown.

We previously demonstrated that a 15-day diet supplementation with inulin efficiently modulates the gut microbiota and promotes the growth of *Bifidobacterium* in mice [34].

This modulation of the microbiota led to the activation of colonic $\gamma\delta$ T intraepithelial lymphocytes (IELs), notably enhancing their capacity to produce pro-inflammatory cytokines. Local $\gamma\delta$ T cell activation was accompanied by systemic $\gamma\delta$ T cell activation, as evidenced by enhanced cancer immunosurveillance. In contrast to mice on a control diet, mice supplemented with inulin exhibited a significant reduction in the size of subcutaneously transplanted melanoma tumors. This effect was dependent on the microbiota and $\gamma\delta$ T cells, as simultaneous treatment with broad-spectrum antibiotics or administration of an anti- $\gamma\delta$ TcR blocking antibody completely abolished the efficacy of inulin-mediated protection. Collectively, our findings demonstrate that this prebiotic strategy holds great potential for activating systemic host immunity, particularly $\gamma\delta$ T cells, in a cancer context [34]. Considering the protective role of $\gamma\delta$ T cells in *P. aeruginosa* infections [7–9], we hypothesized that prophylactic nutritional intervention with inulin supplementation could trigger a protective systemic activation of $\gamma\delta$ T cell, potentially safeguarding against lethal *P. aeruginosa* infection. To evaluate this scenario, we conducted the present study.

2. Materials and Methods

2.1. Animals

Female C57Bl/6 mice (aged 5 weeks) were provided by Janvier SA Laboratory (Le Genest-Saint-Isle, France) and housed at “Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA)” UGA core facility (Grenoble, France), EU0197, Agreement C38-51610006, under specific pathogen-free conditions, in a temperature-controlled environment with a 12 h light/dark cycle and ad libitum access to water and diet. Animal housing and procedures were conducted in accordance with the recommendations from the Direction des Services Vétérinaires, Ministry of Agriculture of France, according to European Communities Council Directive 2010/63/EU, and according to recommendations for health monitoring from the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Protocols involving animals were reviewed by the local ethics committee, “Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale no.#12, Cometh-Grenoble”, and approved by the Ministry of Research (APAFIS#21249-2019062715154462.v4, on 19 July 2019). Only female mice were used in this project, to avoid housing issues after group randomization. After a 1-week adaptation, the mice were randomly assigned to 2 groups, according to their diet.

(1) Healthy control group (Control), $n = 16$

$n = 10$: *P. aeruginosa* infected ($n = 6$ were used for survival assessment, and $n = 4$ were used for lung and blood-immunity analysis).

$n = 6$: Non-infected mice, used for lung and blood-immunity analysis.

(2) Inulin-supplemented group (Inulin) $n = 24$

$n = 12$: *P. aeruginosa* infected ($n = 6$ were used for survival assessment, and $n = 6$ were used for lung and blood-immunity analysis).

$n = 6$: *P. aeruginosa* infected + anti- $\gamma\delta$ TcR, used for survival assessment.

$n = 6$: Non-infected mice, used for lung and blood-immunity analysis.

For inulin treatment, mice received a standard diet and drinking water supplemented with 7.2% inulin, starting 15 days before *P. aeruginosa* intranasal infection. Drinking bottles supplemented with inulin were renewed 3 times a week. All experiments were conducted with 6 mice per group, except when indicated in the figure legend.

2.2. Bacterial Culture

A clinical strain of *P. aeruginosa*, named CHA, was used for intrapulmonary infections [35]. Bacteria were cultured in Lysogeny Broth (LB) medium, under agitation at 37 °C. Bacterial growth, followed by optical density (OD) at 600 nm, was stopped at the exponential phase, corresponding to OD = 1. After centrifugation, bacteria were resuspended at a concentration of 1.25×10^8 CFU/mL in Phosphate Buffer Saline 1X (PBS) (Gibco). The number of bacteria administered was confirmed by colony-forming unit (CFU) count after 24 h of culture at 37 °C on LB agar.

2.3. Intranasal Inoculation of *P. aeruginosa*

Mice were anesthetized with 4% isoflurane and infected intranasally with 3×10^6 CFU *P. aeruginosa*, in 40 μ L PBS. After 14 h, half of the mice were euthanized for pulmonary immunity analysis. The other half were under acute surveillance for 96 h. The severity of the symptoms was evaluated regularly by calculating a clinical score, as follows:

Score 1: normal clinical condition, may have slight piloerection, normal activity and no weight loss.

Score 2: slight piloerection, slight prostration, weight loss < 20%.

Score 3: piloerection, moderate prostration, weight loss < 20%, slightly closed eyes, irregular breathing, slightly reduced mobility, slightly reduced activity.

Score 4: piloerection, prostration, weight loss > 20%, closed eyes, reduced breathing rate, increased breathing depth, reduced activity: animal has reached moderate endpoint and should be euthanized.

When a score reached 3, animals were monitored every hour. Animals reaching a score of 4 were euthanized, to avoid any unnecessary suffering, and reported as dead from the infection.

2.4. In Vivo Blocking of $\gamma\delta$ -TcR

Mice received 100 μ g of the anti- $\gamma\delta$ TcR monoclonal antibody (clone UC7-13D5, Euroimedex, Souffekweyersheim, France) intraperitoneally, in 100 μ L PBS 1X. Anti- $\gamma\delta$ TcR antibodies were injected the day before and after the bacterial challenge.

2.5. Lung Harvest

Lung lobes were collected in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) complete medium (supplemented with 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, 50 U/mL penicillin and 50 μ g/mL streptomycin (all from Life technologies, Courtaboeuf, France)). Each lobe was lacerated into small pieces using scalpels, and digested with LiberaseTM (25 μ g/mL, Roche, Meylan, France) for 30 min at 37 °C. Finally, the digested lungs were passed through a 70 μ m cell strainer, washed, and cells were resuspended in 10% Fetal Bovine Serum (FBS) (Life technologies, Courtaboeuf, France) RPMI complete medium.

2.6. Blood Sample Preparation

Blood was collected via retro-orbital sampling in K2E tubes (BD Medical, Le Pont-de-Claix, France). After centrifugation, blood pellets were resuspended in 1 mL Red Blood Cell Lysis buffer 1X (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France) and washed with 10% FBS complete RPMI.

2.7. Flow Cytometry

To allow intracellular cytokine detection, cell suspensions were stimulated for 4 h at 37 °C with 50 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), 1 μ g/mL ionomycin (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, France), in the presence of Golgi StopTM (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). Following activation, cells were stained for extracellular markers and incubated with 200 ng of each antibody for 15 min in the dark at RT. The antibodies targeting extracellular proteins were CD45 (30-F11), CD3 (17A2), CD4 (GK1.5) (Biolegend, Amsterdam, The Netherlands), $\gamma\delta$ -TcR (eBioGL3 (GL-3, GL3)) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). To allow intracellular labeling, cells were first permeabilized using a FoxP3 staining buffer kit (Life technologies, Courtaboeuf, France) before being incubated with intracellular antibodies for 1 h in the dark at RT. Antibodies targeting intracellular cytokines were IFN γ (XMG1.2) (Biolegend, Amsterdam, The Netherlands), IL-10 (JES5-16E3) (Life technologies, Courtaboeuf, France), and IL-17A (TC11-18H10) (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). After intracellular labeling, cells were fixed with FACS (fluorescence-activated cell sorting) Lysing Solution 1X (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France) and stored at +4 °C until acquisition. All data

were acquired on a BD Biosciences FACS Canto II and analyzed using FlowJo Software V10.4.2. The gating strategy is shown in Figure S1.

2.8. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed on GraphPad PRISM software. Mann–Whitney tests were used to compare 2 groups; ns corresponds to non-significant and * corresponds to p -value < 0.05.

3. Results

3.1. An Inulin-Enriched Diet Protects Mice against Lethal *P. aeruginosa* Infection and Enhances Pulmonary IL-17-Producing $\gamma\delta$ T Cells

We have recently described how an inulin-enriched diet promotes systemic $\gamma\delta$ T cell activation through microbiota modulation [19]. Since $\gamma\delta$ T cells are critical players in controlling acute *P. aeruginosa* infections, we assessed the potential anti-bacterial effect of such an inulin-mediated immune boost. To do so, mice were fed either a standard diet or an inulin-enriched diet for 2 weeks before being intranasally challenged with a lethal dose of *P. aeruginosa* (Figure 1A). Only the two-week inulin-enriched diet efficiently protected 33% of infected mice from death (two out of six mice) (Figure 1B).

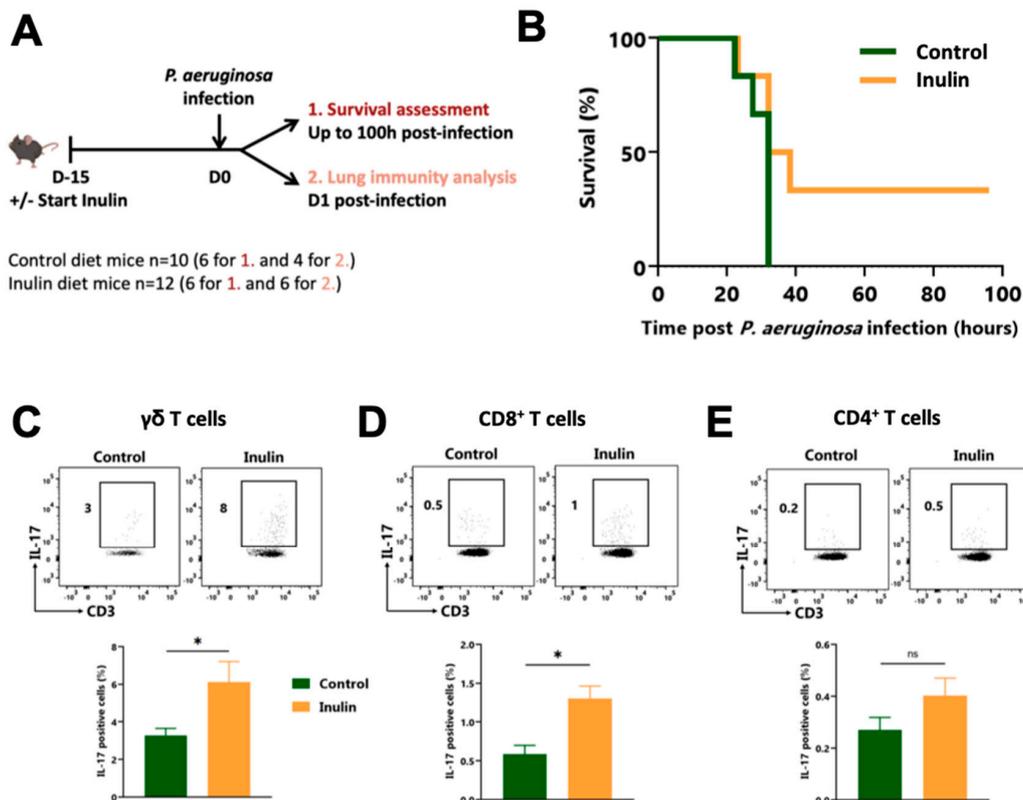


Figure 1. The inulin-enriched diet protects against lethal *P. aeruginosa* infection by reinforcing $\gamma\delta$ T cells. (A) Experimental schedule. C57BL/6 mice were fed a control or an inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) ($n = 4–6$ mice per group) starting 15 days before intranasal infection with 3×10^6 CFU of *P. aeruginosa*. (B) Survival curves of mice treated and infected as described in (A). (C–E) Frequency of pulmonary IL-17-producing cells gated on $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^+$, defined as $\gamma\delta$ T cells (C), $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^- CD4^-$, defined as $CD8^+$ T cells (D) or $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^- CD4^+$, defined as $CD4^+$ T cells (E) from mice treated as in (A) 12 h post-infection. Graphs show the mean \pm SEM. Statistically significant results are indicated by: ns = non-significant, * $p < 0.05$, by Mann–Whitney tests.

To better understand the mechanisms behind this observation, we analyzed lung immunity by flow cytometry 12 h post-infection. While the inulin-enriched diet did not affect the infiltration of CD45⁺ and CD3⁺ in the lung (Figure S2), it significantly increased the proportion of pulmonary IL-17-producing $\gamma\delta$ T lymphocytes (Figure 1C) and CD8⁺ T lymphocytes (Figure 1D), from 3% to 8%, and 0.5% to 1%, respectively. The frequency of IL-17-producing CD4⁺ T cells also tended to increase, although non significantly (Figure 1E). The proportions of Interferon γ (IFN γ)-producing T lymphocytes in the lungs were not affected by the inulin-enriched diet (Figure S3A), but the proportion of IL-10-producing CD8⁺ T cells was increased in the lungs of infected mice (Figure S3B).

IL-17-producing $\gamma\delta$ T lymphocytes have already been described as potent protective immune cells against *P. aeruginosa* infection. To confirm that the inulin-mediated protection was immune-dependent, and particularly dependent on $\gamma\delta$ T cell-dependent, the same experiment was repeated, with one group receiving a blocking $\gamma\delta$ TcR antibody the day before and the day after intranasal infection (Figure 2A). While 33% of inulin-treated mice were protected against *P. aeruginosa* infection (two out of six mice), the administration of the $\gamma\delta$ TcR-blocking antibody completely abrogated this protective effect (Figure 2B), and none of the mice from either the control or the inulin + blocking $\gamma\delta$ TcR group survived. These results collectively indicate that inulin triggered a Th17-polarized antibacterial lung immunity strongly supported by $\gamma\delta$ T lymphocytes. Indeed, $\gamma\delta$ T lymphocytes, and more likely their $\gamma\delta$ TcR engagement, are mandatory for inulin's protection against *P. aeruginosa*.

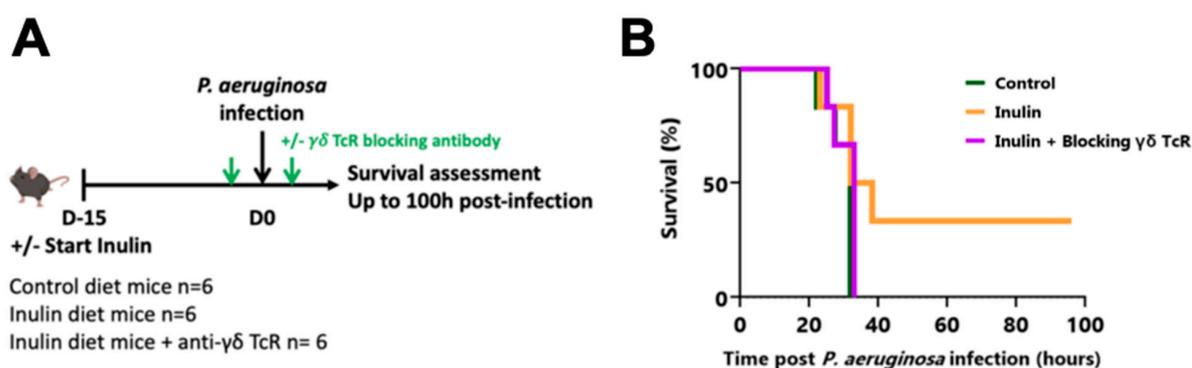


Figure 2. The inulin-mediated protective effect against *P. aeruginosa* depends on $\gamma\delta$ T cells. **(A)** Experimental schedule. C57BL/6 mice were fed a control or an inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) ($n = 6$ mice per group) starting 15 days before intranasal infection with 3×10^6 CFU *P. aeruginosa*. Anti- $\gamma\delta$ TcR antibodies were injected intraperitoneally (i.p.) into 6 mice from the inulin group the days before and after bacterial infection. **(B)** Survival curves of mice treated and infected as described in **(A)**.

3.2. The Inulin Diet Reinforces Blood Circulating Immunity

We have previously shown that a 15-day inulin-enriched diet triggers $\gamma\delta$ T cell activation in the gut [34], specifically within colon IntraEpithelial Lymphocytes (IELs) $\gamma\delta$ T cells. The gut microbiota can induce immune modulation in distal sites, including the lungs (known as gut-lung axis) [22]. Therefore, we investigated whether an inulin-enriched diet modulates lung $\gamma\delta$ T cell infiltration under steady-state conditions or if these cells are only recruited from the periphery upon infection. To address this, we analyzed both the immune cells infiltrating the lungs and the immune cells circulating in the blood following a 15-day inulin-enriched diet (Figure 3A), corresponding to the day of infection (Figure 1A).

The inulin-enriched diet did not trigger higher lung leukocyte (CD45⁺) or T cell infiltration compared to mice on the control diet (Figure S4). Among the T cells, we did not observe any differences in the proportions of $\gamma\delta$, CD4⁺, and CD8⁺ T cells (Figure 3B–D). The cytokine patterns of lung-infiltrating T cells, particularly IFN γ , IL-17, and IL-10, were comparable in both groups (Figure S5A,B), except for the proportion of the IL-10-producing CD8⁺ T cells, which was found to be higher under the inulin diet (Figure S5C). While

the inulin diet did not affect the proportions of pulmonary T lymphocytes, it significantly increased the proportion of $\gamma\delta$ T and $CD4^+$ T cells in the blood, from 0.08% to 0.14%, and from 3.9% to 8.3%, respectively (Figure 3E,G). The proportion of $CD8^+$ T cells also showed a tendency to increase, but did not reach statistical significance (Figure 3F). Regarding the cytokine patterns of circulating T cells in the blood, the proportion of IL-17- and IL-10-producing T lymphocytes were comparable between both groups (Figure S5D,F), while the proportions of IFN γ -producing $\gamma\delta$ and $CD8^+$ T cells were reduced (Figure S5E).

Altogether, these observations suggest that the inulin diet promotes the circulation of $\gamma\delta$ T cells and conventional T cells within the blood, but does not enhance their infiltration into the lung under steady-state conditions. However, upon acute infection, these cells are recruited to the lungs.

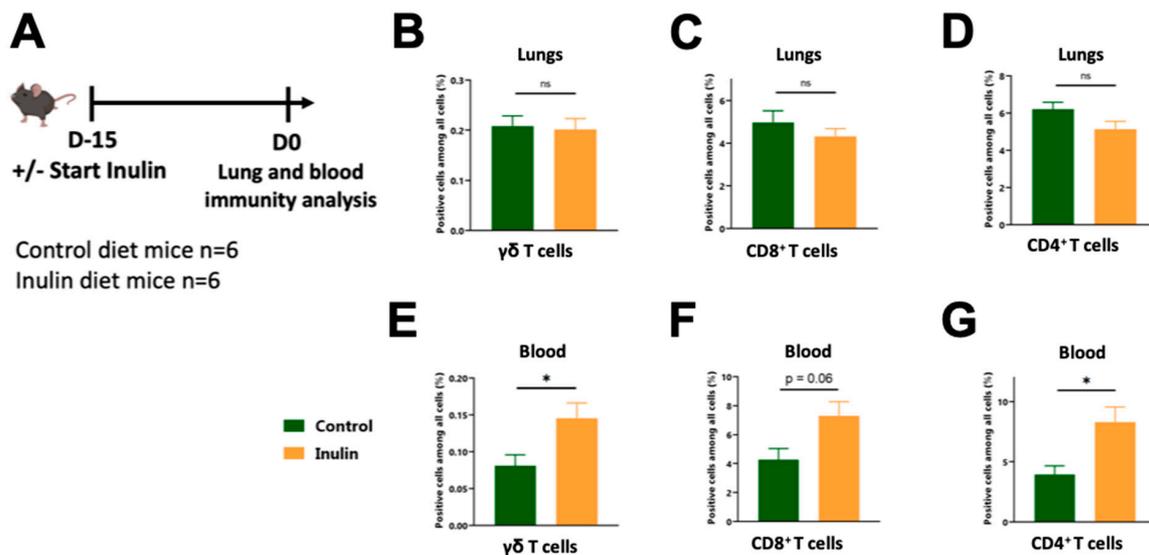


Figure 3. Pulmonary-activated T cells probably originate from the blood. (A) Experimental schedule. C57BL/6 mice were fed a control or an inulin-enriched diet (7.2% in drinking water) ($n = 6$ mice per group) starting 15 days before the analysis of the lung-infiltrated and blood-circulating immune cells. (B–D) Frequency of lung-infiltrated immune cells gated on $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^+$, defined as $\gamma\delta$ T cells (B), $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^- CD4^-$, defined as $CD8^+$ T cells (C) or $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^- CD4^+$, defined as $CD4^+$ T cells (D) from mice treated as in (A). (E–G) Frequency of blood-circulating cells gated on $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^+$, defined as $\gamma\delta$ T cells (E), $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^- CD4^-$, defined as $CD8^+$ T cells (F) or $CD45^+ CD3^+ \gamma\delta TcR^- CD4^+$, defined as $CD4^+$ T cells (G) from mice treated as in (A). Graphs show the mean \pm SEM. Statistically significant results are indicated by: ns = non-significant, * $p < 0.05$, by Mann–Whitney tests.

4. Discussion

P. aeruginosa is widely recognized as a priority pathogen with respect to its high pathogenicity and the development of antibiotic resistance. There is an urgent need for emerging strategies that target the immune system, particularly those focusing on $\gamma\delta$ T cells, which have been shown to play a critical role in combatting such infections [7–9]. In this study, we propose to harness the prebiotic and immune-stimulatory properties of inulin. It has been demonstrated, by ourselves and others, that this dietary fiber promotes the growth of immune-stimulatory bacteria such as *Bifidobacterium* [34,36], consequently leading to $\gamma\delta$ T cell activation. Additionally, inulin promotes gut health by facilitating the production of SCFAs by the gut microbiota, which possess anti-inflammatory properties and support gut barrier integrity [37–39]. Strategies that reinforce the immune system through modulations of the gut microbiota are being increasingly investigated. Among the various gut microbiota modulators, inulin holds the advantage of being a widely consumed prebiotic, available either through diet source or as a supplement.

In the present study, we report that an inulin-enriched diet has the capacity to protect 33% of mice against lethal infection with *P. aeruginosa*. This protective effect was accompanied by an increased proportion of IL-17-producing $\gamma\delta$ T lymphocytes infiltrating the lungs, which play a critical role in this process, as blocking the $\gamma\delta$ TcR in vivo abolished the protective effect mediated by inulin. Previous studies have also highlighted the importance of these cells in immune defense against *P. aeruginosa* infections [7–9], which our results confirm. Prior to infection, at a steady state, the proportion of immune cells in the lungs did not appear to be affected by inulin consumption. However, there was an increase in the proportion of patrolling T lymphocytes in the bloodstream. It is possible that the production of SCFAs or other metabolites induced by the inulin modulate $\gamma\delta$ T cell proportion through the stimulation of lymphoid hematopoiesis, as has been described for the myeloid compartment [20,21]. As a result, an inulin-enriched diet enhances systemic immunosurveillance, making it more responsive to lung infiltration upon infection and thereby protecting the host from death.

The molecular mechanisms underlying the activation of systemic $\gamma\delta$ T lymphocyte are still unclear. In addition to establishing the essential role of $\gamma\delta$ T lymphocytes as mediators, our data indicate that their activation is TcR-mediated rather than mediated through NKR (natural killer receptor) or TLR molecules. Since $\gamma\delta$ T cells detect metabolites such as (E)-4-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl pyrophosphate (HMB-PP) derived from bacteria or isopentenyl-pyrophosphate (IPP) derived from tumors via their TcR [40], our findings strongly suggest that their activation may be mediated by microbiota-derived metabolites. Further research is needed to unravel the exact mechanisms and identify the specific metabolites that activate $\gamma\delta$ T cells. The identification of these metabolites would be highly valuable for developing future post-biotic therapeutic strategies based on metabolites, particularly for immunocompromised or dysbiotic patients who are already infected, as nutritional interventions would require significant time to achieve the optimal modulation of the microbiota.

In addition to immune-stimulatory metabolites, we also hypothesized that anti-inflammatory and tissue repair signals (metabolites/mediators) could play a role. These signals would have a protective effect by preventing a harmful immune response from the host, which could lead to the destruction of lung tissue and, ultimately, death. Among the metabolites derived from inulin that have been described, SCFAs are known to promote the integrity of the gut epithelial barrier through IL-22 production, and possess anti-inflammatory properties [41]. In the protective effect observed in the acute *P. aeruginosa* infection mouse model due to inulin consumption, SCFAs could also regulate immunity, preventing mice from succumbing to excessive inflammation. Consistent with this, we observed a slight increase in the proportion of IL-10-producing CD8⁺ T cells in the lungs when the mice were on an inulin diet, supporting this hypothesis. We previously demonstrated that an inulin diet promotes IL-22, a cytokine involved in tissue repair, in the lamina propria of the gut [34]. It is conceivable that such modulation occurs at distant sites such as the lungs.

Beyond *P. aeruginosa* infection-related issues, the immune state of patients prior to any infection is a determining factor in clinical outcome. This has been exemplified by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic, where individuals with microbiota-related disorders (such as obesity and diabetes) were more prone to developing severe disease [42]. This can be attributed to pre-existing immune dysregulation (chronic systemic inflammatory state) and a compromised gut barrier, which facilitates the spread of the virus and subsequent multi-organ failure [43]. Both of these factors are associated with a dysbiotic state of the gut microbiota [44]. In a state of eubiosis, beneficial bacteria that are part of the microbiota produce key metabolites, notably SCFAs, which are crucial for gut health. SCFAs promote mucus production by goblet cells, preventing excessive inflammation [45]. The mucus acts as a barrier, shielding epithelial cells from bacteria and thus preventing tissue inflammation through Toll-like receptors (TLRs) and/or tissue damage caused by bacterial toxins [46]. SCFAs also possess anti-inflammatory properties [41], which help prevent autoimmunity and subsequent tissue damage. Additionally, SCFAs promote the expression of the tight junction protein by epithelial cells, maintaining the integrity of the intestinal barrier and preventing the translocation of bacteria or bacterial products from the gut lumen into the

bloodstream [45]. On the other hand, dysbiosis, characterized by a loss or reduction of beneficial bacteria and decreased or absent SFCA production, leads to a thinner mucus layer, a decrease in anti-inflammatory signals, and compromised barrier integrity, due to the downregulation of tight junctions. Dysbiosis promotes local and systemic inflammation, particularly through bacterial product translocation. This systemic inflammation can trigger metabolic syndromes such as insulin resistance, diabetes, and obesity. It has been demonstrated that the initial response to SARS-CoV-2 infection is crucial in rapidly reducing viral load and preventing a later exacerbated immune response that could be detrimental and even fatal for patients [43]. However, individuals with metabolic syndromes may already have a pre-existing chronic inflammation that impairs the initial anti-SARS-CoV-2 response. Importantly, since the virus has a tropism for the gut due to the expression of the angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in gut cells [47], a compromised gut epithelial barrier due to dysbiosis can facilitate viral propagation in the body. The virus can then reach vital organs, multiply, and cause death through immune exacerbation and multiple organ failure [43]. Similar scenarios could arise in future pandemics, especially if caused by an enterotropic pathogen (virus or bacteria) capable of eliciting exacerbated and harmful immune responses. Based on this knowledge and lessons learned, one can envision strategies to attenuate the severity and clinical outcome of viral and bacterial infections, as well as future pandemics, by promoting the optimization of the gut microbiota, particularly through nutritional intervention, within the general population. We believe that this should be given priority as a preventive strategy for various health issues, including infections. Inulin is a very interesting prebiotic for prevention, because it has been shown that this fiber could ameliorate mucus production, decrease gut permeability and reduce inflammation in obese patients [48]. Additionally, in line with our preclinical data, inulin profoundly modifies the composition of the gut microbiota in humans, in a bifidogenic manner [49]. Since inulin is a natural fiber, it is possible to enrich people's daily diet in a simple way by increasing the intake of inulin-rich vegetables and fruits, and/or through supplementation.

To conclude, our study has identified inulin as a promising fiber capable of triggering host immune reinforcement, which can protect certain individuals from lethal infections, in a microbiota- and $\gamma\delta$ T cell-dependent manner. This research provides the groundwork for promoting a fiber-rich diet among the general population as a significant preventive strategy against current and future infection-related issues. In order to exploit these findings for severe acute infections, it is imperative that we urgently identify the microbiota-derived metabolites involved to develop post-biotic metabolite-based immunotherapy.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/nu15133037/s1>, Figure S1: Flow cytometry gating strategy; Figure S2: CD45⁺ and CD3⁺ cell lung infiltration, upon *P. aeruginosa* infection. Figure S3: IFN γ - and IL-10-producing T cell lung infiltration, upon *P. aeruginosa* infection. Figure S4: CD45⁺ and CD3⁺ cell lung infiltration at steady state. Figure S5: Cytokine production by pulmonary and blood T Lymphocytes at steady state.

Author Contributions: Conceptualization, D.H., B.T. and E.B.; methodology, D.H.; validation, D.H., E.B. and C.P.; formal analysis, E.B., C.P. and D.H.; investigation, E.B., C.P., A.L.G. and D.H.; data curation, E.B., C.P. and D.H.; writing—original draft preparation, E.B., C.P. and D.H.; writing—review and editing, B.T.; supervision, D.H.; project administration, D.H.; funding acquisition, D.H. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: D.H. is supported by la Fondation du Souffle et de la Santé Respiratoire, GEFLUC Dauphiné-Savoie, Ligue contre le Cancer Comité Isère, Ligue contre le Cancer Comité Savoie, Université Grenoble Alpes IDEX Initiatives de Recherche Stratégiques, Université Grenoble Alpes IRGA grant program, and TIMC lab grant «Emergence 2023». E.B. is supported by a grant salary from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation. The funders had no role in study design, data collection, or analysis.

Institutional Review Board Statement: The animal study was reviewed and approved by “Comité d’Éthique pour l’Expérimentation Animale no.#12, Cometh-Grenoble” and approved by the Ministry of Research (APAFIS#21249-2019062715154462.v4).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Sylvie Berthier (Cytometry Platform, CHUGA), Hervé Lerat, Kevin Escot, and Laurie Arnaud (PHTA Animal Facility), for their technical assistance.

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

References

- Zaragoza, R.; Vidal-cortés, P.; Aguilar, G.; Borges, M.; Diaz, E.; Ferrer, R.; Maseda, E.; Nieto, M.; Nuvials, F.X.; Ramirez, P.; et al. Update of the Treatment of Nosocomial Pneumonia in the ICU. *Crit. Care* **2020**, *24*, 383. [[CrossRef](#)]
- Malhotra, S.; Hayes, D.; Wozniak, D.J. Cystic Fibrosis and Pseudomonas Aeruginosa: The Host-Microbe Interface. *Clin. Microbiol. Rev.* **2019**, *32*, e00138-18. [[CrossRef](#)]
- Tiew, P.Y.; Jaggi, T.K.; Chan, L.L.Y.; Chotirmall, S.H. The Airway Microbiome in COPD, Bronchiectasis and Bronchiectasis-COPD Overlap. *Clin. Respir. J.* **2021**, *15*, 123–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gellatly, S.L.; Hancock, R.E.W. Pseudomonas Aeruginosa: New Insights into Pathogenesis and Host Defenses. *Pathog. Dis.* **2013**, *67*, 159–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- López-Causapé, C.; Cabot, G.; del Barrio-Tofiño, E.; Oliver, A. The Versatile Mutational Resistome of Pseudomonas Aeruginosa. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 685. [[CrossRef](#)]
- World Health Organization. WHO Publishes List of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. *Saudi Med. J.* **2017**, *38*, 444–445.
- Liu, J.; Qu, H.; Li, Q.; Ye, L.; Ma, G.; Wan, H. The Responses of $\Gamma\delta$ T-Cells against Acute Pseudomonas Aeruginosa Pulmonary Infection in Mice via Interleukin-17. *Pathog. Dis.* **2013**, *68*, 44–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Omar, T.; Ziltener, P.; Chamberlain, E. Mice Lacking $\Gamma\delta$ T Cells Exhibit Impaired Clearance of Pseudomonas Aeruginosa Lung Infection and Excessive Production of Inflammatory Cytokines. *Infect. Immun.* **2020**, *88*, e00171-20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pan, T.; Tan, R.; Li, M.; Liu, Z.; Wang, X.; Tian, L.; Liu, J.; Qu, H. IL17-Producing $\Gamma\delta$ T Cells May Enhance Humoral Immunity during Pulmonary Pseudomonas Aeruginosa Infection in Mice. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2016**, *6*, 170. [[CrossRef](#)]
- Liu, J.; Feng, Y.; Yang, K.; Li, Q.; Ye, L.; Han, L.; Wan, H. Early Production of IL-17 Protects against Acute Pulmonary Pseudomonas Aeruginosa Infection in Mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **2011**, *61*, 179–188. [[CrossRef](#)]
- Giver, C.R.; Shaw, P.A.; Fletcher, H.; Kaushal, D.; Pamela, G.; Omoyege, D.; Bisson, G.; Gumbo, T.; Wallis, R.; Waller, E.K.; et al. IMPACT-TB*: A Phase II Trial Assessing the Capacity of Low Dose Imatinib to Induce Myelopoiesis and Enhance Host Anti-Microbial Immunity Against Tuberculosis. *Imatinib Mesylate per Oral As a Clinical Therapeutic for TB. *Blood* **2019**, *134*, 1050. [[CrossRef](#)]
- Wallis, R.S.; O'Garra, A.; Sher, A.; Wack, A. Host-Directed Immunotherapy of Viral and Bacterial Infections: Past, Present and Future. *Nat. Rev. Immunol.* **2023**, *23*, 121–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hurley, M.N.; Cámara, M.; Smyth, A.R. Novel Approaches to the Treatment of Pseudomonas Aeruginosa Infections in Cystic Fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2012**, *40*, 1014–1023. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Reig, S.; Le Gouellec, A.; Bleves, S. What Is New in the Anti-Pseudomonas Aeruginosa Clinical Development Pipeline Since the 2017 WHO Alert? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *12*, 862. [[CrossRef](#)]
- Belkaid, Y.; Harrison, O.J. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity* **2017**, *46*, 562–576. [[CrossRef](#)]
- Parigi, S.M.; Eldh, M.; Larssen, P.; Gabrielsson, S.; Villablanca, E.J. Breast Milk and Solid Food Shaping Intestinal Immunity. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 415. [[CrossRef](#)]
- Kamada, N.; Seo, S.U.; Chen, G.Y.; Núñez, G. Role of the Gut Microbiota in Immunity and Inflammatory Disease. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, *13*, 321–335. [[CrossRef](#)]
- Caffaratti, C.; Plazy, C.; Mery, G.; Tidjani, A.R.; Fiorini, F.; Thiroux, S.; Toussaint, B.; Hannani, D.; Le Gouellec, A. What We Know so Far about the Metabolite-Mediated Microbiota-Intestinal Immunity Dialogue and How to Hear the Sound of This Crosstalk. *Metabolites* **2021**, *11*, 406. [[CrossRef](#)]
- Li, Y.; Innocentin, S.; Withers, D.R.; Roberts, N.A.; Gallagher, A.R.; Grigorieva, E.F.; Wilhelm, C.; Veldhoen, M. Exogenous Stimuli Maintain Intraepithelial Lymphocytes via Aryl Hydrocarbon Receptor Activation. *Cell* **2011**, *147*, 629–640. [[CrossRef](#)]
- Rooks, M.G.; Garrett, W.S. Gut Microbiota, Metabolites and Host Immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **2016**, *16*, 341–352. [[CrossRef](#)]
- Trompette, A.; Gollwitzer, E.S.; Yadava, K.; Sichelstiel, A.K.; Sprenger, N.; Ngom-Bru, C.; Blanchard, C.; Jung, T.; Nicod, L.P.; Harris, N.L.; et al. Gut Microbiota Metabolism of Dietary Fiber Influences Allergic Airway Disease and Hematopoiesis. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 159–166. [[CrossRef](#)]
- Dang, A.T.; Marsland, B.J. Microbes, Metabolites, and the Gut-Lung Axis. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 843–850. [[CrossRef](#)]
- Collins, N.; Belkaid, Y. Control of Immunity via Nutritional Interventions. *Immunity* **2022**, *55*, 210–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bowerman, K.L.; Rehman, S.F.; Vaughan, A.; Lachner, N.; Budden, K.F.; Kim, R.Y.; Wood, D.L.A.; Gellatly, S.L.; Shukla, S.D.; Wood, L.G.; et al. Disease-Associated Gut Microbiome and Metabolome Changes in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 5886. [[CrossRef](#)]
- Kim, Y.J.; Lee, J.Y.; Lee, J.J.; Jeon, S.M.; Silwal, P.; Kim, I.S.; Kim, H.J.; Park, C.R.; Chung, C.; Han, J.E.; et al. Arginine-Mediated Gut Microbiome Remodeling Promotes Host Pulmonary Immune Defense against Nontuberculous Mycobacterial Infection. *Gut Microbes* **2022**, *14*, 2073132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

26. Kim, J.H.; Kim, D.H.; Jo, S.; Cho, M.J.; Cho, Y.R.; Lee, Y.J.; Byun, S. Immunomodulatory Functional Foods and Their Molecular Mechanisms. *Exp. Mol. Med.* **2022**, *54*, 1–11. [[CrossRef](#)]
27. Holmes, E.; Li, J.V.; Marchesi, J.R.; Nicholson, J.K. Gut Microbiota Composition and Activity in Relation to Host Metabolic Phenotype and Disease Risk. *Cell Metab.* **2012**, *16*, 559–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fehlbaum, S.; Prudence, K.; Kieboom, J.; Heerikhuisen, M.; van den Broek, T.; Schuren, F.H.J.; Steinert, R.E.; Raederstorff, D. In Vitro Fermentation of Selected Prebiotics and Their Effects on the Composition and Activity of the Adult Gut Microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3097. [[CrossRef](#)]
29. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert Consensus Document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) Consensus Statement on the Definition and Scope of Prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Dehghan, P.; Pourghassem Gargari, B.; Asgharijafarabadi, M. Effects of High Performance Inulin Supplementation on Glycemic Status and Lipid Profile in Women with Type 2 Diabetes: A Randomized, Placebo-Controlled Clinical Trial. *Health Promot. Perspect.* **2013**, *3*, 55–63. [[CrossRef](#)]
31. Li, Y.; Elmén, L.; Segota, I.; Xian, Y.; Tinoco, R.; Feng, Y.; Fujita, Y.; Segura Muñoz, R.R.; Schmaltz, R.; Bradley, L.M.; et al. Prebiotic-Induced Anti-Tumor Immunity Attenuates Tumor Growth. *Cell Rep.* **2020**, *30*, 1753–1766.e6. [[CrossRef](#)]
32. Cherbut, C. Inulin and Oligofructose in the Dietary Fibre Concept. *Br. J. Nutr.* **2002**, *87*, S159–S162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Ruiz, L.; Delgado, S.; Ruas-Madiedo, P.; Sánchez, B.; Margolles, A. Bifidobacteria and Their Molecular Communication with the Immune System. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Boucher, E.; Plazy, C.; Richard, M.L.; Suau, A.; Mangin, I.; Cornet, M.; Aldebert, D.; Toussaint, B.; Hannani, D. Inulin Prebiotic Reinforces Host Cancer Immunosurveillance via $\gamma\delta$ T Cell Activation. *Front. Immunol.* **2023**, *14*, 1104224. [[CrossRef](#)]
35. Toussaint, B.; Delic-Attree, I.; Vignais, P.M. Pseudomonas Aeruginosa Contains an IHF-like Protein That Binds to the AlgD Promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1993**, *196*, 416–421. [[CrossRef](#)]
36. Sivan, A.; Corrales, L.; Hubert, N.; Williams, J.B.; Aquino-Michaels, K.; Earley, Z.M.; Benyamin, F.W.; Lei, Y.M.; Jabri, B.; Alegre, M.L.; et al. Commensal Bifidobacterium Promotes Antitumor Immunity and Facilitates Anti-PD-L1 Efficacy. *Science* **2015**, *350*, 1084–1089. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Yao, Y.; Cai, X.; Fei, W.; Ye, Y.; Zhao, M.; Zheng, C. The Role of Short-Chain Fatty Acids in Immunity, Inflammation and Metabolism. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2022**, *62*, 1–12. [[CrossRef](#)]
38. Kim, C.H. Control of Lymphocyte Functions by Gut Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids. *Cell. Mol. Immunol.* **2021**, *18*, 1161–1171. [[CrossRef](#)]
39. Kelly, C.J.; Zheng, L.; Campbell, E.L.; Saeedi, B.; Scholz, C.C.; Bayless, A.J.; Wilson, K.E.; Glover, L.E.; Kominsky, D.J.; Magnuson, A.; et al. Crosstalk between Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids and Intestinal Epithelial HIF Augments Tissue Barrier Function. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 662–671. [[CrossRef](#)]
40. Herrmann, T.; Fichtner, A.S.; Karunakaran, M.M. An Update on the Molecular Basis of Phosphoantigen Recognition by V γ 9v δ 2 t Cells. *Cells* **2020**, *9*, 1433. [[CrossRef](#)]
41. Yang, W.; Yu, T.; Huang, X.; Bilotta, A.J.; Xu, L.; Lu, Y.; Sun, J.; Pan, F.; Zhou, J.; Zhang, W.; et al. Intestinal Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Regulation of Immune Cell IL-22 Production and Gut Immunity. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4457. [[CrossRef](#)]
42. Jabczyk, M.; Nowak, J.; Hudzik, B.; Zubelewicz-Szkodzińska, B. Microbiota and Its Impact on the Immune System in COVID-19—A Narrative Review. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 4537. [[CrossRef](#)]
43. Kim, H.S. Do an Altered Gut Microbiota and an Associated Leaky Gut Affect COVID-19 Severity? *MBio* **2021**, *12*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Rivera-Piza, A.; Lee, S.J. Effects of Dietary Fibers and Prebiotics in Adiposity Regulation via Modulation of Gut Microbiota. *Appl. Biol. Chem.* **2020**, *63*, 2. [[CrossRef](#)]
45. Ma, J.; Piao, X.; Mahfuz, S.; Long, S.; Wang, J. The Interaction among Gut Microbes, the Intestinal Barrier and Short Chain Fatty Acids. *Anim. Nutr.* **2022**, *9*, 159–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Herath, M.; Hosie, S.; Bornstein, J.C.; Franks, A.E.; Hill-Yardin, E.L. The Role of the Gastrointestinal Mucus System in Intestinal Homeostasis: Implications for Neurological Disorders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 248. [[CrossRef](#)]
47. Penninger, J.M.; Grant, M.B.; Sung, J.J.Y. The Role of Angiotensin Converting Enzyme 2 in Modulating Gut Microbiota, Intestinal Inflammation, and Coronavirus Infection. *Gastroenterology* **2021**, *160*, 39–46. [[CrossRef](#)]
48. Fernandes, R.; do Rosario, V.A.; Mocellin, M.C.; Kuntz, M.G.F.; Trindade, E.B.S.M. Effects of Inulin-Type Fructans, Galacto-Oligosaccharides and Related Synbiotics on Inflammatory Markers in Adult Patients with Overweight or Obesity: A Systematic Review. *Clin. Nutr.* **2017**, *36*, 1197–1206. [[CrossRef](#)]
49. Ramirez-Farias, C.; Slezak, K.; Fuller, Z.; Duncan, A.; Holtrop, G.; Louis, P. Effect of Inulin on the Human Gut Microbiota: Stimulation of Bifidobacterium Adolescentis and Faecalibacterium Prausnitzii. *Br. J. Nutr.* **2009**, *101*, 541–550. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Stimulation of the immune system by a tumor antigen-bearing adenovirus-inspired VLP allows control of melanoma growth

Solène Besson,¹ Emilie Boucher,² David Laurin,^{3,4} Olivier Manches,^{3,4} Caroline Aspard,^{3,4} Dalil Hannani,² and Pascal Fender¹

¹CNRS, University Grenoble Alpes, CEA, UMR5075, Institut de Biologie Structurale, 38042 Grenoble, France; ²University Grenoble Alpes, CNRS, UMR 5525, VetAgro Sup, Grenoble INP, TIMC, 38000 Grenoble, France; ³Institute for Advanced Biosciences, Immunobiology and Immunotherapy in Chronic Diseases, INSERM U 1209, CNRS UMR 5309, Université Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France; ⁴R&D Laboratory, Etablissement Français du Sang Auvergne-Rhône-Alpes, 38000 Grenoble, France

Virus-like particles (VLPs) are versatile protein-based platforms that can be used as a vaccine platform mainly in infectiology. In the present work, we compared a previously designed, non-infectious, adenovirus-inspired 60-mer dodecahedral VLP to display short epitopes or a large tumor model antigen. To validate these two kinds of platforms as a potential immunostimulating approach, we evaluated their ability to control melanoma B16-ovalbumin (OVA) growth in mice. A set of adjuvants was screened, showing that polyinosinic-polycytidylic acid (poly(I:C)) was well suited to generate a homogeneous cellular and humoral response against the desired epitopes. In a prophylactic setting, vaccination with the VLP displaying these epitopes resulted in total inhibition of tumor growth 1 month after vaccination. A therapeutic vaccination strategy showed a delay in grafted tumor growth or its total rejection. If the “simple” epitope display on the VLP is sufficient to prevent tumor growth, then an improved engineered platform enabling display of a large antigen is a tool to overcome the barrier of immune allele restriction, broadening the immune response, and paving the way for its potential utilization in humans as an off-the-shelf vaccine.

INTRODUCTION

Despite the genomic vaccine revolution seen during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic,¹ protein-based vaccines remain attractive because of their low cost of production, ease of transport and storage, and better social acceptance. Virus-like-particles (VLPs) are non-infectious nanoparticles that assemble spontaneously, mimicking their corresponding virus and, thus, their immunogenicity. Two of the best known examples are the surface antigen of hepatitis B virus (HBV)² and the structural L1 protein of the human papillomavirus (HPV), which elicit antibodies preventing virus-induced cervical cancer from different HPV types.³ Beyond this, VLPs can be used as a scaffold for display of epitopes derived from other biological targets. The immunogenicity is highly increased through presentation to the immune system in a multimeric manner, and a number of vaccine platforms have been developed to this aim,

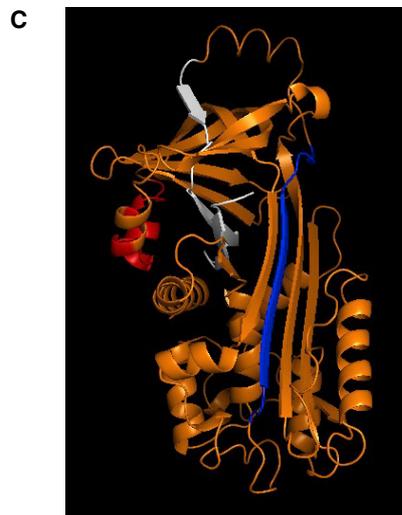
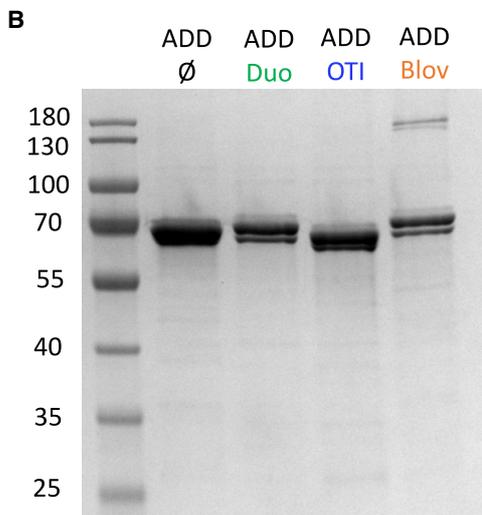
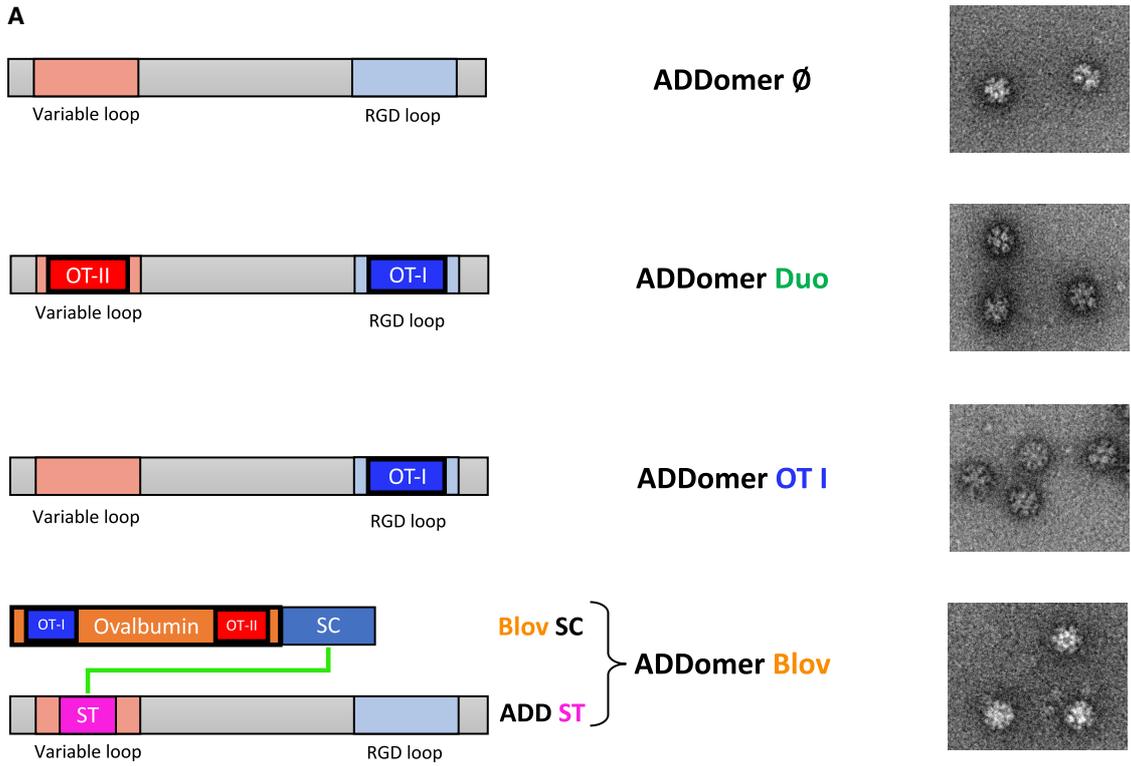
with various advantages and limitations.⁴ One advantage is that the small size of VLPs (less than 100 nm) permits efficient drainage to the lymph nodes, which can favor the immune response.^{5,6} Formulation with an adequate adjuvant, such as inorganic salts (alum), an oil emulsion (MF59), or a lipid A component (monophosphoryl lipid [MPL]) is often used and depends on the platform/antigen tandem and the targeted application.⁷

From a manufacturing point of view, two main approaches can be considered for presentation of epitopes at the VLP surface. Chemical cross-linking has been reported to induce a good titer of neutralizing antibodies but makes the manufacturing workflow more complex and increases the cost of production. Genetic insertion of the epitope into the VLP enables an easier way of production and purification but may face the risk of epitope misfolding and/or VLP self-assembly issues during production. Because this limitation increases with the size and complexity of the epitope to be inserted, large antigen display cannot be considered using this approach. To overcome this issue, a two-component system called SpyTag/SpyCatcher (ST/SC) has been developed. In this system, derived from *Streptococcus pyogenes*, an aspartate residue from the 13-amino-acid ST peptide genetically inserted in the VLP can spontaneously create a covalent bond with a lysine residue in the complementary SC module that can be fused to large antigens.^{8–11}

We have reported previously that a non-infectious VLP derived from the human adenovirus of type 3 and consisting of 60 identical penton base monomers could be exploited to display epitopes of interest on its surface.^{6,12,13} In this vaccine platform, called adenovirus dodecamer (ADDomer), exposed loops of the penton base protein were engineered to allow insertion of foreign peptides, such as a linear neutralizing epitope from chikungunya virus. However, this design did not permit insertion of structurally complex antigens. To

Received 31 August 2022; accepted 5 December 2022;
<https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.12.003>.

Correspondence: Pascal Fender, CNRS, University Grenoble Alpes, CEA, UMR5075, Institut de Biologie Structurale, 38042 Grenoble, France.
E-mail: pascal.fender@ibs.fr



D

GSI GAASMEFCFDVFKELKVH HANETIFYCPIAIMSALAMVYLGA KDSTR TQINKVVRFDKLPFGFDSIEAQC GTSVNVHSSLRDILNQJTKPN DVVSF
 SLASRLYA EERYPI LPEYLQCVKELYRGGLEPINFQTAADQARELINSWVESQTNGIIRNVLQPSSVDSQTAMV LVNAIVFKGLWEKAFKDED TQAMP
 FRVTEQESKPVQMMYQIGLFRVASMASEKMKILEL PFASGTMSMLVLLPDEVSGLEQL ESIINFEKLT EWTS S NVMEERKIKVYLP RMKMEEKYNLT
 FVLMAMGITDV FSSANLSGISSAESLKI SQAVHAAHAEINEAGR EVVGSAEAGVDAASV ASGGTVDTL SGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRD
 EDGKELAGATMELRDSSGKTISTWISDGQV KDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQQGQTVNGKATKGD AHIGSGHHHHHH

(legend on next page)

overcome this limitation while keeping the immunogenicity advantage of ADDomer, we redesigned this platform by genetically inserting an ST. Spontaneous display of large and structurally complex antigens with potential post-translational modifications, such as the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) receptor binding domain (RBD) fused to the SC was achieved. This system has proven to be highly effective to elicit potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2.¹⁴

In this work, we assess the potential of these two vaccine platforms (direct epitope display and large antigen fusion via SC) in the context of cancer immunotherapy, using the melanoma B16-ovalbumin (OVA) model in mice. An investigation of the cellular immune response underlying tumor growth control is also performed.

RESULTS

MHC class I and class II OVA epitopes can be displayed successfully on the ADDomer surface

The ADDomer is a non-infectious nanoparticle formed of 12 bricks of the homopentameric penton base from the human adenovirus type 3. Two exposed loops can be used for insertion of epitopes: the variable loop (VL) and the RGD (Arg-Gly-Asp) loop (RGD-L). The major histocompatibility complex (MHC) class I epitope (SIINFEKLTEWTS, called OT-I) and the MHC class II epitope (ISQAVHAHAIEI NEAGR, called OT-II) from the OVA were genetically inserted into the RGD-L and VL respectively. These two epitopes have been chosen to initiate a CD8⁺ T lymphocyte immune response (via the epitope OT-I presented to CD8 by dendritic cells) as well as a CD4⁺ T lymphocyte immune response (via the epitope OT-II presented to CD4⁺ T cells by dendritic cells). Because of the spontaneous homooligomerization of the 12-pentameric penton bases, 60 copies of each epitope are exposed on the surface of the ADDomer particle, called ADDomer-Duo (ADD-Duo) (Figure 1A). The ADD-Duo was successfully produced in a baculovirus expression system and purified in two steps (Figure 1B). Negative-stain electron microscopy showed that particles harboring these two epitopes were well folded (Figure 1A). An ADDomer displaying only the OT-I epitope was also generated.

Immunization with ADD-Duo in combination with the poly(I:C) adjuvant elicits a potent cellular and humoral anti-OVA response compared with the other adjuvants used

We aimed to define the best adjuvant to use in combination with the ADDomer vaccine. To do so, mice were vaccinated with ADD-Duo without or with a different set of adjuvants according to a prime-boost schedule (Figures 2A and 2B). Mice vaccinated with an “empty”

ADDomer (ADD-Ø; i.e., an ADDomer that does not display any OVA epitopes) were used as a control. For the adjuvant screening, three different adjuvants were screened separately or in combination (i.e., the three adjuvants together). These different adjuvants aim to target different Toll-like receptors (TLRs) on the three human dendritic cells subtypes (Figure 2B), each of them being representative of one subset. MPLA targets the TLR4 mostly present on cDC2, poly(I:C) (polyinosinic-polycytidylic acid) targets the TLR3 mostly present on cDC1, and ODN 2395 (oligodeoxynucleotide containing an unmethylated CpG motif) targets the TLR9 mostly present on pDC (plasmacytoid Dendritic Cell). To define the best ADD-Duo/adjuvant combination, mice were split into 6 groups (Figure 2B). On day 14, mice were sacrificed, and their immune response was analyzed in their circulating blood, spleen, and injection site-draining lymph nodes (Figure 2A).

The frequency of antigen-specific CD8⁺ T cells has been determined in the draining lymph nodes and the spleen using a dextramer staining. Poly(I:C) alone was the adjuvant that gave the most homogeneous anti OT-I immune response in the draining lymph nodes (Figure 2C). In the spleen, it was more difficult to determine the best combination because two mice of three in group 5 (poly(I:C)) showed a similar response as the other groups. However, the third mouse of this group showed the highest percentage of specific CD8⁺ T lymphocytes compared with all other mice of all groups.

Humoral response against the OT-II peptide was also investigated by ELISA (Figure 2D). Again, poly(I:C) gave the highest responses, and the combination of the three adjuvants together did not significantly improve the response compared with poly(I:C) alone (Figure 2D).

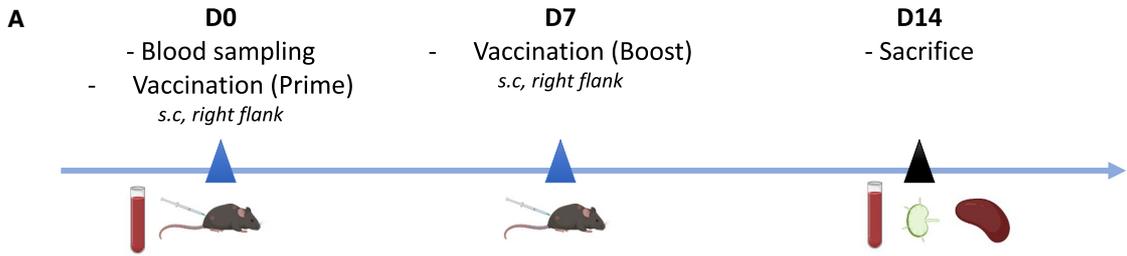
The results show that the association of the three adjuvants did not give a better response (cellular and humoral) than poly(I:C) alone. In particular, in the draining lymph nodes, the response obtained with the association of the three adjuvants is lower than the one obtained for poly(I:C) alone. This suggests that the cDC1 subset was probably the main dendritic cell (DC) subset involved in mounting an immune response against the epitopes displayed by the ADDomer. Poly(I:C) is thus a well-suited adjuvant for ADDomer vaccination *in vivo*. This is in line with other studies using poly(I:C) for therapeutic anti-cancer vaccines.^{15,16}

Immunization with ADDDuo+poly(I:C) protects against B16-OVA tumor challenge

To assess the functionality of antigen-specific T cells induced by ADDomer vaccination, vaccinated mice were challenged with a

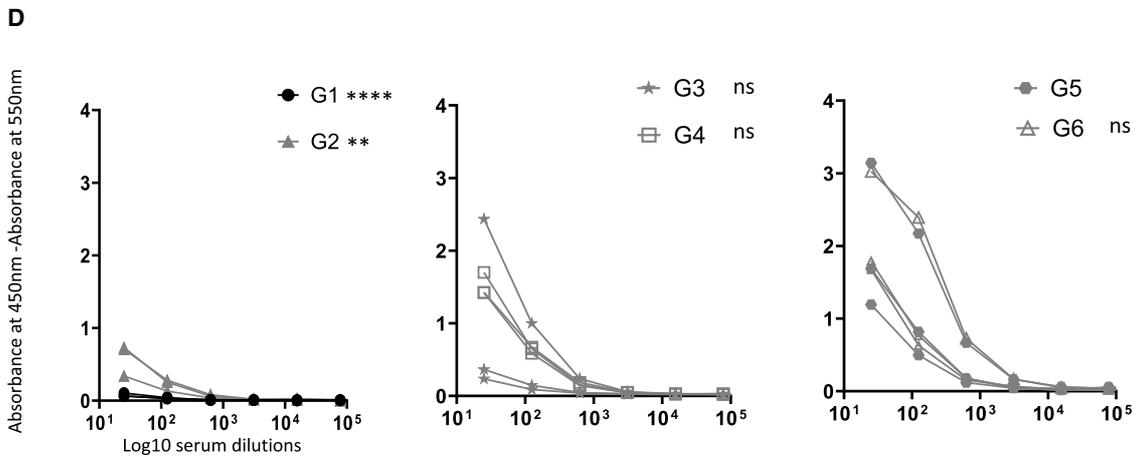
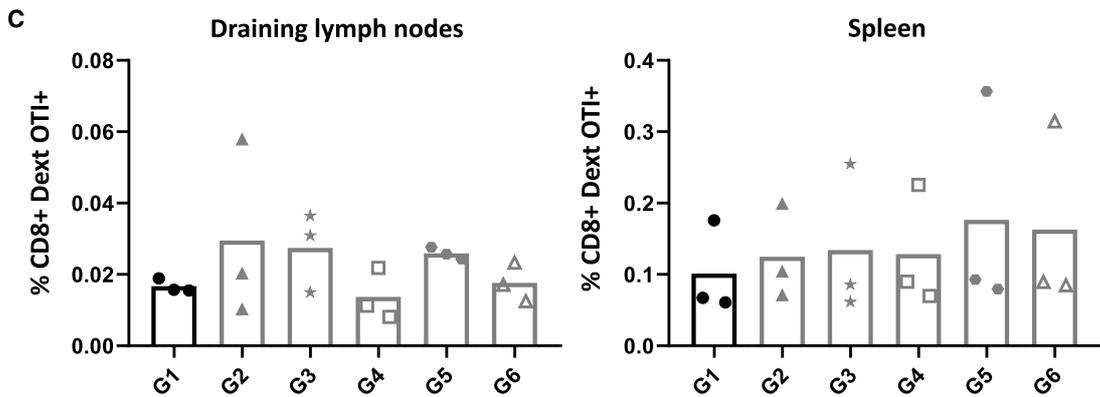
Figure 1. Design and characterization of ADD-Ø, ADD-Duo, ADD-OT-I, and ADD-Blov

(A) Diagram showing the insertion of epitopes (OT-I, blue; OT-II, red) and SpyTag (ST; pink) in the 2 loops of the ADDomer monomer. ST (pink) can make an isopeptidic bond with SpyCatcher (SC; blue) fused to the OVA protein (orange) containing the OT-I and OT-II epitopes. Negative-stain electron micrographs of ADD-Ø, ADD-Duo, ADD-OT-I, and ADD-Blov (bar, 30 nm) are shown on the right. (B) SDS-PAGE profile of reduced and boiled samples of ADD-Ø, ADD-Duo, ADD-OT-I, and ADD-Blov, showing a higher-molecular weight (MW) covalent adduct for the ADD-Blov (ADD-ST/Blov-SC). (C) Structure of the OVA protein with the epitopes OT-I and OT-II highlighted, respectively, in blue and red. The protein structure colored in white was removed and replaced by the SC to give the Blov-SC protein. (D) Sequence of Blov-SC with OVA (orange; OT-I and OT-II epitopes highlighted, respectively, in blue and red), SC (blue), and additional linkers and histidine tag (black).



B

Groups	Vaccinations	DC subset(s) targeted with the adjuvant(s)
G1	ADDomer \emptyset	/
G2	ADDomer Duo	/
G3	ADDomer Duo + ODN 2395	pDC
G4	ADDomer Duo + MPLA	cDC2
G5	ADDomer Duo + Poly I:C	cDC1
G6	ADDomer Duo + ODN 2395 + MPLA + Poly I:C	pDC + cDC2 + cDC1



(legend on next page)

subcutaneous OVA-expressing tumor inoculation (prophylactic setting). Mice were vaccinated 5 times every 2 or 3 days with ADD-Duo+poly(I:C) (Figure 3A). ADD-Ø was used as a control (Figure 3B). Nearly 4 weeks (25 days) after the last injection, mice were challenged with subcutaneous implantation of the tumor cell line B16-OVA. This cell line expresses the OVA antigen containing the two epitopes OT-I and OT-II, which are displayed on ADD-Duo.

Tumor growth was monitored, and mice were sacrificed on day 17, when the first tumor reached the ethical tumor size limit. Mice that received ADD-Ø developed tumors, whereas mice that received ADD-Duo did not have visible tumors on day 17. (Figure 3C). This result shows that the immune response induced by vaccination was specific to the tumor antigens borne by the vehicle and not due to an indirect stimulating response triggered by the vehicle itself. Remarkably, even though a gap of nearly 4 weeks passed between the last vaccination and the challenge, none of the mice showed tumor growth, reflecting that a robust response was mounted during this immunization period.

Large OVA antigen can be successfully displayed on the ADDomer's surface

To get rid of the allelic restriction and elicit a multi-specific anti-tumor response, display of large antigens rather than small epitopes on the ADDomer surface is desirable. To do so, an ADDomer displaying the ST peptide (ADD-ST) on its surface was used to spontaneously make an isopeptidic bond with an SC fused to the OVA protein (1–355), called binder long OVA (Blov), containing the OT-I and OT-II epitopes (Figures 1A and 1D). The OVA C terminus sequence (356–396, colored white in Figure 1C) buried in the protein was removed and replaced with the SC prolonged with a histidine tag. This OVA C-terminus deletion aimed to make the SC more accessible to the ST to favor Blov-SC assembly to ADD-ST. A melittin signal peptide was added to Blov fused to SC (Blov-SC) to allow protein post-translational modifications (PTMs), such as glycosylations and secretion from insect cells. ADD-ST and Blov-SC were produced separately in insect cells using the baculovirus expression system.

Covalent binding of Blov-SC to ADD-ST was assessed by SDS-PAGE. As expected, an adduct of a higher molecular weight corresponding to Blov-SC bound to the ADD-ST monomer was clearly seen (Figure 1B). This faint band, observed around 180 kDa, reflects weak binding of Blov-SC to ADD-ST (3 Blov-SCs per ADD-ST particle), which is lower than the theoretical ratio used for incubation (ratio of 4:1, meaning 15 Blov-SCs per ADD-ST particle). Electron micrographs showed that particles remained intact after antigen binding (Figure 1A).

Therapeutic vaccination with ADD-Duo, ADD-OT-I, and ADD-Blov drastically decreases tumor growth and improves mouse survival

To assess the efficacy of the ADDomer vaccine in a therapeutic setting, mice were vaccinated 5 times every 2–3 days with ADD-Duo, ADD-OT-I, and ADD-Blov from 1 day after tumor inoculation. ADD-Ø was used as a control, and all ADDomers were injected with poly(I:C) (Figures 4A and 4B). Each group was composed of 12 mice; 6 were euthanized on day 15 to evaluate immunological responses and the others (5 or 6 per group according to the success of tumor implantation) when the maximal ethical tumor size was reached to investigate the long-term clinical response.

On day 15, mice vaccinated with ADD-Duo, ADD-OT-I, and ADD-Blov had a significantly smaller tumor than mice vaccinated with ADD-Ø. For example, on day 15, the mean tumor size for the ADD-Ø group was 81.7 mm² versus 16.8 mm² for the ADD-Duo group (Figure 4C). Visual inspection showed a massive difference in tumor size between the ADD-Ø and ADD-OT-I groups (Figure 4D, center panel). Macroscopic observation showed a well-vascularized tumor in mice vaccinated with ADD-Ø, whereas a much smaller and very poorly vascularized tumor was seen in mice vaccinated with ADD-OT-I (Figure 4D, left and right panel, respectively).

Cellular response was investigated (Figures 5 and S2). In the spleen, a higher OVA-specific CD8⁺ T cell frequency was observed with the ADD-Duo and ADD-OT-I groups compared with the ADD-Ø group. However, the difference between the ADD-Blov and ADD-Ø groups was not significant (Figure 5A, left). In the tumor, tumor-infiltrating OVA-specific CD8⁺ T cell frequency was higher with the ADD-Duo, ADD-OT-I, and ADD-Blov groups versus the ADD-Ø group (Figures 5A, right, and 5B). This observation could only be made on one tumor for the treated groups (ADD-Duo, ADD-OT-I, and ADD-Blov) because only one tumor was available for analysis as a result of the high efficiency of the vaccination regarding tumor growth. A similar trend was observed in the spleen and in the tumor when looking at the absolute number of OVA-specific CD8⁺ T lymphocytes (Figure 5C).

Therapeutic vaccination improves mouse survival in all vaccinated groups and notably for the group of mice vaccinated with ADD-OT-I and ADD-Blov (Figure 6A). Individual tumor growth experiments showed that all tumors were well controlled, even over 60 days of follow up, and only one mouse from two groups escaped from immunological control (Figure 6B, groups ADD-OT-I and ADD-Blov).

DISCUSSION

In this study, we assessed the potential use of an adenovirus-inspired non-infectious VLP as a potential therapeutic anticancer vaccine. The

Figure 2. ADD-Ø and ADD-Duo immunogenicity evaluation and adjuvant screening

(A) Immunization schedule, blood sampling, and organ collection for all groups. s.c., subcutaneous. (B) Different groups were evaluated regarding the immunogenicity of ADD-Ø (G1), ADD-Duo (G2), ADD-Duo + 1 adjuvant (G3, G4, G5), and ADD-Duo + 3 adjuvants (G6). (C) Percentage of CD8⁺ dextramer OT-I⁺ T lymphocytes in the draining lymph nodes and spleen for all groups (n = 3). (D) Ab response against OT-II peptide on day 14 (n = 3).

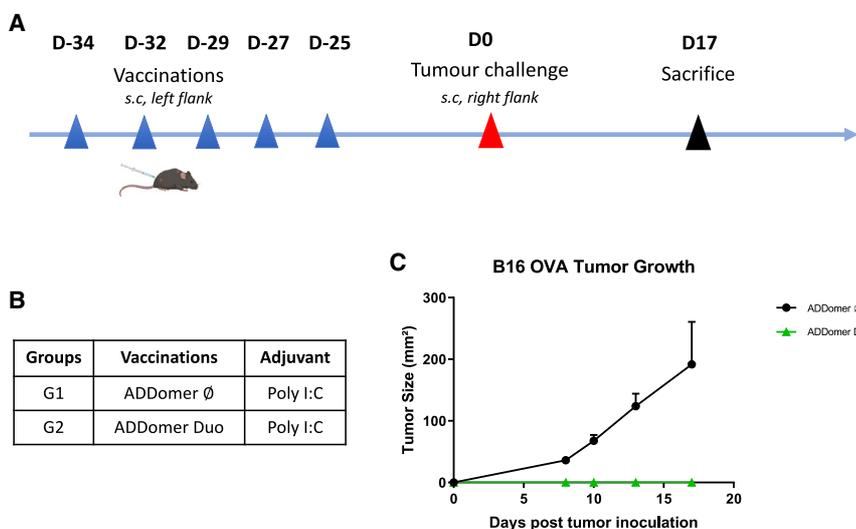


Figure 3. Tumor challenge of mice vaccinated previously with ADD-Ø and ADD-Duo

(A) Immunization and tumor challenge schedule for all groups. (B) Different groups were evaluated regarding the protective effect of ADD-Ø (G1) and ADD-Duo (G2) against a tumor challenge. Both ADDomers were injected with the poly(I:C) adjuvant, and the tumor challenge was performed using the B16-OVA cell line. (C) Tumor size evolution days after tumor inoculation ($n = 3$).

investigated VLP originally results from spontaneous assembly of 12 homopentameric penton bases from a human adenovirus of type 3 (HAdV-B3).¹⁷ Engineering of this 60-mer VLP, called ADDomer, enabled easy and rapid genetic insertion of short epitopes at two different locations of the particle surface. This vaccine platform has been shown recently to trigger a significant neutralizing humoral response against a 19-amino-acid epitope from chikungunya virus.⁶

OVA is a well-characterized antigen encompassing the immunodominant MHC class I-restricted OVA_{257–264} (SIINFEKL) and the MHC class II-restricted OVA_{323–339} (ISQAVHAAHAEINEAGR) epitopes. This OVA system is often used to investigate the immunization potential of novel vaccine platforms or vaccine candidates against different cancers, including melanoma.^{18–20} To bind the MHC class I proteins, class I epitopes must be processed by the proteasome into 8- to 10-amino-acid peptides. Because the cleavage efficiency is influenced by the flanking regions,^{21,22} special attention must be paid to the directly neighboring epitope. It is known that small amino acid residues, such as glycine or alanine, favor antigen processing by the proteasome.²³ Here we genetically inserted the MHC class I OVA epitope flanked by GSGG linkers alone in the RGD-L or in combination with an MHC class II OVA epitope in the VL (Figure 1A). In both cases, the VLPs displaying MHC class I alone or both epitopes at once resulted in nicely folded VLPs, as seen by transmission electron microscopy (Figure 1A).

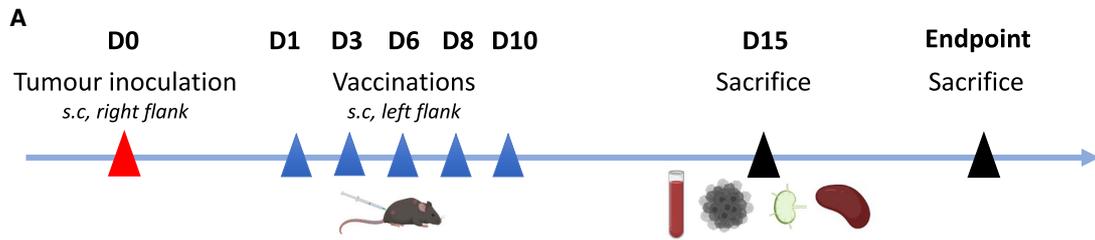
To obtain an optimized vaccine formulation, it is often necessary to combine an adjuvant to the vaccine platform/antigen tandem. Adjuvants enhance the magnitude, breadth, and durability of the immune response and can orient the balance between the humoral and cellular response.²⁴ Despite identification of TLRs expressed on DCs sensing the different pathogen-associated molecular patterns (PAMPs),^{25,26} the choice of adjuvant is still empirical. The immune response triggered by ADD-Duo occurred in the absence or presence of a set of adjuvants known to activate different subsets of DCs. ODN 2395, MPLA,

and poly(I:C), activating pDC, cCD2, and cCD1, respectively, were tested (Figure 2). Poly(I:C) gave the most homogeneous OVA-specific CD8 response in the draining lymph nodes and spleen as well as a good humoral response against the MHC class II OVA epitope. Poly(I:C) has been reported to interact with TLR3²⁷ and is

often used in cancer immunotherapy trials²⁸ because it triggers potent Th1-mediated anti-tumor immunity through cDC1 targeting.

In a first attempt, we studied the possibility of preventing tumor growth in vaccinated mice. For this purpose, immunizations were performed with ADD-DUO in the presence of poly(I:C) with a delay of 25 days between the last injection and tumor implantation. Tumor growth was monitored until the ethical endpoint was reached. Contrary to the rapid increase in tumor size seen in the group vaccinated with the empty ADDomer (i.e., vehicle not displaying OVA epitopes), no tumors were seen in mice vaccinated with ADD-Duo (Figure 3C). This result shows that the anti-tumor effect was indeed due to the epitope displayed by the vector and not due to non-specific activation of the immune system. This protection seems to last for a long time because there was a delay of 25 days between the last immunization and tumor implantation, suggesting elicitation of a potent memory CD8⁺ T cell response.

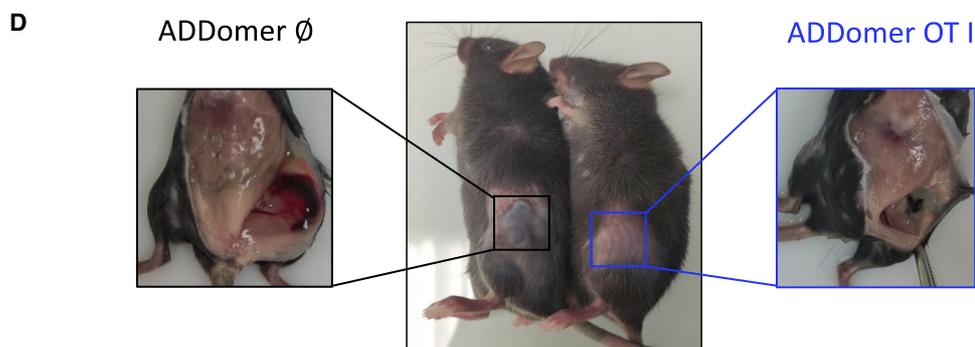
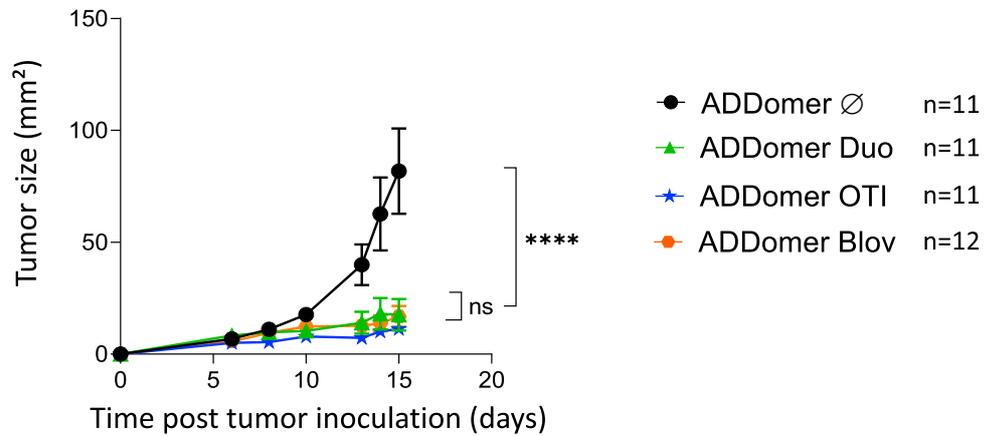
Genetic insertion of sequences coding short epitopes, such as OT-I and OT-II (14 and 17 residues, respectively), in the two exposed loops of the ADDomer did not affect the overall particle structure (Figure 1A), and the slightly faster migration of OT-I compared to ADDomer-Ø is likely due to its sequence composition²⁹ because mass spectroscopy analyses confirmed the exact molecular weight of these two constructs. In humans, an epitope-based vaccine would represent an important limitation because use is restricted to a particular HLA-bearing population (for instance an HLA-A2-restricted epitope-based vaccine would be suitable only for around 40% of the European population). It would be desirable to overcome this limitation by developing a fully protein-based vaccine, enabling epitope presentation in all individuals (i.e., developing an off-the-shelf vaccine).³⁰ Thus, displaying large antigens rather than short epitopes would be valuable. Unfortunately, genetic insertion of large folded antigens results in subunit misfolding and insolubility.³¹ Villegas et al.^{20,32} have shown that the OVA_{248–376} antigen could be fused to



B

Groups	Mice number	Vaccinations	Adjuvant	Mice sacrificed at D15	Mice sacrificed at endpoint
G1	12	ADDomer Ø	Poly I:C	6	6
G2	12	ADDomer Duo	Poly I:C	6	6
G3	12	ADDomer OTI	Poly I:C	6	6
G4	12	ADDomer Blov	Poly I:C	6	6

C B16 OVA melanoma tumor growth



(legend on next page)

WW domains (containing two conserved tryptophans) to make interactions with the adenovirus PPxY sequences in the adenovirus penton base. However, this non-covalent interaction relied on a relatively low K_D (65 nM)³³ that did not warrant a homogeneous batch required for clinical trials. To overcome this limitation, insertion of an ST (13 residues) in the exposed loops of the ADDomer has been reported to permit spontaneous and covalent attachment of large and correctly folded antigens, such as the SARS-CoV-2 RBD, to the particle.^{8,14} Fusion of OVA₁₋₃₅₅ (Blov) to the SC successfully resulted in display of this antigen to the vaccine platform (Figures 1A and 1B).

Therapeutic vaccination where tumor implantation occurred prior to vaccination has been performed using an ADDomer with genetic epitope insertion and large OVA antigen display using the ST/SC system. Both systems were efficient at preventing B16-OVA tumor growth (Figure 4C). The different OVA-bearing VLPs (30 nm for the undecorated particle) are within the size range (20–200 nm) of particles readily drained to lymph nodes, potentiating uptake by antigen-presenting cells and cross-presentation.^{34,35} These immunizations seemed to elicit robust and sustained immune responses capable of rejecting the highly aggressive B16-OVA melanoma in prophylactic and therapeutic strategies (Figures 3 and 4).

Because CD8⁺ T cells are key players in immuno-oncology, most efforts in vaccine development focus on generation of this response by improving antigen delivery and presentation on the DC surface for the initial T cell encounter.³⁶

In our experiments, immunological characterization showed a significant OVA-specific CD8⁺ T cell response in the spleen of mice vaccinated with ADD-Duo and ADD-OT-I (Figures 5A and 5C). A similar tendency was also observed in the only residual tumor where this analysis was feasible (Figures 5B and 5C). However, because of the low number of mice presenting a tumor with a size suitable for this analysis, we cannot draw a solid conclusion regarding this observation. Surprisingly, the anti-OT-I CD8⁺ T cell response in the spleen of mice vaccinated with ADD-Blov was not significant compared with control ADD-Ø. By contrast, this response seemed to be significant compared with the control group within the tumor (4.08% versus 0.28%). Despite the low amount of tumor material that could be analyzed in the ADD-Blov group, this tendency is highly supported by tumor growth control as well as long-term mouse survival (Figures 4C and 6A, respectively). In Blov mice, multi-specific immune responses could have been triggered, improving the tumor control, even though such multi-specific responses were not investigated here (only response against a single epitope was investigated). Such

multi-specific responses could be investigated through cytokine production upon *ex vivo* T cell restimulation with APC loaded with OVA.

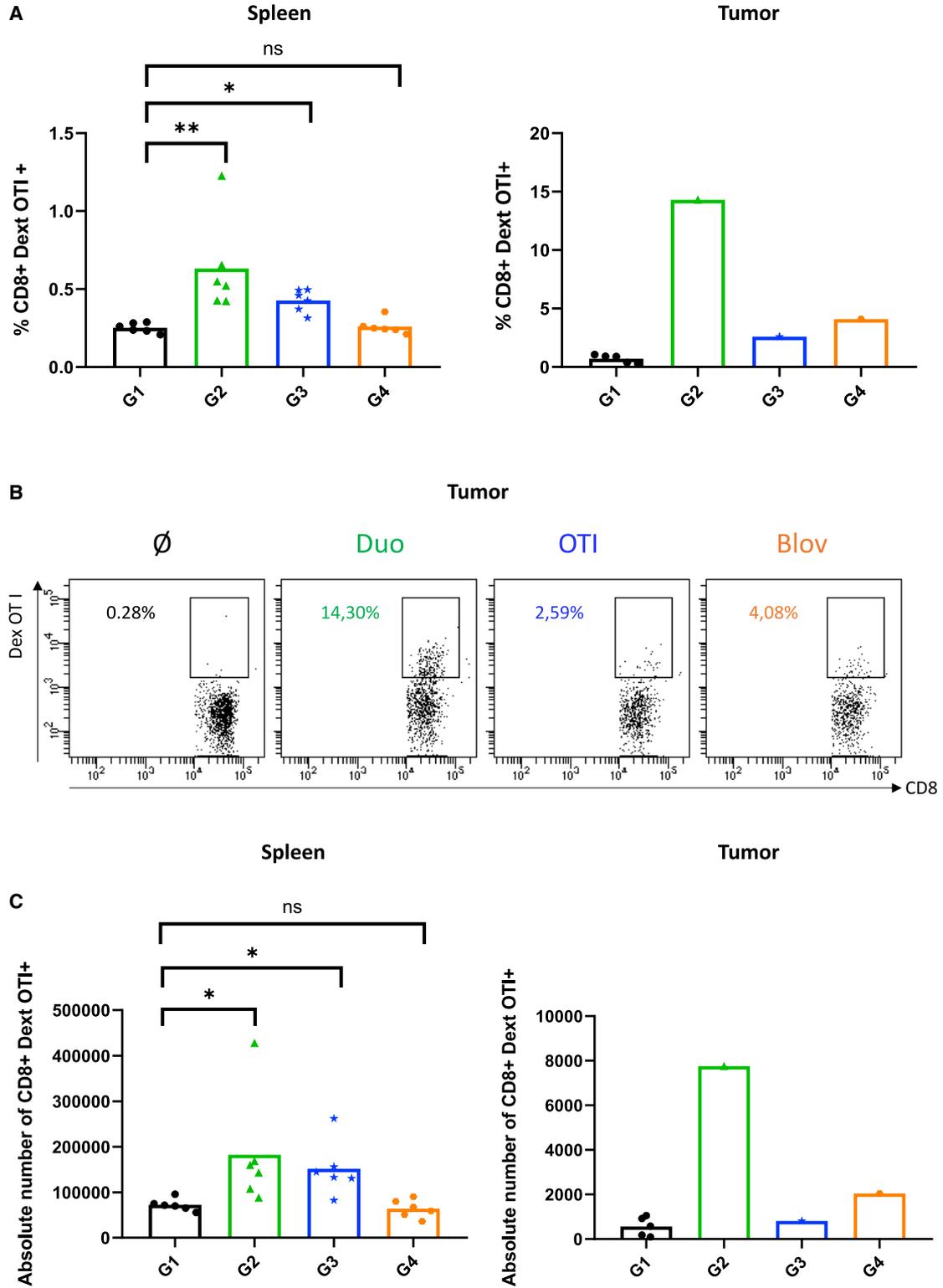
Another unexpected feature was the presence of a strong, anti-OVA CD8⁺ T cell response in the spleen and in measurable tumors of mice vaccinated with ADD-Duo, which was not correlated with the long-term survival curves. We propose two possible hypotheses to explain these data: generation of regulatory T cells and/or tumor escape. It is conceivable that addition of a unique CD4⁺ T cell epitope, as opposed to ADDomer-OT-I or full OVA protein, triggered a regulatory T cell response which, in turn, impaired efficient anti-tumor immunity despite a high proportion of anti-OVA CD8⁺ T cells. Another explanation could be tumor escape from anti-OVA CD8⁺ T cells by MHC class I loss and/or strong immune checkpoint expression. The ADD-Duo vaccine triggered the highest immunization in spleen and tumor (Figure 5). One can imagine that, upon strong immune pressure, tumor cell clones lacking MHC class I expression were selected and/or that OVA-specific T cell-derived interferon γ (IFN γ) triggered high PD-L1 expression by tumor cells, leading to their inhibition and subsequent tumor escape. To address these hypotheses, fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of OVA-specific FoxP3 regulatory T cells as well as MHC class I, PD-L1, and PD-1 expression would be required.

Our data show that the ADDomer is well suited to mount an efficient anti-tumoral response. Genetic insertion of epitopes directly in the ADDomer loops is based on single-particle expression but limited to short epitopes, thus restricting its use to personalized medicine or stratified patients. Display of large antigen required expression of ADD-ST and the large cargo fused to the SC. Because of the autocatalytic reaction, simple addition of both components resulted in “ready-to-use” immunotherapy applicable to a large population. With this latter strategy, a mosaic vaccine displaying several different antigens at once can be produced,^{37,38} paving the way for next-generation products with a broader immunological spectrum for off-the-shelf cancer immunotherapy.

Improvement of the technology can be envisioned to combine our platform with other therapeutic strategies, such as oncolytic viruses (OVs). Indeed, a similar approach has already been reported with oncolytic adenovirus encoding OVA or melanoma epitopes directly into the tumor.³⁹ It could be feasible to combine the respective advantages of OVs and particle display by designing an oncolytic adenovirus encoding the ADDomer-ST and the antigen of interest fused to an SC to benefit from tumor lysis and *in situ* immune stimulation.

Figure 4. Effect of therapeutic vaccination with ADDomers on B16-OVA tumor growth

(A) Tumor inoculation, immunization, blood sampling, and organ collection for all groups. (B) Different groups were evaluated regarding the therapeutic effect of ADD-Ø (G1), ADD-Duo (G2), ADD-OT-I (G3), and ADD-Blov (G4). ADDomers were injected with the poly(I:C) adjuvant, and tumor inoculation was performed using the B16-OVA cell line. Each group is composed of 12 mice; 6 were sacrificed on day 15 to evaluate the short-term clinical and immunological response, and the remaining mice (n = 5 for ADD-Ø/Duo/OT-I, n = 6 for ADD-Blov) were sacrificed when the endpoint was reached to investigate a long-term response. (C) Tumor size evolution days after tumor inoculation (n = 11 for ADD-Ø/Duo/OT-I, n = 12 for ADD-Blov). (D) Photographs showing the difference in tumor size and aspect on mice vaccinated with ADD-Ø or ADD-OT-I.



(legend on next page)

MATERIALS AND METHODS

Baculovirus production

The baculovirus expression system was used for production of the different ADDomers (ADD-Ø, ADD OT-I, ADD-Duo, and ADD-ST) and for OVA fused to SC (Blov-SC). Synthetic DNA (Genscript) was cloned in pACEBac1 using the restriction sites BamHI and HindIII. For Blov-SC, the OVA sequence (1–355) was cloned upstream of the SC, and a His₆ tag was added to the C-terminus of SC. This fusion protein was secreted using the melittin signal peptide in the vector. Recombinant baculoviruses were made by transposition with an in-house bacmid expressing yellow fluorescent protein, as described previously.⁶ The baculovirus was amplified on Sf21 cells at a low multiplicity of infection (MOI), and after two amplification cycles, it was used to infect insect cells for 64–72 h at a high MOI. For ADDomer production, the infected cells were pelleted and recovered, whereas for Blov-SC, cells were discarded, and the supernatant was saved.

Protein purification

ADDomer purification

The ADDomers were purified according to a classic protocol.⁴⁰ Briefly, after lysis of the insect cell pellet by three cycles of freezing-thawing in the presence of Complete protease inhibitor cocktail (Roche) and removal of debris, the lysate was loaded onto a 20%–40% sucrose density gradient. The gradient was centrifuged for 18 h at 4°C at 41,000 rpm on an SW41 rotor in a Beckman XPN-80 ultracentrifuge. The dense collected fractions at the bottom of the tubes were dialyzed against HEPES (10 mM, pH 7.4) and NaCl (150 mM) and then loaded onto a Macroprep Q cartridge (Bio-Rad). After elution by a 150–600 mM linear NaCl gradient in HEPES (10 mM, pH 7.4), ADDomer-containing fractions were checked by SDS-PAGE and concentrated on Amicon (MWCO, 100 kDa) with buffer exchange to HEPES (10 mM, pH 7.4) and NaCl (150 mM).

Blov-SC purification

The insect cell supernatant was centrifuged after thawing for 15 min at 5,000 × *g* for 30 min. The new supernatant was supplemented with 10 mM imidazole-HCl and Complete protease inhibitor cocktail EDTA free (Roche). The His-tagged Blov-SC protein was then purified by loading the supernatant onto a 1-mL His GraviTrap prepacked column (GE Healthcare), pre-equilibrated with 20 column volumes (CVs) of 500 mM sodium chloride, 10 mM HEPES (pH 7.4), and 10 mM imidazole. Columns were then washed with 20 CVs of the same buffer to remove non-specifically bound material. A second wash was performed at 12.5 mM imidazole in a similar buffer. Proteins were eluted with 10 CVs of buffer containing 200 mM imidazole.

Blov-SC-containing fractions were checked by SDS-PAGE and concentrated on Amicon (MWCO, 30 kDa) with buffer exchange to HEPES (10 mM, pH 7.4) and NaCl (150 mM).

ADD-Blov complex formation for characterization and mouse immunization experiments

Covalent complex formation was obtained by incubation of purified ADD-ST with purified Blov protein fused to SC (Blov-SC). Incubation was performed at 25°C under agitation on a Thermomixer at 300 rpm. The Blov-SC ratio per ADD-ST was fixed to 1:4 (1 Blov-SC for 4 monomers) to avoid steric hindrance between the Blov-SC proteins on the ADDomer surface. For immunization experiments, a ratio of 3 copies of Blov-SC per ADD-ST was chosen to leave minimal free Blov-SC. This ratio was calculated on SDS-PAGE using ImageLab software (Bio-Rad). The integrity of ADD-Blov was checked by negative-stain electron microscopy.

B16-OVA culture and preparation for tumor challenge in mice

B16 melanoma cells stably expressing chicken OVA (B16-OVA) were provided by Dr. Dalil Hannani (TIMC Laboratory, Université Grenoble Alpes, France). The cells were tested for OVA expression (Figure S1) and for pathogens (mouse essential panel and PVM (Pneumonia Virus of Mice) PCR, Charles River Laboratories). The cell lines were maintained in RPMI-1640 Glutamax (Gibco) containing 10% fetal bovine serum (Gibco), 5,000 U/100 mL of penicillin-streptomycin (Gibco), and 500 µg/mL Geneticin at 37°C in 5% CO₂. Cells were cultivated in T75 flasks, washed with PBS, and passaged with trypsin. For mouse injection, cells were resuspended at 2.10⁶/mL in PBS.

In vivo experiments and vaccination

Animals were housed and bred at the Plateforme de Haute Technologie Animale (PHTA) core facility (Grenoble, France; EU0197, Agreement C38-51610006) under specific pathogen-free conditions in a temperature-controlled environment with a 12-h light/dark cycle and *ad libitum* access to water and food. Animal housing and procedures were in accordance with the recommendations from the Direction des Services Vétérinaires, Ministry of Agriculture of France, according to European Communities Council Directives 2010/63/EU and according to recommendations for health monitoring from the Federation of European Laboratory Animal Science Associations. Protocols involving animals were reviewed by the local ethics committee (Comité d’Ethique pour l’Expérimentation Animale no. 12, Cometh-Grenoble) and approved by the Ministry of Research (APAFIS 2021032418404959_v3, APAFIS 2018062601109404_v2, and APAFIS 2020112016376739_v1).

Figure 5. Short-term immunological responses

(A) Percentage of CD8⁺ dextramer OT-I⁺ T lymphocytes in the spleen (n = 6) and in the tumor (n = 5 for ADD-Ø, n = 1 for the other groups) for all groups. (B) Dot plot representation of the percentage of CD8⁺ dextramer OT-I⁺ T lymphocytes in the tumor of one mouse per group. (C) Absolute number of CD8⁺ dextramer OT-I⁺ T lymphocytes in the spleen (n = 6) and in the tumor (n = 5 for ADD-Ø, n = 1 for the other groups) for all groups.

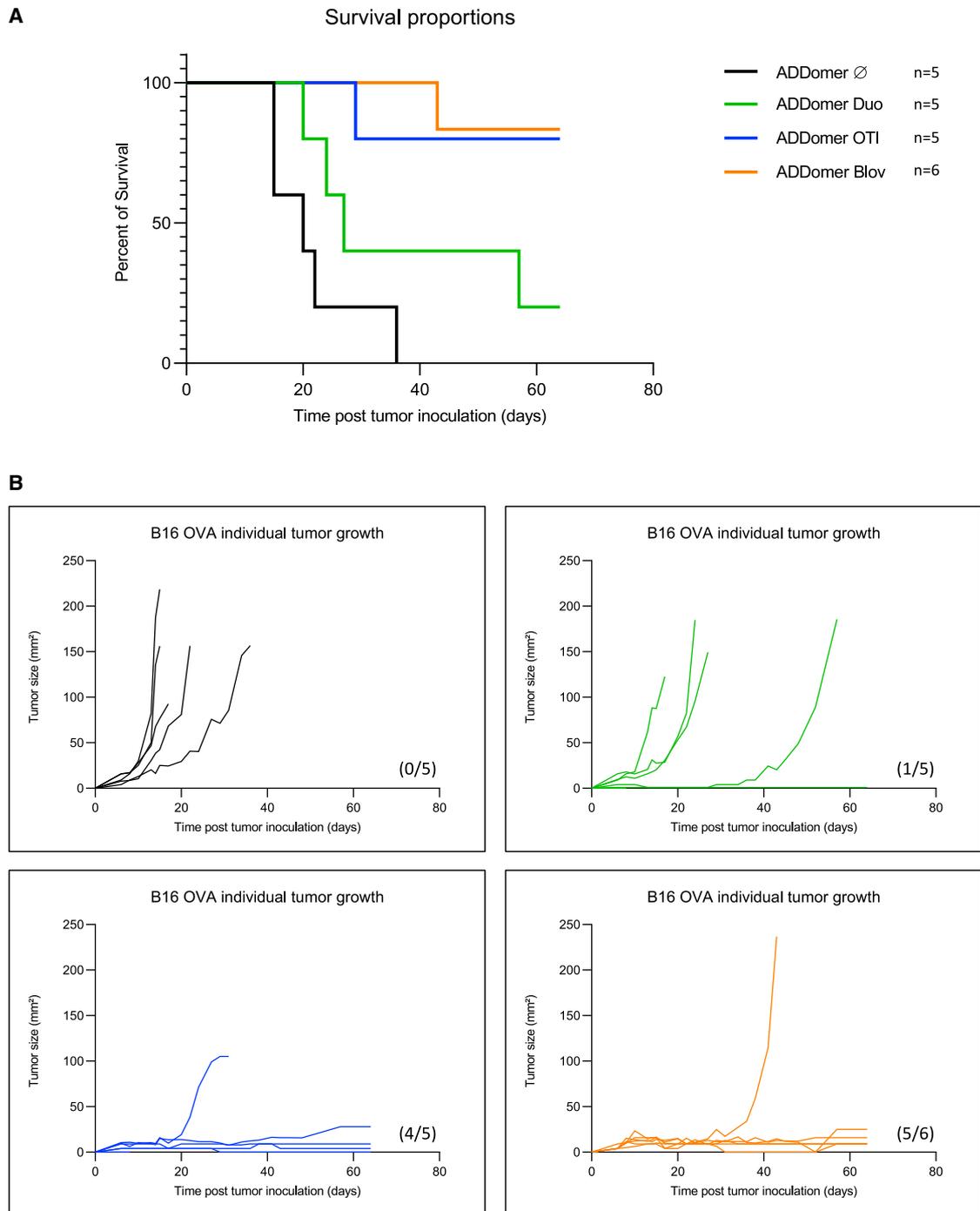


Figure 6. Tumor growth and survival monitoring for therapeutic vaccination

(A) Kaplan-Meier survival analysis showing the percentage of surviving mice. (B) Tumor growth curves for individual mice of each group. The numbers of tumor-free mice are shown in parentheses.

Vaccination experiments were performed according to ethics guidelines. Five-week-old female C57Bl/6 mice were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France).

Adjuvant screening

Each mouse (6 groups of 3 mice each) received 100 μ L of vaccine: 50 μ L of ADDomer (40 μ g per mouse) in HEPES (10 mM) and

NaCl (150 mM) adjuvanted with an equivalent volume of ODN 2395 (50 µg per mouse), MPLA (20 µg per mouse), or poly(I:C) (50 µg per mouse) (VacciGrade-InvivoGen). Mice were injected subcutaneously in the right flank twice (days 0 and 7) and sacrificed on day 14 for organ harvest (spleen and injection site draining lymph nodes [axillary, brachial, and inguinal lymph nodes on the right flank]). Blood was collected by retro-orbital sampling on day 0 and day 14 under anesthesia using 4% isoflurane.

Prophylactic vaccination

Mice received 5 doses, injected subcutaneously in the left flank, of the poly(I:C) adjuvanted ADDomer vaccine on days 0, 2, 5, 7, and 9. On day 34 (i.e., 25 days after the last vaccination), the mice were challenged with inoculation of B16-OVA cells (2.10^5 cells/mice in a total volume of 100 µL of PBS, right flank). Tumor growth was monitored for 17 days after the challenge.

Therapeutic vaccination

Mice received the first tumor inoculation (B16-OVA, 2.10^5 cells, right flank) before receiving 5 doses of the therapeutic poly(I:C)-adjuvanted ADDomer vaccine on days 1, 3, 6, 8, and 10. On day 15, 6 of the 12 animals were sacrificed, and the blood, tumor, spleen, and tumor side draining lymph nodes (axillary, brachial, and inguinal lymph nodes on the right flank) were collected for immune analyses. The 5 or 6 remaining vaccinated and tumor-bearing mice were then monitored for survival until the ethical endpoint was reached.

Flow cytometry analyses of the CD8⁺ dextramer OT-I⁺ response

After collection, organs (lymph nodes, spleens, and tumors) were re-suspended, washed, and filtered using a 100-µm cell strainer. For spleens and tumors, Red Blood Lysis Buffer (1-min incubation, 1181438900, Merck) and RPMI-1640 Glutamax (Gibco) supplemented with 25 µg/mL of Liberase (20-min incubation, Liberase Research Grade, 5401119001, Merck), respectively, were used during this process. Two million cells were then incubated at room temperature (RT) in the dark for 30 min with the dextramer OT-I (H-2 Kb [SIINFEKL], JD2163-PE, Immudex). CD45, Live/Dead, CD3, CD4, and CD8 antibodies (BD Biosciences) were then added for 20 min at 4°C in the dark. Cells were then washed and analyzed on a flow cytometer (LSRII Analyzer, BD Biosciences).

ELISA

The peptide OT-II (peptide OVA_{23–339}, InvivoGen) was diluted at 2 µg/mL in PBS, and 50 mL was coated overnight at 4°C in a 96-well plate (Maxisorp Nunc Immunoplate, 442404). Plates were washed using a Thermo Scientific microplate washer (5165040). After three washes with 100 µL of PBS-Tween (0.05%), plates were blocked with PBS-BSA (3%) for 1 h. Mouse serum was serially diluted in PBS and incubated for 1 h (50 mL/well) at RT. After five washes with PBS-Tween (0.05%), a goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG) (H + L) secondary antibody linked to horseradish peroxidase (JIR 115-035-062) diluted at 1:2,500 in PBS-Tween (0.05%) was added for 1 h. After five washes, 50 mL of transmembrane domain substrate

was distributed per well. The enzymatic reaction was stopped after 70 s by addition of 50 mL of H₂S₀₄ (1 M), and plates were read at 450 nm with a Tecan Spark 10M plate reader.

Electron microscopy: Negative staining

Samples of 3.5 mL were adsorbed on the clean side of a carbon film evaporated previously on mica and then stained using 2% (w/v) sodium silicotungstate (pH 7.4) for 30 s. The sample/carbon ensemble was then transferred to a grid and air dried. Images were acquired under low-dose conditions ($<30 e^-/\text{Å}^2$) on an F20 electron microscope operating at 120 kV using a CETA camera.

Statistical analyses

Because percentages and absolute numbers of CD8⁺ dextramer OT-I⁺ T lymphocytes datasets followed a non-normal, heteroscedastic distribution, a non-parametric test was used for comparison of the different groups. Kruskal-Wallis tests were performed, followed by a Dunn's multiple comparison test for each figure. Differences were considered significant when the p value was below 0.05. Statistics were performed using GraphPad software v.8.

DATA AVAILABILITY

Data are available upon request.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2022.12.003>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jean Paufigue and Brigitte Closs from the Fondation d'Entreprise SILAB for scientific and financial support, which enabled us to perform this work. We are grateful to Daphna Fenel and Guy Schoehn for electron microscopy. We are indebted to Emilie Stermann, Marie-Claire Dagher, Christopher Chevillard, Axelle Amen, Pascal Poinard, and Laurence Chaperot for help and advice. We thank the zootechnicians of the PHTA facility for animal housing and care. This work was supported by Fondation d'Entreprise SILAB - Jean PAUFIQUE. S.B. was the recipient of the SILAB price 2020–2022 dedicated to skin cancer research. S.B. was granted by a “bourse doctorale” from the Université Grenoble Alpes. D.H. is supported by GEFLUC Dauphiné-Savoie, Ligue Contre le Cancer Comité Isère, Ligue Contre le Cancer Comité Savoie, Université Grenoble Alpes IDEX Initiatives de Recherche Stratégiques, and Fondation du Souffle-Fonds de Recherche en Santé Respiratoire (FdS-FRSR). This work used the platforms of the Grenoble Instruct-ERIC Center (ISBG; UAR 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB), supported by FRISBI (ANR-10-INBS-05-02) and GRAL, financed within the Université Grenoble Alpes graduate school (Ecoles Universitaires de Recherche) CBH-EUR-GS (ANR-17-EURE-0003). The electron microscope facility is supported by the Auvergne-Rhône-Alpes region, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), the Fonds

FEDER, and the GIS-Infrastructures en Biologie Sante et Agronomie (IBISA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Conceptualization, S.B., C.A., D.H., and P.F.; investigation, S.B., E.B., O.M., D.L., C.A., and D.H.; animal experiments, S.B., C.A., D.L., E.B., and D.H.; funding acquisition, S.B. and P.F. S.B. and P.F. wrote the manuscript.

DECLARATION OF INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Bok, K., Sitar, S., Graham, B.S., and Mascola, J.R. (2021). Accelerated COVID-19 vaccine development: milestones, lessons, and prospects. *Immunity* 54, 1636–1651. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.07.017>.
- Ho, J.K.-T., Jeevan-Raj, B., and Netter, H.-J. (2020). Hepatitis B virus (HBV) subviral particles as protective vaccines and vaccine platforms. *Viruses* 12, 126. <https://doi.org/10.3390/v12020126>.
- Villa, L.L., Costa, R.L.R., Petta, C.A., Andrade, R.P., Ault, K.A., Giuliano, A.R., Wheeler, C.M., Koutsky, L.A., Malm, C., Lehtinen, M., et al. (2005). Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet Oncol.* 6, 271–278. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(05\)70101-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(05)70101-7).
- Nguyen, B., and Tolia, N.H. (2021). Protein-based antigen presentation platforms for nanoparticle vaccines. *NPJ Vaccines* 6, 70. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00330-7>.
- Reddy, S.T., van der Vlies, A.J., Simeoni, E., Angeli, V., Randolph, G.J., O'Neil, C.P., Lee, L.K., Swartz, M.A., and Hubbell, J.A. (2007). Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. *Nat. Biotechnol.* 25, 1159–1164. <https://doi.org/10.1038/nbt1332>.
- Vraginau, C., Bufton, J.C., Garzoni, F., Stermann, E., Rabi, F., Terrat, C., Guidetti, M., Jossierand, V., Williams, M., Woods, C.J., et al. (2019). Synthetic self-assembling ADDomer platform for highly efficient vaccination by genetically encoded multiepitope display. *Sci. Adv.* 5, eaaw2853. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw2853>.
- Caldeira, J.C., Perrine, M., Pericle, F., and Cavallo, F. (2020). Virus-like particles as an immunogenic platform for cancer vaccines. *Viruses* 12, 488. <https://doi.org/10.3390/v12050488>.
- Zakeri, B., Fierer, J.O., Celik, E., Chittock, E.C., Schwarz-Linek, U., Moy, V.T., and Howarth, M. (2012). Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E690–E697. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115485109>.
- Brune, K.D., Leneghan, D.B., Brian, I.J., Ishizuka, A.S., Bachmann, M.F., Draper, S.J., Biswas, S., and Howarth, M. (2016). Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization. *Sci. Rep.* 6, 19234. <https://doi.org/10.1038/srep19234>.
- Li, L., Fierer, J.O., Rapoport, T.A., and Howarth, M. (2014). Structural analysis and optimization of the covalent association between SpyCatcher and a peptide tag. *J. Mol. Biol.* 426, 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.10.021>.
- Keeble, A.H., and Howarth, M. (2020). Power to the protein: enhancing and combining activities using the Spy toolbox. *Chem. Sci.* 11, 7281–7291. <https://doi.org/10.1039/D0SC01878C>.
- Fender, P., Ruigrok, R.W., Gout, E., Buffet, S., and Chroboczek, J. (1997). Adenovirus dodecahedron, a new vector for human gene transfer. *Nat. Biotechnol.* 15, 52–56. <https://doi.org/10.1038/nbt0197-52>.
- Besson, S., Vraginau, C., Vassal-Stermann, E., Dagher, M.C., and Fender, P. (2020). The adenovirus dodecahedron: beyond the platonic story. *Viruses* 12, 718. <https://doi.org/10.3390/v12070718>.
- Chevillard, C., Amen, A., Besson, S., Hannani, D., Bally, I., Dettling, V., Gout, E., Moreau, C.J., Buisson, M., Gallet, S., et al. (2022). Elicitation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibody responses through immunization with a versatile adenovirus-inspired multimerization platform. *Mol. Ther.* 30, 1913–1925. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2022.02.011>.
- Martins, K.A.O., Bavari, S., and Salazar, A.M. (2015). Vaccine adjuvant uses of poly-IC and derivatives. *Expert Rev. Vaccines* 14, 447–459. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.966085>.
- Liu, C., Chu, X., Sun, P., Feng, X., Huang, W., Liu, H., and Ma, Y. (2018). Synergy effects of Polyinosinic-polycytidylic acid, CpG oligodeoxynucleotide, and cationic peptides to adjuvant HPV E7 epitope vaccine through preventive and therapeutic immunization in a TC-1 grafted mouse model. *Hum. Vaccin. Immunother.* 14, 931–940. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1420446>.
- Fender, P., Hall, K., Schoehn, G., and Blair, G.E. (2012). Impact of human adenovirus type 3 dodecahedron on host cells and its potential role in viral infection. *J. Virol.* 86, 5380–5385. <https://doi.org/10.1128/JVI.07127-11>.
- Bellone, M., Cantarella, D., Castiglioni, P., Crosti, M.C., Ronchetti, A., Moro, M., Garancini, M.P., Casorati, G., and Dellabona, P. (2000). Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J. Immunol.* 165, 2651–2656. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.165.5.2651>.
- Epaulard, O., Toussaint, B., Quenee, L., Derouazi, M., Bosco, N., Villiers, C., Le Berre, R., Guery, B., Filopon, D., Crombez, L., et al. (2006). Anti-tumor immunotherapy via antigen delivery from a live attenuated genetically engineered *Pseudomonas aeruginosa* type III secretion system-based vector. *Mol. Ther.* 14, 656–661. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2006.06.011>.
- Villegas-Mendez, A., Garin, M.I., Pineda-Molina, E., Veratti, E., Bueren, J.A., Fender, P., and Lenormand, J.-L. (2010). In vivo delivery of antigens by adenovirus dodecahedron induces cellular and humoral immune responses to elicit antitumor immunity. *Mol. Ther.* 18, 1046–1053. <https://doi.org/10.1038/mt.2010.16>.
- Del Val, M., Schlicht, H.-J., Ruppert, T., Reddehase, M.J., and Koszinowski, U.H. (1991). Efficient processing of an antigenic sequence for presentation by MHC class I molecules depends on its neighboring residues in the protein. *Cell* 66, 1145–1153. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90037-Y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90037-Y).
- Kloetzel, P.-M. (2001). Antigen processing by the proteasome: ubiquitin and proteasomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 179–187. <https://doi.org/10.1038/35056572>.
- Nussbaum, A.K., Dick, T.P., Keilholz, W., Schirle, M., Stevanović, S., Dietz, K., Heinemeyer, W., Groll, M., Wolf, D.H., Huber, R., et al. (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome β subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12504–12509. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.21.12504>.
- Pulendran, B., Arunachalam, P.S., and O'Hagan, D.T. (2021). Emerging concepts in the science of vaccine adjuvants. *Nat. Rev. Drug Discov.* 20, 454–475.
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signaling. *Nature* 430, 257–263. <https://doi.org/10.1038/nature02761>.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 11, 373–384. <https://doi.org/10.1038/ni.1863>.
- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 413, 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>.
- Ammi, R., De Waele, J., Willemen, Y., Van Brussel, I., Schrijvers, D.M., Lion, E., and Smits, E.L.J. (2015). Poly(I:C) as cancer vaccine adjuvant: knocking on the door of medical breakthroughs. *Pharmacol. Ther.* 146, 120–131. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2014.09.010>.
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V.G., Chen, G., and Deber, C.M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 1760–1765. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>.
- Zhao, W., Wu, J., Chen, S., and Zhou, Z. (2020). Shared neoantigens: ideal targets for off-the-shelf cancer immunotherapy. *Pharmacogenomics* 21, 637–645. <https://doi.org/10.2217/pgs-2019-0184>.

31. Vragliau, C. (2018). Modification des dodécaèdres bases de l'adénovirus de sérotype 3: Design et caractérisation d'un nouveau vecteur multi-épitopique polyvalent. In PhD Thesis, <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-02110396>.
32. Villegas-Méndez, A., Fender, P., Garin, M.L., Rothe, R., Liguori, L., Marques, B., and Lenormand, J.-L. (2012). Functional characterisation of the WW minimal domain for delivering therapeutic proteins by adenovirus dodecahedron. *PLoS One* 7, e45416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045416>.
33. Galinier, R., Gout, E., Lortat-Jacob, H., Wood, J., and Chroboczek, J. (2002). Adenovirus protein involved in virus internalization recruits Ubiquitin-Protein ligases. *Biochemistry* 41, 14299–14305. <https://doi.org/10.1021/bi020125b>.
34. Bachmann, M.F., and Jennings, G.T. (2010). Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 787–796. <https://doi.org/10.1038/nri2868>.
35. Zabel, F., Kündig, T.M., and Bachmann, M.F. (2013). Virus-induced humoral immunity: on how B cell responses are initiated. *Curr. Opin. Virol.* 3, 357–362. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2013.05.004>.
36. Shibagaki, N., and Udey, M.C. (2002). Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J. Immunol.* 168, 2393–2401. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.5.2393>.
37. Cohen, A.A., Gnanaprasam, P.N.P., Lee, Y.E., Hoffman, P.R., Ou, S., Kakutani, L.M., Keeffe, J.R., Wu, H.-J., Howarth, M., West, A.P., et al. (2021). Mosaic nanoparticles elicit cross-reactive immune responses to zoonotic coronaviruses in mice. *Science* 371, 735–741.
38. Cohen, J. (2021). The dream vaccine. *Science* 372, 227–231. <https://doi.org/10.1126/science.372.6539.227>.
39. Feola, S., Russo, S., Martins, B., Lopes, A., Vandermeulen, G., Fluhler, V., De Giorgi, C., Fuscillo, M., Pesonen, S., Ylösmäki, E., et al. (2022). Peptides-coated oncolytic vaccines for cancer personalized medicine. *Front. Immunol.* 13, 826164. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.826164>.
40. Fender, P. (2014). Use of dodecahedron “VLPs” as an alternative to the whole adenovirus. *Methods Mol. Biol.* 1089, 61–70. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-679-5_4.

