



HAL
open science

Nouvelles stratégies vaccinales anti-tumorales par vecteurs AAVs recombinants : manipulation de la mort cellulaire immunogénique dans le contexte tumoral

Allan Scarpitta

► **To cite this version:**

Allan Scarpitta. Nouvelles stratégies vaccinales anti-tumorales par vecteurs AAVs recombinants : manipulation de la mort cellulaire immunogénique dans le contexte tumoral. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2023. Français. NNT : 2023NORMR075 . tel-04439519

HAL Id: tel-04439519

<https://theses.hal.science/tel-04439519>

Submitted on 5 Feb 2024

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 diplôme de doctorat

Spécialité **SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

Préparée au sein de l'**Université de Rouen Normandie**

Nouvelles stratégies vaccinales anti-tumorales par vecteurs AAVs recombinants : manipulation de la mort cellulaire immunogénique dans le contexte tumoral

Présentée et soutenue par

ALLAN SCARPITTA

Thèse soutenue le 23/06/2023

devant le jury composé de :

M. OLIVIER KEPP	Directeur de Recherche - CENTRE DE LUTTE CONTRE LE CANCER	Rapporteur du jury
MME SANDRINE VALSESIA-WITTMANN	Docteur HDR - Boehringer Ingelheim Animal Health	Rapporteur du jury
MME NADIRA DELHEM	Professeur des Universités - UNIVERSITE DE LILLE	Membre du jury
M. JEAN-LUC PERFETTINI	Directeur de Recherche - CENTRE DE LUTTE CONTRE LE CANCER	Membre du jury
MME HELENE CASTEL-GANDOLFO	Directeur de Recherche - Université de Rouen Normandie	Président du jury
M. SAHIL ADRIOUCH	Professeur des Universités - Université de Rouen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par **SAHIL ADRIOUCH** (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE) et **OLIVIER BOYER** (PHYSIOPATHOLOGIE, AUTOIMMUNITE ET IMMUNOTHERAPIE)

« Le chercheur doit être libre de tenter des expériences audacieuses, de soutenir des théories révolutionnaires, voire paradoxales. Il doit disposer du droit à l'erreur. »

Pierre Joliot.

Remerciements

Premièrement, je tiens particulièrement à remercier Sandrine Valsesia-Wittmann, Nadira Delhem, Oliver Kepp, Jean-luc Perfettini et Hélène Castel-Gandolfo d'avoir pris part à ce jury.

Je tiens à remercier Olivier Boyer de m'avoir accueilli au sein du laboratoire INSERM U1234 PANTHER depuis la réalisation de mon Master 1 jusqu'à la réalisation de ce doctorat.

Je remercie particulièrement Sahil Adriouch d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu tout au long de ce travail de thèse. Merci d'avoir été humain en toutes circonstances et disponible dès que j'en avais besoin.

Merci à Mélanie d'avoir pris le temps de m'encadrer lors de mon master et au début de cette thèse mais aussi pour tous les bons moments passés ensemble. Je te souhaite le meilleur dans ta vie professionnelle et personnelle, tu le mérites. Merci à Romain de m'avoir aidé dans la réalisation de ce projet et d'avoir pris part à de grands fous rires en bibliographie. Merci à Henri d'avoir été la source de quelques moments épiques hors du laboratoire (« Le Vixen » résume assez bien ma pensée). Je tiens à remercier Marine B. de m'avoir aidé dans la finalisation de ce travail de thèse quand le temps était un enjeu précieux et d'avoir supporté mes blagues (parfois un peu lourdes, je l'accorde) pendant ces dernières années. Je remercie les doctorants de l'autre bureau (Charlotte, Misah et Sarah), merci d'avoir été le siège de nombreuses discussions dans votre bureau, je vous souhaite sincèrement le meilleur. Thara, merci pour ton aide, pour nos pauses « coca », ta folie et tous tes dictons incompréhensibles. Justine, merci d'avoir servi de sparring-partner pour toutes mes vanes vestimentaires et pour ta gentillesse. Merci à Marine M. de m'avoir conseillé, pour ta franchise et d'avoir pris le temps de m'aider pour mes projets futurs. Merci à Gaëtan d'avoir été toujours disponible pour la cytométrie mais aussi pour aller manger un très typique « sdou » rouennais. Merci à Chantal d'avoir été une grande aide dans la réalisation de ce travail.

Je remercie tous les autres membres du laboratoire que j'ai croisés durant toutes ces années, vous côtoyer a été enrichissant autant humainement que scientifiquement.

Plus personnellement, je remercie grandement Élise. Un grand merci d'avoir été d'un soutien inconditionnel pendant toutes ces années et de m'avoir soutenu et de continuer à le faire dans tous mes projets fous. Merci pour tout ce que tu m'as apporté, notamment nos deux enfants Noah et Elsa. Ta rencontre et l'arrivée de nos enfants sont les meilleures choses qui me soient arrivées, je vous aime.

Je te remercie maman, pour tout ce que tu as fait pour nous, ta résilience est un exemple qui m'a accompagné dans la réalisation de ce travail. Méganne, Tom et Médhy merci à vous d'avoir été toujours présents pour moi, votre soutien et votre amour inconditionnel sont très importants pour moi.

Je finis par une mention spéciale à ma grand-mère, tu resteras un exemple de droiture, d'intégrité et de franchise. Merci d'avoir été si aimante et d'avoir été si présente dans mon éducation et mon apprentissage. Tout ce que tu m'as inculqué restera un exemple que je m'efforce de reproduire avec mes enfants.

Table des matières

PARTIE I : CANCER ET SYSTEME IMMUNITAIRE	10
1. IMPORTANCE DU SYSTEME IMMUNITAIRE DANS LE CONTROLE DU DEVELOPPEMENT DES TUMEURS	10
1.1. <i>Prémices de l'immunosurveillance et premiers obstacles</i>	10
1.2. <i>Renaissance du principe de l'immunosurveillance</i>	11
1.3. <i>Principe du Cancer immunoediting</i>	12
2. IMPORTANCE ET ROLE DES CYTOKINES DANS LE CANCER	13
2.1. <i>Rôles des cytokines dans le cancer</i>	14
2.2. <i>Utilisation des cytokines en clinique</i> :	15
3. LES IMMUNOTHERAPIES	16
3.1. <i>Inhibition de CTLA-4</i>	18
3.2. <i>Inhibition de la voie PD-1/PD-L1</i>	19
3.3. <i>Mécanismes de résistances aux ICI</i>	20
PARTIE II : LES MORTS CELLULAIRES	21
1. LA MORT CELLULAIRE IMMUNOGENIQUE	23
1.1. <i>Principe de la mort cellulaire immunogénique</i>	23
1.2. <i>MCI et stimulation du SI</i>	29
2. L' APOPTOSE	31
2.1. <i>Voie d'activation intrinsèque de l'apoptose</i>	32
2.2. <i>Voie d'activation extrinsèque de l'apoptose</i>	35
2.3. <i>Mécanismes tolérogènes associés à l'apoptose</i>	36
3. LA NECROPTOSE	42
3.1. <i>Mécanismes moléculaires de la nécroptose</i> :	43
3.2. <i>MLKL</i> :	46
4. LA PYROPTOSE	49
4.1. <i>Les Gasdermines</i>	49
4.2. <i>Libération du contenu intracellulaire</i> :	55
4.3. <i>Différentes voies d'activation de la pyroptose</i> :	57
4.4. <i>La Gasdermine D</i> :	60
4.5. <i>La Gasdermine E</i> :	65
5. DIFFERENCES ET MECANISMES COMMUNS ENTRE LA PYROPTOSE/NECROPTOSE	68
5.1. <i>Localisation et fixation aux différentes membranes cellulaires</i>	70
5.2. <i>Mécanismes de réparation de la membrane cellulaire</i> :	71
6. INFLUENCE DES DIFFERENTES MCI DANS LE CANCER :	73
6.1. <i>Rôle complexe de la nécroptose dans le cancer</i>	73
6.2. <i>Rôle complexe de la pyroptose dans le cancer</i>	76
7. SIGNATURES MOLECULAIRES LIEES AUX MCI DANS LE CANCER.	80
PARTIE III : LES VIRUS ADENO-ASSOCIES (AAV)	81
1. BIOLOGIE DES AAV	81
1.1. <i>Structure</i>	82
1.2. <i>Sérotypes</i>	82
2. AAV COMME VECTEUR POUR DELIVRER DES GENES	83
2.1. <i>Mécanismes de transduction des AAVs</i>	83
2.2. <i>Méthodes de production des vecteurs AAV</i> :	84
3. LES AAVS EN CLINIQUE	87
OBJECTIFS DE LA THESE	89
RESULTATS	91
DISCUSSION GENERALE	138
BIBLIOGRAPHIE	155
ANNEXES	183

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Le rôle des cytokines dans le microenvironnement tumoral.....	13
Figure 2 - Les différentes classes d'immunothérapies	17
Figure 3 - Les différents morts cellulaires programmés.....	23
Figure 4 - La MCI dans le contexte tumoral et ses conséquences sur l'activation du SI.....	30
Figure 5 - Voie intrinsèque et extrinsèque de l'activation de l'apoptose.....	33
Figure 6 - Les différentes étapes conduisant à la prise en charge des cellules apoptotiques par les phagocytes .	40
Figure 7 - Les différents stimuli activant MLKL et mécanismes d'induction de la nécroptose.	42
Figure 8 - Voies moléculaires de l'activation de la nécroptose.	44
Figure 9 - Pattern d'expression de MLKL et RIPK3 dans les différents tissus	45
Figure 10 - Structures des protéines impliquées dans la nécroptose	47
Figure 11 - Structure et mécanismes de régulation des Gasdermines	50
Figure 12 - Profil d'expression des protéines de la famille des gasdermines.....	52
Figure 13 - Voies d'activation de la pyroptose.....	55
Figure 14 - Mécanismes induisant l'activation de la pyroptose médiée par la GSDME	58
Figure 15 - Comparaison de la structure de la GSDMD murine et de la GSDMD humaine.....	60
Figure 16 - Modèle de la formation du pore membranaire par les Gasdermines	62
Figure 17 - Représentation de l'interaction entre le domaine N-terminal et C-terminale de la GSDMD.....	63
Figure 18 - Structure et résidus importants de la GSDMD murine et humaine.....	63
Figure 19 - Le complexe ESCRT-III régule l'action des Gasdermines et de MLKL	73
Figure 20 - La transduction des cellules par les AAVs nécessite différentes étapes	85
Figure 21 - Méthodes de production des AAVs basés sur les baculovirus et les cellules d'insecte sf9.	87
Figure 22 - Caractérisation in vitro de la capacité de transduction des différents sérotypes d'AAVs ainsi que la fonctionnalité d'AAVs codant pour les effecteurs de la pyroptose ou de la nécroptose dans différents modèles tumoraux	132
Figure 23 - L'injection intratumorale d'AAV2 codant pour la pyroptose ou la nécroptose n'induit pas de rejet de tumeur dans la lignée cellulaire B16-F10.....	134
Figure 24 - L'injection intratumorale d'AAV2 codant pour GSDME ¹⁻²⁵¹ réduit la croissance tumorale et le rejet de tumeur dans la lignée cellulaire MC38	135
Figure 25 - L'injection intratumorale d'AAV2 codant pour la GSDME ¹⁻²⁵¹ associée à l'immunothérapie anti-PD-1 induit un fort rejet tumoral et une augmentation de la survie dans la lignée cellulaire B16-F10.....	136

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 - Les différentes cytokines évaluées en clinique.	16
Tableau 2 - Le système immunitaire est capable de sonder l'environnement via l'expression de récepteurs particuliers appelés PRR.....	25
Tableau 3 - Exemples des stratégies utilisées en clinique induisant la MCI.....	26
Tableau 4 - Les récepteurs de mort cellulaires humains et leurs ligands	36
Tableau 5 - Récapitulatif des propriétés et des fonctions des protéines de la famille des gasdermines.....	53
Tableau 6 - Comparaison des marqueurs caractéristiques entre l'apoptose, la pyroptose et la nécroptose.....	69
Tableau 7 - Les différents sérotypes d'AAV ainsi que les essais cliniques utilisant les AAV comme vecteur de thérapie génique.....	83
Tableau 8 - Récapitulatif des résultats obtenus in vitro concernant la caractérisation des constructions	139
Tableau 9 - Récapitulatif des résultats obtenus in vivo lors des protocoles de vaccination prophylactique.....	140
Tableau 10 - Résumé des expériences in vivo où l'injection intratumorale d'AAVs codant pour les effecteurs de la MCI ont été évalués	143

LISTES DES ABBREVIATIONS

-A-

APAF1 : « *adapter protein apoptotic protease activating factor 1* »

ARNm : acide(s) ribonucléique(s) messenger(s)

-B-

BCL-2 : « *B-cell lymphoma 2* »

BH domain : « *Bcl-2 homology domain* »

BIR : « *Baculoviral IAP repeat* »

-C-

CRT : calréticuline

CAR-T Cells : cellules T possédant un TCR chimérique

CARD : « *caspase activation and recruitment domain* »

CD : cellules dendritiques

Cellules NK : cellules naturelles tueuses

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CT : domaine C-terminal de la Gasdermine D

Cyt C : cytochrome C

-D-

DAMP : « *danger-associated molecular pattern* »

DED : « *death-inducing domain* »

DISC : « *death-inducing signal complex* »

-E-

eATP : adénosine triphosphate extracellulaire

eIF2 α : facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2

ERO : espèce réactive de l'oxygène

ECRT-III : « *endosomal sorting complexes required for transport* »

-F-

FADD : « *Fas-associated death domain* »

FDA : « *Food Drug Administration* »

-G-

GM-CSF : facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages ou « *granulocyte-macrophage colony stimulating factor* »

GrzB : granzyme B

-I-

IAP : protéines inhibitrices de l'apoptose

ICI : inhibiteurs de points de contrôle immunitaire

IFN- γ : interféron gamma

IL : interleukine

-K-

KO : « *knock-out* »

-L-

LPS : lipopolysaccharide

LyT : lymphocytes T

-M-

MAT : macrophages associés à la tumeur

MCA : méthylcholantrene

MCI : mort cellulaire immunogénique

MET : microenvironnement tumoral

MDSC : cellules myéloïdes immunosuppressives ou « *myeloid derived suppressor cells* »

-N-

NK : cellules naturelles tueuses

NT : domaine N-terminal de la Gasdermine D

-P-

PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*

PIPs : phosphoinositides

PMT : pore mitochondrial transitoire

PtdSer : phosphatidylsérines

PRR : recepneur de reconnaissance de motifs moléculaires ou « *pattern recognition receptor* »

-R-

RI : réponse(s) immunitaire(s)

-S-

SI : système immunitaire

SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise

SNC : système nerveux central

-T-

TCR : récepteur des cellules T ou « *T Cell Receptor* »

TEM : transition épithélio-mésenchymateuse

TNF : « *tumor necrosis factor* » ou facteur de nécrose tumorale

TRADD : « *TNF-receptor associated death domain* »

Tregs : lymphocytes T CD4⁺ régulateurs

-W-

WT : souris « *Wild type* » ou de type sauvage

Introduction

Partie I : Cancer et système immunitaire :

1. Importance du système immunitaire dans le contrôle du développement des tumeurs

1.1. Prémices de l'immunosurveillance et premiers obstacles

En 1909, Paul Erlich soumet l'hypothèse que le système immunitaire (SI) pourrait contrôler le développement des tumeurs (Blair and Cook, 2008; Block and Markovic, 2009). Puis, en 1957, Thomas et Burnet approfondissent cette hypothèse d'immunosurveillance dont l'idée principale est que les lymphocytes agissent comme des gardiens capables de reconnaître et de détruire des cellules néoplasiques (Dunn, Old and Schreiber, 2004; Blair and Cook, 2008). Cependant, le manque de technologies à l'époque a empêché ces auteurs de le démontrer expérimentalement. Toutefois, des études cliniques se penchant sur le lien entre l'immunosuppression à long terme, liée à une maladie (syndrome de l'immunodéficience acquise ou SIDA) ou médicamenteuse (patients ayant subi une greffe allogénique), et le développement de tumeurs ont proposé des arguments en faveur de l'existence et l'importance de l'immunosurveillance (Block and Markovic, 2009). Ceci n'a cependant pas pu être démontré chez les souris *nude* immunodéficientes en système immunitaire adaptatif, le seul modèle murin immunodéficient de l'époque. Effectivement, l'absence de cellules immunitaires n'a pas augmenté l'incidence d'apparition de lésions néoplasiques dans cette lignée comparée aux souris sauvages après utilisation du méthylcholantrene (MCA), un puissant carcinogène (Rygaard and Povlsen, 1974; Stutman, 1974, 1979). A l'époque, ces expériences tendaient donc à réfuter ce principe d'immunosurveillance. Cependant, avec du recul, plusieurs éléments manquaient pour interpréter correctement ces résultats. Premièrement, les souris *nude* ne sont pas totalement dépourvues de cellules immunitaires puisqu'elles possèdent une quantité détectable de lymphocytes T (LyT) α/β mais aussi un SI inné fonctionnel (Hunig, 1983; Ikehara *et al.*, 1984; Maleckar and Sherman, 1987). Deuxièmement, ces souris possèdent les cellules naturelles tueuses (NK), une sous population de cellules immunitaires jusqu'alors inconnues, sous-estimant de ce fait leur impact dans la mise en place des réponses immunitaires (RI) antitumorales. De même, le rôle de l'immunité innée était totalement sous-estimé notamment dans le développement des réponses immunitaires (RI) adaptatives (Janeway, 1989). De surcroît, les souris *nude* expriment à haut niveau une isoforme de l'enzyme qui est impliquée dans la métabolisation du MCA, le rendant hyper-actif et augmentant son pouvoir carcinogène (Heidelberger, 2003). Ainsi, la

transformation cellulaire induite par cette molécule est si efficace qu'il est impossible de mettre en exergue un éventuel rôle du SI dans le développement tumoral. Même si ces réserves peuvent désormais être appréciées, ces expériences ont grandement mis à mal le principe d'immunosurveillance dans les années 1970.

1.2. Renaissance du principe de l'immunosurveillance

Dans les années 1990, toute une série d'expériences s'est avérée être en faveur du concept d'immunosurveillance. De fait, une première série d'études a montré que l'interféron gamma (IFN- γ), un acteur majeur de la réponse immunitaire, protège contre le développement de tumeurs transplantées ou chimio-induites et contre l'apparition spontanée de tumeurs (Kaplan *et al.*, 1998; Street, Cretney and Smyth, 2001; Street *et al.*, 2002). Les tumeurs croissent plus rapidement et avec une plus grande incidence lorsqu'un anticorps bloquant cette molécule est utilisé, confirmant les résultats précédents (Dighe *et al.*, 1994). En outre, l'utilisation de souris « *knock-out* » (KO) pour le récepteur IFNGR1 (sous unité du récepteur de l'IFN- γ) et de STAT1 (une protéine responsable des effets biologiques de l'IFN- γ) a montré que ces souris étaient 10 à 20 fois plus sensibles à l'apparition de tumeurs que les souris sauvages dans un modèle tumoral chimio-induit par le MCA. Ces souris développaient plus de tumeurs, poussant plus vite et à des doses plus faibles de MCA (Kaplan *et al.*, 1998). Ceci fût confirmé dans des expériences indépendantes avec des souris déficientes pour le gène codant de l'IFN- γ (Street, Cretney and Smyth, 2001). Dans un second temps, des travaux se focalisant sur les effets de la perforine, une protéase exprimée par les LyT et les cellules NK et impliquée dans la cytotoxicité induite par les lymphocytes, dans le contexte tumoral ont apporté de nouveaux éléments en faveur du principe d'immunosurveillance. En effet, les souris déficientes pour la perforine sont plus sensibles aux tumeurs chimio-induites par le MCA (Van Den Broek *et al.*, 1996; Smyth *et al.*, 2000; Street, Cretney and Smyth, 2001; Street *et al.*, 2002). De surcroît, elles développent plus de tumeurs spontanées et l'incidence de lymphome est même augmentée dans un fond génétique déficient pour p53. Ces expériences montrent donc que le développement de tumeurs est contrôlé par des acteurs du SI remettant ainsi au goût du jour le concept d'immunosurveillance. Finalement, le travail démontrant définitivement ce principe médié par les lymphocytes et l'IFN- γ est venu avec la génération de souris déficientes pour les enzymes recombinases RAG1 et RAG2 (souris RAG1^{-/-} et RAG2^{-/-}), impliquées dans le réarrangement V(D)J du récepteur à l'antigène des LyT (TCR pour « *T-cell Receptor* ») et générant donc des souris ne possédant pas de cellules T, B et NK-T (Shinkai *et al.*, 1992). Les souris 129/SVEV RAG2^{-/-} développent d'ailleurs plus de tumeurs et plus rapidement que les animaux non génétiquement

modifiés après challenge avec le MCA. Ces résultats ont aussi été confirmés dans les souris RAG1^{-/-} mettant en exergue le rôle prédominant du SI dans la lutte contre la mise en place de tumeurs (Smyth, Crowe and Godfrey, 2001). Le recoupement entre les voies suppressives du développement de tumeurs liées à l'IFN- γ et celles liées aux lymphocytes a été investigué en réalisant une étude comparative sur la formation de tumeurs entre les souris déficientes pour le récepteur à l'IFN- γ (IFNGR1^{-/-} ou STAT1^{-/-} ou déficientes pour les deux voies IFNGR1^{-/-} et STAT1^{-/-}) et des souris RAG2^{-/-} ou des souris doublement déficientes RAG2^{-/-} et IFN- γ ^{-/-} (Shankaran *et al.*, 2001). Toutes les lignées de souris KO suscitées engendrent trois fois plus de tumeurs comparées aux souris de type sauvage (WT) après une seule injection de MCA démontrant d'autant plus le rôle du SI dans le développement de tumeurs. D'ailleurs, le terme « *immunoediting* » selon lequel le SI permet la sélection de clones tumoraux et la formation de tumeurs moins immunogènes est apparu pour la première fois dans cette étude.

1.3. Principe du Cancer *immunoediting*

Il est maintenant acté que le SI peut empêcher la mise en place de tumeurs mais il peut aussi promouvoir la croissance tumorale dans d'autres contextes. Ce processus est appelé « *immunoediting* » et se compose de trois phases distinctes : i) la phase d'élimination ii) la phase d'équilibre et iii) la phase d'échappement (Dunn *et al.*, 2002; Dunn, Old and Schreiber, 2004). Pendant la première phase, la coopération du SI inné et adaptatif permet la détection et l'élimination des cellules ayant échappé aux mécanismes cellulaires empêchant le développement de tumeurs. Très peu de clones tumoraux sont capables d'outrepasser cette phase d'élimination pour entrer dans la phase d'équilibre dans laquelle la croissance tumorale est limitée due à un équilibre entre la pression du SI et les processus néoplasiques cellulaires favorables. Cependant, la pression constante du SI et l'instabilité génétique des cellules tumorales conduisent à la sélection de clones de plus faible immunogénicité entraînant l'échappement de ces cellules à la reconnaissance et à leur destruction par le SI. La perte de l'expression antigénique des cellules tumorales et la baisse d'expression de l'IFN- γ par les LyT sont deux procédés majoritaires, mais non exhaustifs, entraînant la mise en place de ces phénomènes. Cette tumeur remaniée par le SI peut ensuite rentrer dans une phase d'échappement où sa croissance n'est plus limitée entraînant une maladie cliniquement détectable.

2. Importance et rôle des cytokines dans le cancer

Les cytokines sont des protéines importantes pour la régulation de processus biologiques notamment pour les cellules du SI. Leur production et leur rôle biologique ont été historiquement reliés aux cellules du SI même s'il est maintenant connu que certaines cellules épithéliales ou mésenchymateuses peuvent également en produire. La grande famille des cytokines regroupe les interleukines (IL), les IFNs, certains membres des facteurs de nécrose tumoraux (TNF pour *tumor necrosis factor*), des facteurs de croissance mais aussi des chimiokines (Propper and Balkwill, 2022). Ces molécules ont un effet le plus souvent paracrine mais peuvent aussi avoir une fonction autocrine. A ce jour, une quarantaine de cytokines ont été identifiées et certaines peuvent être regroupées en famille voire en superfamille.

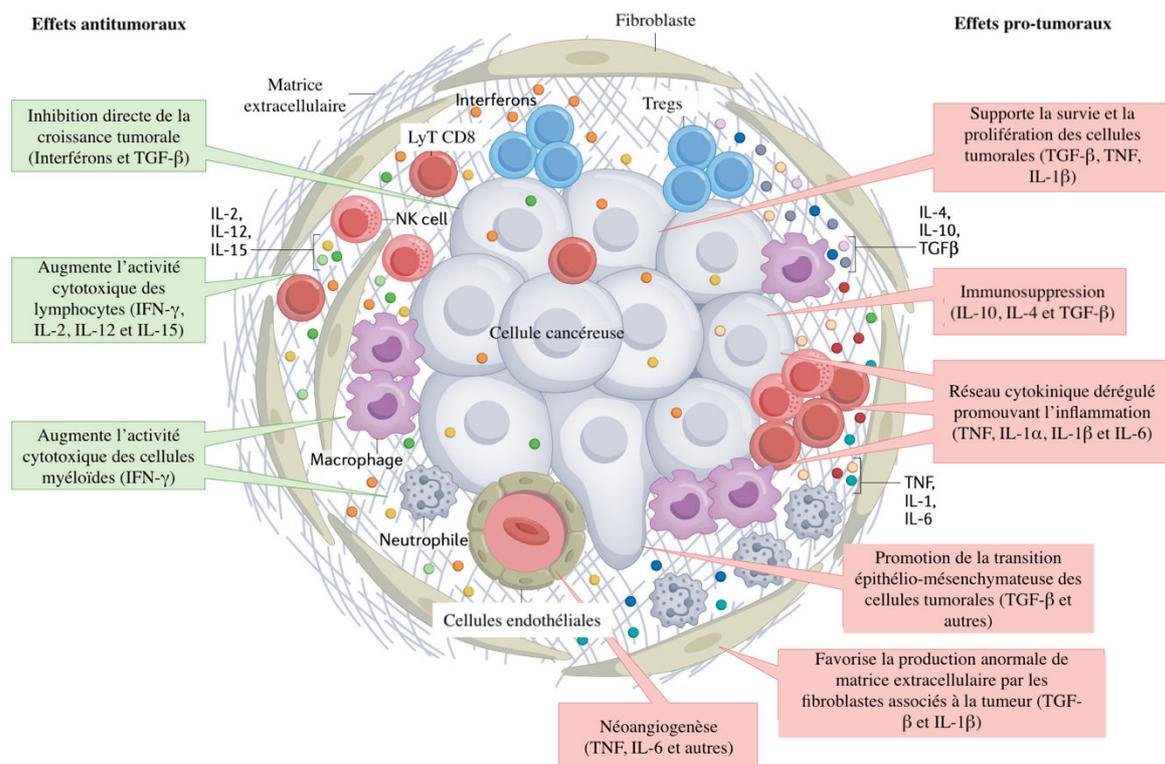


Figure 1 - Le rôle des cytokines dans le microenvironnement tumoral.

Dans le microenvironnement tumoral (MET), de nombreuses cytokines sont produites que ce soit par les cellules immunitaires mais aussi par les cellules tumorales. Ces cytokines peuvent posséder des effets positifs sur la RI mais aussi des effets négatifs en fonction du contexte cellulaire dans lequel ces molécules sont sécrétées. Certaines de ces cytokines possèdent des effets anti-tumoraux (boîtes vertes) notamment en inhibant directement la croissance tumorale, en activant fortement les lymphocytes ou les cellules myéloïdes. Cependant, on retrouve aussi des effets pro-tumoraux comme la stimulation de la survie cellulaire, de l'immunosuppression, un environnement pro-inflammatoire favorable à la tumeur et des phénomènes d'angiogenèse. Figure issue et modifiée de (Propper and Balkwill, 2022).

2.1. Rôles des cytokines dans le cancer

Les cytokines sont des actrices majeures de la communication cellulaire dans le contexte tumoral. Bien que certaines cytokines soient importantes pour la mise en place de RI antitumorales (comme l'IL-2 et l'IFN- γ), la dérégulation de leur production participe à la carcinogenèse (**voir figure 1**) et influe sur la réponse aux traitements. Ces cytokines peuvent avoir un effet direct sur les cellules tumorales comme la promotion de la transition épithélio-mésenchymateuse, l'induction de modifications épigénétiques, la régulation positive d'autres cytokines promotumorales ou anti-inflammatoires et la production de certaines protéases facilitant l'invasivité et les métastases (Propper and Balkwill, 2022). On retrouve aussi des effets sur les cellules stromales avec la stimulation de l'angiogenèse ainsi que la production de molécules de la matrice extracellulaire toutes deux bénéfiques à la tumeur. Concernant l'action des cytokines sur le SI, elles participent au recrutement et à la polarisation des cellules immunitaires en cellules immunosuppressives, à l'inhibition de la mise en place de RI ainsi que celle de l'action cytotoxique des lymphocytes. Bien qu'on estime que 20-25% des cancers soient des séquelles de pathologies fortement inflammatoires comme une infection ou une maladie auto-immune, le développement de tumeurs peut induire des modifications inflammatoires du MET notamment *via* la production de cytokines. Effectivement, des souris déficientes pour des cytokines ou des voies inflammatoires médiées par des cytokines sont moins susceptibles de développer des tumeurs ainsi que des métastases (Moore *et al.*, 1999; Greten *et al.*, 2004). Toutes ces données nous amènent à penser que modifier l'environnement inflammatoire des cancers en utilisant directement des cytokines ou des antagonistes pourrait permettre de « rééduquer » le MET afin qu'il soit favorable à une RI antitumorale. De surcroît, une méta-analyse à partir de la base de données « *The Cancer Genome Atlas* » étudiant le profil d'expression d'acides ribonucléiques messagers (ARNm) de 10 000 tumeurs a révélé six signatures basées sur l'expression de cytokines et de molécules associées au SI. Celles-ci permettent de différencier six sous classes immunitaires : i) dominée par l'IFN- γ , ii) inflammatoires, iii) absence de lymphocytes, iv) silencieuse immunitairement, v) dominée par le TGF- β et vi) cicatricielle (signature moléculaire dominée par des gènes impliqués dans la réparation tissulaire) (Thorsson *et al.*, 2018). Cette classification est basée sur le profil d'expression d'ARNm de cytokines, chimiokines, de récepteurs aux chimiokines et cytokines stratifié sur l'amplification, la délétion ou la méthylation de gènes impliqués dans la fonction de ces cytokines (Thorsson *et al.*, 2018). Cette classification pourrait justifier l'utilisation de certaines cytokines ou antagonistes des récepteurs aux cytokines dans certaines sous-populations de tumeurs. Elle pourrait aussi permettre de les utiliser

en combinaison avec certaines immunothérapies spécifiquement dans certains sous-types de tumeurs.

2.2. Utilisation des cytokines en clinique :

Bien que des modèles précliniques aient montré l'intérêt de l'administration de cytokines, seules ou en combinaison, de nombreux essais cliniques tentent également de l'appliquer chez l'homme. Cependant, plusieurs limites freinent grandement l'utilisation de ces molécules en clinique : i) une faible durée de vie dans la circulation, ii) une faible biodistribution dans les tissus cancéreux, iii) une action non spécifique, iv) une fenêtre thérapeutique très courte avec une toxicité importante, v) des effets immunosuppresseurs et iv) des effets dépendants du contexte d'utilisation (Propper and Balkwill, 2022). Afin de palier à ces difficultés, un axe important est la modification de ces cytokines dans le but d'augmenter la durée de vie et l'affinité pour leur récepteur afin de réduire la toxicité mais aussi d'éviter l'accumulation de cellules immunosuppressives, telles que les LyT régulateurs (Tregs) ou les cellules myéloïdes immunosuppressives dans le MET. D'autres stratégies visent à délivrer ces cytokines directement dans le lit de la tumeur *via* l'utilisation de virus oncolytiques. Par exemple, le Talimogene laherparepvec codant le facteur de stimulation des colonies de granulocytes et de macrophages (GM-CSF) ou codant l'IL-12 a montré une régression de la tumeur primaire mais aussi des tumeurs secondaires chez des patients atteints de mélanome dans un essai clinique de phase 1 (Daud *et al.*, 2008). Même si ces molécules possèdent un rôle important dans le MET, il semblerait que la modulation d'une seule voie *via* l'administration de cytokines ne soit pas suffisante et nécessiterait l'utilisation de plusieurs cytokines en même temps, d'être combinée à d'autres thérapies ou d'employer un mode d'administration plus efficace. D'ailleurs, une récente étude basée sur l'injection intratumorale d'une combinaison d'ARNm codant pour l'IL-12sc, l'IL-15 sushi, l'IFN- α 4 et le GM-CSF associé à des inhibiteurs de points de contrôle immunitaire (ICI) a permis un ralentissement de la croissance tumorale et une augmentation de la survie (Hotz *et al.*, 2021). Ces nouveaux éléments montrent qu'il faut utiliser des méthodes combinées afin d'obtenir un fort effet antitumoral. Également, l'utilisation de certaines chimiothérapies dans le cancer de l'ovaire active la voie de l'IL-1 β et l'inflammasome « *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3* » (NLRP3) conduisant *in fine* à une mort immunogénique importante pour la réponse au traitement ce qui montre que l'inhibition de l'action de certaines cytokines dans le contexte tumoral pourrait être contre-productif et expose la difficulté de trouver des voies ayant de réels bénéfices thérapeutiques. Finalement, la complexité et la dérégulation du MET, l'activation chronique de voies moléculaires parfois redondantes, mais

aussi la dérégulation de voies différentes dans des sites métastatiques et la diversité intra ou inter-patients des RI sont des limites importantes au développement de thérapies efficaces. Alors que l'utilisation seule des cytokines n'ait pas montré d'effets bénéfiques dans différents cancers (**voir tableau 1**), leur combinaison à différentes immunothérapies - comme les ICI - reste l'axe de recherche majoritaire dans ce domaine.

Tableau 1 - Les différentes cytokines évaluées en clinique.

Cytokine	Action dans le MET	Limites et effets secondaires
IL-2	Favorise la réponse des Lyt, des cellules NK, la prolifération des LyT CD4 et la production d'anticorps par les cellules B	Courte demie-vie, syndrome de fuite vasculaire et cardiotoxicité
IL-10	Cytokine anti-inflammatoire et immunosuppressive mais peut activer les LyT CD8	Courte demie-vie
IL-12	Stimule la prolifération et la cytotoxicité des LyT et des cellules NK. Induit la différenciation des LyT en TH1 et la production d'IFN- γ	Courte demie-vie, inflammation systémique, hépatotoxicité et myélotoxicité (qui peuvent être fatals)
IL-15	Favorise la génération, la persistance et l'activité des cellules NK et LyT CD8	Courte demie-vie
IFN- α	Action antivirale, anti-angiogénique, cytostatique et immunostimulante	Courte demie-vie et faible biodistribution, fatigue et dépression
IFN- γ	Principale cytokine régulant l'immunité innée et adaptative ainsi que la réponse antitumorale médiée par les LyT CD4 et CD8	Courte demie-vie

Tableau issu et modifié de (Propper and Balkwill, 2022)

3. Les immunothérapies

Un autre argument en faveur de l'importance du SI dans le contexte tumoral est l'avènement, ces 10 dernières années, des immunothérapies comme les cellules T possédant un TCR chimérique (CAR-T-cells pour « *Chimeric Antigen Receptor T cells* »), les virus oncolytiques mais aussi les ICI (**voir figure 2**). Ces molécules ont grandement révolutionné l'approche thérapeutique et la survie des patients dans certains types de cancer et font partie actuellement de l'armement thérapeutique en oncologie. Comparées aux thérapies classiques, ces stratégies

présentent des avantages importants : i) elles ne dépendent pas de voies oncogéniques des cellules tumorales (Huang *et al.*, 2016) et ii) elles ont des effets supérieurs par rapport aux thérapies classiques et sont très bien tolérées par les patients (Lebbé *et al.*, 2014; Schadendorf *et al.*, 2015).

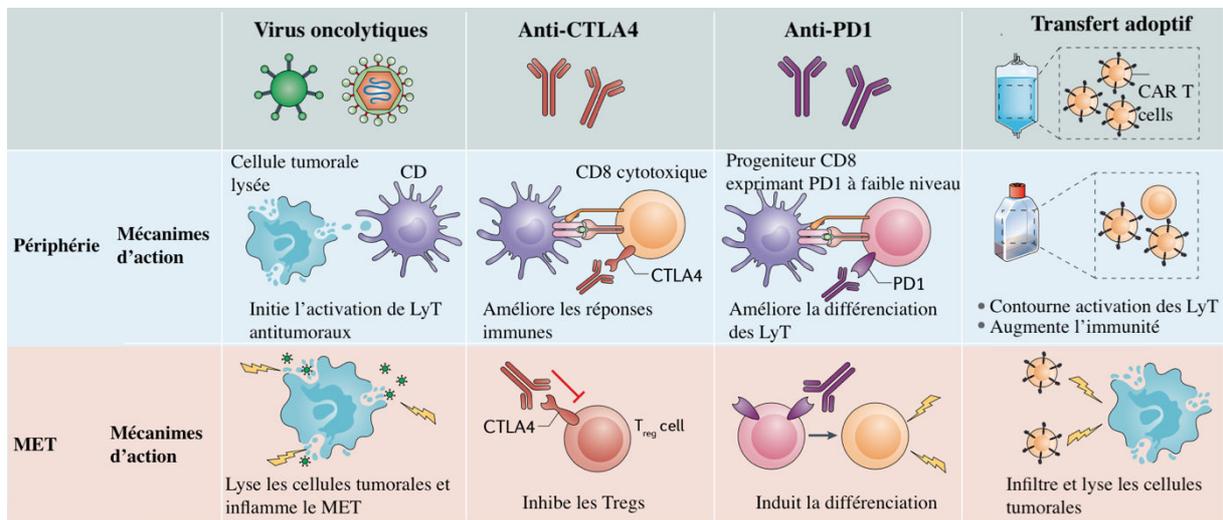


Figure 2 - Les différentes classes d'immunothérapies

Les immunothérapies regroupent différentes sous-catégories de molécules et de stratégies. Parmi ces derniers, les virus oncolytiques se caractérisent par leur capacité à se répliquer dans le MET et d'induire une lyse des cellules de celui-ci. Cette lyse cellulaire induit une inflammation capable d'initier des RI en faveur d'une RI antitumorale. Les ICI sont une autre classe d'immunothérapies. Les plus utilisés en clinique sont les anticorps dirigés contre CTLA-4 et PD-1 mais il existe d'autres cibles thérapeutiques intéressantes dans le cancer comme TIM-3 et LAG-3. Ces molécules vont soit inhiber des voies importantes pour les Tregs avec les anti-CTLA-4 (défavorables dans le cadre du cancer) mais aussi de réveiller des RI en bloquant l'action de freins moléculaires comme PD-1 et CTLA-4. Une autre révolution dans le traitement des cancers est l'avènement des CAR-T cell. Ces LyT modifiés *ex vivo* pour exprimer un TCR chimérique (CAR pour « *chimeric antigen receptor* ») sont capables de reconnaître un antigène spécifiquement exprimé par la tumeur et d'induire la lyse directe des cellules tumorales. Figure issue et modifiée de (DePeaux and Delgoffe, 2021).

Comme précédemment introduit, le SI joue un rôle dans la détection et la lutte contre le développement de tumeurs même si ces dernières peuvent néanmoins se développer grâce à différents processus. En ce sens, l'activation des points de contrôle de la RI est un des mécanismes mis en place par les tumeurs pour contrer l'action du SI. En effet, ces molécules sont principalement exprimées par les cellules immunitaires (principalement les LyT régulateurs) pour freiner la RI limitant ainsi l'emballement de ce dernier et le développement de maladies auto-immunes (DePeaux and Delgoffe, 2021). Les tumeurs utilisent en partie ce levier pour freiner et limiter la RI aboutissant à un environnement favorable au développement tumoral. Bien qu'il existe une multitude de points de contrôles immunitaires, nous allons dans ce

manuscrit nous focaliser sur les plus détaillés et les plus utilisés en clinique c'est-à-dire CTLA-4 et l'axe PD-1/PD-L1.

3.1. Inhibition de CTLA-4

Le premier anticorps monoclonal dirigé contre un point de contrôle immunitaire approuvé par la « *food drug administration* » (FDA) aux États-Unis fut l'ipilimumab en 2011 pour traiter des patients souffrant d'un mélanome de stade avancé (Lipson and Drake, 2011). En 2012, il fut utilisé en Europe et au Canada pour des patients souffrant de mélanome (Hanaizi *et al.*, 2012). CTLA-4 est une protéine membranaire caractérisée dans les années 80 (Dariavach *et al.*, 1988). Cette molécule fut premièrement décrite par le Dr James Allison pour son effet inhibiteur de l'attaque des LyT sur les cellules cancéreuses (Leach, Krummel and Allison, 1996). Cette découverte a d'ailleurs abouti à l'obtention du prix Nobel de médecine et de physiologie en 2018. Pour que les LyT puissent attaquer et détruire les cellules cancéreuses, ils ont besoin de s'activer correctement pour devenir des cellules effectrices. Ce processus nécessite une stimulation spécifique de l'antigène médié par le TCR et une stimulation supplémentaire *via* l'action de récepteurs dits de co-stimulation (Lenschow, Walunas and Bluestone, 1996). Durant les premières phases de mise en place de la RI, les récepteurs de co-stimulation CD28 et les récepteurs inhibiteurs CTLA-4 (tous les deux font partie de la famille des récepteurs B7) envoient des signaux d'activation et d'inhibition (Harris and Ronchese, 1999). Dans les ganglions drainants, les LyT surpassent ce signal inhibiteur lié à CTLA-4 et CD28 se fixe à CD80/CD86 sur les cellules dendritiques (CD) permettant l'activation de ces dernières et la mise en place d'une RI spécifique de l'antigène (Linsley *et al.*, 1994; Egen and Allison, 2002; Riley *et al.*, 2002; Schneider *et al.*, 2002, 2006; Parry *et al.*, 2005). Donc, le blocage de CTLA-4 (comme elle intervient dans les processus d'activation des LyT) dans le contexte tumoral permet la régulation de la RI dans les phases précoces de la maturation des LyT.

Cependant, même si l'on constate un taux de réponse thérapeutique de 10-20% chez les patients, il existe des effets secondaires importants de l'utilisation de cette stratégie pour les patients comme des colites et des dermatoses. Ces effets sont dus directement à l'inhibition de cette voie en participant à l'augmentation des pathologies inflammatoires. Précisément, le fait d'amplifier l'activation des lymphocytes en surpassant des mécanismes inhibiteurs participe à l'augmentation des risques de développer des maladies auto-immunes. De plus, l'action de ces molécules joue un rôle sur l'activation du SI plutôt qu'une action directe sur les cellules

tumorales. Mais toutes ces limites n'empêchent pas le développement de nombreux anticorps monoclonaux en cours d'évaluation par plusieurs agences du médicament dans le monde.

3.2. Inhibition de la voie PD-1/PD-L1

Bien que l'implication du SI soit suspecté depuis plus de 100 ans, les travaux d'Allison et Honjo ont permis de valider ce concept allant jusqu'au développement de thérapies. La protéine PD-1 est un inhibiteur de la RI innée et adaptative et est exprimée sur les cellules T (infiltrantes ou non la tumeur), les lymphocytes B, les CD8, les macrophages et les cellules NK. PD-L1 appartient à la famille des protéines B7 (comme CD80 et CD86) et est le ligand de PD-1. Cette molécule est exprimée sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et certaines cellules du MET et notamment les cellules tumorales elles-mêmes. La fixation de PD-L1 sur PD-1 entraîne le recrutement de deux phosphatases (SHP1 et SHP2) inhibant des voies biologiques importantes à la fonction du LyT comme les voies prolifératives, la sécrétion de cytokines et leur activité cytotoxique. Les cellules tumorales peuvent exprimer fortement PD-L1 induisant des phénomènes d'épuisement et d'apoptose des LyT ce qui participe à l'échappement des cellules tumorales à l'immunosurveillance. Il a d'ailleurs été démontré que la liaison de PD-1 sur PD-L1 participe à la perte de fonction des lymphocytes directement dans la tumeur (Freeman *et al.*, 2000; Zou and Chen, 2008).

Ces ICIs de nouvelle génération (ciblant l'axe PD-1/PD-L1) ont montré des réponses importantes dans différents cancers (comme 70% de patients répondeurs dans le lymphome de Hogkin) qui ne répondaient pas aux thérapies classiques. Des données d'études cliniques ont d'ailleurs souligné que l'utilisation des anti-PD-1 est plus efficace que les anti-CTLA-4 dans un modèle de mélanome et possèdent aussi une meilleure tolérance biologique. De fait, CTLA-4 joue un rôle important sur l'initiation des RI entraînant une augmentation des phénomènes d'auto-immunité comparé à ce que l'on observe chez des patients ayant reçu des anti-PD-1. Il semblerait donc que l'utilisation des anti-PD-1 soit plus efficace car CTLA-4 joue également un rôle important dans la régulation des RI dirigés contre les auto-antigènes (Walker, 2013; Rosenberg, 2014; Redman, Gibney and Atkins, 2016). Le ciblage de CTLA-4 pourrait entraîner l'infiltration des lymphocytes dans les tissus comme retrouvée chez les souris CTLA-4-KO (McCoy and Le Gros, 1999; Sansom, 2000). Cela aurait comme conséquence l'activation des RI contre des auto-antigènes menaçant l'intégrité des organes et la vie des patients. L'inhibition de l'axe PD-1/PD-L1 entraîne des effets secondaires moins importants comme ce que l'on retrouve avec les souris PD-1 KO. Ces effets secondaires vont de la fatigue à des pneumopathies

(ayant d'ailleurs entraîné la mort de certains patients dans un essai clinique évaluant le nivolumab) ainsi que des colites.

3.3. Mécanismes de résistances aux ICI

Quoique le développement de ces immunothérapies ait permis de proposer des thérapies efficaces dans certains cancers métastatiques, il s'avère qu'une résistance à ces traitements peut apparaître, limitant le nombre de patients répondeurs à ces thérapies. Pour que ces thérapies soient efficaces, 3 conditions importantes sont nécessaires : i) la présence de LyT activés contre la tumeur ii) des lymphocytes infiltrant la tumeur et iii) des LyT tuant les cellules tumorales. Il est donc possible qu'une de ces trois étapes soit enrayée par des mécanismes intrinsèques de la tumeur comme certaines mutations ou la présence de cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC). Il a d'ailleurs été rapporté chez des patients traités, atteints d'un mélanome métastatique, la perte de la $\beta 2$ microglobuline (partie importante pour la stabilité du CMH de classe 1) entravant la présentation antigénique et donc l'activation des LyT CD8⁺ contre la tumeur (Restifo *et al.*, 1996). Il a aussi été montré que l'utilisation d'anticorps dirigés contre PD-1 entraînait la régulation positive d'autres molécules immunorégulatrices telle que TIM-3 (Koyama *et al.*, 2016; Romero, 2016). Dans ces cas particuliers, il semblerait que l'utilisation combinée de plusieurs ICI puisse être une solution pour outrepasser les phénomènes de résistances.

Actuellement, on estime que seulement 30% des patients peuvent bénéficier de ces thérapies et il est donc nécessaire de trouver de nouvelles stratégies combinées afin de répondre à cette problématique. La découverte d'un nouveau type de mort cellulaire dite immunogénique ouvre de nouvelles perspectives afin de rendre éligibles plus de patients à ces immunothérapies.

Partie II : Les morts cellulaires

En 1972, *Kerr et al.* proposent le terme “apoptose” pour caractériser un phénomène de délétion cellulaire contrôlé (Kerr, Wyllie and Currie, 1972). L’apoptose a ensuite été reconnue comme une forme cellulaire associée à la condensation du cytoplasme et le fractionnement de la cellule. Plus tard, l’apoptose a été caractérisée comme une mort cellulaire programmée impliquée dans la plupart des processus physiologiques comme le développement embryonnaire, la morphogénèse et le renouvellement cellulaire (Nagata and Tanaka, 2017). L’apoptose est maintenant largement décrite et les mécanismes moléculaires et cellulaires sont désormais bien compris. Cela implique l’activation des caspases initiatrices (caspase 8 et 9) qui sont responsables de l’activation secondaire des caspases effectrices (caspase 3, 6 et 7) qui propagent le signal de mort cellulaire en clivant une multitude de substrats cellulaires. Les caractéristiques morphologiques après l’induction de l’apoptose sont : i) la contraction de la cellule ii) le bourgeonnement cellulaire iii) la formation de corps apoptotiques et iv) la prise en charge rapide par les cellules phagocytaires environnantes. L’apoptose a été largement considérée comme un processus contrôlé qui empêche l’initiation d’une inflammation restante silencieuse d’un point de vue du SI. Cela va à l’opposé au phénomène de nécrose - considérée comme un événement non-programmé qui conduit à la libération non contrôlée du contenu intracellulaire - associée à des molécules pro-inflammatoires pouvant initier des RI. L’apoptose comme mort cellulaire tolérogène opposée à la nécrose a longtemps été considérée comme le seul dogme de la mort cellulaire même si des formes de morts cellulaires non conventionnelles ont été décrites. C’est seulement récemment que le spectre des morts cellulaires a pris un nouveau tournant avec la découverte de morts cellulaires inflammatoires programmées, appelées morts cellulaires immunogéniques (MCI), comme la pyroptose et la nécroptose. Comme l’apoptose, ces MCI sont contrôlées par des acteurs moléculaires maintenant bien décrits. D’autres MCI ont aussi été nouvellement décrites comme la ferroptose, la parthanatose, la mort cellulaire dépendante de l’autophagie, la mort cellulaire dépendante du lysosome, NETose (**voir figure 3**). De récents travaux ont d’ailleurs montré que la MCI pouvait être directement induite par des traitements mécaniques (par exemple l’utilisation de particules magnétiques détruisant les cellules tumorales par vibration déclenché par un champ magnétique) ou médicamenteux ouvrant la voie au ciblage de ces voies spécifiques dans le traitement du cancer.

La première génération de chimiothérapies interfère avec la progression du cycle cellulaire et la plupart d'entre-elles induisent l'apoptose dans un large panel de cellules (Wong, 2011). Par conséquent, les cellules non-cancéreuses qui se divisent rapidement comme les cellules hématopoïétiques et les cellules immunitaires sont en même temps détruites, inhibant la mise en place d'une RI contre la tumeur ce qui représente un facteur important de rechute. Avec l'avènement du concept des MCI, beaucoup d'efforts se portent sur l'élaboration de thérapies qui induisent des formes de mort cellulaire non-apoptotiques comme des molécules de seconde génération, l'irradiation ou d'autres stratégies antitumorales. Plus spécifiquement, le concept émergent est que la libération de molécules pro-inflammatoires (DAMPs pour motifs moléculaires associés au dégats ou « damage-associated molecular pattern ») lors de la MCI induit des RI antitumorales très fortes (Kroemer *et al.*, 2022). Récemment, avec la découverte de ces voies moléculaires, de nouvelles études ont permis de montrer que des médicaments utilisés (par exemple le mitoxantrone, l'oxaliplatine ou le paclitaxel) de façon classique dans le traitement de certains cancers induisaient des MCI (Kepp, Senovilla and Kroemer, 2014; Y. Wang *et al.*, 2017a; Yu and He, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Ces nouvelles données renforcent l'idée que le relais du SI est important et primordial pour lutter contre l'émergence de cellules tumorales et la lutte antitumorale. Il est donc important de développer de nouvelles stratégies antitumorales capables de stimuler le SI.

Dans un premier temps, nous allons parler des caractéristiques de la MCI pour nous focaliser ensuite sur les processus de la mort cellulaire la mieux caractérisée qu'est l'apoptose. Les procédés d'induction et de régulation seront abordés ainsi que les éléments rendant cette mort incapable de stimuler fortement le système immunitaire. Dans un second temps nous étudierons les mécanismes associés à la pyroptose et la nécroptose, deux morts cellulaires inflammatoires et pourquoi ces dernières stimulent le SI. Nous terminerons sur l'intérêt des différentes morts cellulaires dans le cancer.

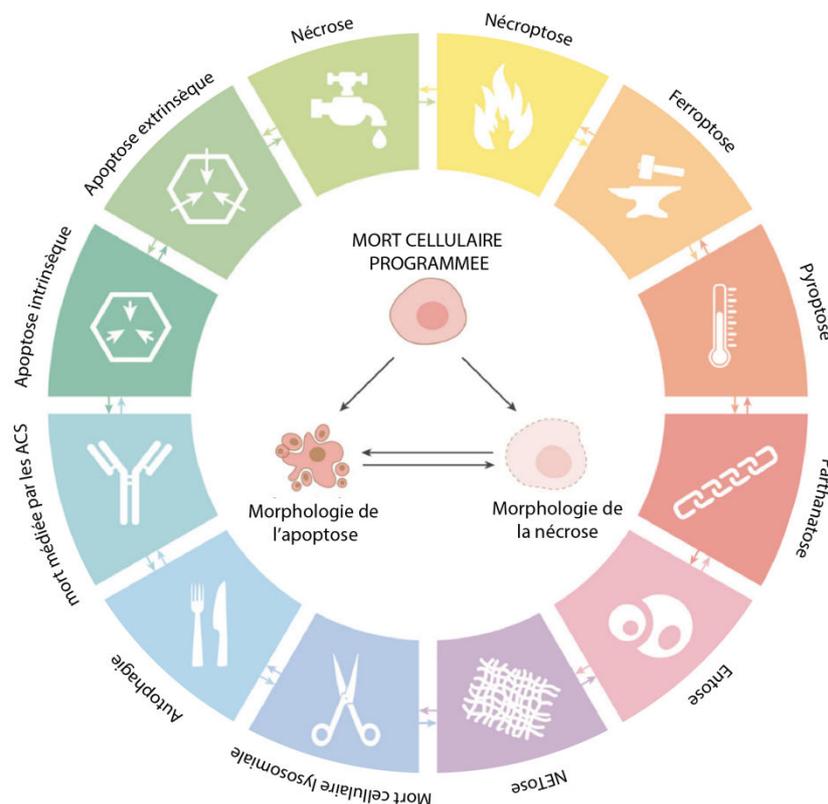


Figure 3 - Les différentes morts cellulaires programmées

Les cellules en situation de stress extérieur ou intérieur peuvent activer différentes voies de mortalité cellulaire. Toutes ces morts cellulaires programmées (avec des voies cellulaires dédiées) possèdent des caractéristiques et des morphologies particulières. Ces voies seront plutôt anti-inflammatoires ou tolérogènes (de la case verte à la case bleue) et pro-inflammatoire ou immunogéniques (de la case violette à la case jaune). Figure issue et modifiée de (Galluzzi *et al.*, 2018).

1. La mort cellulaire immunogénique

1.1. Principe de la mort cellulaire immunogénique

1.1.1. Adjuvantivité et antigénicité

L'immunogénicité repose sur la capacité de certains mécanismes à stimuler le SI et, est dépendante de deux sous phénomènes distincts : l'adjuvantivité et l'antigénicité. Effectivement, la RI adaptative induite par les MCI peut seulement se mettre en place dans certains contextes spécifiques. Le répertoire des lymphocytes conventionnels α/β reconnaît uniquement les peptides présentés par le CMH de classe I et de classe II et la structure de ces peptides est différente des peptides présentés par les cellules non-tumorales (Klein *et al.*, 2014). Par conséquent, la RI adaptative induite par les MCI est seulement possible si l'immunopeptidome des cellules mourantes possède une assez forte antigénicité. C'est le cas, par exemple, des cellules infectées par

un pathogène où les peptides encodés par le génome du pathogène sont capables d'induire une RI (Georgieva, Buckee and Lipsitch, 2019). Les cellules malignes, quant à elles, peuvent exprimer ou réexprimer des protéines qui ne sont pas couvertes par les mécanismes de tolérance centrale ou périphérique. C'est notamment le cas des mutations somatiques induisant l'expression de nouveaux antigènes (néoantigènes tumoraux) ou pour la réexpression de gènes inactifs fœtaux à l'âge adulte (Zitvogel *et al.*, 2021). Également, la modification post-traductionnelle (MPT) des protéines dans les cellules tumorales par phosphorylation, oxydation ou citrullination peuvent créer de nouveaux néoantigènes tumoraux (Engelhard *et al.*, 2020; Katayama *et al.*, 2021). Cependant, l'antigénicité n'est pas suffisante pour induire une RI adaptative car la présentation de peptides aux lymphocytes sans signaux additionnels de co-stimulation entraîne des mécanismes d'anergie (Jhunjunwala, Hammer and Delamarre, 2021). En outre, la faculté des CPA à stimuler les LyT par expression des molécules de stimulation (CD80, CD86 et CMH) provient de leur capacité à sonder le microenvironnement aux signaux de danger *via* l'expression notamment de récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR pour « *Pattern recognition receptor* ») (**voir tableau 2**) (Paludan *et al.*, 2021). Dans le contexte infectieux, ces signaux de danger sont formés par des motifs bactériens comme le lipopolysaccharide (LPS) et les ARNs double brins (Wolf and Underhill, 2018; Rehwinkel and Gack, 2020). Dans le cadre du cancer, les cellules cancéreuses sous l'effet d'un stress peuvent libérer des molécules endogènes (DAMPs) activant les CPA du MET (Gong *et al.*, 2020; Kroemer *et al.*, 2022). Les DAMPs (mais aussi certains motifs associés aux pathogènes) sont reconnus par les PRR, des molécules conservées exprimées fortement par les cellules myéloïdes (**voir tableau 2**) (Gong *et al.*, 2020). Ces deux éléments distincts, l'antigénicité et l'adjuvantité, sont donc complémentaires et nécessaires afin d'induire une stimulation efficace du SI.

Tableau 2 - Le système immunitaire est capable de sonder l'environnement via l'expression de récepteurs particuliers appelés PRR

Ligands (DAMPS)	Localisations cellulaires	Récepteurs
Heat shock proteins	Cytoplasme	TLR2 et TLR4
mtDNA	Mitochondrie	TLR3
HMGB1	Noyau et cytoplasme	TLR4
Histones	Noyau	TLR4
ADN	Noyau	TLR3
ATP extracellulaire (eATP)	Autophagosomes et cytoplasme	P2X7-NLRP3
Espèces réactives de l'oxygène (ERO)	Mitochondries	NLRP3
Protéines S100	Cytoplasme	TLR2 et TLR4
Acide urique	Cytoplasme	NLRP3

1.1.2. Stress cellulaire et mort cellulaire immunogénique

Une multitude d'agents connus induisent un stress cellulaire pouvant aboutir à la libération de DAMPs par les cellules tumorales. Bien qu'initialement, *Kepp et al.* aient démontré que seulement 9 agents utilisés en cancérologie sur près de 2 000 testés étaient capables d'induire des stigmates de la MCI, de nouvelles études ont étayé ces éléments par de nouveaux critères d'évaluation (**voir tableau 3**) (Kepp, Senovilla and Kroemer, 2014). En effet, certaines chimiothérapies utilisées couramment en clinique comme l'oxaliplatine, les anthracyclines, le cyclophosphamide, les dérivés des platines mais aussi la radiothérapie, les traitements photodynamiques et les virus oncolytiques induisent la libération de DAMPs favorables à la stimulation du SI (Kroemer *et al.*, 2022). De façon générale, l'induction de la MCI dans les cellules tumorales induit : i) l'altération de la membrane plasmique permettant l'exposition de certaines protéines intracellulaires à la surface, ii) des changements dans le MET par libération de protéines ou métabolites inflammatoires normalement séquestrés à l'intérieur de la cellule. Ces éléments sont capables de stimuler le SI par des voies moléculaires particulières qui seront détaillées dans le sous-chapitre suivant.

Tableau 3 - Exemples des stratégies utilisées en clinique induisant la MCI

Classe	Molécules	Observations
Chimiothérapies	Actinomycine D	Inhibiteur transcriptionnel utilisé pour le traitement des tumeurs de Wilms, du rhabdomyosarcome pédiatrique, du sarcome d'Ewing et des tumeurs germinales métastatiques non séminomateuses
	Anthracyclines	La doxorubicine et la mitoxantrone sont des inducteurs de la MCI largement utilisés pour le traitement du cancer du sein et des malignités hématologiques
	Bléomycine	Agent endommageant l'ADN couramment utilisé pour le traitement du cancer des testicules et du carcinome ovarien
	Cyclophosphamide	Agent alkylant autorisé pour une utilisation chez les personnes atteintes de cancer du sein, de tumeurs cérébrales et de néoplasmes hématologiques
	Lurbinectédine	Inhibiteur transcriptionnel actuellement approuvé pour le traitement du cancer du poumon à petites cellules métastatique
	Oxaliplatine	Dérivé du platine couramment utilisé dans la thérapie du cancer colorectal ; supérieur au cisplatine pour induire un stress cellulaire, l'exposition de la calréticuline et l'induction de la MCI
	PT-112	Conjugaison novatrice de platine-pyrophosphate en développement clinique pour la thérapie du cancer
	Taxanes	La docétaxel et le paclitaxel sont des inducteurs de la MCI largement utilisés dans la prise en charge du cancer du sein
	Téniposide	Inhibiteur de la topoisomérase II couramment utilisé pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë pédiatrique réfractaire
Thérapie endocrinienne	Mifépristone	Antagoniste des récepteurs de la progestérone (et des glucocorticoïdes) avec un potentiel induisant la MCI des cellules du cancer du sein
Photochimiothérapie extracorporelle	8-MOP	Photosensibilisateur inducteur de la MCI couramment utilisé pour le traitement extracorporel du lymphome cutané à cellules T
Virothérapie oncolytique	Rotarix/RotaTeg	Vaccins contre le rotavirus cliniquement approuvés qui induisent la MCI et la synergie avec les ICI dans des modèles de tumeurs de souris syngéniques
	Talimogène lahépépvec	Variant génétiquement modifiée de l'HSV1 exprimant le GM-CSF actuellement utilisée pour le traitement du mélanome
Thérapie photodynamique	Hypericine	Photosensibilisateur inducteur de la MCI pour le traitement du lymphome cutané à cellules T
	Redaporfine	Photosensibilisateur inducteur de la MCI pour la thérapie du cholangiocarcinome
	Vertéporfine	Photosensibilisateur inducteur de la MCI approuvé pour le traitement de la dégénérescence maculaire et en développement clinique pour une utilisation chez les personnes atteintes de diverses tumeurs solides
Radiothérapie	Irradiation γ	Puissant inducteur de la MCI largement utilisé dans la prise en charge des personnes atteintes de cancer
Thérapie ciblée	Belantamab	Conjugaison anticorps-médicament conçue pour délivrer une charge cytotoxique aux cellules exprimant le BCMA,
	mafodotin	

		actuellement approuvé pour la prise en charge du myélome multiple récurrent/réfractaire
	Bortézomib	Inhibiteur du protéasome induisant la MCI couramment utilisé pour le traitement du myélome multiple réfractaire
	Inhibiteurs de CDK4/CDK6	Inhibiteurs du cycle cellulaire avec de puissants effets immunostimulants induisant une forte induction d'IFN de type I et III, actuellement approuvés en tant que traitement de première intention pour le cancer du sein hormono-dépendant avancé/métastatique
	Cétuximab	Anticorps monoclonal ciblant l'EGFR largement utilisé chez les patients atteints de carcinome colorectal et de carcinome épidermoïde de la tête et du cou
	Crizotinib	Inhibiteur de la tyrosine kinase à large spectre utilisé pour la prise en charge du carcinome pulmonaire non à petites cellules favorisant la MCI

Tableau issu et modifié de (Humeau, Sauvat, et al., 2020)

Seulement quelques stress cellulaires bien particuliers peuvent induire une authentique MCI et peuvent être provoqués par certains agents ou stratégies utilisées actuellement en clinique (**voir tableau 3**). Au niveau mécanistique, les molécules induisant une MCI vont induire un arrêt de la transcription par des effets encore peu détaillés (Humeau, Sauvat, et al., 2020). Un autre mécanisme commun de ces agents est leur capacité à induire une dérégulation du cytosquelette notamment des microtubules (de Oca et al., 2021; Senovilla et al., 2012). Il est possible que ces processus soient induits par des mécanismes totalement différents, ciblant des composants et des protéines distinctes de la voie de la transcription ou de la formation du cytosquelette. Les événements reliant les réponses au stress dans les cellules malignes à une antigénicité accrue ont été peu caractérisés, bien que les stress transcriptionnel et traductionnel semblent être particulièrement efficaces pour générer des néoantigènes potentiels (Zitvogel et al., 2021). La réponse au stress est un phénomène conservé chez les eucaryotes et induit une baisse de la synthèse protéique et une augmentation de l'expression des certains gènes spécifiques en réponse à un stress cellulaire ou environnemental afin de réguler l'homéostasie (Pakos-Zebrucka et al., 2016). Cela conduit à la phosphorylation du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 (eIF2 α) par un des quatre membres de la famille des kinases eIF2 α (eIF2 α 1-4) et la production de la protéine ATF4 qui conduit à des mécanismes de survie cellulaire. L'activation de ce programme cellulaire dépend du contexte mais aussi de l'intensité du stimulus. Même si cette voie cellulaire est une voie de survie, elle peut conduire à la mort cellulaire à la suite d'un stress cellulaire trop important. L'activité de eIF2 α K2 et eIF2 α K3 semble être particulièrement importante pour l'induction de la MCI (Humeau, Leduc, et al., 2020; Humeau, Sauvat, et al., 2020). Au contraire d'agents cytotoxiques n'induisant pas la phosphorylation d'eIF2 α , les molécules ou stratégies induisant une MCI entraînent la

phosphorylation de cette protéine qui est, en outre, un biomarqueur spécifique de la MCI (Bezu et al., 2018; Humeau, Sauvat, et al., 2020). Dans des échantillons de tumeurs humaines, la phosphorylation de eIF2 α est corrélée avec l'exposition de la calréticuline (CRT) à la membrane des cellules mourantes de MCI mais aussi avec l'infiltration des CD8 et des LyT cytotoxiques (Fucikova et al., 2021). Ces éléments sont donc de bons pronostics pour les patients présentant ces marqueurs spécifiques. D'autres études ont aussi mis en lumière le rôle prépondérant de cette molécule dans les MCI. Précisément, l'expression d'une version non phosphorylable de eIF2 α (eIF2 α^{S51A}) abolit totalement l'expression membranaire de la CRT mais aussi l'autophagie (importante notamment pour la libération d'eATP) lorsque les cellules tumorales sont traitées par des anthracyclines (Humeau, Sauvat, et al., 2020). Ces éléments mettent donc en exergue le rôle central de la réponse au stress dans les phénomènes d'exposition membranaires de la CRT et de libération d'eATP importants dans les MCI. D'ailleurs cette réponse au stress est un mécanisme mis en place par le réticulum endoplasmique (RE) important pour détecter les protéines mal conformées. Il existe une multitude de protéines impliquées dans la réponse au stress du RE, notamment la protéine IRE1 qui contribue à l'épissage de l'ARN codant pour XBP1 participant elle aussi dans la réponse au stress cellulaire (Hetz et al., 2020). Des expériences ont permis de montrer que l'inhibition de la voie IRE1-XBP1 entraîne la perte d'exposition de la CRT après traitement par cetuximab suggérant que ce mécanisme est associé à la réponse au stress (Pozzi et al., 2016).

La réponse au stress est aussi nécessaire à l'autophagie cellulaire, processus grandement impliqué dans la libération d'eATP lors de la MCI (Klionsky et al., 2021). Cependant, le rôle précis de l'autophagie dans la MCI reste à déterminer et semble dépendant du contexte dans lequel elle prend place. En effet, certaines études ont montré que l'induction de l'autophagie par traitement photodynamique entraîne la baisse d'expression du CMH de classe I (diminuant de ce fait l'antigénicité) sur des cellules tumorales pancréatiques (Yamamoto et al., 2020), la baisse d'exposition membranaire de la CRT par les cellules tumorales (Garg et al., 2013) mais aussi la sécrétion d'IFN de type 1 par des cellules tumorales du sein après traitement par irradiation (Yamazaki et al., 2020). Dans des biopsies de patients atteints de cancer du sein, la signature génique d'une autophagie efficace est corrélée avec l'inhibition de la signalisation de l'IFN de type 1 et de l'IFN- γ ce qui est de mauvais pronostic dans ce cancer (Yamazaki et al., 2020). Cependant, comme expliqué précédemment, les processus d'autophagie sont associés à la libération d'eATP lors de la MCI, molécule importante pour l'activation du SI (Michaud et al., 2011a; Pietrocola et al., 2016). Chez des patients avec un cancer triple négatif du sein, une autophagie est corrélée à un meilleur pronostic ainsi qu'à un meilleur ratio LyT

cytotoxiques/Tregs. Il semblerait donc que les mécanismes d'autophagie soient importants pour la MCI et la RI mais dépendrait du type de cancer dans lequel ils prennent place.

L'ensemble de ces éléments montrent que la réponse au stress cellulaire joue un rôle important dans l'adjuvantité lors de la MCI notamment par la libération d'eATP, l'exposition membranaire de la CRT et peut être dans d'autres mécanismes encore peu ou pas compris.

1.2. MCI et stimulation du SI

De nombreuses études ont lié l'émission de DAMPs par les cellules tumorales succombant à une MCI à la mise en place de RI adaptatives (Galluzzi et al., 2017). La sécrétion de l'eATP dépendante de la Pannexin-1 (PANX1) ou dépendante du lysosome par les cellules mourantes et sa libération passive après la rupture de la membrane cellulaire augmentent la concentration extracellulaire en eATP aboutissant au recrutement des CPA *via* le récepteur P2Y2 dans le MET (Kepp et al., 2021; Michaud et al., 2011b). De plus, la libération passive de ANXA1 (*protein annexin A1*) va guider les CPA (surtout les CDs) vers les cellules mourantes ce qui facilite les interactions entre ces différentes cellules (Vacchelli et al., 2015). Les cellules succombant à une MCI vont exposer activement la CRT ainsi que d'autres molécules chaperonnes du RE comme PDIA3 (pour « *disulfide isomerase family A member 3* ») à la surface cellulaire (Obeid et al., 2007; Sprooten & Garg, 2020). L'exposition de la CRT va agir comme un signal « *eat-me* » permettant la phagocytose des cellules tumorales par les CDs *via* le récepteur CD91 (ou LRP1 pour *LDL receptor related protein 1*).

L'activation de P2X7 par l'eATP et la stimulation du TLR4 par la libération d'HMGB1 lors de la MCI par les cellules tumorales va induire la maturation des CDs (**voir figure 4**) (Apetoh et al., 2007). En outre, la maturation des CDs est aussi possible *via* la stimulation du récepteur CLEC9A (pour « *c-type lectine domain containing 9A* ») par la fixation de la F-lectine libérée des cellules mourantes (Ahrens et al., 2012). Ce récepteur principalement exprimé par les CDs de type 1 permet le réacheminement des peptides exogènes vers la voie du CMH de classe I en perturbant le phagosome (Canton et al., 2021). Ce procédé pourrait expliquer la plus haute capacité de ces cellules à induire des mécanismes de cross-présentation des antigènes comparés aux autres cellules (Hildner et al., 2008a). Un autre effet immunostimulant important est l'accumulation de DAMPS intracellulaires dans les cellules tumorales comme des ARN aberrants (détectés par le TLR3) (Sistigu et al., 2014), de l'ADN mitochondrial (mtDNA) activant de par leur structure la voie CGAS-STING (Hildner et al., 2008b; Yamazaki et al., 2020). Cette voie moléculaire culmine par l'activation de la voie NF- κ B et la sécrétion de plusieurs cytokines dépendantes de la IRF3 (*IFN responsive factor 3*) dont les IFNs de type 1 permettant la mise

en place d'une réponse adaptative après l'induction des morts cellulaires programmées (Zitvogel et al., 2015).

Cependant, toutes les DAMPs n'aboutissent pas à une activation du SI et cela participe dans la faculté qu'ont certaines voies à induire des mécanismes de tolérance. Par exemple, la libération de la prostaglandine E2 (PGE2) après l'activation de la caspase 3 induit des mécanismes immunosuppresseurs (Zelenay et al., 2015). Dans la même lignée, l'activation de la caspase 3 engendre aussi la libération de lysophosphatidylcholine et l'exposition des phosphatidylsérines (Ptdser) permettant le recrutement de macrophages immunosuppresseurs (MDSC) ce qui conduit à la prise en charge tolérogénique des cellules mourantes (Lauber et al., 2003; Segawa et al., 2014; Suzuki et al., 2013). De surcroît, les cellules tumorales libèrent - par des procédés encore mal compris - la molécule TPT1 ce qui attire les MDSC participant à la progression tumorale par la mise en place d'un MET immunosuppresseur (Hangai et al., 2021).

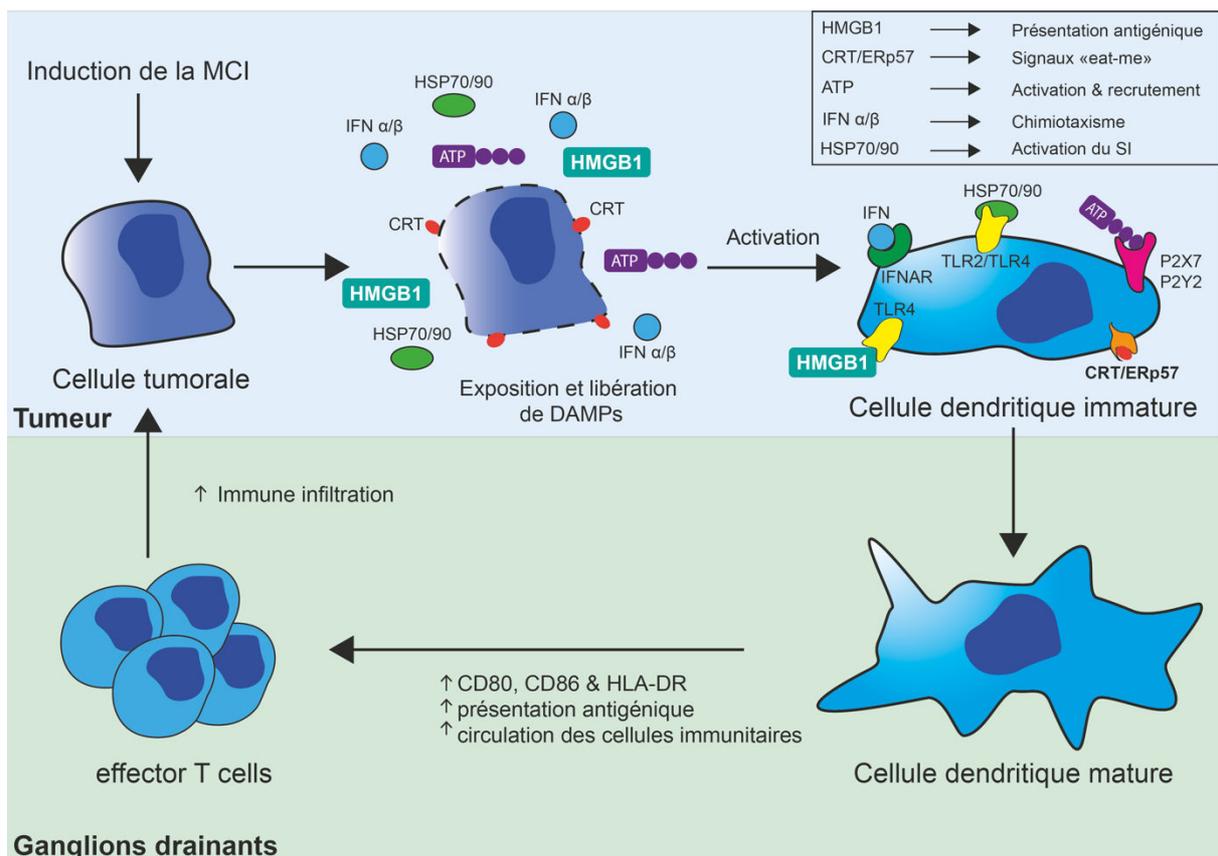


Figure 4 - La MCI dans le contexte tumoral et ses conséquences sur l'activation du SI

La MCI peut être induite par diverses stratégies telles que la chimiothérapie, la radiothérapie, les virus oncolytiques, la nécroptose et la pyroptose. Cela entraîne la libération de DAMPs et de signaux «eat-me» tels que l'eATP, HMGB1, HSP70, HSP90, la calréticuline (CRT) et l'ERp57. L'interaction de ces signaux avec des récepteurs exprimés sur les cellules phagocytaires facilite l'englobement des cellules tumorales et des antigènes,

augmentant la présentation des antigènes tumoraux et le recrutement des CD8. La MCI déclenche également la libération de cytokines, notamment de l'interféron de type I ($IFN\alpha/\beta$), qui stimule la maturation des CD8, leur migration vers les ganglions lymphatiques et la présentation des antigènes tumoraux aux LyT $CD4^+$ et $CD8^+$, conduisant finalement à l'activation et à la prolifération des LyT effecteurs anti-tumoraux. Figure issue de (Scarpitta et al., 2021).

2. L'apoptose

L'apoptose, découverte en 1972 (Kerr et al., 1972) est la mort cellulaire la plus étudiée et donc la mieux caractérisée. Elle intervient lors du développement, dans l'homéostasie tissulaire et cellulaire, dans la maturation thymique des LyT mais est aussi impliquée dans différentes maladies. L'apoptose se caractérise par des changements morphologiques tels que la compaction cellulaire, le bourgeonnement membranaire appelés aussi « corps apoptotiques », la condensation nucléaire ainsi que la fragmentation de l'ADN. Des changements biochimiques sont aussi observés comme la perméabilisation de la membrane extérieure de la mitochondrie, l'activation de protéases appelées caspases et l'externalisation des phosphatidylsérines (PtdSer) qui pourront entraîner la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules phagocytaires sans induire de réponse inflammatoire (D'Arcy, 2019). L'implication des cellules phagocytaires dans la prise en charge des corps apoptotiques permet de limiter la propagation du contenu intracellulaire aux cellules voisines, restreignant de ce fait l'inflammation. C'est pour cela que l'apoptose est considérée comme une mort silencieuse ne stimulant pas le SI contrairement à d'autres morts cellulaires programmées au pouvoir inflammatoire plus important.

Cette mort cellulaire programmée survient après l'induction de signaux pro-morts ou la perte de signaux de survie. L'apoptose est activée quand les signaux pro-morts surpassent les signaux de survie. Ces signaux de mort cellulaire se finalisent par l'activation des caspases initiateuses 8 et 9 activant à leur tour les caspases exécutoires 3, 6 et 7 qui cliveront une centaine de substrats intracellulaires aboutissant à l'apoptose (D'Arcy, 2019; Gudipaty et al., 2018). Ce mécanisme d'apoptose est conservé chez les organismes multicellulaires mais des mécanismes similaires se retrouvent chez certaines bactéries (Kaczanowski, 2016). L'apoptose peut être initiée par la cellule elle-même en cas de stress génotoxique (par exemple, une exposition prolongée aux ERO), d'hypoxie et de radiations (voie intrinsèque) mais aussi à la suite de l'interaction d'une cellule du SI avec une cellule endommagée (voie extrinsèque). Tous les jours, 1×10^9 cellules meurent par apoptose (Elliott & Ravichandran, 2010) et les deux voies (intrinsèque et extrinsèque) agissent en synergie pour assurer l'homéostasie tissulaire et cellulaire. Une division cellulaire incontrôlée peut résulter dans le développement de pathologies comme le cancer alors qu'un taux excessif de mort cellulaire peut entraîner des maladies comme

Alzheimer, Parkinson ou la polyarthrite rhumatoïde. Bien qu'associé au développement des cancers, la dérégulation de l'apoptose est aussi impliquée dans la résistance aux thérapies anticancéreuses (Plati et al., 2008). Pour ces raisons, la dérégulation de l'apoptose est considérée comme une caractéristique principale du cancer (Fulda, 2009).

2.1. Voie d'activation intrinsèque de l'apoptose

Cette voie est aussi connue sous le nom de la voie mitochondriale de l'apoptose (Igney & Krammer, 2002) et implique une multitude de stimuli actionnant différentes cibles cellulaires. Elle est sous la dépendance de facteurs libérés par la mitochondrie et peut être initiée par des signaux positifs ou négatifs. Les signaux négatifs sont associés à la perte de différents facteurs importants dans l'environnement immédiat de la cellule comme la perte de cytokines, de facteurs de croissance ou d'hormones (D'Arcy, 2019; Plati et al., 2008). Sans ces facteurs de « survie », d'autres molécules pro-apoptotiques intracellulaires (comme PUMA, Noxa et Bak) normalement inhibées deviennent actives et induisent l'apoptose. D'autre part, les facteurs positifs se caractérisent par différents stress comme l'hypoxie, une hyperthermie, la présence de toxines, les radiations ionisantes, la libération d'ERO, un stress du RE ou une infection par un agent pathogène. La caspase initiateur responsable de l'activation de la voie intrinsèque est la caspase 9, capable de se fixer à APAF1 (pour « *adapter protein apoptotic protease activating factor 1* ») après la libération du cytochrome C (Cyt C) par la mitochondrie (**voir figure 5**). L'apoptose s'initie après un changement de charge dans la membrane mitochondriale externe permettant l'ouverture du pore mitochondrial transitoire (PMT). Dans un premier temps, la cellule tente de réparer le stress *via* les protéines de la famille BCL-2. Si ce stress n'est pas réparable, alors une sous classe de cette famille - Bax et Bak - entraîne la formation du PMT. L'ouverture de ce pore entraîne la libération de diverses molécules normalement séquestrées dans l'espace inter-membranaire de la mitochondrie comme smac/DIABLO, HTRA2/OMI, AIF, l'endonucléase G (ENDO G) et notamment le Cyt C qui permet l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose. Une fois libéré, le Cyt C va subir un changement conformationnel en se fixant sur APAF1 permettant l'exposition de deux domaines importants : i) le domaine de fixation à l'ATP ii) un domaine d'oligomérisation. Une fois l'ATP fixé, se met en place la formation d'un complexe composé de plusieurs molécules d'APAF1 et pro-caspase 9 appelé l'apoptosome. Ce complexe protéique possède en son centre plusieurs domaines d'activation CARD (pour « *caspase activation et recruitment domain* ») des caspases permettant le recrutement et l'activation d'une multitude de pro-caspase 9 (possédant aussi un domaine CARD). Une fois activée, la caspase 9 actionne à son tour la caspase 3 permettant le clivage de différents substrats

intracellulaires comme des protéines de l'appareil de Golgi, des lamines nucléaires permettant la perméabilisation du noyau facilitant l'accès au noyau par différentes DNase et des protéines permettant l'exposition de signaux spécifiques à la cellule endommagée pour la prise en charge par le SI.

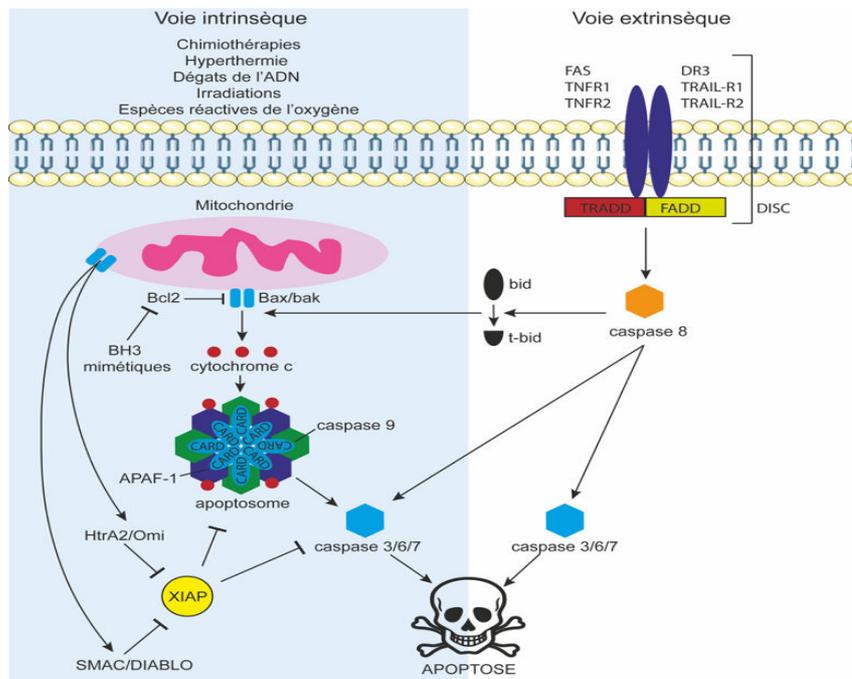


Figure 5 - Voie intrinsèque et extrinsèque de l'activation de l'apoptose

Lors de dégâts cellulaires causés par différents stimuli (chimiothérapies, dégâts de l'ADN, irradiations...) la voie intrinsèque de l'apoptose s'initie par l'insertion des protéines Bax et Bak (de la famille BCL-2) dans la membrane mitochondriale formant ainsi le pore mitochondrial transitoire (PMT) au travers duquel certaines protéines mitochondriales sont libérées (Cyt C, smac/DIABLO, HtrA2/Omi). Une fois dans le cytoplasme cellulaire, le Cyt C se lie à APAF-1 et la caspase 9 pour former l'apoptosome. Dès lors, ce dernier active les caspases 3 et 7 effectrices par clivage ce qui conduira, après le clivage de multiples cibles intracellulaires, à la mort cellulaire par apoptose. La voie extrinsèque de l'apoptose est initiée par l'activation de certains récepteurs membranaires de mort cellulaire (TNFR1, FAS, DR3). En fonction du récepteur activé, les protéines adaptatrices TRADD ou FADD seront recrutées sur le récepteur formant le complexe DISC aboutissant à l'activation de la caspase 8. La caspase 8 possède deux actions différentes dans le processus d'apoptose : i) elle conduit à l'amplification de la voie intrinsèque de l'apoptose en clivant la protéine Bid (bid en c-bid) qui une fois clivée se lie à Bax et initie la formation du pore mitochondrial transitoire ii) en activant directement les caspases effectrices 3 et 7 conduisant *in fine* à la mort cellulaire par apoptose. La voie apoptotique est finement régulée à différents niveaux. Pour éviter la formation du PMT, les protéines de la famille BCL-2 se font compétition pour la membrane mitochondriale. De la même manière, les protéines de la famille XIAP inhibent l'apoptosome et les caspases effectrices 3 et 7 pour éviter une activation incontrôlée de l'apoptose. Lors de l'induction de la voie intrinsèque, la mitochondrie libère les molécules HtrA2/Omi et smac/DIABLO qui vont inhiber les protéines XIAP, ce qui permet de lever ce frein moléculaire à la mise en place de l'apoptose.

Également, la libération de SMAC, AIF et ENDOG après la formation du PMT va amplifier le clivage de substrats intracellulaires par différents mécanismes. AIF et ENDOG iront dans le noyau préalablement perméabilisé pour participer à la fragmentation de l'ADN alors

que SMAC est important pour amplifier l'activation des caspases en inhibant la famille des protéines IAP (pour « *inhibitor of apoptosis* ») d'ubiquitine ligases – des molécules connus pour inhiber l'action des caspases effectrices de l'apoptose - et notamment cIAP1 et 2. Cette famille d'ubiquitine ligases se caractérise par la présence d'un domaine répété BIR (pour « *Baculoviral IAP Repeat* »). Outre leur action sur l'activation des caspases, ces molécules régulent la signalisation des PRR (*pattern recognition receptor*) en ubiquitinylant diverses protéines nécessaires pour l'activation de la voie inflammatoire NF- κ B ce qui induit une réponse inflammatoire *via* la voie des MAP kinases. Ces protéines IAP participent aussi à la survie cellulaire en se fixant sur les caspases - via l'interaction de leur domaine IBM (pour « *IAP binding motif* ») sur le motif BIR des caspases – et inhibent de ce fait l'activité catalytique de ces dernières. Les IAP peuvent aussi être bloquées par SMAC ou des molécules spécialement conçues pour mimer l'action de SMAC (les « SMAC mimetics » utilisés en cancérologie) et est une stratégie actuellement utilisée dans le cadre du traitement des cancers pour initier l'apoptose dans ces cellules tumorales initialement résistantes à ces phénomènes.

2.1.1. Régulation de la voie intrinsèque par les protéines de la famille BCL-2

La famille des protéines BCL-2 (pour « *B-cell lymphoma 2* ») régule la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MME) induisant un relargage irréversible de protéines de l'espace inter-membranaire mitochondrial. Ce processus permet *in fine* la cascade d'activation protéolytique des caspases aboutissant à l'apoptose (Kale et al., 2018). Les protéines de la famille BCL-2 se compose de protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques et le destin des cellules est régi par des interactions entre ces différents membres. Ces interactions sont dépendantes de l'abondance et l'affinité des partenaires dans l'environnement immédiat de la MME. La perméabilisation de MME par le PMT a pour but de libérer le Cyt C. La libération de cette molécule est un phénomène très rapide car deux études ont montré que la plupart des mitochondries libéraient le Cyt C dans les 5 minutes après l'induction d'un stress (Green et al., 2000) et l'activation complète des caspases s'obtient dans les 15 minutes résultant une mort cellulaire inévitable (Rehm et al., 2002).

Les protéines de la famille BCL-2 se décompose en 3 familles ayant des fonctions distinctes :

- Les protéines anti-apoptotiques composées de BCL-2, BCL-X_L, BCL-CDS, MCL-1 et BFL-1/A1
- Les protéines pro-apoptotiques capables de former le PMT tels que BAX, BAK et BOK

- Les protéines pro-apoptotiques possédant uniquement un site BH3 comme BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA.

Toutes les interactions entre ces protéines sont réversibles et sont régies par des affinités locales dépendantes de la présence de ces protéines dans l'environnement immédiat de la mitochondrie. Effectivement, ces molécules se trouvent à différents endroits de la cellule dans des compartiments physiologiques tels que le réticulum endoplasmique, le cytosol, l'appareil de golgi, l'enveloppe nucléaire, dans le noyau ou à la membrane plasmique. La fixation de ces protéines à la MME modifie l'affinité des protéines et joue un rôle actif dans leurs fonctions.

Différents scénarios peuvent expliquer les interactions entre les protéines de la famille BCL-2 et la possible formation du PMT permettant la mise en place de l'apoptose. En fonction du contexte physiologique et de la présence d'un stress, la diffusion des différents partenaires se retrouve bouleversée dans la cellule créant des conditions favorables pour la mise en place de l'apoptose.

2.2. Voie d'activation extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque de l'apoptose est aussi connue sous le nom de mort cellulaire associée aux récepteurs de mort (Igney & Krammer, 2002). Elle est initiée par certaines cellules immunitaires *via* l'expression des ligands de récepteurs de morts cellulaires. La fixation des ligands sur ces récepteurs de la cellule cible entraîne l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose après le clivage de la pro-caspase 8 en caspase 8. Les récepteurs de mort cellulaires font partie de la superfamille des récepteurs du TNF et possèdent leurs propres ligands (**voir tableau 4**). La fixation du ligand sur le récepteur de mort cellulaire permet le recrutement d'un monomère de pro-caspase 8 par le domaine DED (pour « *death-inducing domain* ») sur le complexe DISC (pour « *Death inducing signal complex* ») associé au récepteur de mort cellulaire du côté cytoplasmique (**voir figure 5**). Ce complexe DISC s'associe à la protéine adaptatrice FADD (pour « *Fas associated death domain* ») ou à une autre protéine appelée TRADD (pour « *TNF-receptor associated death domain* ») facilitant ainsi l'interaction entre la pro-caspase 8 et le complexe DISC (J. H. Kim et al., 2004). Une autre molécule, cFLIP (pour « *cellular FLICE-like inhibitory protein* ») peut être recrutée sur le complexe DISC et est importante pour définir le destin de la cellule. De fait, en fonction de la concentration de ses différentes isoformes (Short : cFLIP_S, Long : cFLIP_L ou Raji : cFLIP_R), cFLIP peut induire soit des signaux pro-apoptotiques soit des signaux anti-apoptotiques (Öztürk et al., 2012). Des études

mathématiques ont montré que l'induction d'un signal pro- ou anti-apoptotique induit par cFLIP dépend de (i) la force du stimulus au travers du récepteur FAS (ii) la concentration de cFLIP_L et (iii) la présence soit de cFLIP_S ou cFLIP_R. En outre, ces données supportent le fait que les variants cFLIP_{S/R} sont plutôt des modulateurs de la signalisation *via* FAS plutôt qu'être un inhibiteur de l'activation de la caspase 8 après son clivage (Fricker et al., 2010).

Tableau 4 - Les récepteurs de mort cellulaires humains et leurs ligands

Récepteurs de mort cellulaire	Ligands
Récepteur du TNF de type 1	TNF
CD95 (FAS ou APO-1)	CD95-Ligand (FAS-L)
DR3	TL1A
TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1 ou DR4)	TRAIL (Apo-L2)
TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R2 ou DR5)	TRAIL (Apo-L2)

L'association entre la caspase 8 et le complexe DISC permet le clivage et l'activation de la caspase 8 et sa dimérisation autorise l'induction de l'apoptose soit par la voie intrinsèque ou extrinsèque en fonction du contexte cellulaire. Précisément, la caspase 8 clivera directement les caspases exécutrices (3, 6 et 7) et activera donc directement l'apoptose. Cependant, les protéines inhibitrices de l'apoptose (IAP) inhibent directement l'activation des caspases exécutrices 3, 7 et effectrice 9 à moins que ces protéines soient inhibées par des molécules libérées de la mitochondrie (SMAC/DIABLO, HtrA2/Omi) (Spencer et al., 2009). Des études ont ainsi montré l'importance de la caspase 8 dans des modèles de souris KO pour cette dernière où l'inhibition de cette protéine annihile l'induction de l'apoptose après la fixation des ligands aux récepteurs de morts cellulaires (Varfolomeev et al., 1998).

2.3. Mécanismes tolérogènes associés à l'apoptose

2.3.1. Rôle des LyT CD4⁺ et CD8⁺ dans la RI induite par l'apoptose

Les antigènes associés aux cellules apoptotiques sont cross-présentés via le CMH de classe I aux LyT CD8⁺ induisant de ce fait, des CD8⁺ cytotoxiques (Albert et al., 1998). Plusieurs études ont ainsi démontré que le phénomène de tolérance est dépendant du CMH de classe I et implique une immunosuppression médiée par les LyT CD8⁺ (Ferguson et al., 2002;

Heath & Carbone, 2001; Steinman et al., 2003). Après la reconnaissance des antigènes par les CD8⁺ et leur conversion en lymphocytes cytotoxiques, le devenir de ces cellules dépend de signaux supplémentaires des CD. Ces dernières sont capables d'induire des RI après l'interaction avec les LyT préalablement activés notamment via l'interaction entre CD40 et CD40L (Hecht et al., 1998). Dans certains contextes infectieux, les LyT CD8⁺ sont capables d'exprimer le CMH de classe II par trogocytose (arrachement d'une partie de la membrane d'une autre cellule possédant le CMH-II) permettant une interaction directe entre les LyT CD4⁺ et CD8⁺ ce qui initie des RI (Romagnoli et al., 2013). D'autres travaux ont aussi démontré que la stimulation des TLR3 et des molécules de co-stimulation CD40 sur les CD permettait d'induire des RI sans l'aide des LyT CD4⁺ (Hervas-Stubbs et al., 2007). Cependant, cette stimulation n'est possible que dans un autre contexte que l'apoptose, car cette mort cellulaire se caractérise par une faible libération de molécules capables de stimuler activement le SI. Sans ces signaux additionnels, les LyT CD8⁺ deviennent des LyT à courte durée de vie (J. C. Sun & Bevan, 2003) ou meurent après une réexposition à l'antigène par une mort cellulaire induite par activation (Janssen et al., 2003, 2005). Ce type de mort cellulaire est médié par la molécule TRAIL et provoque l'auto-délétion des cellules CD8⁺ ou CD4⁺ (Griffith et al., 2007; Janssen et al., 2003). La mort cellulaire induite par TRAIL semble être spécifique du contexte apoptotique car la déficience de TRAIL chez les CD8⁺ ne change pas leur phénotype et leur fonction lors d'infections à *Listeria monocytogenes* (Sacks & Bevan, 2008). En outre, certaines expériences ont ainsi montré que les CD ayant phagocyté des cellules nécrotiques présentent les antigènes aux CD4⁺ et CD8⁺ alors que les CD ayant phagocyté des cellules apoptotiques ne présentaient les antigènes seulement aux CD8⁺ (Griffith et al., 2007). Ce type d'activation entraîne la formation de LyT CD8⁺ à courte durée de vie menant à l'expression de TRAIL qui va induire une auto-délétion et en même temps la suppression des LyT CD4⁺. En parallèle, ce processus va endiguer la mise en place de RI et induire une tolérance. Cependant, ces phénomènes ne se retrouvent pas dans des modèles infectieux où certaines réponses peuvent être médiées sans l'activation parallèle des CD4⁺ et semble donc être spécifiques à l'apoptose.

2.3.2. Récepteurs engagés

Les récepteurs cellulaires impliqués dans la prise en charge des cellules apoptotiques peuvent déterminer le devenir de la RI. Le processus de phagocytose nécessite la reconnaissance des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires et la formation d'une synapse. Cette synapse est régulée par un réseau de signaux appelés « *eat me* » et « *find me* ». Lors de la mort cellulaire des neutrophiles après activation, ces derniers libèrent certains signaux « *eat*

me » comme l'eATP ou l'eUTP qui interagissent avec le récepteur P2Y2 (Kourtzelis et al., 2020). Les neutrophiles libèrent aussi des lysophosphatidylcholine (LPC) et des sphingosine-1-phosphate (S1P) qui se fixent sur les récepteurs couplés à des protéines G comme G2A et S1P1-5 respectivement exprimés par les macrophages (Kourtzelis et al., 2020). De surcroît, la prise en charge des cellules apoptotiques est médiée par l'expression des molécules appelés « *eat me* ». Dans cette catégorie, les PtdSer qui sont habituellement intégrées dans la membrane cellulaire du côté intracellulaire se retrouvent exprimées à la surface des cellules apoptotiques jouant le rôle de signal « *eat-me* » pour les macrophages. La CRT est aussi une molécule faisant partie de cette catégorie qui se fixe sur les récepteurs LRP1 ou CD91 (pour « *LDL-receptor-related protein 1* ») (Kourtzelis et al., 2020). Il existe aussi certaines molécules dans l'environnement qui peuvent agir comme des adaptateurs moléculaires entre les récepteurs sur les macrophages et les molécules « *eat-me* » sur les cellules apoptotiques. Par exemple, la lactadhérine promeut l'efferocytose (phagocytose des cellules apoptotiques par les phagocytes) en se fixant sur les PtdSer et sur les récepteurs $\alpha V\beta 3$ et $\alpha v\beta 5$ des macrophages (Kourtzelis et al., 2020).

Le processus d'efferocytose est important pour l'homéostasie et sa dérégulation peut entraîner la mise en place de maladies inflammatoires ou auto-immunes. En effet, le lupus érythémateux systémique peut survenir dans certains cas par un défaut de prise en charge des cellules apoptotiques (GaipI et al., 2007; Yamaguchi et al., 2008). La perte d'expression de certains récepteurs impliqués dans la phagocytose (TIM4, MFG-E8, MER...) peut compromettre la tolérance au soi et induire des maladies auto-immunes (GaipI et al., 2006; Hanayama et al., 2004; Miyanishi et al., 2007). Ce n'est pas forcément le cas pour toutes les molécules impliquées dans ces processus car la perte d'expression de CD14, CD26, de l'intégrines $\beta 3$, de l'intégrines $\beta 5$ n'induit pas forcément des phénomènes d'auto-immunité (Ravichandran & Lorenz, 2007). D'autres études ont montré que des macrophages déficients pour CD26 n'étaient pas capables de prendre en charge les cellules apoptotiques mais continuaient de produire des cytokines immunosuppressives tel que le TGF- β (Lucas et al., 2006).

2.3.3. Modification des DAMPS

La majorité des protéines qui sont libérées par les cellules passent par la voie classique de sécrétion des molécules composée du réticulum et de l'appareil de Golgi (Murray & Stow, 2014). Cependant quelques protéines nucléaires ou dénuées de peptides signaux peuvent être libérées par des voies non-conventionnelles qui ne sont toutefois pas encore bien comprises. Les cellules qui meurent libèrent des molécules appelées DAMPS (Murao et al., 2021). Ces

molécules habituellement invisibles pour le SI en conditions physiologiques peuvent stimuler le SI lorsqu'elles sont exposées à la membrane ou libérées dans l'espace extracellulaire lors d'une infection, d'un stress ou lors de la rupture de la membrane cellulaire quand les cellules meurent (Matzinger, 1994). Les MPTs des protéines est un processus important qui permet la vérification rapide de la fonction d'une protéine contrôlant sa relocalisation cellulaire, la régulation des interactions protéines/protéines et son activation/inactivation (Rider et al., 2017). Les MPTs possibles sont : i) l'acétylation ii) la phosphorylation iii) l'ADP ribosylation iv) la méthylation v) la glycosylation et, vi) l'oxydation. Ces MPTs vont être différentes si les cellules meurent d'apoptose, de nécrose secondaire, de nécroptose ou de pyroptose ce qui influence l'activation secondaire du SI.

2.3.3.1. HMGB1 comme modèle des MPTs:

HMGB1 est une des molécules les mieux caractérisées et servira ici d'exemple des MPTs lors de l'apoptose. HMGB1 est une protéine nucléaire et la première étape nécessaire à sa libération est sa translocation du noyau vers le cytoplasme (Bonaldi et al., 2003; B. Lu et al., 2014). Beaucoup de MPTs de cette protéine vont augmenter l'interaction avec le récepteur nucléaire CRM1, facilitant son export vers le cytoplasme de la cellule (Kwak et al., 2020). Le mécanisme précis de libération d'HMGB1 reste obscur mais elle pourrait être libérée passivement lors de la perte de l'intégrité membranaire (Kwak et al., 2020). Certaines études ont montré que l'injection intraveineuse de cellules nécrotiques va induire une RI *via* l'action d'HMGB1. Cette même étude a montré l'importance de cette molécule pour induire une RI car l'absence de HMGB1 dans les mêmes conditions induit de la tolérance (Kazama et al., 2008). D'autres études ont également démontré que lorsque cette protéine est libérée, lors de la pyroptose (une mort cellulaire inflammatoire caractérisée par la perméabilisation de la membrane plasmique associée à une libération du contenu intracellulaire), cette dernière est hyperacétylée ce qui n'est pas le cas lors de la nécrose secondaire ou de l'apoptose (Yang et al., 2015). D'ailleurs, HMGB1 est sous une forme particulière appelée « *disulfide bond form* » après la pyroptose et la nécrose alors que l'apoptose induit une forme totalement oxydée. Cette conformation particulière peut modifier la capacité de HMGB1 à se fixer sur les récepteurs exprimés par le SI et peut donc expliquer pourquoi cette molécule est capable de stimuler le SI dans le cas de la pyroptose et de la nécroptose et pas de l'apoptose. Tous les événements ayant lieu durant le processus de mort cellulaire peuvent modifier le devenir des RI via les différentes voies que ces morts cellulaires programmées sont capables d'activer ou non. Effectivement, la formation

d'ERO par les cellules mourantes d'apoptose va modifier certaines cystéines importantes d'HMGB1 empêchant ainsi le développement de RI (Kazama et al., 2008).

En conclusion, un des facteurs importants pour savoir si la mort cellulaire va induire plutôt de la tolérance ou des RI est de savoir si les cellules mourantes vont être capables de modifier efficacement les DAMPs afin de se fixer sur des récepteurs spécifiques du SI et d'induire secondairement la mise en place d'une stimulation de ce dernier.

2.3.4. Libération de médiateurs immunosuppresseurs lors de l'apoptose

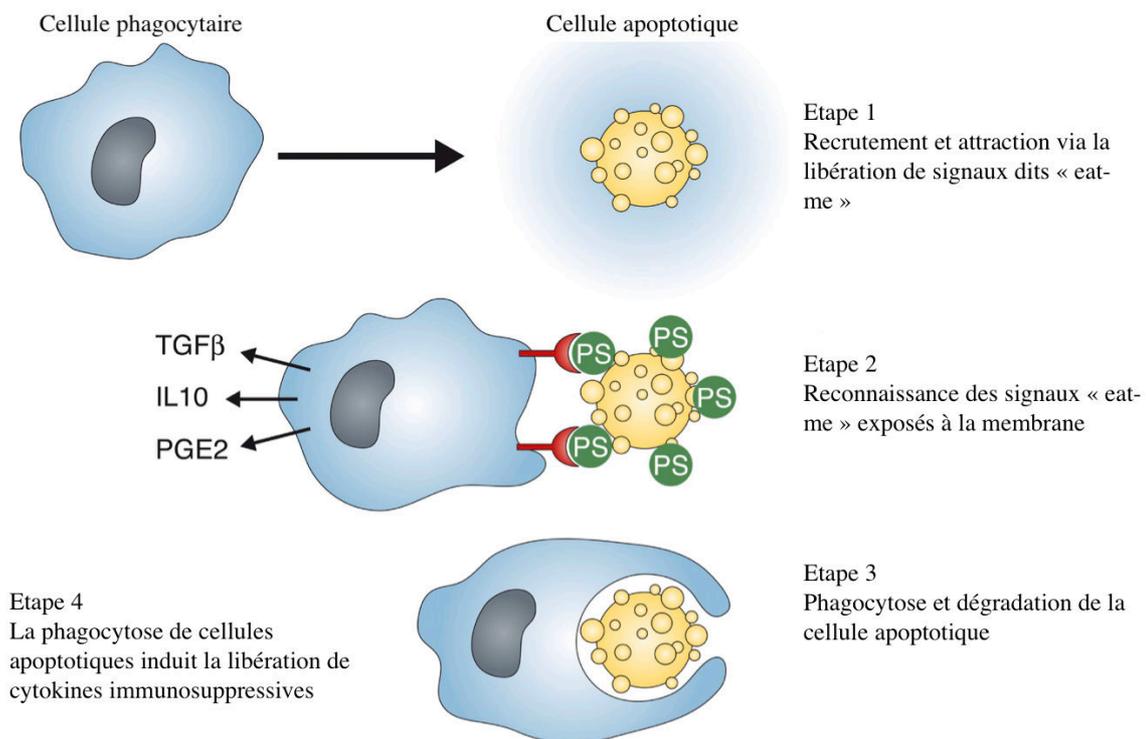


Figure 6 - Les différentes étapes conduisant à la prise en charge des cellules apoptotiques par les phagocytes.

Lors de la mort cellulaire, les cellules apoptotiques libèrent des signaux « eat-me » (par exemple l'eATP) ce qui attire les cellules phagocytaires. Une fois attirées, les phagocytes reconnaissent les PtdSer exprimés à la membrane (ce qui induit la transcription de cytokines immunosuppressives) des cellules en apoptose ce qui permet d'initier le processus de phagocytose. Une fois les cellules endocytées, les cellules phagocytaires libèrent des molécules immunosuppressives (comme le TGF-β, l'IL-10 ou le PGE2) limitant grandement l'induction d'une RI. Figure issue et modifiée de (Ravichandran, 2010).

Lors de la mort cellulaire, les cellules mourantes mais aussi les cellules phagocytaires vont libérer des molécules immunosuppressives possédant un rôle important sur la mise en place des phénomènes de tolérance. Lors du contact des cellules apoptotiques avec les macrophages, ces derniers sécrètent de molécules immunosuppressives telles que le TGF-β, l'IL-10, la molécule PAF (pour « *platelet activation factor* »), de resolvines mais aussi la prostaglandine

E2 (**voir figure 6**) (Chung et al., 2008; Fadok et al., 1998; Serhan & Levy, 2018; Voll et al., 1997). En outre, les cellules apoptotiques vont produire des médiateurs lipidiques (comme le 15-lipoxygénase ou l'acide 15-hydroxyeicosatétraénoïque) qui vont actionner la résolution de l'inflammation (Serhan et al., 2015; Serhan & Savill, 2005). Certaines études ont souligné que les cellules apoptotiques avaient un effet inhibiteur dans des modèles inflammatoires mais aussi que l'apoptose induite par certains pathogènes permettait la survie de ce dernier via l'effet immunosuppresseur du TGF- β (Freire-De-Lima et al., 2000; Huynh et al., 2002). Cet effet immunosuppresseur peut principalement être médié par les signaux « *eat me* » présents à la surface des cellules apoptotiques. Précisément, l'injection de vésicules exprimant des phosphatidylsérines membranaires induit des phénomènes d'immunosuppressions dépendants de l'action du TGF- β (Hoffmann et al., 2005). Les cellules apoptotiques peuvent produire elles aussi des médiateurs immunosuppresseurs lors de l'engagement de la voie de mort cellulaire comme l'IL-10 et du TGF- β ce qui va inhiber la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages. De surcroît, Le TGF- β produit par les macrophages après phagocytose des cellules apoptotiques va induire la production de Tregs participant de ce fait aux phénomènes immunitaires tolérogènes associés à l'apoptose (Kleinclauss et al., 2006; Maeda et al., 2005).

2.3.5. Échec de l'efferocytose et activation du SI

L'efferocytose peut parfois être dérégulée comme dans le lupus érythémateux disséminé (LED). Le défaut d'efferocytose entraîne une apoptose prolongée appelée nécrose secondaire et la libération de DAMPS promouvant de ce fait le développement du LED (Müoz et al., 2010). On sait que la molécule C1q - un composant du complément - intervient dans ce mécanisme d'efferocytose et est le gène majeur de susceptibilité dans le LED (Botto & Walport, 2002). D'autres études ont montré que C1q se fixe aux cellules en apoptose tardive mais pas au temps précoce de ce processus. Ces éléments suggèrent que cette fixation tardive permet de limiter la mise en place de maladies auto-immunes secondairement à un défaut primaire d'efferocytose (Nagata, 2018). Quand ces mécanismes ne fonctionnent pas correctement ou que trop de cellules meurent au même moment, les cellules apoptotiques atteignent le stade de nécrose secondaire. Dans un contexte physiologique, les cellules mourantes vont libérer de l'ADN qui sera dégradé par des DNases dans l'environnement péricellulaire évitant donc d'activer des récepteurs pro-inflammatoires sur les cellules phagocytaires (comme le TLR9). (Colonna et al., 2016; Elkon & Santer, 2012; Shichita et al., 2017). Cette fragmentation de l'ADN est donc un second élément de prévention contre la mise en place de maladies auto-immunes. D'une autre part, si l'ADN n'est pas digéré par les DNases (ces enzymes sont parfois mutées dans le LED)

cela amènera la formation de complexes immuns (Yang et al., 2016) activant les macrophages et les CD4 via le TLR9 et le récepteur au fragment constant des anticorps. La fixation de ce complexe immun sur les macrophages entraîne la libération d'IFN de type 1 et du TNF- α entraînant l'amplification des RI pouvant aboutir à la mise en place de pathologies auto-immunes. Donc la non prise en charge des cellules apoptotiques par les cellules phagocytaires peut aboutir à la stimulation du système immunitaire par la libération passive des molécules intracellulaires.

3. La nécroptose

La nécroptose est une mort cellulaire inflammatoire médiée par la protéine MLKL (pour « *mixed lineage kinase domain-like* ») (Murphy et al., 2013a). La nécroptose peut être déclenchée par les récepteurs de mort connus pour induire l'apoptose extrinsèque (par exemple, FAS, TNFR1, DR4/DR5), mais elle ne se produit que lorsque l'initiateur, la caspase-8, est bloquée comme dans les cellules tumorales ou lors d'infections (Tummers & Green, 2017). Elle est considérée comme une voie suicidaire alternative qui déclenche la mort de la cellule lorsque l'initiation de l'apoptose est inhibée et représente un

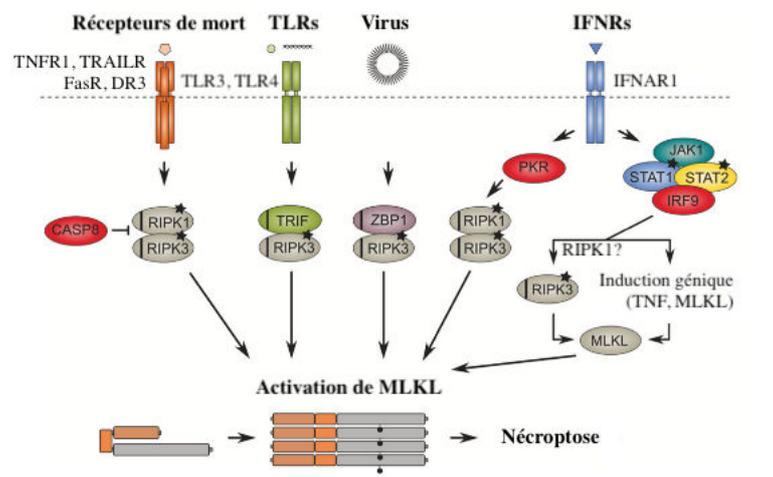


Figure 7 - Les différents stimuli activant MLKL et mécanismes d'induction de la nécroptose.

La nécroptose peut être initiée après la phosphorylation de RIPK3, ZBP1 ou TRF1 à la suite d'activation de différents signaux (TLRs, les récepteurs de mort cellulaire, la présence de virus ou l'activation des récepteurs aux IFN (IFNRs)). La caspase 8 peut inhiber l'action du complexe RIPK1 et RIPK3. Figure issue et modifiée de (Martens et al., 2021).

mécanisme de secours supplémentaire (Frank & Vince, 2019). En aval des récepteurs de mort cellulaire, la voie moléculaire implique la phosphorylation de MLKL par le complexe RIPK1/RIPK3 entraînant son oligomérisation et son association au feuillet interne de la membrane plasmique (voir figure 7). Contrairement à la pyroptose, MLKL est la seule protéine

effectrice connue pour être capable de déclencher la nécroptose et se retrouve dans différentes espèces animales mais aussi chez les plantes montrant son importance dans la lutte contre les pathogènes (Mahdi et al., 2020). La phosphorylation de MLKL aboutit, comme pour la pyroptose, à la formation de pores membranaires. La perméabilisation de la membrane induit en outre un gonflement cellulaire et une osmolyse (X. Chen et al., 2016a). Finalement, cela induit la rupture de la membrane et la libération de DAMPs pro-inflammatoires dans le milieu extracellulaire, déclenchant une stimulation du SI (Kaczmarek et al., 2013).

3.1. Mécanismes moléculaires de la nécroptose :

Dans les années 2000, *Holler et al.* découvrent RIPK1 comme étant l'acteur d'une mort cellulaire qui n'est pas l'apoptose (N. et al., 2000). 5 ans plus tard, c'est la première fois que le nom de nécroptose est donné après avoir découvert que la necrostatin inhibe l'action de RIPK1 et empêche des fibroblastes de mourir après un traitement au TNF (Degterev et al., 2005). S'en suit la découverte des deux derniers acteurs de cette voie cellulaire que sont RIPK3 et MLKL, les composants de la machinerie nécroptotique (Weinlich et al., 2017).

Le rôle du TNF a aidé à mieux caractériser cette voie. De fait, la fixation du TNF sur le récepteur TNFR1 entraîne la formation d'un complexe 1 sur la face cytoplasmique de ce récepteur (**voir figure 8**). La nécroptose peut aussi être induite par des récepteurs de mort cellulaire connus pour induire l'apoptose extrinsèque comme FAS, TNFR1, DR4/DR5 (Tummers & Green, 2017). Le complexe 1 est composé de TRADD, FADD, TRAF (TNFR associated factors), LUBAC, RIPK1 et cIAP 1 et 2 (pour « *cellular inhibitor of apoptosis protein* ») (**voir figure 8**). Dans ce complexe I, cIAP1/2 vont poly-ubiquitiner la lysine 63 de RIPK1 (J. Chen et al., 2019). Cette chaîne va servir d'échafaudage moléculaire pour le recrutement du complexe formé de IKK α , IKK β et de NEMO ainsi que du complexe formé de TAK1, TAB1 et 2. L'agrégation de ces deux complexes conduit à l'activation de la voie NF- κ B ainsi que la survie cellulaire.

La déubiquitination de RIPK1 (par CYLD ou A20) conduit à la formation d'un complexe II avec deux variantes possibles : le complexe IIa ou IIb. FADD et la pro-caspase 8 sont recrutés sur TRADD et RIPK1 pour former le complexe IIa ce qui permet l'activation de la caspase 8 (J. Chen et al., 2019). En cas d'absence de cIAP1/2, de TAK1 ou du complexe IKK, le complexe IIb se constitue, de RIPK1, FADD et la pro-caspase-8 à l'exception de TRADD, et active la caspase-8 (J. Chen et al., 2019). Cette dernière induit alors l'apoptose. Toutefois, lorsque l'activité de la caspase-8 est inhibée, par exemple par cFLIP, par l'inhibiteur pan-caspase zVAD-fmk ou lors d'infections, la nécroptose dépendante de RIPK3 est déclenchée.

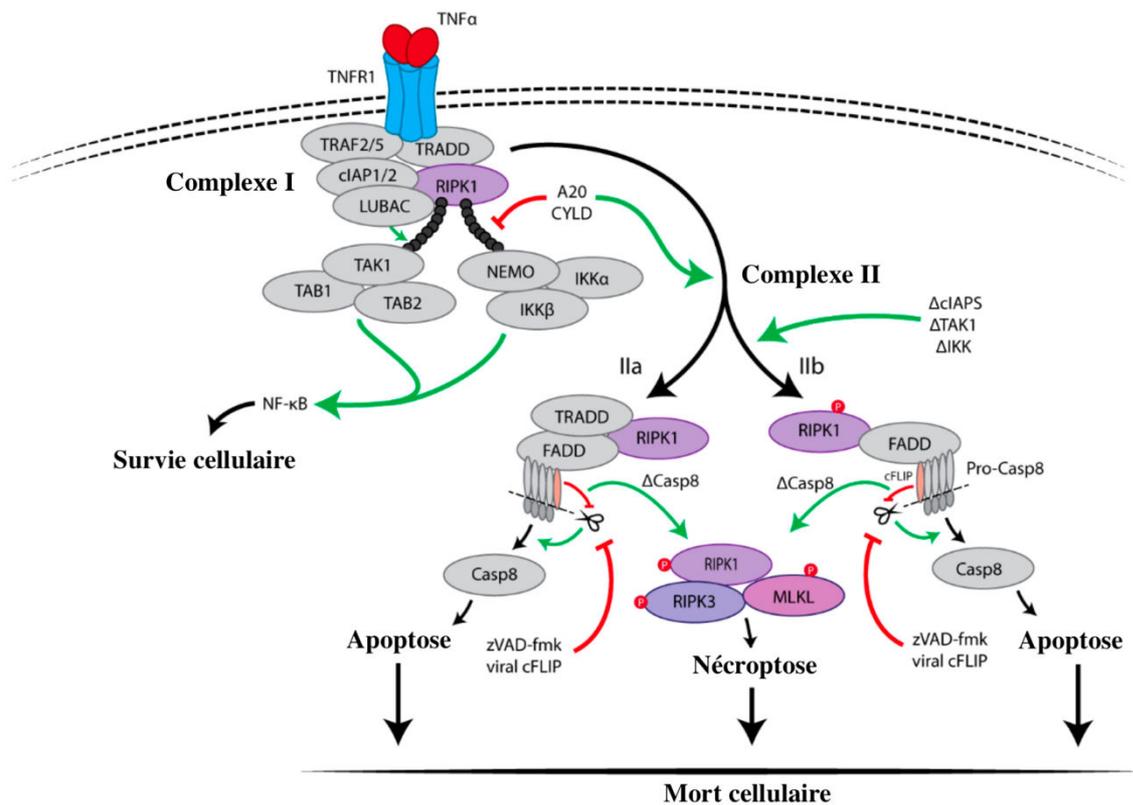


Figure 8 - Voies moléculaires de l'activation de la nécroptose.

La nécroptose est induite par des récepteurs de mort tels que FAS, TNFR1 et DR4/DR5. Le complexe I comprend TRADD, FADD, TRAF, LUBAC, RIPK1 et cIAP 1 et 2. Dans ce complexe I, cIAP1/2 polyubiquitine RIPK1 sur la lysine 63. Cette chaîne sert d'échafaudage moléculaire pour recruter des complexes formés par IKK α , IKK β et NEMO, ainsi que ceux formés par TAK1, TAB1 et 2. L'agrégation de ces deux complexes conduit à l'activation de la voie de signalisation NF- κ B et à la survie cellulaire. La déubiquitination de RIPK1 (par CYLD ou A20) forme le complexe II avec deux variantes possibles (complexe IIa ou IIb). FADD et pro-caspase-8 sont recrutés dans TRADD et RIPK1 pour former le complexe IIa, permettant l'activation de la caspase-8. En l'absence de complexes cIAP1/2, TAK1 ou IKK, le complexe IIb (qui contient RIPK1, FADD, la pro-caspase-8) est formé. Ce dernier induit l'apoptose. Figure issue et modifiée de (J. Chen et al., 2019).

La source du stimulus détermine si la nécroptose sera initiée par la formation de l'hétéro-dimère RIPK1/RIPK3 ou par l'homo-dimère RIPK3/RIPK3 (Orozco et al., 2014; X. N. Wu et al., 2014). RIPK1 se fixe à RIPK3 après l'activation des récepteurs de mort cellulaires et peut induire aussi bien l'apoptose que la nécroptose en fonction du contexte cellulaire. Cependant, la fixation de RIPK1 sur RIPK3 n'est pas indispensable pour l'activation de cette dernière par les TLR3, TLR4 et ZBP1/DAI (axe reconnaissant la présence d'ADN dans le cytoplasme et impliqué dans les processus antiviraux) (Grootjans et al., 2017; Pasparakis & Vandenabeele, 2015).

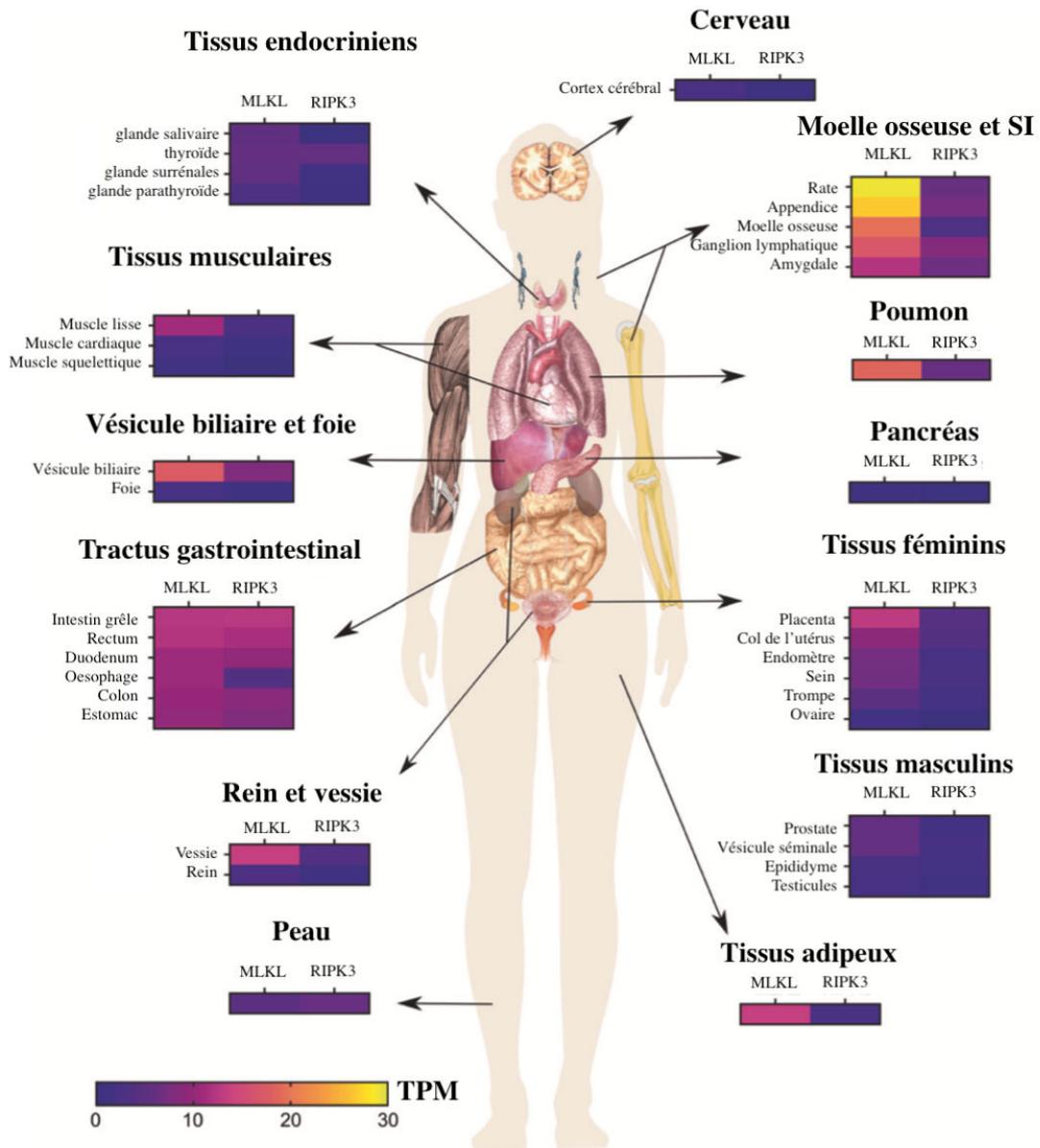


Figure 9 - Pattern d'expression de MLKL et RIPK3 dans les différents tissus

Pattern d'expression de la protéine MLKL dans les différents tissus humains. Réalisé à partir de « *Human protein Atlas* ». Figure issue et modifiée de (De Schutter, 2021).

Le niveau d'expression de RIPK3 est déterminant pour induire la nécroptose (Y. S. Cho et al., 2009; S. He et al., 2009; D.-W. Zhang et al., 2009) et son expression est différente en fonction des tissus (**voir figure 9**). Précisément, le complexe RIPK1/RIPK3 recrute de plus en plus de RIPK3 aboutissant à l'activation de cette dernière par autophosphorylation (W. Chen et al., 2013). Une fois phosphorylée, RIPK3 va à son tour phosphoryler MLKL (L. Sun et al., 2012a; J. Zhao et al., 2012) conduisant à son oligomérisation et son activation (Grootjans et al., 2017; L. Sun et al., 2012a). Une fois insérés dans la membrane, les oligomères de MLKL

forment un pore qui induit des perturbations cellulaires conduisant à la mort de la cellule. Ce pore membranaire permet, comme pour la pyroptose, la libération du contenu intracellulaire. Dès que ces molécules sont libérées dans le compartiment extracellulaire, elles deviennent des molécules d'alertes permettant l'activation du SI via la fixation sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules immunitaires notamment les CD.

3.2. MLKL :

MLKL est l'acteur majeur de la nécroptose car son activation est nécessaire pour déstabiliser la membrane plasmique et induire la libération de molécules immunostimulantes. Cette protéine possède une structure particulière et ses voies d'activation propres qui seront détaillées dans les paragraphes suivants.

3.2.1. Structure de MLKL

RIPK1 est une protéine qui possède une multitude de fonctions comme la régulation de la survie, de l'inflammation mais aussi de la mort cellulaire (Tao et al., 2022). Elle possède 3 domaines importants : i) le domaine kinase N-terminal qui possède des sites de phosphorylations, ii) un domaine avec un motif particulier appelé RHIM (pour « *RIP homotypic interaction motif* ») important pour l'interaction avec RIPK3 et iii) un domaine C-terminal de mort (DD pour « *death domain* ») indispensable pour le recrutement sur le récepteur TNFR1 et TRADD dans le même complexe (**voir figure 10**) (W. J. Wang et al., 2019). RIPK3, quant à elle, possède aussi un domaine kinase N-terminal et RHIM mais est dénuée du domaine de mort cellulaire. La structure 3D de MLKL permet de déterminer la présence d'un domaine N-terminal 4HB (pour « *four helix bundle domain* ») et d'un domaine C-terminal PsKD (pour « *pseudokinase domain* ») reliés par une région « *brace* » (Murphy et al., 2013b; Su et al., 2014). Le domaine 4HB permet l'interaction avec la membrane plasmique et est responsable de la mortalité induite par MLKL. Le domaine « *brace* », composé de deux hélices, est impliqué dans l'oligomérisation de MLKL et le domaine pseudokinase (PsKD) est important pour l'interaction avec RIPK3 sous sa forme phosphorylée (Murphy et al., 2013a; Quarato et al., 2016a). Le domaine 4HB agit comme un domaine induisant une mortalité cellulaire alors que le domaine PsKD et la région charnière sont essentiels pour contrôler la fonction du domaine 4HB (Arnež et al., 2016; Hildebrand et al., 2020; Su et al., 2014; Tanzer et al., 2016).

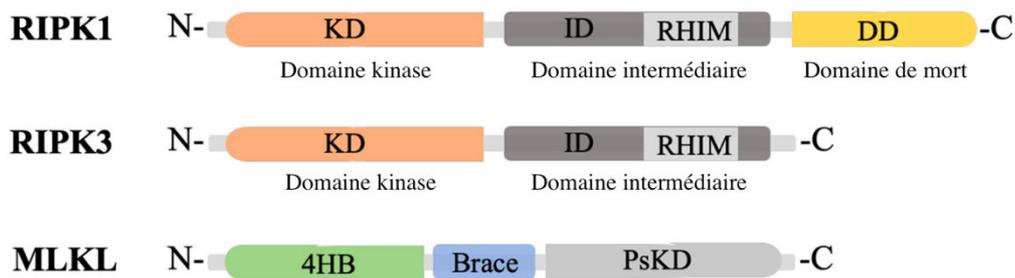


Figure 10 - Structures des protéines impliquées dans la nécroptose

RIPK1 et RIPK3 possèdent un domaine N-terminal kinase (KD) qui sert de région de phosphorylation important à la fonction de la protéine et un domaine intermédiaire contenant un motif RHIM (important pour l'interaction entre ces deux protéines). Seule RIPK1 possède un domaine de mort DD (pour « *death domain* ») qui permet le recrutement de cette dernière sur les récepteurs de mort cellulaires. MLKL quant à elle est divisée en 3 sous-domaines. Elle possède un domaine 4HB responsable de l'insertion dans la membrane et la mortalité induite par MLKL, un domaine « *brace* » important pour les mécanismes d'oligomérisation et un domaine « PsKD » responsable de l'interaction avec RIPK3 phosphorylée. Figure issue et modifiée de (Tao et al., 2022).

3.2.2. Activation de MLKL :

L'activation de MLKL par phosphorylation entraîne la formation d'une boucle du domaine psKD et libère le domaine 4HB responsable de l'activité cytolitique. L'activation de MLKL dépend de la phosphorylation de la sérine 227 (S227) chez l'homme et 232 (S232) pour la souris de RIPK3 (L. Sun et al., 2012a). Le co-cristal de RIPK3 (résidus 182 à 464) et MLKL (résidus 1 à 318) ont permis de mieux comprendre les interfaces de fixation entre ces deux molécules. Effectivement, ces auteurs ont ainsi montré que la S232 de RIPK3 forme un pont disulfure avec le groupe hydroxyle de la S204 de MLKL (Xie et al., 2013). Deux autres résidus phosphorylés de RIPK3 (la sérine 184 et la thréonine 231) interviennent dans les interactions entre RIPK3 et MLKL. Au centre de cette interface de fixation, la phénylalanine 27 (Phe27) de RIPK3 interagit avec la Phe234 de MLKL par des interactions π - π (liaisons non-covalentes) donnant la force majoritaire à la formation de ce complexe (Xie et al., 2013). Cependant, la formation du complexe RIPK3/MLKL n'est pas suffisante à elle seule pour induire la nécroptose et nécessite d'autres co-partenaires. Une étude a récemment mis à jour le rôle du complexe HSP90-CDC37 dans ces mécanismes (D. Li et al., 2015). Ces mêmes auteurs ont souligné que l'utilisation d'inhibiteurs ou le KO de HSP90 prévient l'induction de la nécroptose en empêchant la phosphorylation de RIPK3 sur la S227. En outre, la déphosphorylation de RIPK3 supprime l'induction de la nécroptose (W. Chen et al., 2015). Ensemble, ces données permettent de mettre en lumière le rôle primordial de l'autophosphorylation de RIPK3 en S227 pour la formation d'une interface de reconnaissance de MLKL. Une fois activée et fixée à MLKL, RIPK3 active cette dernière par phosphorylation sur les résidus T357/S358 (S345 chez la

souris) (L. Sun et al., 2012b). Après activation, MLKL va changer de conformation ce qui facilite les interactions avec les phosphatidylinositols (PIPs) membranaires via un cluster de résidus chargés positivement localisés dans le domaine 4HB (Dondelinger et al., 2014). Ces mécanismes forment un domaine de haute affinité aux PIPs stabilisant l'interaction de MLKL avec la membrane plasmique (Quarato et al., 2016b).

3.2.3. Déstabilisation de la membrane plasmique :

De nos jours, la structure supramoléculaire des oligomères de MLKL permettant la perméabilisation de la membrane plasmique reste encore incomprise. Les mécanismes induisant la perméabilisation de la membrane cellulaire sont donc aussi inconnus mais l'hypothèse générale serait que MLKL perméabilise directement la membrane plasmique soit par une insertion partielle (Su et al., 2014) dans la bicouche lipidique ou par une activité pore ou canal (Xia et al., 2016). Toutefois, savoir si MLKL induit une mort cellulaire via une action directe ou indirecte, seule ou avec d'autres partenaires protéiques reste encore à élucider.

Une des principales caractéristiques des domaines capables d'induire des pores membranaires est la présence d'une partie hautement hydrophobe permettant son incorporation au sein du cœur hydrophobe de la membrane cellulaire. De surcroît, les hélices α amphiphiles que l'on retrouve dans le domaine 4HB peuvent aussi agir comme un domaine capable d'induire des pores et sont idéales pour se fixer à la membrane (Grage et al., 2016; Ros & García-Sáez, 2015). Cependant, la façon de déstabiliser la membrane cellulaire par MLKL reste inconnue et des auteurs ont élaboré une étude bio-informatique afin de proposer 3 scénari pour répondre à cette question (Flores-Romero et al., 2020). Le premier scénario est que le domaine 4HB agit comme un surfactant et crée un tapis sur la membrane cellulaire jusqu'à atteindre une concentration suffisante pour déstabiliser et perméabiliser la membrane cellulaire comme le font certains détergents et/ou les fibres amyloïdes (S. Liu et al., 2017). Le second serait que MLKL agit comme une protéine possédant des hélices α amphiphiles capable d'induire des pores provoquant une courbure de la membrane et formant ainsi un pore composé de protéines et de lipides. Ce même mécanisme a été proposé pour expliquer l'action des protéines ou lipides lytiques comme la melittin, la megainin (Lee et al., 2011; Sengupta et al., 2008) ou les actinoporines (Alvarez et al., 2003; Mesa-Galloso et al., 2019). Dans ce cas, ce mécanisme induirait un amincissement de la membrane permettant sa courbure et la formation d'un pore toroïdal (F. Y. Chen et al., 2003; Grage et al., 2016; Woo & Lee, 2017). La dernière hypothèse serait que MLKL induit une courbure et une perméabilisation à cause d'une haute concentration locale avec les

PIPs. Dans tous les cas, l'altération de la double couche lipidique pourrait faciliter le basculement des lipides membranaires sous l'action de scramblases (enzyme répartissant aléatoirement les phospholipides fraîchement produits dans la membrane cellulaire). L'exposition des lipides de la couche interne lipidique cellulaire expliqueraient l'exposition des Ptdser lors de l'induction de la nécroptose (Y. N. Gong et al., 2017). A ce jour, les processus d'oligomérisation de MLKL restent mal compris et leurs résolutions pourraient permettre de mieux comprendre de quelle façon MLKL déstabilise la membrane plasmique.

4. La pyroptose

Lors de l'infection de l'organisme par des pathogènes, la surveillance immunitaire se fait principalement par les cellules circulantes telles que les macrophages ou les neutrophiles. Une multitude de pathogènes sont intracellulaires et la seule solution pour les éliminer est d'induire la mort cellulaire de la cellule infectée. La mort cellulaire peut être induite de façon extrinsèque ou intrinsèque à la cellule. Si la cellule est capable de détecter une perturbation ou la présence d'un pathogène alors elle active une mort cellulaire intrinsèque qui peut-être la voie intrinsèque de l'apoptose, la nécroptose ou la pyroptose. Certains pathogènes sont capables de détourner ces voies pour limiter leur élimination et favoriser leur persistance dans l'organisme. A la suite d'une multitude de découvertes, la pyroptose est actuellement la mort programmée inflammatoire la mieux caractérisée et se définit par sa capacité d'éliminer les pathogènes et d'induire une réponse inflammatoire forte.

4.1. Les Gasdermines

Récemment, certains travaux ont ainsi pu démontrer la capacité de la Gasdermine D à former des pores membranaires. Cette protéine est l'un des acteurs moléculaires majeur de la pyroptose - appartenant à la famille des Gasdermines - protéines exclusivement responsable de cette mort cellulaire inflammatoire (J. Shi et al., 2015a). La Gasdermine D fait partie d'une famille de protéines hyper-conservées que sont les Gasdermines comprenant les Gasdermines A, B, C, D, E et PJVK (**voir tableau 5**) (Kovacs & Miao, 2017a). Elles possèdent une structure semblable avec la présence d'une partie N-terminale responsable de la formation du pore membranaire et une partie C-terminale répressive reliées entre elles par un linker protéique (**voir figure 11**) (J. Shi et al., 2015a). PJVK est la seule à posséder un domaine en doigt de zinc sur sa partie C-terminale au lieu d'un domaine inhibiteur. Une fois clivée, la partie N terminale de la protéine va se lier aux phospholipides membranaires internes de la cellule permettant

l'oligomérisation et la formation d'un pore membranaire responsable de la pyroptose. La partie N-terminale de toutes les protéines de cette famille est capable d'induire la mort cellulaire pyroptotique sauf celle de PJVK (Kovacs & Miao, 2017b). Des études *in vitro* ont aussi montré que l'insertion dans la membrane bactérienne provoque la lyse de ces dernières étayant de ce fait le rôle des Gasdermines dans la clairance de différents pathogènes en cas d'infection. Également, l'analyse d'expression a permis de montrer qu'au moins une des protéines de la famille des Gasdermines, la GSDME, est exprimé de façon ubiquitaire ce qui tend à renforcer le rôle que peuvent avoir ces protéines dans la clairance des pathogènes.

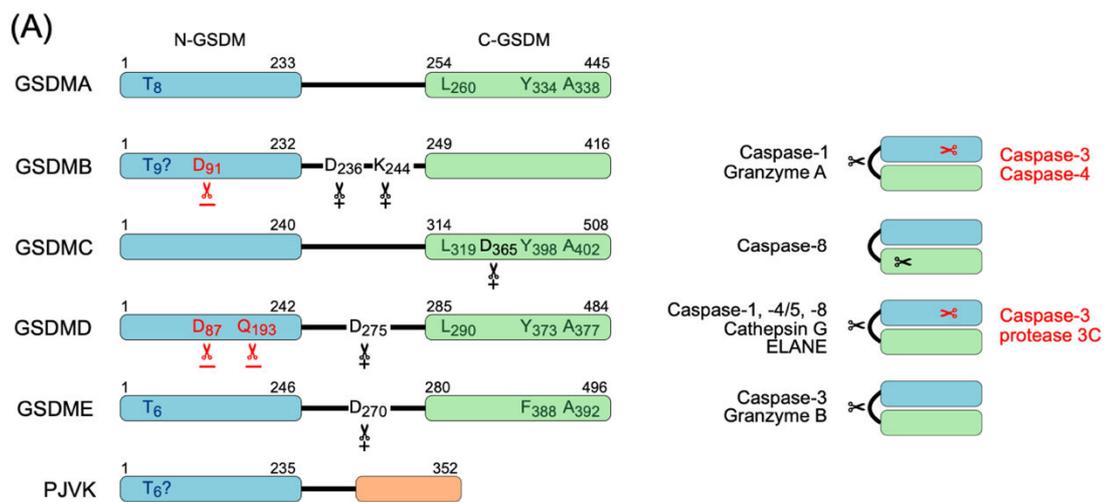


Figure 11 - Structure et mécanismes de régulation des Gasdermines

Les protéines de la famille des Gasdermines possèdent une partie N-terminale (bleue) capable de perméabiliser la membrane plasmique et une partie auto-inhibitrice (verte) - sauf pour PJVK qui est remplacée par une structure en doigt de zinc (orange) - reliés par un linker protéique (trait noir). La GSDME possède un résidu thréonine 6 (T₆) qui après phosphorylation entraîne l'inhibition de la fonction de la partie N-terminale. Ces résidus conservés d'inhibition se retrouvent dans les Gasdermines A, B, et PJVK mais l'action inhibitrice de cette phosphorylation n'a pas été confirmée dans toutes les protéines où ce résidu est présent (présence d'un « ? »). Certains clivages activateurs (+ noir) et inhibiteurs (- rouge) sont représentés par des ciseaux. Par exemple, le clivage de la GSDMD par la Caspase 1/4/5/8, la Cathepsin G ou ELANE sur le résidu D₂₇₅ entraîne l'activation et la perméabilisation membranaire de la cellule alors que le clivage du résidu D₈₇ ou Q₁₉₃ par la caspase 3 ou la protéase 3C entraîne l'inhibition de la perméabilisation membranaire. Sur la droite de la figure se trouve une synthèse des protéines activatrices (en noir) ou inhibitrices (en rouge) par clivage de la fonction des protéines de la famille des gasdermines. Figure issue de (De Schutter et al., 2021).

4.1.1. Pattern d'expression des différentes Gasdermines :

La localisation des différentes Gasdermines varie en fonction des tissus, des sous-types cellulaires mais aussi dans la localisation intracellulaire ce qui montre que ces protéines possèdent des fonctions différentes. La GSDMD et la GSDME sont toutes les deux exprimées dans une grande majorité de tissus alors que ce n'est pas forcément le cas des autres Gasdermines (**voir figure 12**). Cependant, la génération de souris KO pour ces deux protéines n'entraîne pas

l'apparition d'un phénotype particulier suggérant que ces protéines sont impliquées dans des phénomènes particuliers comme le cancer ou les infections. En effet, l'expression de ces protéines aux interfaces (comme les épithéliums, le tractus respiratoire, le système digestif) se retrouve principalement aux endroits où les pathogènes sont le plus susceptibles de se trouver. L'expression restreinte de la GSDMA et la GSDMC dans la peau (GSDMA) ou dans les poumons, la muqueuse buccale, l'estomac et l'œsophage (pour la GSDMC) nous laisse penser que ces protéines peuvent intervenir dans des conditions particulières comme les infections bactériennes ou virales. Des changements d'expression de ces protéines peuvent aussi être retrouvés dans certains contextes cellulaires ou physiopathologiques. En effet, un traitement au dexaméthasone entraîne une régulation positive de la GSDMD (Webb et al., 2007) alors que des conditions hypoxiques permettent la régulation positive de la GSDMC médiée par le point de contrôle immunitaire PD-L1 (Hou et al., 2020). Pour le moment, ces modifications d'expression des Gasdermines est incompris même si nous savons de façon générale comment ces protéines sont exprimées dans différents tissus, nous manquons de connaissances sur l'expression de ces protéines dans certains sous-types cellulaires.

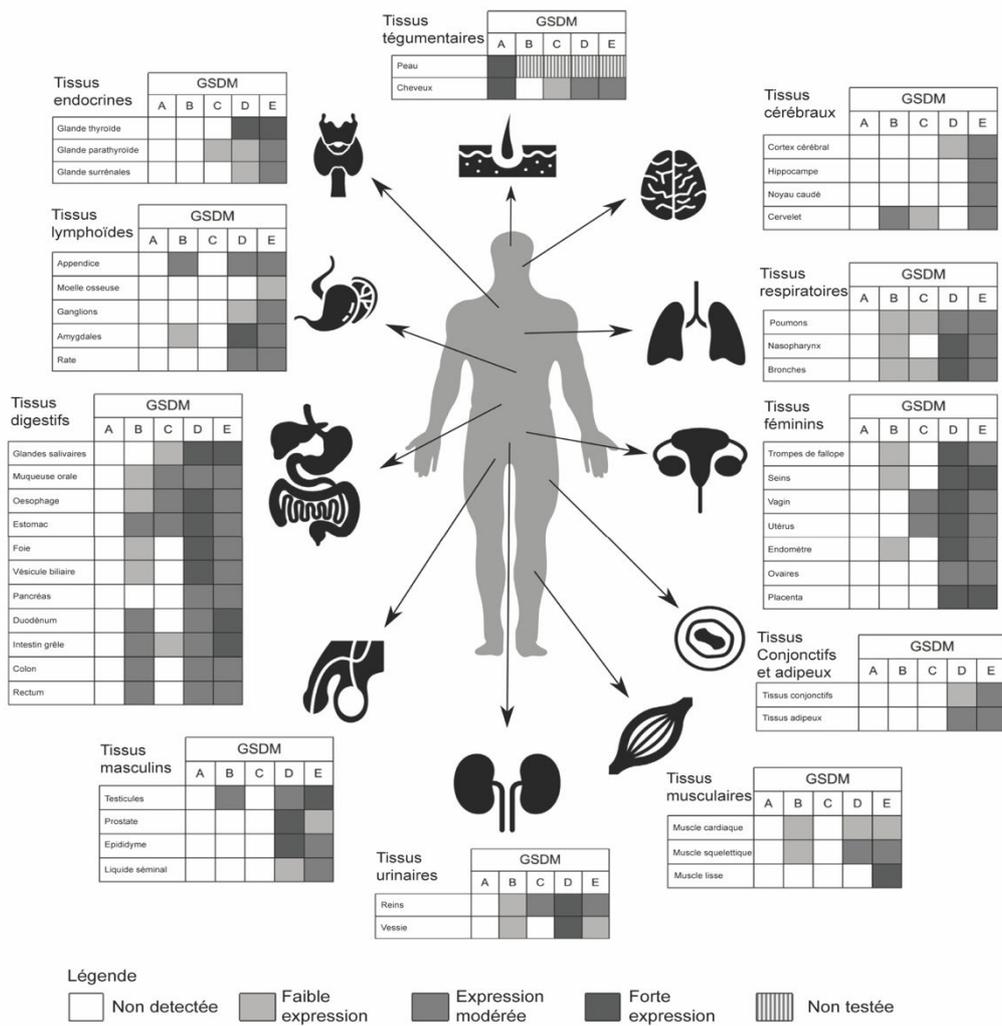


Figure 12 - Profil d'expression des protéines de la famille des gasdermines

Pattern d'expression de la famille des Gasdermines réalisé par immunohistochimie à partir de « Human protein Atlas ». Figure issue et modifiée de (De Schutter et al., 2021).

Tableau 5 - Récapitulatif des propriétés et des fonctions des protéines de la famille des gasdermines

Gène humain	Noms alternatifs	Gène murin	Activé par	Maladies associées	Formation du pore
<i>GSDMA</i>	Gasdermin (GSDM), gasdermin1 (GSDM1)	<i>Gsdma1</i> <i>Gsdma2</i> <i>Gsdma3</i>	?	Alopécie, asthme	oui
<i>GSDMB</i>	PRO2521 gasdermin-like (GSDML)	Non présent	Caspase-1/3/6/7	Asthme et maladies immunitaires	oui
<i>GSDMC</i>	MLZE	<i>Gsdmc1</i> <i>Gsdmc2</i> <i>Gsdmc3</i> <i>Gsdmc4</i>	?	?	oui
<i>GSDMD</i>	GSDMDC1 DFNA5L	<i>Gsdmd</i>	Caspase-1/8/11/4/5	Choc septique	oui
<i>DFNA5</i>	DFNA5	<i>Dfna5</i>	Caspase-3	Surdité congénitale autosomique dominante	oui
<i>DFNB59</i>	Pejvakin PJVK	<i>Dfnb59</i>	?	Surdité congénitale autosomique récessive	inconnu

4.1.2. Mécanismes moléculaires de la pyroptose médiée par la Gasdermine D et la Gasdermine E

Dans cette partie, nous nous focaliserons sur la pyroptose induite par la Gasdermine D et la Gasdermine E car ce sont les voies moléculaires les mieux décrites et les mieux comprises. L'activation des autres Gasdermines reste un sujet en développement avec des incertitudes quant à leurs rôles, le contexte de leurs activations, et les éléments de régulation associée. La pyroptose médiée par la Gasdermine D est régulée par des mécanismes dépendants ou indépendants de la caspase 1 (**voir figure 13**) (Stowe et al., 2015) alors que la pyroptose médiée par la GSDME dépend principalement de l'activité de la caspase 3. Les processus indépendants de la caspase 1 sont régulés par la caspase 4 et 5 chez l'humain et la caspase 11 chez la souris. Peu importe la voie moléculaire activée, que ce soit avec la GSDMD ou la GSDME les caractéristiques morphologiques seront les mêmes, c'est-à-dire (i) le gonflement de la cellule (ii) une perméabilité membranaire se caractérisant par un co-marquage pour l'Annexin V et TUNEL (DAPI ou l'iodure de propidium) (iii) une condensation de la chromatine et (iv) une fragmentation de l'ADN (Fernandes-Alnemri et al., 2007; Fink et al., 2008; Fink & Cookson, 2006). De plus, les mitochondries des cellules tendent à perdre leur potentiel membranaire pendant la pyroptose ce qui implique qu'elles induisent un stress cellulaire important modifiant l'activité d'une majorité des organites cellulaires (Shimada et al., 2012). La libération du fragment N-terminal permettra la fixation aux phospholipides membranaires internes, à la formation d'un pore membranaire de 10-15 nm composé de 15 monomères de Gasdermine D (Ding et al., 2016a; Evavold et al., 2018; Y. Zhao et al., 2018). L'effet terminal de la pyroptose est la perméabilisation de la membrane cellulaire s'accompagnant de la diffusion dans le milieu extracellulaire du contenu de la cellule, incluant des cytokines pro-inflammatoires, de ligands endogènes, d'alarmines et autres DAMPs (C. J. Chen et al., 2007; Dombrowski et al., 2011; England et al., 2014; Kuida et al., 1995; Lamkanfi et al., 2010; P. Li et al., 1995; Mariathasan et al., 2004). Cependant, même si la membrane est perméabilisée, cette dernière garde une intégrité suffisante pour piéger les bactéries intracellulaires. De fait, des études réalisées par immunohistochimie ont permis de montrer que contrairement à l'apoptose où les corps apoptotiques sont phagocytés principalement par des macrophages, lors de la pyroptose les bactéries piégées se retrouvent phagocytées majoritairement par les neutrophiles (Kovacs & Miao, 2017a).

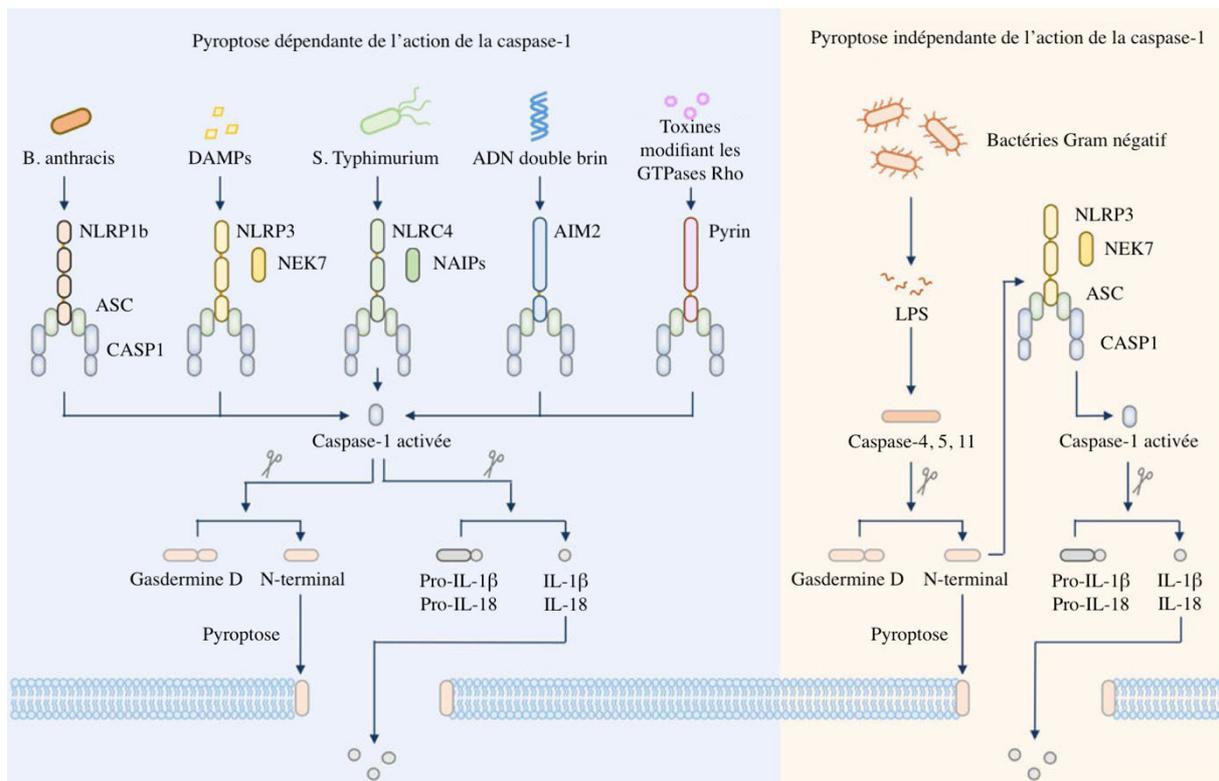


Figure 13 - Voies d'activation de la pyroptose

La pyroptose dépendante de la caspase 1 repose sur l'activation de différents inflammasomes (NLRP1b, NLRP3, NLRC4, AIM2, Pyrin) sensibles à des stimuli différents. Contrairement à ses homologues, les inflammasome NLRP3 et NLRC4 ont besoin de protéines complémentaires pour s'activer, NEK7 et NAIP respectivement. L'activation de l'inflammasome permet le recrutement de la protéine ASC et de la caspase 1 entraînant la formation d'un complexe protéique. La caspase 1 ainsi activée entraîne d'une part le clivage de la Gasdermine D mais aussi celui des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. Le clivage de la Gasdermine D libère le fragment N-terminal qui - après oligomérisation - formera un pore membranaire entraînant la libération du contenu intracellulaire et des cytokines actives IL-1 β et IL-18. D'autre part, la détection du LPS intracellulaire entraîne l'activation de la caspase 4 et 5 chez l'humain ou 11 chez la souris qui aboutira au clivage de la Gasdermine D. La formation du pore membranaire entraîne un efflux potassique qui active l'inflammasome NLRP3. L'IL-1 β et l'IL-18 seront clivées après la formation du complexe ASC-NLRP3-Caspase. Par conséquent, que ce soit par des mécanismes dépendants ou non de la caspase 1, la pyroptose s'accompagne de la libération de cytokines pro-inflammatoires ainsi que du contenu intracellulaire après rupture de la membrane cellulaire. Figure issue et modifiée de (Man et al., 2017).

4.2. Libération du contenu intracellulaire :

Peu importe la voie utilisée par la cellule pour activer la pyroptose, cette dernière s'accompagne toujours de la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 β , l'IL-1 α et l'IL-18 dans les macrophages. L'IL-1 β est une cytokine possédant un puissant effet inflammatoire, notamment en augmentant la vasodilatation, l'extravasation des cellules immunitaires et induit une forte RI adaptative (Man et al., 2017). L'IL-18 induit la production d'INF- γ par

les cellules TH1, par les NK et les CD8 et permet le développement d'une inflammation locale (Dinarello et al., 2013). La pyroptose induit la libération d'autres alarmines comme l'IL-1 α , l'eATP mais aussi HMGB1 (C. J. Chen et al., 2007; Dombrowski et al., 2011; England et al., 2014; Kuida et al., 1995; Lamkanfi et al., 2010; P. Li et al., 1995; Mariathasan et al., 2004). Il semblerait que la formation du pore membranaire médié par la GSDMD permette le passage uniquement des cytokines et des DAMPs de petites tailles mais la libération de molécules plus grosses comme HMGB1 nécessiterait la présence d'une protéine appelée Ninjurin-1 (NINJ1) impliquée dans la perte de l'intégrité membranaire après l'induction de la pyroptose médiée par la GSDMD (Kayagaki et al., 2021). Effectivement, l'induction de la pyroptose dans des cellules déficientes en NINJ1 fait que les cellules restent dilatées sans être capables de libérer des protéines de taille plus importantes.

HMGB1 est une protéine impliquée dans la régulation de l'autophagie et l'expression génique (car HMGB1 participe à la courbure de l'ADN, favorable à la fixation d'éléments impliqués dans l'expression géniques comme les facteurs de transcription). Une fois dans le milieu extracellulaire, elle devient une molécule au puissant pouvoir inflammatoire. Sa fixation sur différents récepteurs exprimés par les cellules immunitaires et les cellules endothéliales participe à l'activation du SI. En effet, la liaison de HMGB1 sur les récepteurs TLR2, TLR4 et RAGE des macrophages entraîne l'activation de la voie NF- κ B mais aussi la libération de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF- α (Paudel et al., 2019). On sait d'ailleurs que cette protéine est capable de se lier à l'IL-1 β activée, au LPS, aux nucléosomes mais aussi à l'ADN simple brin augmentant fortement son pouvoir inflammatoire. Il est clair que HMGB1 participe aux processus inflammatoires associés à la pyroptose, cependant il est difficile d'évaluer son rôle réel tant son statut post-traductionnel et la fixation à d'autres cofacteurs peuvent en moduler ses effets (Paudel et al., 2019).

D'autres études ont d'ailleurs illustré que les cellules pyroptotiques libèrent aussi la protéine ASC - impliquée dans la formation de l'inflammasome - propageant de ce fait l'inflammation (Baroja-Mazo et al., 2014; Franklin et al., 2014). Tous ces éléments, ensembles, perpétuent et amplifient l'inflammation générée par la pyroptose.

4.3. Différentes voies d'activation de la pyroptose :

4.3.1. Voie d'activation canonique de la pyroptose médiée par les inflammasomes :

Dans la voie canonique de la pyroptose, la caspase 1 sera activée par différents inflammasomes (**voir figure 13**). Ces inflammasomes agissent comme des détecteurs intracellulaires de plusieurs PAMPS ou DAMPS. L'inflammasome NLRP3 réagit aussi bien à différents événements cellulaires (flux ioniques, dysfonction mitochondriale, production de ROS, dommages lysosomiaux) qu'à certains DAMPS/PAMPS. L'inflammasome NLRC4 s'active par la fixation à la flagelin ou à l'appareil bactérien de sécrétion de type III. L'inflammasome NLRP1b chez la souris et NLRP1 chez le rat, est activé à la suite de son clivage par un facteur produit par les bactéries Gram positives *Bacillus anthracis*. L'activation de l'inflammasome Pyrin est induite par des modifications des GTPases RHO et nécessite l'assemblage des microtubules pour son activation. Quant à lui, l'inflammasome AIM2 est activé par la fixation d'ADN double brin cytoplasmique. D'une façon générale, peu importe l'inflammasome activé, cela aboutira par l'incorporation de la caspase 1 dans ce complexe. Une fois incorporée dans ce complexe, cette protéine sera activée aboutissant à la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 et *in fine* à la mise en place de la pyroptose par clivage de la Gasdermine D (Man et al., 2017).

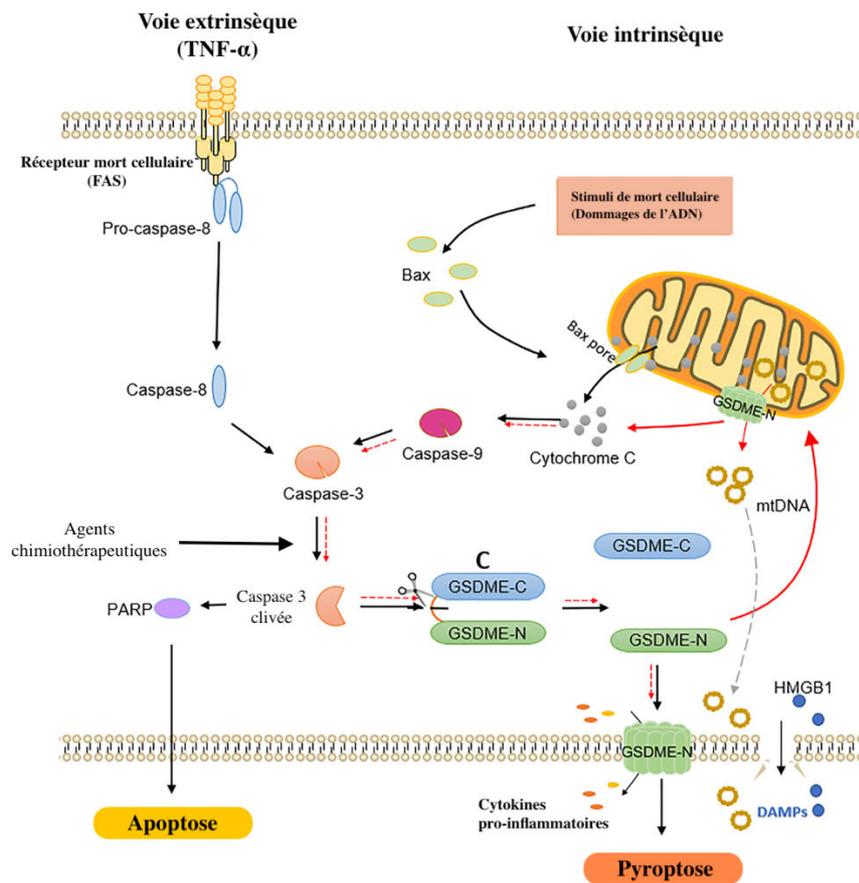


Figure 14 - Mécanismes induisant l'activation de la pyroptose médiée par la GSDME

Lors de l'initiation de l'apoptose (par la voie intrinsèque ou extrinsèque), la caspase-3 sera clivée par une succession d'événements moléculaires. Cette dernière peut soit induire l'apoptose si les cellules expriment faiblement la GSDME. La caspase-3 est aussi capable de cliver la GSDME pour libérer sa partie N-terminale exécutive de la pyroptose. D'ailleurs, dans les cellules où la GSDME est fortement exprimée, l'apoptose initialement enclenchée se change en pyroptose. Certains agents chimiothérapeutiques sont aussi capables d'activer le clivage de la caspase-3 et secondairement l'activation de la pyroptose médiée par la GSDME (dans le cas de cellules tumorales exprimant fortement la GSDME). Figure issue et modifiée de (Liao et al., 2022).

4.3.2. Voie non canonique de l'activation de la pyroptose :

La reconnaissance du LPS intracellulaire présent dans les bactéries à gram négatif par les caspases 4/5 chez l'homme et 11 chez la souris, entraîne le clivage et l'activation de la Gasdermine D (voir **figure 13**) (Man et al., 2017). Dans les macrophages, quand la pyroptose est induite par la reconnaissance du LPS intracellulaire, il faut d'autres mécanismes afin de permettre la maturation et la libération de l'IL-1 β et de l'IL-18. Précisément, la formation du pore membranaire entraîne la déplétion du potassium intracellulaire directement par un efflux potassique au travers de ce dernier. Cette déplétion potassique active directement l'inflammasome NLRP3 entraînant donc la formation du complexe NLRP3/ASC/Caspase 1 qui procédera à la maturation des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18 (Muñoz-Planillo et al., 2013).

Ces cytokines seront directement libérées de la cellule via le pore membranaire formé la Gasdermine D.

4.3.3. Voies cellulaires conduisant à la pyroptose médiée par la Gasdermine E :

La GSDME est clivée par la caspase 3, une protéase à cystéine impliquée dans la dégradation d'une multitude de protéines pendant la phase finale de l'apoptose. Différents événements cellulaires comme le stress oxydatif, la voie intrinsèque ou extrinsèque de l'apoptose, la voie des MAP kinases ou le stress du réticulum endoplasmique peuvent conduire à l'activation de la caspase 3 et par conséquent à l'activation de la pyroptose médiée par la GSDME (**voir figure 14**) (Shangguan et al., 2021; Shen et al., 2021; M. Wu et al., 2019; X. Zhang et al., 2020; Z. Zhang et al., 2021). On sait aussi que certaines drogues de chimiothérapies comme le topotécan, l'étoposide ou le cisplatine sont capables d'activer la caspase 3 et par conséquent d'induire la pyroptose dans les cellules cancéreuses exprimant la caspase 3 et la GSDME. Donc, le niveau d'expression de la GSDME définit quel type de mort cellulaire la cellule va subir : une faible expression conduit à l'apoptose alors qu'une forte expression induit la pyroptose (Y. Wang et al., 2017a). Ce mode alternatif de mort cellulaire pourrait permettre aux cellules exprimant fortement la GSDME d'induire une mort catastrophique afin de préserver et alerter les cellules environnantes lors d'épisodes infectieux. D'autres études ont aussi mis en lumière que les NK, en libérant la granzyme B cliveront la GSDME pour induire la pyroptose dans les cellules exprimant cette protéine ce qui montre aussi le rôle qu'elle peut avoir dans la mort cellulaire induite par le SI (Z. Zhang et al., 2020). Il est important de noter que lorsque les cellules succombent à l'apoptose mais ne sont pas pris en charge par les cellules phagocytaires, les cellules subissent un événement non régulé ce qu'on appelle la nécrose secondaire. Des travaux ont ainsi montré que l'induction de la nécrose secondaire se produit après l'induction de la voie apoptotique dans des cellules déficientes en GSDME démontrant ainsi le rôle de cette protéine dans le choix de mort cellulaire subit par la cellule (Rogers et al., 2017). *In fine*, l'activation de cette voie conduira aux mêmes événements cellulaires que ceux médiés par la GSDMD, c'est-à-dire la formation d'un pore membranaire, le gonflement de la cellule avec la perturbation de l'homéostasie cellulaire aboutissant à la mort de la cellule accompagnée de la libération de molécules inflammatoires.

4.4. La Gasdermine D :

La Gasdermine D est la protéine la mieux caractérisée de la famille des Gasdermines et a été récemment cristallisée (Z. Liu et al., 2019) révélant ses mécanismes d'auto-inhibition ainsi que les domaines importants à sa fonction.

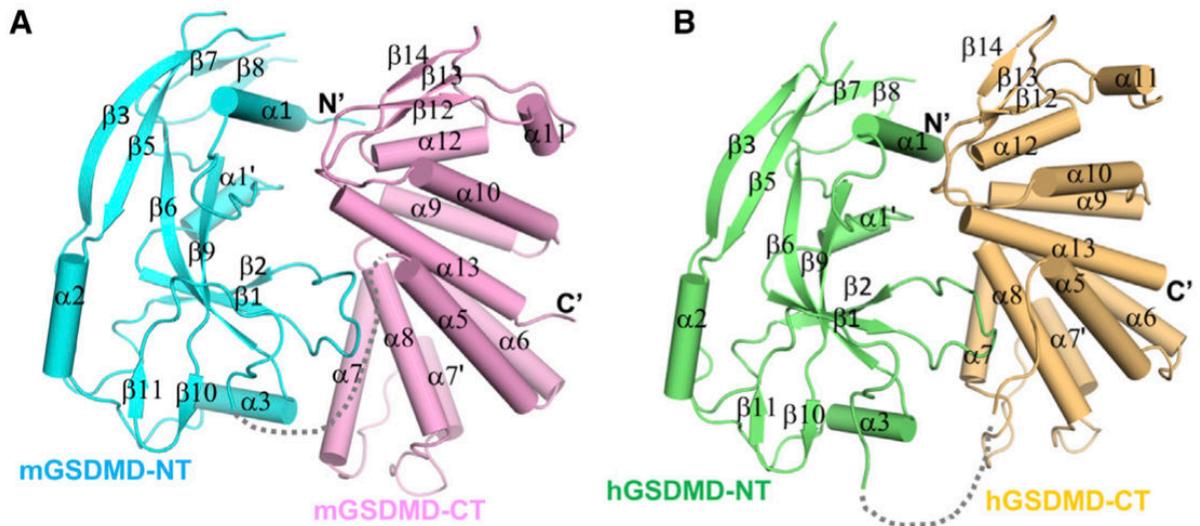


Figure 15 - Comparaison de la structure de la GSDMD murine et de la GSDMD humaine

Structure générale de la GSDMD murine (A) et humaine (B). Le domaine N-terminal de la protéine est représenté en bleu et vert pour la mGSDMD et hGSDMD respectivement. Le domaine C-terminal de la mGSDMD et le hGSDMD est ici figuré en rose et jaune. Le linker protéique entre ces deux domaines est tracé à l'aide d'une ligne grise en pointillée (15 résidus pour la protéine murine et 20 pour la GSDMD humaine). Figure issue et modifiée de (Z. Liu et al., 2019).

4.4.1. Structure :

La Gasdermine D possède un domaine N-terminal (NT) (aussi appelé P30) et un autre domaine C-terminal (CT) (appelé aussi P20) séparés par un linker protéique (**voir figure 15**). Le domaine CT sert de module d'auto-inhibition protéique, le clivage du linker protéique entre le CT et le NT par différentes caspases (Caspase 1, 4 et 5 chez l'humain, 11 chez la souris) libère le domaine NT qui s'auto-oligomérisé et forme un pore membranaire responsable de la pyroptose (**voir figure 16**). Lors de l'induction de la voie canonique de la pyroptose, la caspase 1 clive la GSDMD après la F275 chez l'homme et D276 chez la souris. Ces pores augmentent la perméabilité membranaire et autorise la libération des cytokines pro-inflammatoires responsables d'une forte réponse inflammatoire (Man et al., 2017). Des études par cryo-électromicroscopie ont ainsi montré que le pore membranaire était composé de 16 sous-unités et mesurait 14-16 nm de diamètre. Le domaine NT possède 3 hélices α (α_1 , α_2 , α_3) et 11 feuillets β (β_1 à

11). Le domaine CT possède une forme globulaire formée par 9 hélices α ($\alpha 4$ à $\alpha 13$) capées par 3 feuillets β antiparallèles ($\beta 12$, $\beta 14$, $\beta 13$) (**voir figure 15**). Il n'existe aucune différence significative entre l'homme et la souris sur la structure de ces différents domaines.

4.4.2. Mécanismes d'auto-inhibition

Les mouvements protéiques entre le NT et le CT sont autorisés par la présence d'un linker protéique qui permet des mouvements de type charnière entre ces deux sous parties de la protéine. Les résidus intervenant dans cette interaction sont conservés entre les membres de la famille des Gasdermines, ce qui prouve leur importance. Dans le domaine NT, une boucle formée par les feuillets $\beta 1/\beta 2$ (surtout deux résidus importants : F50 et W51 chez la souris, F49 et W50 chez l'homme) participent à l'interaction avec une poche hydrophobique dans le domaine CT formée par les résidus L292, E295, Y376, A380, S470 et A474 des hélices $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ et $\alpha 13$ (**voir figure 17 et 18**) (Z. Liu et al., 2019). Ces mêmes auteurs ont aussi montré que la perturbation de ces domaines par des mutations ponctuelles entraîne la perte d'auto-inhibition protéique permettant la perméabilisation de la membrane plasmique. Ces domaines sont donc importants pour l'auto-inhibition protéique avant le clivage et l'activation par différentes caspases.

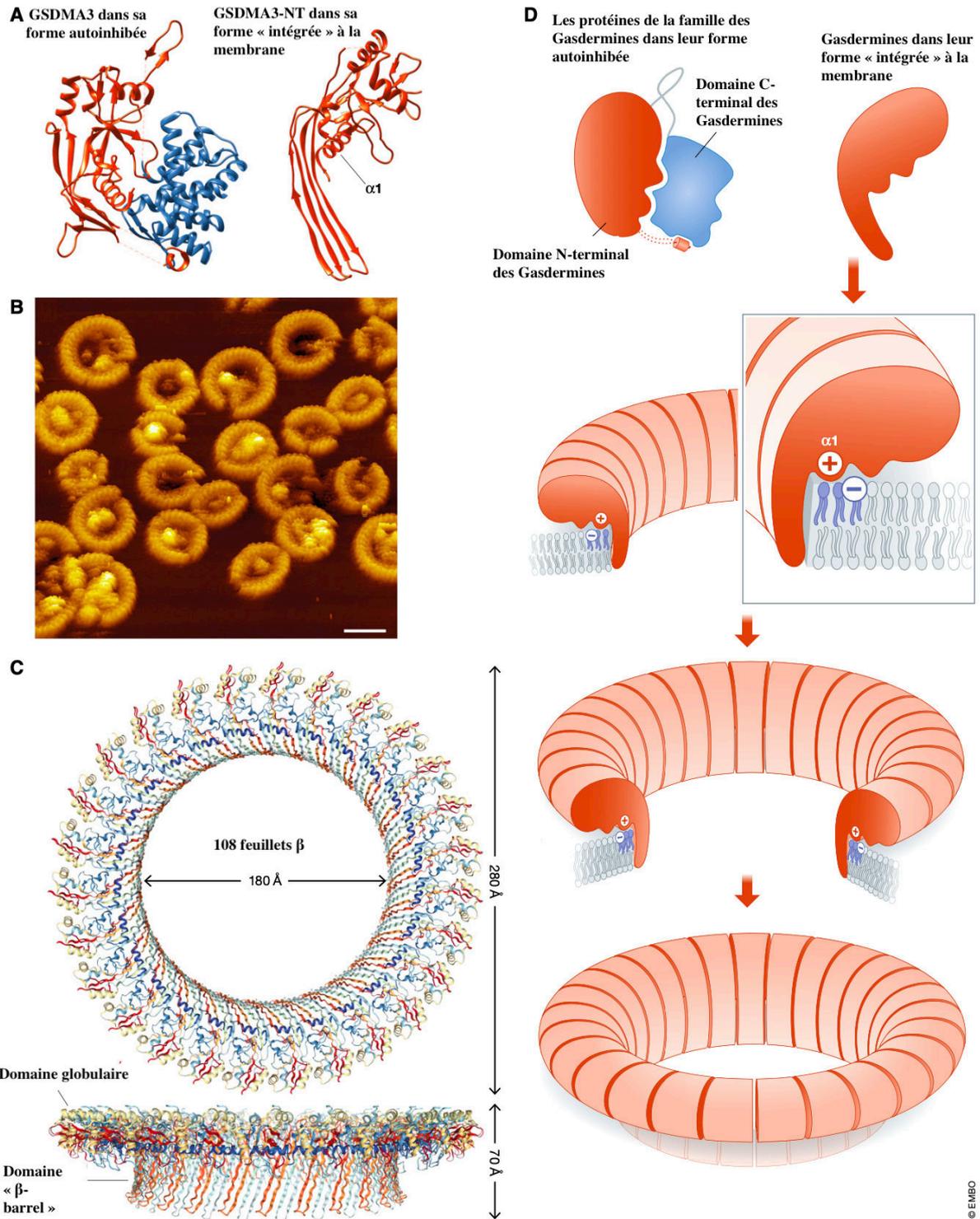


Figure 16 - Modèle de la formation du pore membranaire par les Gasdermines

(A) Cristal de la forme inactive de la GSDMA. Le domaine N-terminal actif est en rose et la partie inhibitrice en bleu. (B) Image de la formation des pores membranaires par la GSDMD obtenus par microscopie à force atomique (C) La structure du pore membranaire formé par la GSDMA3 obtenue par cryo-microscopie électronique. (D) Modèle théorique de la formation du pore membranaire formé par les protéines de la famille des Gasdermines. Les monomères, une fois clivés, vont se fixer à la membrane cellulaire et ensuite s'oligomériser dans la membrane en forme d'arc de cercle ou en structure ouverte pour ensuite former un pore membranaire en forme de « β -barrel ». Figure issue et modifiée de (Flores-Romero et al., 2020).

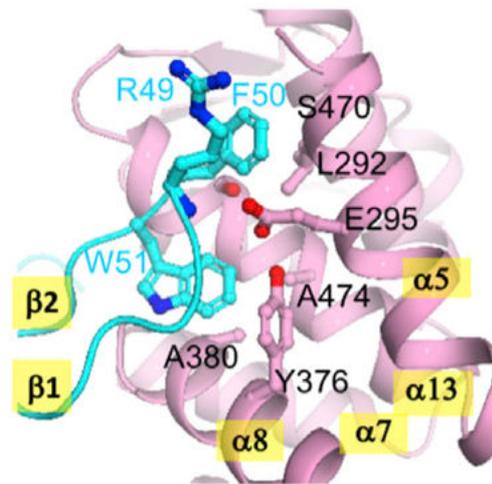


Figure 17 - Représentation de l'interaction entre le domaine N-terminal et C-terminale de la *GSDMD*

Domaine d'interface entre la GSDMD-NT (en bleu) et la GSDMD-CT (en rose) ainsi que les différents résidus importants dans l'interface entre ces deux sous-domaines protéiques. Figure issue et modifiée de (Z. Liu et al., 2019).

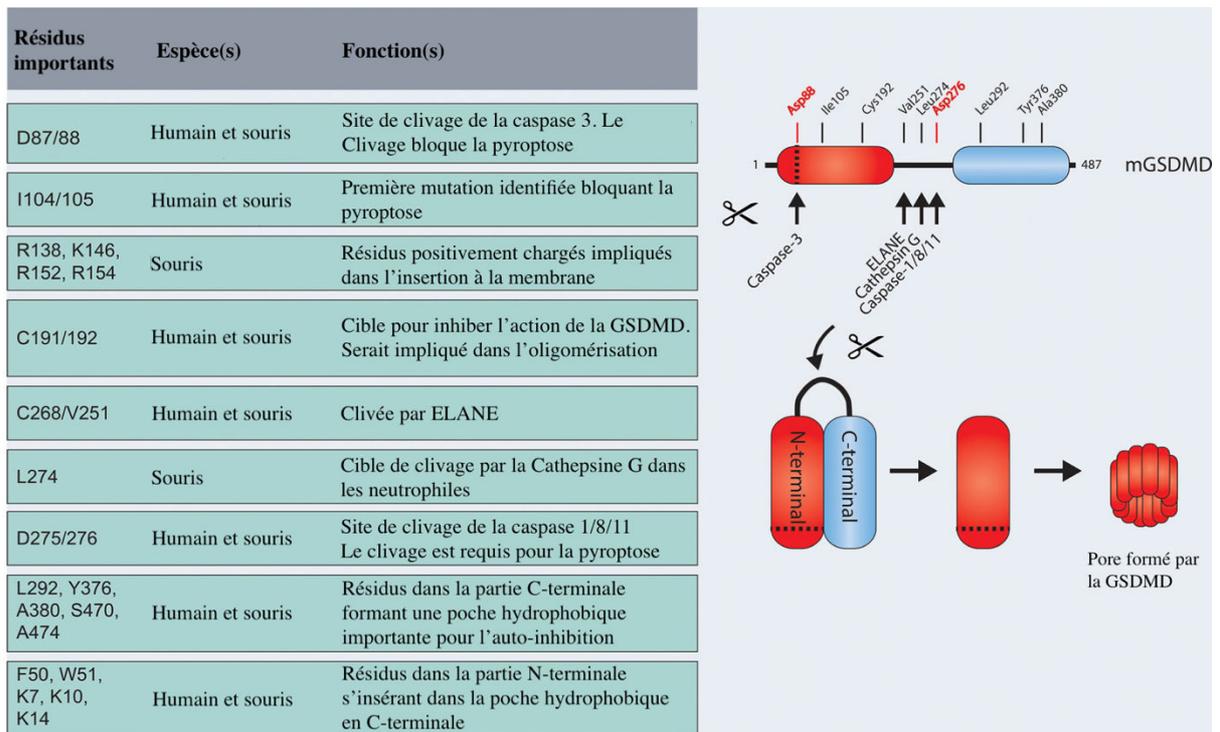


Figure 18 - Structure et résidus importants de la GSDMD murine et humaine

Figure issue et modifiée de (Orning et al., 2019)

4.4.3. Oligomérisation :

L'oligomérisation des Gasdermines est une étape importante pour transformer une cascade d'événements cellulaires en bouleversement majeur pour l'homéostasie et la survie cellulaire. Le contrôle de la formation des ROS par la cellule semble être une étape limitante dans l'oligomérisation de la GSDMD ainsi que la formation du pore mais pas pour sa présence à la membrane. Bien qu'on ne sache pas encore précisément si les monomères de GSDMD s'assemblent dans le cytosol pour ensuite s'insérer dans la bicouche lipidique ou s'ils le font directement dans la membrane, des études ont récemment mis en évidence des éléments allant dans le sens de la dernière hypothèse (Evavold et al., 2021; Y. Wang et al., 2019). Une première étude a permis de montrer que la production de ROS dans les macrophages induit des modifications oxydatives des résidus Cys58, Cys56, Cys268, Cys467 chez l'humain et Cys39, Cys57, Cys265 et Cys487 chez la souris (Y. Wang et al., 2019). Ces MPT sont nécessaires pour la modulation de la pyroptose par les ROS. Une seconde étude a ensuite permis de montrer que ces mécanismes sont dépendant de la voie mTORC1 contrôlant la production d'ERO chez les macrophages mais il ne nécessite pas d'interaction directe entre la GSDMD et ces molécules. La capacité des ROS à induire une récupération de la formation d'un pore membranaire dans des souris RAG^{-/-} indique que la principale fonction de cette voie dans l'induction de la pyroptose est la production d'ERO indispensables à la formation d'un pore membranaire (Evavold et al., 2021). Il existe d'ailleurs d'autres voies cellulaires activant la voie mTOR comme le glucose, les facteurs de croissance, des récepteurs aux cytokines et d'autres PRR (G. Y. Liu & Sabatini, 2020). L'activation de la voie mTORC1 au travers de ces différents stimuli seraient donc suffisants pour induire l'oligomérisation de la GSDMD. En outre, l'activation de l'inflammasome ou des infections microbiennes peuvent activer la voie mTOR participant de ce fait à l'oligomérisation de GSDMD nécessaire pour l'induction de la pyroptose dans le contexte infectieux (West et al., 2011). Tout cela pris en compte, l'activation de la caspase 1 et le clivage de la GSDMD ne semblent pas être des éléments suffisants pour la mise en place de la pyroptose et dévoilent de nouvelles étapes de régulation. Un contexte cellulaire particulier - favorable à l'induction de la pyroptose - semble être nécessaire pour que la GSDMD clivée puisse former un pore membranaire tuant de ce fait la cellule de manière immunogénique.

4.4.4. Fixation à la membrane cellulaire :

La partie N-terminale de la Gasdermine D et de la Gasdermine A3 se fixent aux lipides membranaires et forment des pores responsables de la pyroptose (**voir figure 16**) (Aglietti et

al., 2016; X. Chen et al., 2016a; Ding et al., 2016a; X. Liu et al., 2016a; Sborgi et al., 2016). L'utilisation de liposomes et des mutations ponctuelles dans les structures $\alpha 1$ et $\beta 1$ - $\beta 2$ ont permis de montrer l'importance de ces structures dans la fixation de la partie N terminale de ces protéines aux lipides membranaire et donc à l'induction de la pyroptose (Z. Liu et al., 2019). En effet, des mutations dans les deux structures $\alpha 1$ et $\beta 1$ - $\beta 2$ entravent la fixation de la protéine à la membrane et donc l'induction de la pyroptose. Ces éléments suggèrent que ces structures participent à la fixation aux lipides membranaires et sont indispensables à l'initiation de la pyroptose.

4.5. La Gasdermine E :

Le gène de la GSDME a été découvert par le Professeur Guy Van Camp à l'université d'Anvers pour être responsable d'une surdité autosomale dominante en 1998 (Op De Beeck et al., 2012). La même équipe s'est aperçu que toutes les mutations spécifiques retrouvées dans des familles atteintes de ce syndrome entraînaient un saut de l'exon 8 au niveau de l'ARNm de la GSDME. De surcroît, l'analyse de la méthylation de ce gène dans le cancer montre qu'il est fréquemment hyperméthylée entraînant la perte d'expression de cette molécule dans différents cancers ce qui confirme le rôle bénéfique que pourrait jouer la GSDME dans le cancer (Croes et al., 2018). Bien qu'elle soit impliquée dans pathologies, les mécanismes précis liant la GSDME aux conséquences physiopathologiques n'est pas encore bien compris. En parallèle, la découverte d'autres protéines partageant des caractéristiques similaires permet de les classer en famille appelée Gasdermines sans bien comprendre encore leurs fonctions. Le Pr. Guy Van Camp découvre que la perte de l'exon 8 de la GSDME entraîne une mortalité cellulaire dans les cellules exprimant cette forme de la protéine. En outre, il expose qu'elle possède un domaine N-terminal responsable de la mortalité et d'une partie C-terminale régulatrice permettant le contrôle de la partie N-terminale reliés par une région charnière. Ces particularités sont partagées avec les membres des autres Gasdermines. En 2015, la découverte que la GSDMD est clivée par la Caspase 1 et 4/5 entraîne un regain d'attention et de recherche sur la fonction de ces protéines (J. Shi et al., 2015b). Bien que la GSDME ne soit pas actuellement cristallisée, la forte homologie de séquences entre la partie N et C terminale de la GSDMD, de la GSDMA3 et la GSDME a permis d'aboutir aux mécanismes d'activation de la GSDME.

4.5.1. Structure :

La structure de la GSDME ressemble fortement à ce que l'on retrouve pour les autres Gasdermines. Effectivement, au regard de la comparaison de séquences faites entre les différentes protéines composant cette famille, elles possèdent toutes (à l'exception de PJVK) une forte conservation de résidus dans des parties importantes et notamment dans les structures tertiaires permettant la liaison entre la partie N effectrice et C-terminale inhibitrice.

Bien que la GSDME ne soit pas encore cristallisée, *De Schutter* a réalisé dans ses travaux de doctorat une analyse *in silico* sur la structure de la GSDME en utilisant une analyse bio-informatique basée sur le cristal de la GSDMA3 murine (mGSDMA3) (De Schutter, 2021). Ces analyses ont montré qu'il existe une forte homologie de séquence entre la mGSDMA3, la GSDME humaine mais aussi la GSDMD humaine. En effet, on retrouve une organisation des structures tertiaires comme les hélices α et les feuillets β quasi-identiques dans la partie N-terminale entre les membres de cette famille de protéines. Cependant, dans la partie C-terminale on retrouve plus de variabilités et notamment une perte d'une hélice α pour la GSDME humaine que l'on ne retrouve pas pour les autres membres de cette famille. En outre, on retrouve des différences dans la conformation de la région charnière et notamment pour la GSDMD humaine où cette région est située plus près du cœur de la protéine. Ces différences dans la partie charnière peuvent s'expliquer par un ciblage de cette région par différentes protéases comme les caspases. Cependant, l'interaction entre la partie N-terminale et C-terminale fait intervenir les mêmes structures tertiaires entre les différentes protéines de cette famille.

4.5.2. Mécanismes d'auto-inhibition :

Comme l'interaction entre la partie C et N-terminale permet l'inhibition des GSDMs, *De Schutter et al.* ont étudié les interactions entre ces deux parties en utilisant des outils bio-informatiques (De Schutter, 2021). Cette étude *in silico* a permis de montrer que les mécanismes et les résidus impliqués dans l'auto-inhibition sont conservés entre la GSDMA3, la GSDMD et la GSDME. En effet, dans la GSDME – de la même manière que la GSDMA et la GSDMD – l'hélice $\alpha 1$ et la boucle $\beta 1/\beta 2$ forment une plateforme de fixation nécessaire pour l'interaction entre la partie NT et CT. D'autres études ont montré que la présence de résidus arginine dans l'hélice $\alpha 1$ joue un rôle très important dans la capacité de la GSDMA3 et de la GSDMD à induire la rupture de la membrane cellulaire. L'analyse *in silico* réalisée par *De Schutter et al.*

a mis en évidence la présence de ces résidus dans l'hélice $\alpha 1$ de la GSDME ce qui montre que cette molécule se comporte de la même manière que les autres membres des GSDMs. Dans l'auto-inhibition, l'hélice $\alpha 1$ (de la GSDMA3, de la GSDMD et GSDME) se retrouve dans le centre de la protéine ce qui permet de cacher cette région et donc d'éviter les mécanismes conduisant à la rupture de la membrane cellulaire. Ces éléments semblent faciliter la fixation de résidus hydrophobes dans la boucle $\beta 1/\beta 2$ de la partie N-terminale à des résidus hydrophobes du domaine C-terminal. Les résidus impliqués sont les résidus I313, F388 et A392 de la partie C-terminale (Ding et al., 2016b) et la même analyse *in silico* a permis de montrer que ces résidus forment une structure hydrophobe dans la partie CT qui se fixe fortement au résidu W46 présent dans la boucle $\beta 1/\beta 2$ du domaine effecteur NT. Ces mécanismes d'auto-inhibition de la GSDME sont donc similaires aux autres GSDMs.

4.5.3. Fixation à la membrane cellulaire :

Récemment, une étude a montré que la GSDMA3 changeait drastiquement de forme lors du clivage par les différentes protéases du linker entre la partie NT et CT afin d'adopter une conformation plus ouverte et plus allongée (Ruan et al., 2018). Cette conformation permet l'exposition d'une structure globulaire - formée par 4 feuillets β - servant de domaine de fixation à la membrane plasmique. Également, la superposition de la GSDMD, la GSDME et la GSDMA3 dans un modèle bio-informatique a souligné que cette conformation particulière mais aussi que la présence du domaine globulaire sont conservés entre les différentes GSDMs. En supplément, une analyse plus approfondie de la structure de l'hélice $\alpha 1$ et des feuillets β de la partie N terminale a été réalisée car c'est une structure importante pour la fixation du domaine NT dans la membrane plasmique. L'hélice $\alpha 1$ de la GSDME est positionnée au même endroit que celle de la GSDMA3 et de la GSDMD et cette position spécifique permet la formation d'une structure chargée positivement au sommet d'une large région hydrophobe dans le NT de la GSDMD et GSDME. Cela permet la fixation aux phospholipides négativement chargés comme les cardiolipines et l'insertion dans la membrane de la GSDME afin d'aboutir à la perméabilisation membranaire. Ces analyses *in silico* permettent une fois de plus de montrer que la structure et la fonction de la GSDME sont similaires aux autres membres de cette famille.

4.5.4. Oligomérisation :

L'analyse *in silico* de la structure de la GSDME indique que la région transmembranaire de N-GSDME est moins rigide que celle de N-GSDMA3 et N-GSDMD, ce qui pourrait affecter la manière de former des pores membranaires (De Schutter, 2021). Les auteurs de cette étude ont examiné les potentiels de surface de la NT-GSDME et de NT-GSDMD par rapport à la NT-GSDMA3 et ils ont observé que la surface hydrophobe de NT-GSDME contient des zones chargées, perturbant le caractère hydrophobe formé par les 4 feuillets β de la structure globale. En outre, des résidus polaires, non chargés, ont été détectés dans les β 1, β 2 et β 3 de la NT-GSDME, indiquant un caractère plus amphipathique. En revanche, les domaines NT de la GSDMA3, de la GSDMD et de la GSDME sont principalement composés de résidus hydrophiles et chargés, suggérant un contact avec le milieu cellulaire aqueux. Le domaine globulaire de NT-GSDME est légèrement moins chargé et contient un niveau plus élevé de résidus hydrophobes, ce qui est inattendu pour une surface en contact avec le cytoplasme. Ils ont également identifié des interfaces faibles pour l'interaction des sous-unités dans N-GSDME, qui diffèrent de celles proposées pour la GSDMA3 et la GSDMD. Ces résultats suggèrent que le domaine NT de la GSDME pourrait utiliser un mécanisme de formation de pores différent de celui de N-GSDMA3 et N-GSDMD mais cela nécessite la confirmation par des éléments plus probants qu'une étude comparative *in silico*.

5. Différences et mécanismes communs entre la pyroptose/nécroptose

La pyroptose et la nécroptose sont toutes deux des formes de morts cellulaires inflammatoires. Cependant, ces deux voies cellulaires utilisent des voies cellulaires différentes avec des mécanismes propres à chaque mort cellulaire (**voir tableau 6**). Par exemple, la nécroptose est une mort cellulaire de secours activée quand l'apoptose est bloquée lors d'infections bactériennes (Brault & Oberst, 2017; Naderer & Fulcher, 2018) et notamment lorsque que l'activité de la caspase 8 est inhibé par des éléments bactériens ou par dans les cellules tumorales (Kaiser et al., 2011; Oberst et al., 2011). D'autre part, la pyroptose est une mort cellulaire activée en réponse à des dégâts cellulaires, à certaines molécules comme les DAMPs. Quoique les événements finaux d'activation de ces voies semblent identiques, la cause d'activation de ces voies est totalement différente.

Comme l'activité de la GSDMD a le plus été étudié et la mieux caractérisée, nous allons nous focaliser dans cette partie sur les différences entre la GSDMD et MLKL sur les mécanismes différentiels de perméabilisation de la membrane plasmique. Les monomères de

GSDMD forment un pore membranaire d'un diamètre de 10-20 nm (Ding et al., 2016a; Sborgi et al., 2016) alors que les analyses de cryo-microscopie électronique montrent que celui formé par la GSDMA est composé de 26 à 28 monomères de 18 nm de diamètre (Ruan et al., 2018). Contrairement aux processus médiés par la GSDMD, comment MLKL déstabilise la membrane cellulaire est bien moins compris. Certaines études mettent en avant la capacité de MLKL de perméabiliser des liposomes ce qui suggère que MLKL peut directement induire des dommages dans la membrane et que la taille de ces perforations ont été estimés aux alentours de 4 nm (Dondelinger et al., 2014; Quarato et al., 2016b; H. Wang et al., 2014). De surcroît, des travaux ont aussi montré que MLKL pouvait se fixer sur des canaux ioniques et induire des flux ioniques ou qu'il pouvait former des canaux cationiques ce qui n'est pas le cas pour les Gasdermines.

La mortalité induite par MLKL ou GSDMD induit des différences de morphologie (X. Chen et al., 2016a; de Vasconcelos et al., 2019a) qui peuvent être en partie expliqués par une variation dans la fixation des membranes cellulaires ou par la cinétique de la mortalité induite par l'activation de ces voies. Les cellules mourantes de pyroptose restent attachées et gonflent modérément pendant que la membrane se perméabilise ce qui s'explique notamment par les flux ioniques non spécifiques induit par le pore de la GSDMD (X. Chen et al., 2016a; de Vasconcelos et al., 2019a). En comparaison, la nécroptose induit un détachement cellulaire et des perturbations causés par des flux ioniques spécifiques entraînant un gonflement cellulaire important et une lyse osmotique. Outre la taille plus petite des pores médiés par MLKL, la formation de flux ioniques spécifiques entraîne des perturbations cellulaires de plus fortes amplitudes ce qui peut expliquer que l'on retrouve une puissante lyse osmotique lors de la nécroptose.

Tableau 6 - Comparaison des marqueurs caractéristiques entre l'apoptose, la pyroptose et la nécroptose

Sujet	Caractéristiques	Pyroptose	Nécroptose	Apoptose
Propriétés	Mort cellulaire programmée	+	+	+
	Inflammation	+	+	-
Noyau	Dommages de l'ADN	+	+	+
	Condensation de la chromatine	+	+	+
	Intégrité du noyau cellulaire	+	+	-
Membrane	Bourgeonnement cellulaire	+	+	+
	Formation d'un pore	+	+	-
	Exposition des phosphatidylserines	+	+	+
	Lyse osmotique	+	+	-
	Intégrité membranaire	-	-	+

	Contraction cellulaire	-	-	+
	Gonflement cellulaire	+	+	-
Médiateurs	Clivage des gasdermines	+	-	-
	Clivage de PARP	-	-	+
	Clivage de MLKL	-	+	-
	Inflammasomes	+/-	+/-	-
	Activation de la caspase 1	+	+	-
	Activation de la caspase 2	-	-	+
	Activation de la caspase 3	+	-	+
	Activation de la caspase 4	+	-	-
	Activation de la caspase 5	+	-	-
	Activation de la caspase 6	+	-	+
	Activation de la caspase 7	-	-	+
	Activation de la caspase 8	+	+	+
	Activation de la caspase 9	+	-	+
	Activation de la caspase 10	-	-	+
	Activation de la caspase 11	+	-	-
Marquages	Annexin V	+	+	+
	TUNEL	+	+	+
	7-AAD	+	+	-
	DAPI	+	+	-
Réparation	Système ESCRT	+	+	-

5.1. Localisation et fixation aux différentes membranes cellulaires

La partie N-terminale effectrice de la GSDMD se fixe sur des phosphoinositides (PIPs) présents dans la partie interne de la membrane plasmique comme les PI(3, 4,5)P2 mais aussi sur les cardiolipines (X. Chen et al., 2016b; Ding et al., 2016b; X. Liu et al., 2016b). Les cardiolipines sont des composants exposés à la membrane bactérienne externe lors de stress cellulaires ce qui peut expliquer la lyse directe que peut exercer la partie NT de la GSDMD dans des expériences *in vitro* (Ding et al., 2016b; X. Liu et al., 2016b). Les PIPs sont présents dans différents organites de la cellule comme les lysosomes, les endosomes, la mitochondrie ce qui suggère que l'induction de la pyroptose entraîne la perforation de différentes organites cellulaires et non seulement l'ouverture de la membrane plasmique (de Vasconcelos et al., 2019b; Ding et al., 2016b). Il a aussi été montré que la partie NT de la GSDMA, de la GSDMD et de la GSDME ciblait la mitochondrie facilitant la libération du Cyt C (Platnich et al., 2018; Rogers et al., 2019). Lors de la NETose induite par le LPS, le domaine NT de la GSDMD est recruté sur la membrane nucléaire suggérant qu'elle peut participer à la perméabilisation nucléaire et la libération d'ADN (K. W. Chen et al., 2018). En outre, lors de la NETose induite par le

phorbol myristate acétate (PMA), la GSDMD cible des granules proches de la membrane plasmique contenant la protéine ELANE libérant de l'élastane dans le cytoplasme ce qui perméabilise la membrane et la libération de piège extracellulaires neutrophiliques (NET pour *Neutrophil extracellular traps*) (Sollberger et al., 2018). De plus, la GSDME intervient dans des phénomènes d'amplification de l'apoptose en perméabilisant la membrane mitochondriale permettant la libération du Cyt C et la formation de l'apoptosome (Rogers et al., 2019). D'autres études ont aussi montré que dans des neutrophiles activés via l'inflammasome NLRP3, la GSDMD permet la libération d'élastane en ciblant des granules intracellulaires ce qui induit la formation d'autophagosomes sans induire de perméabilisation membranaire ni de mortalité cellulaire (Karmakar et al., 2020). La N-GSDMD intervient donc également dans d'autres processus importants de résolution du stress cellulaire tel que l'autophagie. Pour aller plus loin, l'expression de la GSDMD et de la GSDMA3 dans des cellules HEK293T induit l'augmentation de marqueurs autophagiques (P. Shi et al., 2015). Tous ces différents éléments nous permettent de dire que les Gasdermines participent non seulement à l'induction de MCI mais aussi dans la régulation et la résolution de multiples stress cellulaires via le ciblage différentiel des différentes organites intracellulaires.

Quant à MLKL, il se fixe sensiblement sur les mêmes composants que la GSDMD et notamment les cardiolipines et les PIPs chargés négativement. Il semblerait que la fixation du domaine 4HB sur les PIPs de faible affinité entraînent l'exposition d'un domaine 4HB de haute affinité pour les PIPs et principalement les interactions avec les PI(4,5)P2 (Quarato et al., 2016b). De façon similaire à la GSDMD, MLKL se fixe sur différents organites intracellulaires comme les lysosomes, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et le noyau. De manière semblable à ce que l'on retrouve pour la GSDMD, MLKL intervient dans des mécanismes cellulaires autres que l'induction de la mortalité.

5.2. Mécanismes de réparation de la membrane cellulaire :

Même si des différences existent entre ces morts cellulaires inflammatoires, il existe des mécanismes communs de réparation de la membrane cellulaire après l'induction de ces différentes voies. Dans les faits, l'induction de pores membranaires ainsi que les changements intracellulaires associés n'aboutissent pas toujours à la mort de la cellule car il existe des acteurs moléculaires communs participant aux réparations membranaires. L'intégrité de la membrane plasmique est importante pour l'activité biologique de la cellule et la conservation de sa fonction est dictée par des processus actifs. La membrane est composée d'une double couche phospholipidique avec une couche interne hydrophobe et une couche externe hydrophile permettant

le passage de molécules avec une faible hydrophobicité. Ces dernières vont passer passivement au travers de la membrane alors que des molécules chargées ne passeront pas cette barrière. Lors de l'induction de morts cellulaires programmées, des changements dans la membrane apparaissent impactant l'activité de la cellule. La destruction de l'intégrité de cette double couche lipidique entraîne la libération incontrôlée du contenu intracellulaire augmentant l'inflammation locale.

Ces dernières années, la découverte d'un complexe moléculaire impliqué dans la réparation de la membrane plasmique appelé ESCRT-III (pour « *endosomal sorting complexes required for transport* ») a révolutionné notre compréhension des mécanismes permettant aux cellules de surmonter des dégâts cellulaires importants (J. Liu et al., 2020). Ce complexe est impliqué en réponse à des stress chimiques et mécaniques et dans la réparation de la membrane plasmique, de l'enveloppe nucléaire, de la réparation du lysosome et dans la formation des microvésicules (**voir figure 19**) (Vietri et al., 2020). Il joue aussi un rôle important dans la régulation des différentes morts cellulaires programmées comme la pyroptose, la nécroptose et la ferroptose. La destruction de la membrane plasmique entraîne un influx important de calcium ce qui permet l'activation et le recrutement à la membrane de ce complexe. Ce dernier va réparer la double couche lipidique en formant une boucle dans la membrane cellulaire afin de libérer la partie abimée. Cette réparation active de la membrane permet la libération de DAMPs mais aussi de cytokines afin d'alerter les cellules environnantes d'un danger sans induire la mortalité de la cellule. Ces mécanismes sont aussi impliqués dans la résistance aux morts cellulaires inflammatoires et certaines études ont montré que la délétion de certains de ces acteurs augmenterait la susceptibilité des cellules à succomber à la pyroptose, la nécroptose ou à la ferroptose (Dai et al., 2020; Y.-N. Gong et al., 2017; Rühl et al., 2018). Le complexe ESCRT-III est aussi impliqué dans certains cancers pour induire une résistance à l'induction de mort cellulaire inflammatoires mais aussi à l'action cytotoxique des LyT (J. Liu et al., 2020; Ritter et al., 2022).

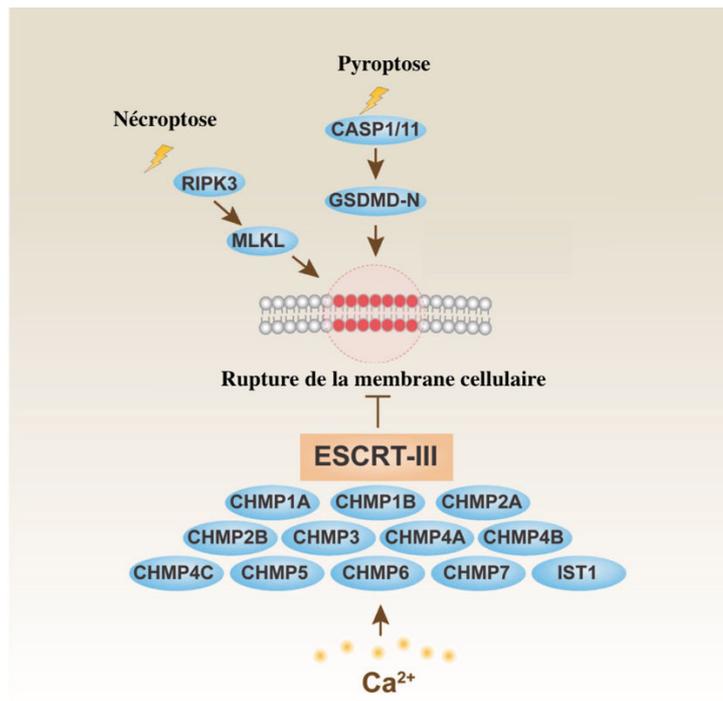


Figure 19 - Le complexe ESCRT-III régule l'action des Gasdermines et de MLKL

Lors de dégâts cellulaires induits par la pyroptose et la nécroptose mais aussi par des stress chimiques et mécaniques, un influx massif de calcium se produit dans la cellule ce qui permet d'activer un complexe particulier appelé ESCRT-III. Ce complexe macromoléculaire est composé d'une douzaine d'acteurs permettant de réparer les dégâts de la membrane plasmique. Figure issue et modifiée de (J. Liu et al., 2020).

6. Influence des différentes MCI dans le cancer :

6.1. Rôle complexe de la nécroptose dans le cancer

Dans le contexte du cancer, la nécroptose peut être considérée comme une arme à double tranchant car des effets positifs et négatifs sur la croissance et l'invasion/métastase des cellules tumorales ont été observés dans différents modèles précliniques.

6.1.1. Effets négatifs de la nécroptose dans le cancer :

Dans l'ostéosarcome, des études ont montré que la surexpression de miR-155-5p inhibait l'expression de RIPK1 et était associée à un mauvais pronostic et à une croissance tumorale accrue (Bhattacharya et al., 2016). MLKL, l'exécuteur moléculaire de la nécroptose, est aussi régulé à la baisse dans divers types de cancers, tels que les cancers gastriques, cervicaux squameux et ovariens, et une faible expression de MLKL est souvent de mauvais pronostic (Ertao et al., 2016; L. He et al., 2013; Ruan et al., 2015). Également, l'expression de MLKL a été proposée comme un potentiel biomarqueur prédictif dans les cancers gastriques, les cancers cervicaux squameux et l'adénocarcinome pancréatique à un stade précoce (Colbert et al., 2013;

Ertao et al., 2016; Ruan et al., 2015). Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que la régulation à la baisse de RIPK1, RIPK3 ou MLKL est associée à un pronostic plus défavorable et/ou à une agressivité tumorale accrue, étayant l'idée que la nécroptose sert de suppresseur de tumeur et que son inhibition représente un mécanisme permettant aux cellules cancéreuses d'échapper à la mort cellulaire. Par exemple, des mécanismes épigénétiques, en particulier la méthylation de la région entourant le site de départ de la transcription, peuvent réprimer l'expression de RIPK3, l'un des principaux composants de la voie moléculaire en amont de MLKL. Cela a été observé dans des lignées cellulaires tumorales, des cellules tumorales de patients atteints de leucémie myéloïde aiguë (LMA) ainsi que dans des cancers primaires du sein (Koo et al., 2015). L'expression de RIPK3 est réduite dans tous les sous-types analysés, y compris dans 73 % des échantillons du groupe luminal A, 84 % du groupe luminal B, 90 % des échantillons triple négatifs et dans 95 % des échantillons Her2-positifs. Cela suggère que l'expression de RIPK3 est négativement sélectionnée au cours de la transformation oncogène ou lors de la croissance tumorale et que sa régulation à la baisse est corrélée à une résistance à la chimiothérapie. Des agents hypométhylants tels que la 5-aza-2'-déoxycytidine (5-AZA) peuvent restaurer l'expression de la protéine RIPK3 dans environ 70 % des lignées cellulaires tumorales testées et pourraient sensibiliser les lignées cellulaires réfractaires à la nécroptose induite par le TNF- α , ainsi qu'à plusieurs agents chimiothérapeutiques de manière dépendante de l'action de RIPK3 (Koo et al., 2015). Dans un modèle de tumeur xéno greffe, la combinaison de 5-AZA et de doxorubicine était plus efficace que chacun des traitements pris séparément. Bien que l'apoptose reste le principal type de mort cellulaire induit par les médicaments de chimiothérapie, des preuves de plus en plus nombreuses indiquent que certains médicaments, comme le cisplatine, peuvent également déclencher la nécroptose (D. Wang & Lippard, 2005).

Cependant, dans le paysage complexe du cancer, des preuves existent également pour suggérer les conséquences négatives associées à l'expression des acteurs clés de la nécroptose. Par exemple, dans le glioblastome (GBM), l'expression de RIPK1 a été liée à un pronostic plus mauvais. Le mécanisme sous-jacent implique l'activation de NF- κ B par RIPK1, qui inhibe l'activité de P53, favorisant ainsi la croissance tumorale (Park et al., 2009). Dans une autre étude, les effets de la nécroptose dans l'adénocarcinome pancréatique canalaire se sont révélés contradictoires lorsqu'ils ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*. L'inhibition *in vitro* de la formation du complexe nécrosome RIPK1/RIPK3 a favorisé la prolifération et l'agressivité des cellules cancéreuses, ce qui est cohérent avec leur rôle de suppresseurs de tumeurs susmentionnés.

Cependant, ce n'était pas le cas *in vivo*, où l'inhibition de la nécroptose était associée au rejet de la tumeur (Seifert et al., 2016). Ces résultats apparemment contradictoires ont été attribués à l'influence négative de la nécroptose sur la composition du MET. Dans le modèle de souris utilisé pour cette étude, la signalisation RIPK1/RIPK3 intacte favorisait le recrutement d'un MET immunosuppresseur (Seifert et al., 2016). Mécanistiquement, cela dépendrait de l'expression dépendante de la nécroptose de la chimiokine CXCL1, du recrutement de cellules myéloïdes, et de leur conversion en cellules immunosuppressives et tumorigènes. Dans ce modèle d'adénocarcinome pancréatique canalaire, la suppression de RIPK3 ou l'inhibition pharmacologique de RIPK1 ont favorisé le recrutement de cellules immunitaires activées et le rejet de la tumeur (Seifert et al., 2016). Par conséquent, dans ce modèle de souris *in vivo*, la nécroptose semble favoriser une réponse pro-inflammatoire chronique de faible intensité qui encourage l'établissement d'un MET immunosuppresseur. Conformément à cette étude, une autre étude a démontré l'effet positif *in vivo* d'un nouvel inhibiteur sélectif de RIPK1 - développé par la société GSK - dans le même type de modèle tumoral ainsi que dans des modèles d'organoïdes humains (W. Wang et al., 2018). Dans cette même étude, il a été constaté que RIPK1 était surexprimé dans les macrophages immunosuppresseurs associés aux tumeurs (MAT). Son inhibition a reprogrammé les MAT vers un phénotype immunogénique induisant l'activation des LyT et la différenciation des LyT helper en phénotypes Th1/Th17 anti-tumoraux, et a amélioré l'immunité antitumorale. Ces études démontrent l'importance d'examiner les conséquences de la nécroptose non seulement sur les cellules tumorales elles-mêmes, mais également sur les cellules du MET et la provocation de réponses anti-immunitaires.

6.1.2. Effets positifs de la nécroptose dans le cancer :

De manière intrigante, l'induction de la nécroptose peut avoir un impact sur l'efficacité de thérapies anticancéreuses dans certaines circonstances. Des études récentes ont révélé que l'expression de RIPK3 dans des lignées de cellules cancéreuses de l'œsophage contribue à la sensibilité au cisplatine dans les cas où la voie apoptotique est altérée ou absente (Xu et al., 2014). Dans ce modèle *in vitro*, l'administration de cisplatine déclenche la production autocrine de TNF- α , un inducteur bien connu de la voie apoptotique extrinsèque via l'action de TNFR1. Une fois de plus, cette situation illustre l'idée que la nécroptose peut être activée lorsque les composants de cette voie sont présents en l'absence d'apoptose. Par conséquent, l'expression des protéines TNFR1 et RIPK1/RIPK3/MLKL par les cellules tumorales, couplée à la production de TNF- α dans le MET, pourrait servir de nouveaux biomarqueurs de la sensibilité au

cisplatine dans les tumeurs résistantes à l'apoptose. Cela ne se limite pas au cisplatine, car il a été reporté que d'autres agents chimiothérapeutiques provoquent la nécroptose par différents mécanismes, tels que la shinokin et la staurosporine dans la leucémie, ou la refisibufogenin et le 5-FU dans le cancer colorectal (T. Gong et al., 2020; Y. Gong et al., 2019).

Comme mentionné précédemment, la nécroptose déclenche la libération de DAMPs et la stimulation des cellules immunitaires *via* diverses voies moléculaires. Néanmoins, des recherches récentes indiquent que la libération de DAMPs lors de l'induction de la nécroptose seule est insuffisante pour une activation croisée efficace des LyT CD8⁺ et une forte immunité adaptative (Yatim et al., 2015). Au lieu de cela, des voies de signalisation moléculaire complexes et coordonnées - impliquant l'activation RIPK1-dépendante de NF-κB - semblent être nécessaires malgré la progression rapide vers la mort cellulaire, ce qui entraîne l'expression simultanée de gènes et de cytokines pro-inflammatoires (Park et al., 2009). De manière intrigante, l'induction directe de la nécroptose intratumorale à l'aide d'un vecteur AAV codant une forme constitutivement active de RIPK3 induit la nécroptose dans une partie des cellules tumorales, améliore l'immunogénicité tumorale en synergie avec le blocage des points de contrôle immunitaires pour encourager une élimination tumorale durable (Snyder et al., 2019). Dans une approche similaire, l'administration intratumorale directe d'ARNm codant pour l'exécuteur de nécroptose MLKL, accompagnée d'une électroporation *in vivo* sur le site d'injection, diminue la croissance et les métastases tumorales, coopère avec le blocage des points de contrôle immunitaires et améliore l'immunité antitumorale dans des modèles de mélanome murin et de cancer colorectal (Van Hoecke et al., 2018). Dans cette étude, l'électroporation d'ARNm de MLKL *in vivo* a permis d'induire des réponses de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ ciblant les antigènes tumoraux responsables du contrôle tumoral. Dans l'ensemble, ces résultats sur des modèles murins suggèrent que la promotion de la nécroptose directement dans les cellules tumorales pourrait être une stratégie novatrice pour stimuler la libération d'antigènes tumoraux, leur présentation efficace et l'induction de RI contre les cellules tumorales.

6.2. Rôle complexe de la pyroptose dans le cancer

Les protéines GSDMD et GSDME exercent un rôle complexe dans le MET. En fonction du type de tumeur et possiblement d'autres facteurs, leurs expressions et leurs fonctions peuvent être associées avec soit une régression ou une progression tumorale.

6.2.1. GSDMD

6.2.1.1. Effets négatifs associés à la pyroptose médiée par la GSDMD dans le cancer :

Les protéines GSDMD et GSDME jouent un rôle complexe dans le MET. Selon le type de tumeur et d'autres facteurs, leur expression et leur fonction peuvent être liées à une régression ou à une progression tumorale. Par exemple, dans le cas du carcinome pulmonaire non à petites cellules, on a constaté que l'expression de GSDMD était régulée à la hausse dans les cellules malignes par rapport aux tissus adjacents (Gao et al., 2018). Cela a été observé dans les sous-types d'adénocarcinome pulmonaire (LUAD) et de carcinome épidermoïde pulmonaire (LUSC). Les analyses ont montré que les patients atteints de LUAD et ayant la plus forte expression de GSDMD ont une survie globale plus faible, suggérant son rôle potentiel en tant que facteur pronostique. Cependant, ce n'est pas le cas chez les patients atteints de LUSC, ce qui met en évidence le rôle différentiel de GSDMD dans différents contextes tumoraux. En outre, la suppression de GSDMD dans des lignées de cellules tumorales NSCLC a réduit la prolifération tumorale *in vitro* et *in vivo* chez des souris immunodéficientes greffées. Les données suggèrent que la libération chronique d'IL-1 β dans le MET peut avoir un effet préjudiciable en recrutant des cellules suppressives dérivées de la moelle osseuse (MDSC) et en favorisant la néo-angiogenèse. De plus, dans certains cancers, l'activation de l'inflammasome NLRP3 est associée à un mauvais pronostic en raison du rôle défavorable de la libération chronique d'IL-1 β et d'IL-18 (Kang et al., 2009; Saijo et al., 2002; Terme et al., 2011).

6.2.1.2. Effets positifs associés à la pyroptose médiée par la GSDMD dans le cancer :

En aval de l'activation de l'inflammasome et de GSDMD, l'IL-1 β et l'IL-18 peuvent également avoir un effet bénéfique car ils jouent un rôle crucial dans l'activation des CD8 et des NK, respectivement, et peuvent ainsi favoriser les RI antitumorales. En accord avec cette idée, la dérégulation de la signalisation de l'inflammasome et/ou la réduction consécutive de la production d'IL-1 β et d'IL-18 ont été associées à la croissance tumorale et à la métastase dans le cancer colorectal (Allen et al., 2010; Daley et al., 2017; Zaki et al., 2010). Par conséquent, GSDMD, exprimé par les cellules tumorales ou par les cellules du MET, pourrait aussi être lié à des effets positifs dans certaines circonstances. En accord, l'expression de GSDMD dans le cancer gastrique était plus faible dans les biopsies tumorales par rapport aux tissus adjacents, et sa réexpression forcée par lentivirus dans des lignées de cellules tumorales correspondantes

a été associée à une diminution de la prolifération *in vitro* ainsi qu'*in vivo* après leur greffe chez des souris immunodéficientes *nude* (W. J. Wang et al., 2018). Cela suggère que l'expression de GSDMD pourrait limiter la prolifération cellulaire tumorale intrinsèque dans ce type de tumeur et sensibiliser les cellules à une mort cellulaire pyroptotique. Cependant, les conséquences que cela pourrait avoir sur les RI antitumorales ne pouvaient évidemment pas être évaluées dans ce modèle de souris immunodéficientes. L'induction directe de la pyroptose en utilisant des vecteurs viraux codant pour la N-GSDMD formant des pores présente une perspective intéressante pour tuer les cellules tumorales et induire des RI antitumorales. Cependant, la production de vecteurs viraux codant pour des protéines lytiques peut être difficile et entraîne généralement la mort des cellules productrices et une faible production de vecteurs viraux. Néanmoins, une étude de principe a utilisé un promoteur spécifique pour contrôler l'expression du gène toxique. Cette étude a rapporté l'utilisation d'un vecteur d'adéno-associé (AAV) codant pour la protéine N-GSDMD formant des pores sous le contrôle du promoteur spécifique des cellules de Schwann P0. L'injection des vecteurs AAV1 correspondants dans des modèles de souris ou de tumeurs de Schwannome humain implantés, respectivement, dans des modèles de souris immunocompétentes et immunodéficientes, a entraîné une diminution significative de la croissance tumorale sans signes apparents de toxicité (Ahmed et al., 2019). Cependant, les mécanismes précis conduisant à un meilleur contrôle tumoral et aux éventuelles RI contre la tumeur n'ont pas été évalués.

L'activation de la GSDMD est associée à la maturation et à la libération de l'IL-1 β , qui peut avoir des effets potentiellement néfastes. En revanche, GSDME est activé par la caspase 3 et ne libère pas d'IL-1 β lors de la pyroptose. Cela suggère que la pyroptose induite par GSDME peut être associée à des effets anti-tumoraux améliorés. Cependant, une étude récente a montré que dans des lignées de cellules de macrophages déficientes en GSDMD et exprimant des niveaux faibles de GSDME, l'activation de l'inflammasome peut déclencher secondairement la GSDME pour former un conduit pour la libération de l'IL-1 β sans induire la mort cellulaire par pyroptose. Il reste à explorer si ce nouveau mécanisme a une pertinence pour les cellules myéloïdes ou les cellules tumorales de l'environnement tumoral.

6.2.2. GSDME :

6.2.2.1. Effets négatifs de la pyroptose médiée par la GSDME

Les cellules qui expriment des niveaux suffisants de GSDME peuvent convertir l'apoptose dépendante de la caspase 3 en pyroptose, ce qui a le potentiel de transformer n'importe quel signal pro-apoptotique en pyroptose si GSDME est exprimée et fonctionnelle. Dans la plupart des cellules tumorales, l'expression de GSDME est inactive en raison de deux mécanismes complémentaires : une régulation négative de l'expression basée sur l'hyperméthylation épigénétique du promoteur ou des mutations de perte de fonction conduisant à une protéine inactive incapable de former un pore membranaire (Akino et al., 2007; Croes et al., 2018; Ibrahim et al., 2019; M. S. Kim, Chang, et al., 2008; M. S. Kim, Lebron, et al., 2008). En outre, la méthylation des motifs CpG en dehors de la région du promoteur et dans le gène *GDME* a été décrite, et un ensemble croissant de preuves suggère que ces motifs de méthylation pourraient être utiles en tant que biomarqueurs de diagnostics du cancer. Cependant, les données sur les niveaux d'expression de GSDME entre les échantillons de cancer et les échantillons normaux sont controversées. Alors que la majorité des études translationnelles aient trouvé des niveaux réduits de GDME dans le cancer par rapport au tissu normal, d'autres n'ont pas trouvé de telles différences. De surcroît, il n'y avait aucune corrélation claire entre la méthylation de GSDME et les niveaux d'expression de GSDME dans un certain nombre d'études (Z. Zhang et al., 2020). Dans l'ensemble, *GSDME* semble être un gène suppresseur de tumeur puissant, ce qui a été démontré dans le cancer du sein et le cancer colorectal primaire en utilisant des informations de la base de données « *Cancer Genome Atlas* ».

6.2.2.2. Effets positifs de la pyroptose médiée par la GSDME

La régulation négative de GSDME a été associée à une diminution de la survie globale des patients (Z. Zhang et al., 2020). Dans les lignées de cellules tumorales, le fait de supprimer le gène correspondant dans les cellules EMT6 et CT26 qui expriment GSDME conduit à une augmentation de la croissance tumorale. À l'inverse, l'expression de la version complète de GSDME par l'utilisation de lentivirus diminue la croissance tumorale des lignées de cellules tumorales 4T1 et B16 lorsqu'elles sont greffées chez des souris immunocompétentes. L'analyse des infiltrats de cellules immunitaires met en évidence l'importance de l'expression de GSDME dans la promotion des RI antitumorales caractérisées notamment par les cellules NK infiltrant la tumeur et les LyT cytotoxiques CD8⁺. Il est intéressant de noter que la Granzyme B (GrzB), présente dans les granules cytotoxiques des cellules NK et des LyT cytotoxiques et connue pour

être un mécanisme de mortalité important employé par les cellules immunitaires, clive et active directement la GSDME, indépendamment de l'activation de la caspase 3. Ainsi, cela pourrait être impliqué dans un mécanisme d'auto-amplification visant à augmenter la pyroptose dans le contexte tumoral. Dans ce scénario, un premier signal pro-apoptotique induit, par exemple par un agent chimiothérapeutique, servirait de déclencheur pour initier la pyroptose dans les cellules exprimant GSDME, et le recrutement secondaire de cellules immunitaires cytotoxiques amplifierait davantage la pyroptose par la libération de GrzB et, par conséquent, l'activation directe de la GSDME. De fait, certaines chimiothérapies sont maintenant bien décrites pour induire la pyroptose dépendante de la caspase 3 dans les tumeurs exprimant GSDME (Jiang et al., 2020; Y. Wang et al., 2017b, 2018). Cela pourrait expliquer en partie la survie réduite des patients ayant une faible expression de GSDME dans leur tumeur, qui pourrait être plus résistante à la mort cellulaire pyroptotique, ainsi qu'à l'amplification et la protection secondaires par les RI.

7. Signatures moléculaires liées aux MCI dans le cancer.

Avec l'augmentation de l'intérêt des MCI dans le cancer, de nombreuses équipes se sont focalisés sur l'intérêt de ces voies moléculaires. Des analyses principalement fondées sur des bases de données comme « *The Cancer Genome Atlas* » ou sur des cohortes de patients ont permis de regarder précisément l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans les voies moléculaires associées à la pyroptose et à la nécroptose et de faire des clusters à partir d'échantillon de tumeurs de patients (J. Chen et al., 2022, 2023; A. Liu et al., 2022; C. Liu et al., 2022). Des régressions mathématiques ont ensuite été utilisés pour identifier une signature génique à partir de gènes impliqués dans la pyroptose ou la nécroptose au sein de ces différents clusters. Des analyses bio-informatiques plus poussées ont permis de stratifier les patients en utilisant un score de risque basé sur la signature génique sélectionnée. Ce score permet de classer les patients sur différents critères comme la présence de gènes de la nécroptose, l'infiltrat immunitaire, la présence de cellules immunosuppressive et l'expression de checkpoints immunitaires (J. Chen et al., 2022, 2023; A. Liu et al., 2022; C. Liu et al., 2022). Ce score peut aussi servir à mieux prédire la survie mais aussi la possible réponse aux traitements (immunothérapies, chimiothérapies) en fonction de l'expression d'une multitude de gènes impliqués dans la pyroptose ou la nécroptose. Ces nouvelles analyses offrent des perspectives supplémentaires dans la prise en charge des patients en mieux stratifiant les patients et en proposant des thérapies plus efficaces en fonction de l'expression de gènes impliqués dans la pyroptose ou la nécroptose.

Partie III : Les virus adéno-associés (AAV)

1. Biologie des AAV

Les virus adéno-associés (ou *adeno associated virus*) sont les vecteurs de thérapie génique les plus étudiés. Ils ont été premièrement identifiés comme contaminant de culture d'adénovirus expliquant de ce fait leur nom (Hastie & Samulski, 2015; Rose et al., 1966). Ces virus particuliers font partie de la famille des parvovirus et ont besoin d'une co-infection d'un adénovirus pour se répliquer (car il a besoin de la présence de protéines produites par l'adénovirus pour se répliquer). Ils possèdent des caractéristiques intéressantes afin de les utiliser en thérapie comme un pouvoir intégratif très faible, un tropisme cellulaire particulier dépendant du sérotype viral et une expression à long terme du transgène (Naso et al., 2017). Cependant, le génome viral est de très petite taille ce qui peut être un problème pour l'expression de protéines de grande taille comme dans la myopathie de Duchenne. Le deuxième point limitant est que l'utilisation de ces vecteurs peut induire une RI importante ne permettant pas des injections répétées. Cependant, certaines stratégies ont montré qu'il était possible de surpasser en partie certains de ces inconvénients i) recombinaison homologue entre deux transgènes pour produire des protéines de grande taille ii) utilisation de certaines molécules immunomodulatrices pour limiter la RI contre le virus (comme des inhibiteurs de la voie mTor ou de MyD88). Le premier AAV découvert est l'AAV2 qui a montré des effets intéressants dans différentes maladies humaines comme l'amaurose congénitale de Leber, la choroïdémie, le déficit en décarboxylase des acides aminés aromatiques (Bainbridge et al., 2008; Cideciyan et al., 2008; Hwu et al., 2012; MacLaren et al., 2014). Ces dernières années, une douzaine de sérotypes ont été découverts ouvrant de nouvelles possibilités dans le ciblage de cellules particulières (Bantel-Schaal et al., 1999; Chiorini et al., 1997; Mori et al., 2004; Muramatsu et al., 1996; Rutledge et al., 1998). Ces virus sont actuellement les seuls vecteurs de thérapie génique autorisés en clinique notamment dans le traitement des amyotrophies spinales avec le zolgensma[®] mais aussi dans le traitement de la dystrophie rétinienne héréditaire avec le luxturna[®]. Ces vecteurs font l'objet de fortes investigations pour le traitement des maladies monogéniques mais ils sont aussi, par exemple, un outil utilisé en recherche pour décrypter l'implication de certains récepteurs dans le cancer et les maladies inflammatoires (Demeules et al., 2020).

1.1. Structure

Les AAV possèdent une capsidie protéique icosaédrique protégeant un fragment d'ADN double brin de petite taille (4,8 kilobase). Cet ADN code pour 3 gènes différents : i) le gène *Rep* pour *replication* codant pour 4 protéines (Rep78, Rep68, Rep 52 et Rep40) ii) le gène *Cap* pour *capsidie* codant pour 3 protéines constitutives de la capsidie (VP1, VP2 et VP3) iii) le gène *Aap* (pour « *assembly-activating protein* ») (Naso et al., 2017). Ces trois gènes produisent 9 protéines différentes car ils sont régis par 3 promoteurs distincts, soumis à des phénomènes d'épissage alternatifs et possèdent des sites alternatifs d'initiation de la traduction. Ces séquences codantes sont entourées par des séquences ITR (pour « *inverted terminal repeats* ») importantes pour la réplication du génome mais aussi dans les phénomènes de conditionnement du génome viral au sein de la capsidie protéique. La capsidie virale est composée de 60 protéines VP au total avec un ratio protéique VP1:VP2:VP3 de 1:1:10 avec une abondance de la protéine VP3 par rapport aux deux autres (Samulski & Muzyczka, 2014).

1.2. Sérotypes

Chaque sérotype d'AAV possède une forme icosaédrique composé de 60 monomères des protéines VP : 50 monomères de VP1, 5 monomères de VP2 et 5 monomères VP3 (Gurda et al., 2013). Les structures topologiques saillantes de la surface de la capsidie sont des pores ou des structures en forme de canal à chaque cinquième axe de symétrie, des dépressions à chaque deuxième axe de symétrie, et trois protubérances entourant chaque troisième axe de symétrie (Büning & Srivastava, 2019). Les pores permettent les échanges entre le milieu intérieur et extérieur du virus et participent à la libération du génome lors des phénomènes infectieux. La partie N-terminale de VP1 et VP2 est externalisée au travers du pore au stade précoce infectieux ce qui permet d'échapper au compartiment endosomal et à la dégradation du virus. La protusion autour du troisième axe de symétrie possède 5 des 9 régions variables (VRs) (Tseng & Agbandje-McKenna, 2014). Ces VRs fluctuent entre les différents sérotypes d'AAV et sont responsables de la variation de fixation des récepteurs et des anticorps des nombreux sérotypes d'AAV (**voir tableau 7**) (Büning & Srivastava, 2019; Tseng & Agbandje-McKenna, 2014). La modification génétique de ces régions va perturber l'efficacité de transduction mais aussi la possible fixation d'anticorps neutralisants (Büning et al., 2015; Kay, 2011; Kotterman et al., 2015; Kotterman & Schaffer, 2014). Par leur position exposée et leur implication dans la fixation des récepteurs, ces VRs sont des cibles de choix pour des modifications de la capsidie changeant de ce fait le tropisme des AAV.

Tableau 7 - Les différents sérotypes d'AAV ainsi que les essais cliniques utilisant les AAV comme vecteur de thérapie génique

Sérotipe	Récepteur	Tropisme	Utilisation en clinique	Médicament approuvé
AAV1	Acide sialique	Muscle, système nerveux central (SNC), cœur	Maladies musculaires Insuffisance cardiaque	Non
AAV2	Héparine	Foie, SNC, cœur	Maladies oculaires Hémophilie Maladies du SNC	Luxturna pour la dystrophie rétinienne héréditaire
AAV3	Héparine	Muscle, cellules souches	Aucuns essais en cours	Non
AAV4	Acide sialique	Œil, SNC	Maladies oculaires	Non
AAV5	Acide sialique	SNC, poumon, œil	Maladies oculaires Hémophilie	Non
AAV6	Héparine, acide sialique	Muscle, SNC, cœur, poumon	Hémophilie Maladies du SNC	Non
AAV7	Non connu	Muscle, SNC	Aucuns essais en cours	Non
AAV8	Non connu	Foie, muscle, pancréas, SNC	Maladies musculaires Hémophilie Maladies du SNC	Non
AAV9	Galactose	Tropisme large	Maladies du SNC Maladies musculaires	Zolgensma pour l'amyotrophie spinale
AAV10	Non connu	Muscle	Aucuns essais en cours	Non
AAV11	Non connu	Non connu	Aucuns essais en cours	Non
AAV12	Non connu	Cavité nasale	Aucuns essais en cours	Non

Tableau issu et modifié de (C. Li & Samulski, 2020)

2. AAV comme vecteur pour délivrer des gènes

2.1. Mécanismes de transduction des AAVs

Premièrement, les virions se fixent au récepteur et au co-récepteur cellulaire afin d'initier les mécanismes de transduction (**voir figure 20**). Les virions vont entrer dans le

compartiment cellulaire via l'endocytose et subir des modifications structurales dépendantes du pH endosomal (C. Li & Samulski, 2020). Après l'échappement des endosomes, les virions seront soit ubiquitinylés pour être dégradés par la voie du protéasome ou vont se diriger vers le noyau cellulaire. Une fois dans le noyau, les virions vont libérer une forme ADN simple brin qui sera converti en ADN double brin permettant la transcription et l'export du ARNm hors du noyau laissant libre court à l'expression des gènes responsables de la formation d'un nouvel AAV fonctionnel. La synthèse du deuxième brin d'ADN bicaténaire débute par les ITRs dans la région 3' ce qui permet la formation d'un ADN circulaire stabilisant de ce fait le génome viral, la formation d'un épisode permettant une expression génique de longue durée (Z. Wu et al., 2008). Lors de l'utilisation d'AAVs recombinants (rAAV), 96% du génome viral de l'AAV peut être retiré afin d'insérer et permettre la production d'un transgène d'intérêt. La perte du génome viral sauvage diminue grandement l'immunogénécité et la cytotoxicité que peuvent induire l'utilisation de ces vecteurs. La substitution des gènes Rep et Cap par une cassette d'expression contenant un promoteur, un gène thérapeutique et une queue de poly-adénylation (Z. Wu et al., 2008). Comme les AAVs ont un génome de petite taille (< 4,8 kb), il faut que l'ensemble de ces séquences soient optimisées pour permettre l'insertion et la production du transgène d'intérêt. Dans le génome final des AAV, il reste seulement la séquence naturelle des ITRs du virus sauvage (Les ITRs utilisés en thérapie génique utilisent la séquence des ITRs de l'AAV2). Ces ITRs jouent un rôle primordial dans l'initiation de la production de la cassette thérapeutique mais aussi dans les phénomènes d'encapsidation des virions.

2.2. Méthodes de production des vecteurs AAV :

Actuellement, il existe différents protocoles de production des vecteurs AAV à grande échelle comme : i) la transfection transitoire de cellules de mammifères (HEK 293) ii) l'infection par des adénovirus de lignées cellulaires (Hela, A549 ou Hela 293) exprimant les protéines REP et CAP iii) infection de lignées cellulaires par des *Herpes simplex* virus recombinants (rHSVs) iv) l'infection de cellules d'insectes par des *Baculovirus* recombinants (Penaud-Budloo et al., 2018).

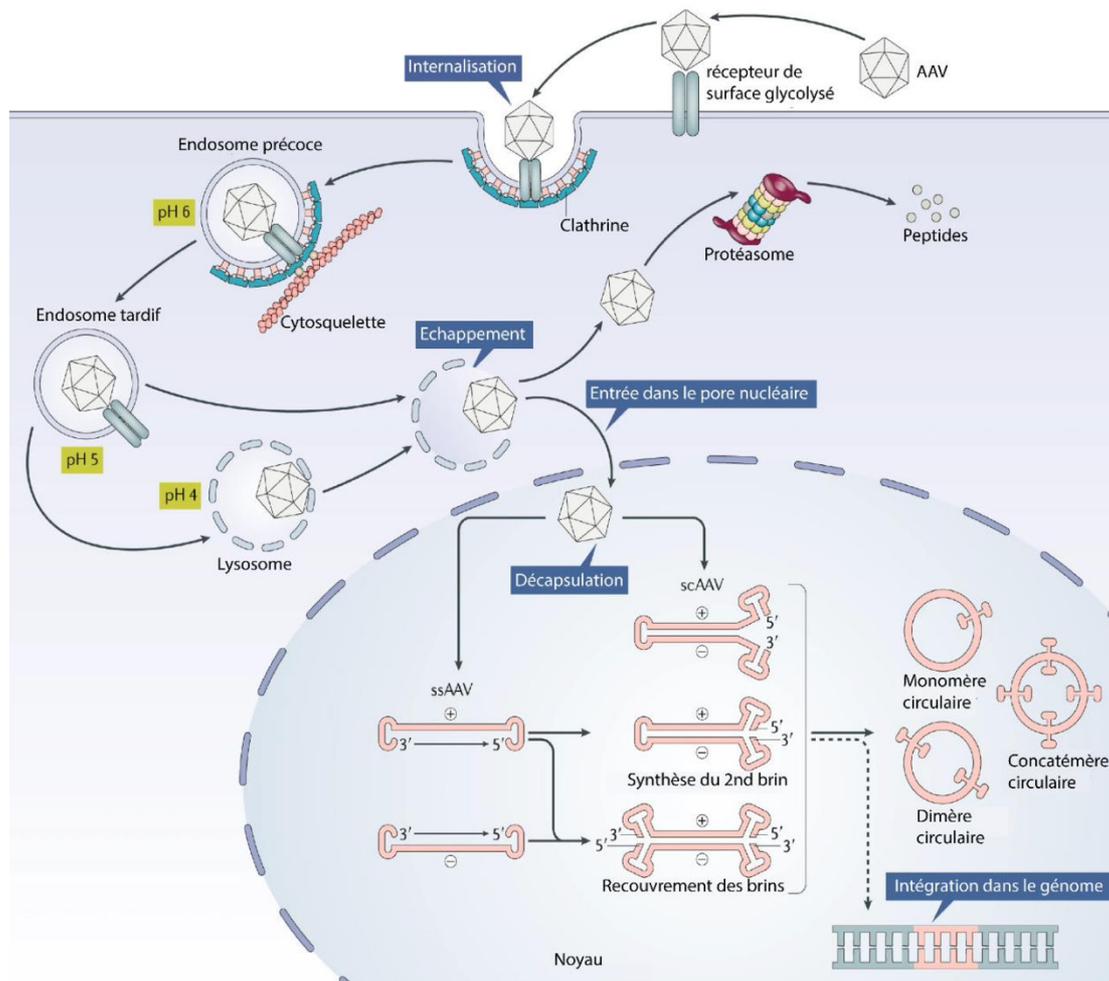


Figure 20 – La transduction des cellules par les AAVs nécessite différentes étapes

Les rAAV se lient à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules cibles, ce qui entraîne leur absorption par endocytose médiée par la clathrine. Dans l'environnement acide du compartiment endosomal, la région VP1/VP2 subit un changement de conformation. Après avoir échappé à l'endosome, les rAAV se déplacent à travers le cytosol en utilisant le réseau cytosquelettique, atteignent le noyau et se désencapsulent. Ils peuvent également subir une protéolyse par le protéasome. Actuellement, il existe deux classes de rAAV utilisées : les rAAV à brin simple (ssAAV) et les rAAV auto-complémentaires (scAAV). Les ssAAV encapsulent soit des génomes sens, soit des génomes antisens sous forme de brins simples. Ces formes brin simple sont inactives du point de vue de la transcription lorsqu'elles atteignent le noyau et nécessitent une conversion en ADN double brin. Cette conversion peut être effectuée par la synthèse d'un brin complémentaire par les ADN polymérases de la cellule hôte ou par recombinaison entre les brins sens et antisens présents dans le noyau. Comme les scAAV sont déjà conçus comme des brins double, ils peuvent être transcrits immédiatement. Les séquences terminales inversées (ITR) peuvent favoriser la recombinaison, soit au sein de la même molécule, soit entre différentes molécules, ce qui entraîne la formation de génomes épisomiques circulaires qui peuvent persister dans le noyau. Les génomes des vecteurs peuvent également s'intégrer dans le génome de l'hôte, bien que cela se produise à des fréquences très faibles (Figure issue et modifiée (D. Wang et al., 2019)).

Dans les méthodes de production basées sur les cellules de mammifères, la production des AAV requiert : i) le génome du virus recombinant contenant le transgène mais aussi les éléments de régulation de ce dernier (introns, promoteurs, queue poly A *etc*) entourés par les séquences ITRs ii) les gènes *Cap* et *rep* en trans iii) l'expression de gènes auxiliaires de

l'adénovirus ou du virus de l'herpès simplex virus (HSV) pour une réplication efficace et une prise en charge du génome viral recombinant (Penaud-Budloo et al., 2018).

D'autres équipes ont montré qu'il était aussi possible d'utiliser les avantages du virus Vaccinia pour produire des vecteurs. Effectivement, la double infection des cellules Hela S3 par le virus de la vaccinia et un adénovirus hybride a permis la production d'AAV recombinants (Dong et al., 2013; Q. Wang et al., 2017). L'avantage de ce système est que l'expression des gènes *rep* et *cap* et le génome du rAAV se fait dans des compartiments différents ce qui évite la production de vecteurs avec une capacité répllicative. D'autres équipes ont aussi montré qu'il était possible d'utiliser des levures (*Saccharomyces cerevisiae*) afin de générer des AAV (Barajas et al., 2017). Cependant, la quantité totale produite est diminuée par rapport aux autres méthodes mais le coût reste modéré ce qui permet de faire des économies pour une faible quantité de vecteurs.

En 2002, une équipe a montré que la réplication et l'assemblage des AAVs était possible dans des cellules d'insecte en utilisant un virus spécifique (appelé Baculovirus) de ces cellules (voir figure 21) (Urabe et al., 2002). De plus, il est possible de limiter fortement l'expression du transgène dans ce système si le transgène est sous la coupe d'un promoteur de mammifère même si une très légère production est quand même possible. Ce problème est peu impactant pour l'expression de protéines dénuées de pouvoir cytotoxique mais peut le devenir dans le cas d'utilisation de gènes toxiques pour la cellule (par exemple GSDMD, GSDME, MLKL) réduisant fortement la quantité d'AAV produits.

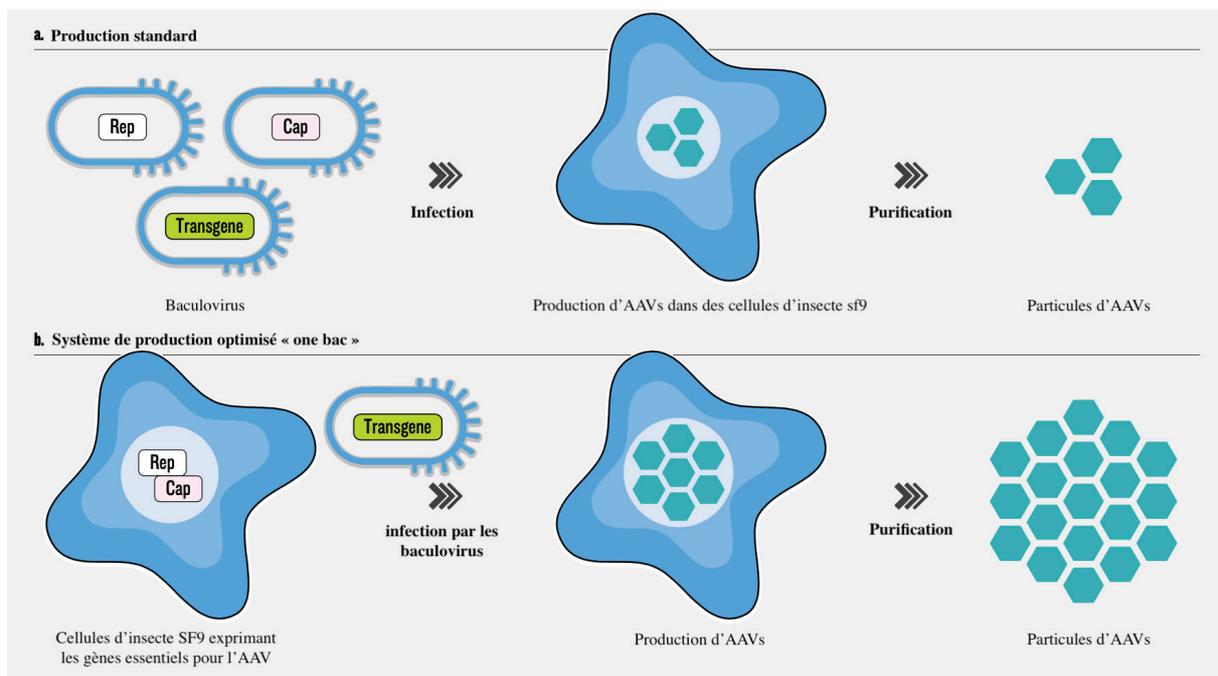


Figure 21 - Méthodes de production des AAVs basés sur les baculovirus et les cellules d'insecte sf9.

(A) Dans la production classique des AAVs utilisant les cellules d'insecte sf9, il faut utiliser 3 baculovirus différents : un codant pour le gène Rep, un codant pour le gène Cap et un dernier qui code pour le transgène d'intérêt. Cette méthode permet la production de vecteurs AAVs à partir des cellules d'insecte sf9. (B) Une deuxième méthode nommée « one-bac » a été développée afin de simplifier la méthode de production des vecteurs. Les cellules sf9 ont été génétiquement modifiées pour produire les gènes Rep et Cap et un seul virus contenant le transgène d'intérêt est maintenant nécessaire pour obtenir la production des AAVs. Cette méthode permet de produire des quantités plus importantes de vecteurs comparées à la méthode standard.

2.2.1. Production d'AAV codant pour des protéines toxiques :

Pour pallier ce problème, des auteurs ont inséré des introns spécifiques (un intron de l'hormone de croissance humaine et du « *the simian virus 40 large T antigen intron* ») dans la séquence codante de la toxine A de la diphtérie et de la protéine Bar, deux protéines capables de tuer les cellules, afin de perturber le cadre de lecture (H. Chen, 2012). L'utilisation de ces introns a d'ailleurs été breveté et l'inventeur a créé une société qui produit actuellement tous les AAVs utilisés dans ce projet basé sur cette stratégie. L'expression de ces protéines dans les cellules d'insecte Sf9 a été totalement abolie ce qui permet une forte production des vecteurs baculovirus (nécessaires à la production finale des vecteurs AAV) et des virus AAV recombinants. Dès que les AAV transduiront des cellules de mammifères, l'intron sera épissé de la séquence codante permettant à ces protéines toxiques de tuer la cellule d'intérêt. Également, cette même étude a montré que ces AAV pouvaient tuer spécifiquement des cellules tumorales *in vitro* (H. Chen, 2012). Ce système est la première preuve qu'il est possible de produire de forts titres de rAAV codant pour des gènes cytotoxiques.

Chaque méthode possède des avantages et des inconvénients et permet la production d'une quantité de virus différente avec une qualité de production qui peut varier d'une méthode à l'autre (virus non-infectieux, capsid ne contenant aucun transgène, capsid dégradée...). Il faut donc prendre en compte tous ces éléments afin de sélectionner la meilleure méthodologie en fonction de l'utilisation de ces vecteurs.

3. Les AAVs en clinique

Actuellement, seuls deux vecteurs AAVs sont autorisés sur le marché (Zolgensma et Luxturna). Le Zolgensma est utilisé dans l'amyotrophie spinale, une maladie dégénérative où le gène *SMN* est déficient entraînant la perte d'une protéine importante pour la survie des neurones ce qui induit une faiblesse musculaire généralisée. L'utilisation d'un AAV9 codant pour SMN montre des effets bénéfiques pour les enfants atteints de cette maladie. Quant à lui, le

Luxturna est utilisé dans le traitement des dystrophies rétiniennes héréditaires résultant de mutations bi-alléliques du gène *RPE65* rendant les patients aveugles. L'injection intra-orbitale d'un AAV2 codant pour l'enzyme RPE65 a amélioré de façon importante la vision des patients traités. Le Glybera, la première thérapie génique par AAV mise sur le marché en 2012 – afin de traiter une déficience de la lipoprotéine lipase - a été autorisée puis retirée du marché car elle était trop chère et très peu de demandes ont été recensées. Récemment de nouveaux vecteurs ont été autorisés sur le marché. La FDA a approuvé en 2022, l'utilisation du Hemgenix (etranacogene dezaparvovec) - un AAV-5 codant pour le facteur IX - permettant le traitement de l'hémophile de type B. La FDA et l'agence européenne du médicament ont approuvé en 2023 l'utilisation de deux nouvelles thérapies géniques médiées par les AAVs. La première, l'Elevidys (delandistrogene moxeparvovec), permet le traitement de la dystrophie musculaire de Duchenne par l'injection intraveineuse d'un AAVrh74 codant pour la μ -dystrophine. La seconde, le Roctavian (valoctocogene roxaparvovec) se base sur l'injection intraveineuse d'un AAV-5 codant pour le facteur XIII (important pour la coagulation) afin de traiter une déficience congénitale du facteur XIII dans les hémophilies de type A. Bien que certaines thérapies géniques utilisent les AAVs, la séoprévalence vis-à-vis des principaux sérotypes dans la population générale est importante. Par exemple, la séoprévalence de l'AAV-2 est de 70% dans la population générale limitant fortement l'utilisation de ce sérotype chez l'homme. Il est donc nécessaire d'utiliser et de développer de nouveaux variants d'AAV afin de permettre une transduction et une production efficace de la protéine thérapeutique. Bien que ces vecteurs soient actuellement utilisés dans de nombreux essais cliniques, très peu de ces essais s'intéressent à l'utilisation des AAVs dans le cadre du cancer (Au et al., 2022).

Objectifs de la thèse

Ce projet vise à explorer *in vivo* de nouvelles stratégies vaccinales antitumorales reposant sur l'utilisation de vecteurs AAV codant des formes actives des protéines majeures exécutrices de la pyroptose et la nécroptose. L'objectif principale est de manipuler la mort immunogénique au sein du MET, en se basant sur l'injection intratumorale de vecteurs AAVs afin d'initier des RI et sensibiliser les tumeurs aux ICIs. Pour cela, des AAVs codants les formes actives de la Gasdermine D (GSDMD), de la Gasdermine E (GSDME) et de MLKL seront utilisés. Une autre stratégie envisagée dans ce travail est l'utilisation de vecteurs AAVs codant pour les effecteurs de la MCI et une cytokine. Les cytokines jouant un rôle important dans la mise en place et l'amplification des RI. Pour commencer, nous avons sélectionné l'IL-18 comme cytokine de départ dans ce projet même si d'autres cytokines sont envisagées. Ces stratégies, seront évaluées seules ou en combinaison avec des anticorps dirigés contre les ICIs ayant déjà fait leur preuve et pourrait permettre d'élargir la réponse aux immunothérapies, en particulier dans le cas de tumeurs dites « froides », peu immunogènes.

Le premier objectif de ce travail est de valider la fonction des protéines sélectionnés sur leur capacité à induire la mort cellulaire immunogénique comme la GSDMD, la GSDME et MLKL. Pour cela, des expériences de transfection transitoire *in vitro* nous permettra de confirmer si les constructions sont capables : i) d'induire une perméabilisation de la membrane cellulaire, ii) de libérer des molécules immunostimulatrices que sont les DAMPS comme l'eATP et la protéine HMGB1 et iii) d'exposer à la membrane cellulaire la CRT. En parallèle, le dosage de la production de la cytokine IL-18 par ELISA sera effectuée avec les plasmides codants pour les protéines effectrices des MCI et l'IL-18. Ce premier objectif est primordial pour valider la capacité de ces constructions plasmidiques à induire la MCI *in vitro*.

Dès que la validation de la fonctionnalité des différentes constructions *in vitro* sera effectuée, une seconde étape vise à confirmer le pouvoir immunogène de nos constructions *in vivo* en utilisant des modèles tumoraux vaccinaux et curatifs. Cette stratégie nous permettra de sélectionner les constructions les plus immunogènes *in vivo* afin de tester ces stratégies via l'injection intratumorale d'un AAV codant pour ces différentes protéines. Cette étape est importante afin de sélectionner la ou les meilleures protéines pour la suite du projet.

Le troisième objectif est d'évaluer l'impact d'une injection intratumorale d'AAVs codant pour les protéines de la MCI (GSDMD, GSDME ou MLKL seules ou en association à l'IL-18) sur la croissance tumorale dans différents modèles tumoraux comme le mélanome murin B16-F10 et le carcinome du colon murin MC38. Cette stratégie nous permettra d'évaluer si l'induction d'une mort cellulaire immunogénique directement dans le contexte tumoral permettrait de ralentir ou de proscrire la croissance tumorale. Cet objectif nous permettra aussi de sélectionner l'AAV donnant les meilleurs résultats d'étudier l'impact de l'injection intratumorale d'AAVs codant pour une protéine induisant une MCI en association avec des immunothérapies déjà éprouvées comme les ICIs.

En parallèle de ces différents objectifs majeurs, l'optimisation de l'utilisation des vecteurs est un point important afin de perfectionner nos méthodes. La réalisation d'expériences de transduction *in vitro* des cellules tumorales B16-F10, CT-26 ou encore MC38 avec des AAVs de différents sérotypes codant la GFP nous permettra de mieux comprendre l'impact des sérotypes dans nos stratégies.

Résultats

Publication

Contexte de l'étude :

La pyroptose et la nécroptose sont deux morts cellulaires inflammatoires récemment découvertes et qui suscitent de plus en plus d'intérêt dans le cancer au vu de leurs caractéristiques particulières. Ces morts inflammatoires sont médiées par les protéines de la famille des Gasdermines pour la pyroptose et par MLKL pour la nécroptose. Bien que ces molécules soient connues pour avoir des effets délétères dans certains types de cancer et de forts effets bénéfiques dans d'autres, nous avons voulu comparer l'immunogénicité qui peut exister entre ces voies moléculaires. Pour ce faire, nous avons donc évalué et comparé l'induction de la MCI *in vitro* et l'impact de l'induction de ces morts cellulaires dans des modèles vaccinaux et curatifs *in vivo*.

Méthode principale :

Dans le but d'étudier le pouvoir immunogène de la pyroptose et de la nécroptose, nous avons dans un premier temps sélectionné des constructions plasmidiques codantes pour les effecteurs de la pyroptose ou la nécroptose seules ou en association avec l'IL-18. Nous avons utilisé des méthodes de transfection transitoire dans le modèle tumoral B16-F10 pour valider la fonctionnalité de ces protéines *in vitro*. Nous avons ensuite utilisé la même technique afin d'injecter les cellules encore vivantes en sous-cutanée afin que ces mêmes cellules meurent *in vivo* et libèrent des molécules capables de stimuler le SI et protéger les souris contre la croissance d'une tumeur secondaire dans un protocole de vaccination. Cette même technique nous a permis d'évaluer l'induction de la pyroptose médiée par la GSDME dans un modèle curatif où les cellules mourantes sont directement injectées dans la tumeur.

Principaux résultats :

- Les plasmides codants pour les effecteurs de la pyroptose et de la nécroptose (seuls ou en association de l'IL-18) induisent tous les stigmates de la MCI *in vitro*, c'est-à-dire l'induction de la perméabilisation membranaire, la libération d'eATP et de la protéine HMGB1.
- Les protocoles de vaccination ont permis de montrer que même si toutes les protéines sélectionnées induisent un effet protecteur vaccinal, la GSDME est celle qui possède le meilleur pouvoir vaccinal.

- L'utilisation de plasmides codant les effecteurs de la MCI et l'IL-18 annihile totalement la capacité de ces constructions à induire une vaccination.
- L'injection intratumorale de cellules mourantes de pyroptose médiée par la GSDME induit un ralentissement significatif de la croissance tumorale.

Induction of immunogenic cell death by pore-forming N-terminal domains of GSDMD, or GSDME, or by active MLKL, vaccinates against secondary tumor challenge and ameliorates tumor control in a mouse melanoma model

Allan SCARPITTA ¹, Melanie DEMEULES ¹, Mohammed EL KADHAOUI ¹, Romain HARDET ¹, Marine BLANDIN ¹, Laurene EL FHAILY ¹, Ulrich T. HACKER ³, Hildegard BÜNING ², Olivier BOYER ¹, and Sahil ADRIOUCH ¹

¹University of Rouen, INSERM, U1234, Pathophysiology Autoimmunity and Immunotherapy (PANTHER), Normandie University, 76000 Rouen, France.

²Department of Medicine II, University Cancer Center Leipzig (UCCL), University of Leipzig Medical Center, 04103 Leipzig, Germany.

³Institute for Experimental Hematology, Hannover Medical School, 30625 Hannover, Germany.

Correspondence should be addressed to

Prof. Sahil ADRIOUCH

Université de Rouen Normandie

Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (iRiB)

22 Boulevard Gambetta

76183 Rouen Cedex 1, France

Phone: +33 2 35 14 85 43

e-mail: sahil.adriouch@univ-rouen.fr

Short title: Active form of GSDME induce potent cancer vaccination.

Abstract:

As opposed to apoptosis, immunogenic cell death (ICD) is accompanied by the release of intracellular pro-inflammatory molecules and immune responses. ICD represent newly recognized forms of lytic cell death triggered by the necroptosis executor MLKL or by pyroptosis executors such as gasdermin D (GSDMD) or E (GSDME), sharing in their active state the ability to form lytic pores at the cell membrane. Here, we evaluated the effects associated with the transient expression of active ICD executors in vitro as well as in vivo. We show that transient expression with plasmids coding for the active forms of MLKL, GSDMD, or GSDME, effectively cause rapid and efficient death of transfected B16-F10 melanoma cells within 24 hours, along with the release of prototypical proinflammatory molecules linked to ICD such as calreticulin, ATP, and HMGB1. Moreover, in vivo vaccination using melanoma cells transfected with our constructs resulted in protection against secondary tumor growth, indicating that the in vivo release of tumor antigens and proinflammatory signals by the dying cells stimulate anti-tumor immunity and potentiates tumor rejection. Additionally, in a therapeutic model, intratumoral injections of melanoma cells transfected to express the active N-terminal domain of GSDME ameliorate tumor control and mice survival. Hence, our data suggest that induction of pyroptosis or necroptosis in the tumor microenvironment represents an effective strategy to increase tumor immunogenicity and to potentiates anti-tumor immune responses.

Introduction:

Cancer is one of the leading causes of death in the world. In recent years, immunotherapies and other innovative therapies of cancer have greatly improved patient survival. However, lack of response in a large proportion of patients and/or resistance to treatment highlight the need to develop new therapeutic approaches. Since the introduction of the term “apoptosis” by John Kerr et al in 1972¹, this particular type of active and inducible cell death, as opposed at that time to passive necrosis, has attracted much interest and have open new avenues in the pharmacological manipulation of cell death in vivo. The development of anti-cancer chemotherapies has mainly focused on the induction or the restoration of apoptosis in cancer cells using small drugs or gene therapies. However, recent knowledge has shown that apoptosis represents a rather silent form cell death unable to effectively stimulate the immune responses², notably because of their rapid detection and elimination by phagocytosis thereby limiting the propagation of inflammatory molecules³. Apoptosis even participates in the induction of anti-inflammatory molecules and in the establishment of immune tolerance.

In contrast, new pro-inflammatory forms of cell death have been recently characterized such as pyroptosis⁴⁻⁶, necroptosis⁷ or ferroptosis⁸. These forms of cell death are also considered as immunogenic cell death (ICD) as they are associated with the release of immune-stimulating molecules, such as the translocation of calreticulin to the cell surface or the release of HMGB1 and ATP into the extracellular milieu^{9,10}. Calreticulin is a well-known endoplasmic reticulum resident protein that can be exposed at the surface of dying cell where it can behave as "eat-me signal" and promote activation of phagocytosis on antigen presenting cells (APC) and presentation and cross-presentation of cell-associated antigens to T cells¹¹. ATP, once released, binds notably to P2Y2 and P2X7 receptors to activate and recruit immune cells¹², while HMGB1 binds to TLR2 and TLR4 on dendritic cells and other innate immune cells to promote antigen processing as well as their cross-presentation.

Pyroptosis is an ICD, involved in innate immunity against infections, triggered by the activation of proteins of the gasdermin family that include GSDMA, GSDMB, GSDMC, GSDMD, GSDME and PVJK¹³. Most proteins of the gasdermin family, apart PVJK, are formed by an N-terminal domain capable of forming pores at the membrane upon oligomerization and an inhibitory C-terminal domain. These domains are separated by a

protein linker that can be recognized by proteases, including inflammatory caspases, responsible for the release of the pore-forming C-terminal active domain. The formation of this membrane pore then leads to cell swelling culminating in membrane rupture and in cell death accompanied by the exposure of calreticulin at the cell surface as well as in the release of other pro-inflammatory molecules such as HMGB1 and ATP¹⁴⁻¹⁶.

The best characterized pyroptosis is the one mediated by GSDMD that occurs mainly in myeloid cells and notably in macrophages. These immune cells are known to express innate intracellular sensors involved in the context of infection or tissue damage in the detection of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) and/or damage associated molecular patterns (DAMPs) leading to inflammasome formation¹⁷. Inflammasome assembly is then known to activate inflammatory caspases, notably caspase-1, which in turn cleave GSDMD to release the N-terminal domain, its oligomerization and insertion in the plasma membrane, and the formation of the membrane pores responsible for the lytic cell death¹⁷. In parallel, active caspase-1 also cleaves cytoplasmic pro-IL-1 β and pro-IL-18 leading to the generation of the active forms of these pro-inflammatory cytokines and then to their release in the extracellular milieu directly through the pore formed by GSDMD or as a consequence of the plasma membrane rupture. Hence, GSDMD has been considered in the recent years as the main molecular executioner of pyroptosis in myeloid cells and as essential proinflammatory pathway associated with the release of intracellular DAMPs as well as pro-inflammatory cytokines¹⁸.

In non-myeloid cells, a similar pathway leading to ICD can be triggered by GSDME. Interestingly, is not cleaved by caspase-1 but is recognized and cleaved by caspase-3 involved in the induction of apoptosis. Hence, pro-apoptotic stimuli normally leading to non-inflammatory apoptotic cell death can be transformed into a pro-inflammatory cell death provided that the GDSME is expressed. In cancer therapies, the use of certain type of chemotherapies such as anthracyclines, have been linked to caspase-3 activation and to GSDME-dependent induction of pyroptosis^{19,20} accompanied with the possible stimulation of anti-tumor immune responses which remained to be fully evaluated.

Necroptosis is an ICD mediated by the RIPK1/RIPK3 pathway leading, as in pyroptosis, to the formation of membrane pores composed of several monomers of MLKL, causing a lytic cell death accompanied with the release of DAMPs^{7,14}. This molecular pathway is activated upon engagement of common pro-apoptotic death receptors (DR4/DR5,

FAS, TNFR1) and appears to possibly represent a backup mechanism to induce a different type of cell death when the pro-apoptotic caspase 8 is inhibited (e.g., an escape mechanism used by some pathogens to inhibit apoptosis)¹⁷.

In view of their ability to stimulate immune responses, induction of ICD has attracted some interest in the recent years in the context of cancer. Novel screening strategies have been proposed to evaluate the potential of anticancer therapies (e.g., chemotherapies, oncolytic viruses, radiotherapy, photodynamic therapy) to stimulate antitumor immune responses by inducing ICD. The net effect of ICD in cancer remains debated as pro-inflammatory signals are known to induce both pro- and anti-tumoral effects. Yet, several recent studies have highlighted the potential anti-tumor effects of pyroptosis and necroptosis. GSDME has been suggested to represent a tumor suppressor factor linked to anti-tumor immunity. Indeed, expression of GSDME has been found to be repressed in most cancers by promoter hypermethylation and, additionally, loss-of-function mutations interfering with pore formation have been observed in most patient derived cancer cells^{21–25}. In mouse models, forced expression of GSDME inhibits tumor growth in a natural-killer and CD8⁺ T lymphocyte dependent manner, suggesting the induction of potent anti-tumor immunity²⁶. Similarly, repression of MLKL expression, or of the upstream proteins such as RIPK1 and RIPK3, are also found in different cancers^{27–30}. Conversely, their expression is positively associated with the T lymphocytes density in hepatocellular carcinoma and predict prognosis³¹. Also, in mouse models, ectopic expression of constitutively active forms of RIPK3 in different tumor cell lines induce necroptosis and synergizes with ICB to promote tumor rejection³². Taken together, these findings support a beneficial role of pyroptosis and necroptosis in the induction of potent anti-tumor immune responses and suggest that induction of ICD in cancer represent an attractive strategy to increase tumor immunogenicity and to potentiate the therapeutic effect of ICB and other immunotherapies. Consistently, bioinformatics studies have suggested that molecular signatures based on necroptosis or pyroptosis pathways correlate with patient survival, quality of the intra-tumoral immune infiltrate, and could possibly be used to predict responsiveness to ICB^{33,33,34}.

Given the potential translational applications of ICD inducer in cancer, we aimed in the present study to compare *in vitro* and *in vivo* different plasmids coding for constitutively active forms of GSDMD, GSDME or MLKL. Although other studies have shown the ability of the N-terminal domains of GSDMD and GSDME, as well as truncated forms of MLKL, to

spontaneously induce lytic forms of cell death with morphological similarities with pyroptosis or necroptosis, no comparative studies have yet been reported on their capacity to release DAMPs or to stimulate immune responses *in vivo*. We generated and compared here plasmids coding for the N-terminal domains of GSDMD¹⁻²⁷⁶ (GSDMD¹⁻²⁷⁶), or GSDME (GSDME¹⁻²⁵¹), as well as a truncated version of MLKL (MLKL¹⁻²⁰¹) and demonstrated their capacity to induce rapid cell death *in vitro* upon transient transfection of the melanoma cell line B16-F10. As expected, cell death was accompanied by the release of prototypical DAMP molecules considered as hallmarks of ICD, such as the release of ATP and HMGB1, as well as the exposure of calreticulin at the surface of the cancer cell line. Interestingly, our comparative study highlighted differences in the amount of DAMPs released upon transfection with our constructs suggesting varying ability to stimulate immune responses. This was in accordance with the data obtained *in vivo*, where we demonstrated that the B16-F10 transiently transfected with the construct coding for GSDME¹⁻²⁵¹ more potently vaccinated treated mice against a secondary tumor challenge, indicating that the *in vivo* release of tumor antigens and proinflammatory signals by the dying cells stimulate anti-tumor immunity and potentiates tumor rejection.

Material and methods:

Mice, reagents, antibodies

All C57BL/6JRj wild type mice used in the experiments were obtained from Janvier Lab. Mice were aged of 8-10 weeks at the beginning of the experimentations and were housed in a barrier facility in a specific pathogen-free animal facility. All animal experimentations were approved by the French Ministry of Education and Research, after consultation of the ethical committee (n° APAFIS#37300).

JetOptimus transfection reagent was obtained from Polyplus. Raptinal was purchased from Sigma-Aldrich. For flow cytometry analysis, Alexa Fluor 647-conjugated anti-calreticulin antibody was purchased from Abcam (ab196159). For western blot analysis, primary rabbit HMGB1 antibody (H9664) was purchased from SIGMA and secondary DyLight-800 goat antibody directed against rabbit IgG (AB_2556616) was obtained from Thermo Scientific. ENLITEN ATP assay was purchased from Promega. DAPI solution was obtained from Thermofisher (D1306).

Cell culture and cell transfection

B16-F10 cell line was cultured in DMEM Glutamax (Thermo fisher Scientific) medium containing 10% FBS, 50 µg/ml of streptomycin, 50 U/ml of penicillin and 1 mM of sodium pyruvate. Cells were regularly tested for mycoplasma contamination. Before each passage, cells were dissociated using 0.05% of trypsin and 0.5 mM of EDTA. Transient transfection was performed as followed, 750 000 cells were seeded in T25 culture flask and were transfected 24 later, when their reached 60-70 % confluency. Cells were transfected using a mixture containing 2 µg of plasmids and 3 µl JetOptimus reagent (1:1.5 ratio) in saline solution, following the recommendation of the supplier.

Plasmids

Different plasmid constructions coding for constitutively active forms of the immunogenic cell death executioners, GSDMD, GSDME, or MLKL have been generated by DNA synthesis (GeneArt, Thermo fisher Scientific) and subjected to codon and sequence optimization. The sequences were flanked by kpnI restriction site at 5' ends and by NotI at the 3' ends that were introduced during DNA synthesis upstream of the start codon and downstream of the stop codon. The sequences were then cloned in the pcDNA6 expression

vector using KpnI/NotI restrictions sites. These plasmids, under the control of ubiquitous CMV promotor, encode for: the first 201 amino acids of MLKL protein (MLKL¹⁻²⁰¹), the active N-terminal domain of GSDMD corresponding of the first 276 amino acids (GSDMD¹⁻²⁷⁶), or the active N-terminal domain of GSDME corresponding to the first 251 amino acids (GSDME¹⁻²⁵¹). For negative controls, we selected a truncated form for MLKL corresponding to the first 164 amino acids (MLKL¹⁻¹⁶⁴), a mutated form for N-terminal domain of GSDMD containing a phenylalanine to aspartic acid substitution in amino acid 81 (GSDMD¹⁻²⁷⁶F81D), and a mutated form for N-terminal domain of GSDME with a double substitution in amino acids 2 and 40 (GSDME¹⁻²⁵¹F2A-K40A).

HMGB1 release assay

Detection of HMGB1 released in the supernatant at different time points (3, 6, 13, 18 and 24 hours post transfection) has been analyzed by Western Blot. For that, proteins in supernatant were denaturated and subjected to SDS-PAGE electrophoresis using 4-12 % polyacrylamide gel, followed by transfer to a nitrocellulose membrane. Membranes were saturated with a commercial blocking buffer (Odyssey blocking buffer; LI-Cor biosciences) overnight and stained with rabbit anti-HMGB1 antibody (H9664, SIGMA) diluted 1/5000 in PBS Tween 0.05%. The presence of HMGB1 protein was revealed by incubation with a goat antibody coupled with DyLight-800 (AB_2556616, Thermo Scientific) anti-rabbit for 1 hour at room temperature. All images were acquired using LI-COR Odyssey infrared imager and the relative quantification of HMGB1 release was performed using ImageJ software.

ATP liberation in supernatant

The quantity of ATP released in supernatant after transfection with the different plasmids was evaluated based on a bioluminescence assay using rLuciferase/luciferin (ENLITEN ATP assay) using the recommendation of the supplier. For that, 100 µl of each collected supernatant were loaded in 96 wells plate and mixed with 100 µl of rLuciferase/luciferin reagent. The light emitted for each well, proportional to the amount of ATP, was analysed using a bioluminometer device (FlexStation-3, Molecular Devices). Molar concentration of ATP was calculated using a standard curve.

Flow cytometry

Cells were collected and single cell suspensions were prepared using standard procedures. For the evaluation of membrane permeabilization and calreticulin exposure at the cell surface, cells were washed with cold D-PBS containing 3% FBS and stained with fluorochrome-conjugated anti-calreticulin (ab196651) and with DAPI exclusion dye to stain membrane permeable cells (Thermo Fisher). Flow cytometry data were acquired using LSRI Fortessa flow cytometer apparatus (BD Biosciences) and analysis were performed using FlowJo Software (v10.8.1, Tree Star, Ashland, OR).

Tumor models

Mice were vaccinated against melanoma cells using B16-F10 cells transfected in vitro with the different plasmids 5 hours prior to their injection in vivo. Collected cells were all alive at this time point after transfection and were expected to die in vivo. Collected cells were maintained on ice and were then injected subcutaneously in the right flank of C57BL/6JrJ. For that, mice were anesthetized using 60 mg/kg of ketamine and 3 mg/kg of xylazine. Then, 3.5×10^5 B16-F10 cells transfected 5 hours before with plasmids coding for GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹ or for MLKL¹⁻²⁰¹ were injected subcutaneously in 100 μ l of PBS. For negative control counterparts, mice received either PBS or equivalent quantities of cells treated during 30 minutes with 5 μ M Raptinal, to induce their apoptosis. Seven days after the first injection in the right flanks, vaccinated mice, were challenged with a second injection of untreated B16-F10 tumor cells, at a dose that was either of 3.5×10^5 or 5×10^5 depending on the experiment settings, inoculated subcutaneously in the opposite flank (i.e., left flanks). Tumor growth was monitored during 15-20 days after tumor inoculation. Tumor sizes were measured using a digital caliper and tumor volumes were estimated using the formula: $V = \text{length} \times \text{width} \times [(\text{length} + \text{width})/2]$. Mice survival was monitored by taking into consideration natural death as well as mice that had been culled after reaching the acceptable humane endpoints.

Statistics:

All data are indicated as mean values and error bars represent standard error of the mean (SEM). One-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons tests were used to perform statistical comparisons between experimental groups. All statistical analyses were performed with Graphpad Prism software V8, GraphPad, San Diego, Ca, USA). The threshold for

statistical significance was set at $p < 0.05$ (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$).

Results:

Transient expression of constitutively active forms of GSDMD, GSDME or MLKL induce rapid cell death of melanoma transfected cancer cells

In the present study, we first aimed to compare in vitro different plasmids coding for constitutively active forms of GSDMD, GSDME or MLKL containing the N-terminal active domain of these proteins. For that we generated plasmids coding for the N-terminal pore forming domains of GSDMD (GSDMD¹⁻²⁷⁶), or GSDME (GSDME¹⁻²⁵¹), or for a truncated active version of MLKL (MLKL¹⁻²⁰¹) and evaluated their capacity to induce cell death upon transient transfection of melanoma B16-F10 cells. As negative controls, we used a plasmid coding for eGFP but also generated plasmids coding for mutated (namely GSDMD¹⁻²⁷⁶ F81D and GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A), or further truncated (namely MLKL¹⁻¹⁶⁴), variants of these proteins which are supposedly unable to induce cell death³⁵⁻³⁷. We then estimated the level of transfection using the plasmid coding for eGFP and monitored overtime the percentage of membrane permeabilized dying cells as evaluated by incorporation of propidium iodide (PI) using flow cytometry. Using the plasmid coding for eGFP, 75-80% of the cells expressed the fluorescent reporter protein 24 hours post-transfection, demonstrating high transfection efficiency of B16-F10 cell line (data not shown). In this experimental condition, only 15% of the cell were detected as dying as evaluated by staining with PI exclusion dye (Fig. 1 A, lower left panel). In contrast, cell permeabilization at this time point reached 79% in cells transfected with plasmids coding for GSDME¹⁻²⁵¹, about 74% in cells induce to express GSDMD¹⁻²⁷⁶, and near 60% in cells transfected with the plasmids coding for MLKL¹⁻²⁰¹ (Fig. 1A). These results therefore suggest that the highest level of cell death is obtained by expression of GSDME¹⁻²⁵¹, while GSDMD¹⁻²⁷⁶ induced an intermediate level, and MLKL¹⁻²⁰¹ the lowest level. These data were also confirmed during the kinetic analysis, where GSDME¹⁻²⁵¹ were found to induce a detectable level of cell death as early as 6 hours post-transfection, that raised up to 60% already at 12 hours, and culminated at 80% at 24 hours. As the efficiency of transfection at 24 hours, as evaluated by the plasmid coding for eGFP, was about 75-80%, these data also suggested that virtually all transfected cells were induced to die when the plasmid coding for GSDME¹⁻²⁵¹ was used. In contrast, about 90% of the effectively transfected cells were induced to die when using the plasmid coding for GSDMD¹⁻²⁷⁶, and about 75-80% with the construct coding for MLKL¹⁻²⁰¹, suggesting a slightly less potent activity of these two proteins as compared to GSDME¹⁻²⁵¹ (Fig. 1 B-D).

When analyzing the mutated versions, used as negative controls, the results confirmed that cells transfected with the plasmid coding for GSDMD¹⁻²⁷⁶ F81D, or GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A, remained alive as the percentages of dying cells were as expected comparable to that obtained with the plasmid coding for eGFP (Fig. 1 A-D). However, when cells were transfected with the plasmid coding for the supposedly inactive MLKL¹⁻¹⁶⁴ variant, the percentage of dead cells was much higher and was indistinguishable from the level observed with the plasmid coding for the active form of MLKL (Fig. 1 D). This evidently indicates that MLKL¹⁻¹⁶⁴ could not be considered here as a negative control, and that this variant has retained a potent cell death inducing activity.

As pyroptosis and necroptosis *in vivo* are also accompanied by expression and secretion of cytokines (e.g., akin to IL-1 β and IL-18 during pyroptosis), which are not directly produced by the dying cells in our experimental model, we also generated and tested bicistronic plasmids that additionally encoded for IL-18. For that, we added in frame downstream of the coding sequence of each given pore-forming cell death executioner, a sequence that encode a P2A self-cleavage peptide as well as the coding sequence of IL-18 to allow its concomitant expression in dying cells. As expected, we confirmed the ability of these bicistronic constructs to induce death of the transfected B16-F10 cells, with a kinetic that is comparable with that obtained in monocistronic vector (Supp. Fig. S1 compared to Fig. 1). Evaluation of IL-18 concentrations in the supernatant of transfected cells show low but detectable levels of IL-18 for all constructs at late time points, but the construct coding for MLKL¹⁻²⁰¹ and IL-18 demonstrated superior and earlier production of IL-18 (Supp. Fig. S1 E). This again suggested that expression of GSDME¹⁻²⁵¹ or GSDMD¹⁻²⁷⁶ induce early and more potent cell death as compare to MLKL¹⁻²⁰¹, possibly limiting the amount of IL-18 that can be secreted in those conditions.

Taken together, these data demonstrated as expected, that transient expression of constitutively active forms of GSDMD, GSDME or MLKL is sufficient, alone, to induce rapid cell membrane permeabilization and cell death. These data also suggest that GSDME¹⁻²⁵¹ or GSDMD¹⁻²⁷⁶ represent potent cell death executioners that induce death of almost all transfected melanoma cancer cells, while MLKL¹⁻²⁰¹ was found to be slightly less potent.

Cell death induced by transient expression of constitutively active forms of GSDMD, GSDME, or MLKL, is accompanied by calreticulin exposition

Immunogenic cell death (ICD) is accompanied by the exposition of calreticulin and the release of other pro-inflammatory signals derived from the intracellular compartments. Aiming to make use of the constitutively active forms of GSDMD, GSDME, or MLKL, to effectively induce ICD *in vitro* and *in vivo*, we evaluated the ability of our constructs to induce calreticulin exposure, concomitant with the induction of cell death. For that, we use again flow cytometry to evaluate exposition of calreticulin in a kinetic study upon transient transfection using the same plasmid constructs. Data confirmed that induction of cell death using either the monocistronic plasmid constructs coding for GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, or for MLKL¹⁻²⁰¹ (Fig.1 E-H) or using the bicistronic constructs additionally coding for IL-18 (Fig. S1 B and D) is associated with the calreticulin exposure. Interestingly, the data obtained paralleled those obtained using PI staining of dying cells both in terms of kinetic and intensity suggesting concomitant cell death and calreticulin exposure (Fig. 1 & Fig S1).

Expression of the active forms of GSDMD, GSDME, or MLKL, induces HMGB1 release in the extracellular milieu

We then focused on the release HMGB1, a non-histone nuclear protein, considered as another important hallmark of ICD. For that, we evaluated by western blot the kinetic of the release of HMGB1 in the supernatant, upon transient transfection of B16-F10 melanoma cells using our plasmid constructs (Fig. 2 A-E). Data demonstrated that HMGB1 is released as early as 6 hours post-transfection with plasmid coding for GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, MLKL¹⁻²⁰¹, or MLKL¹⁻¹⁶⁴. In contrast, HMGB1 remains undetectable in this condition when cells were transfected with the control plasmids coding for eGFP or coding for the mutated inactive forms (i.e. GSDMD¹⁻²⁷⁶ F81D, or GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A). In agreement with the kinetics of cell death and of calreticulin exposition, the release of HMGB1 also increased overtime and culminated at 24 hours post-transfection (Fig. 2 A-E). Of note, at 24 hours post transfection, cell transfected with the negative control plasmids (i.e., coding for eGFP, or for GSDMD¹⁻²⁷⁶ F81D, or GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A) also showed faint HMGB1 release, albeit at lower levels than induced at 6 hours post-transfection with the active forms of GSMD, GSDME, or MLKL (Fig. 2 A-E). This possibly resulted from overgrowing cells and pH modification, a condition that have been suggested to be involved pH-dependent cell death and passive HMGB1 release³⁸. When comparing the different active forms, we found as with the previous assays that expression of GSDME¹⁻²⁵¹ was very potent to induce the release of HMGB1. However, in contrast with the previous results, MLKL¹⁻²⁰¹ and MLKL¹⁻¹⁶⁴ were found to be more potent to release HMGB1 than GSDMD¹⁻²⁷⁶ even if the latter induce more pronounced

cell permeabilization and calreticulin exposure (Fig. 2 B, C, E). Evaluation of the bicistronic constructs, additionally coding for IL-18, confirmed the data and accordingly demonstrated a superior potency to induce HMGB1 release of the constructs coding for the active forms of GSDME, or MLKL, over the construct coding for GSDMD (Supp Fig. S2 A-B). Whether this reflect differences between the active forms of GSDME, MLKL, and GSDMD in the triggering of the active or passive pathways involved in HMGB1 release remains to be explored³⁸.

Expression of the active forms of GSDMD, GSDME, or MLKL, induces extracellular ATP release

The release of ATP in the extracellular milieu by dying cells is also a characteristic marker of ICD. We therefore evaluated the presence of extracellular ATP (eATP) in the culture supernatant based on a sensitive luciferase bioluminescence assay. Data confirmed as expected that eATP is detectable as early as 6 hours post-transfection and further increased at 12 hours post-transfection in cell transiently expressing GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, MLKL¹⁻²⁰¹, or MLKL¹⁻¹⁶⁴ (Fig. 2F-H). Comparable results were also obtained with the bicistronic constructs coding for IL-18 in addition to the evaluated cell death executioner (Supp Fig. S2 C). In contrast, eATP did not increased over the detection limit in cells transfected with the negative control plasmids coding for the inactive forms (i.e., GSDMD¹⁻²⁷⁶ F81D, or GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A) neither at 6 hours nor at 12 hours post-transfection (Fig. 2F-H). Of notes, low levels eATP was however detected in the supernatant harvested at 24 hours post transfection, even in when using the negative control plasmids (data not shown). This again possibly resulted from pH-dependent cell death and is in line with the low level of HMGB1 released in these conditions.

Expression of the active forms of GSDMD, GSDME, or MLKL, by melanoma cells in vivo vaccinates mice against a secondary tumor challenge in a prophylactic model

Our results so far indicate that transient expression of GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, or MLKL¹⁻²⁰¹ induces rapid cell death in vitro that is accompanied by the exposition and release of molecular hallmarks of ICD. As this has the potential to induce potent anti-tumor vaccination in vivo we next evaluated and compared our constructs for their ability to promote secondary tumor rejection. For that, we transfected as before B16-F10 cells in vitro, and harvested the cells 5 hours later, at a time point that precede the earliest induced membrane permeabilization (i.e., observed at 6 hours post transfection, Fig. 1 and sup Fig.S1). The transfected, but not yet dying cells, were then injected subcutaneously on the

right flank of C57BL/6 mice at a dosing of 3.5×10^5 cells per animal (a time point that we termed D-7 in our protocol, Fig. 3). To indirectly access the potential of the in vivo dying cells to release tumor antigens and proinflammatory intracellular molecules capable of initiating an anti-tumor response, we then challenged the mice 7 days later (defined as D0) with the same number of living and untreated B16-F10 melanoma cells injected in the contralateral flanks (Fig. 3A). Tumor growth on ipsilateral and contralateral sites was then monitored overtime in the different groups of mice. Absence of tumor on both flanks was taken as an indication of effective ICD occurring at the primary site, followed by a potent anti-tumor vaccination preventing the growth of the secondary tumor inoculated on the opposite flank. In a first set of experiments, we evaluated the plasmids coding for GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, or MLKL¹⁻²⁰¹, and compared their potential to promote anti-tumor vaccination in vivo. As a control, we used necrotic melanoma cells (that had undergone 3 freeze/thaw cycles, F/T group) and mice treated only with PBS. Remarkably, all groups of mice that were vaccinated using melanoma cells transfected to transiently express GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, or MLKL¹⁻²⁰¹, develop fewer if any tumor demonstrating the vaccination potential of ICD in vivo (Fig. 3 B-H). Indeed, while all PBS treated mice (6 out of 6 mice) developed a tumor at the secondary site, only 17% (1 mouse out of 6) developed at tumor in the GSDMD¹⁻²⁷⁶ or MLKL¹⁻²⁰¹ groups, and no tumor at all was detected in the GSDME¹⁻²⁵¹ group (Fig. 3 B-H). For comparison, tumor growth was detected in 67% of the mice (4 mice out of 6) when necrotic melanoma cells treated with 3 freeze/thaw cycles (i.e., in the F/T group) were used to vaccinate the mice at D-7 (Fig. 3 D, H). Hence, this data is entirely in line with our observations in vitro and indicate a slightly higher potential of GSDME¹⁻²⁵¹ to induce ICD and to promote vaccination in vivo that completely prevents tumor growth (Fig. 3 H).

To better discriminate the protective potential of our constructs in this vaccination model in vivo, we conducted a second study using a more stringent protocol. For that, mice were injected this time with a higher number of the aggressive melanoma cells, corresponding to 5×10^5 B16-F10 cells, during the challenge at D7 of the protocol (Fig. 4A). The observed tumor growth curves and tumor incidence confirmed a faster tumor growth in these conditions (Fig. 3B vs Fig. 4B). Also, for better comparison, we included in addition to the F/T group an additional control group vaccinated at day D0 with B16-F10 cells pre-treated with Raptinal in vitro, to induce cell death by apoptosis in vivo. Results show that both control groups (F/T and Raptinal) were not vaccinated against a secondary tumor challenge

and display a comparable tumor growth curve and a similar tumor incidence confirming that neither induction of necrosis nor apoptosis promote efficient anti-tumor immune responses (Fig. 4 B, C, G, H). In contrast, even in this more stringent experimental setting, more than 50% of the mice (i.e., 4 out of 7) were protected when cell death was induced by GSDMD¹⁻²⁷⁶ or MLKL¹⁻²⁰¹ and, remarkably, more than 85 % of the mice (i.e., 6 out of 7) were protected when cell death was induced GSDME¹⁻²⁵¹ (Fig. 4 B, D, F, H). Only one mouse in the latter group developed a tumor a very late stage, suggesting partial protection or tumor escape in this individual mouse (Fig. 4 F). Hence, this data again suggested that while all the constructs evaluated in this study induce complete or partial cell death and release of immunogenic molecules, GSDME¹⁻²⁵¹ appears to induce a form of cell death that resulted in a more potent induction of anti-tumor immune responses *in vivo*, as compared to GSDMD¹⁻²⁷⁶ or MLKL¹⁻²⁰¹.

Of notes, we also evaluated using this more stringent protocol, the bicistronic constructs additionally coding for IL-18. While these constructs also demonstrated some degree of protection against a secondary tumor challenge compare to the Raptinal group, their potency were reduced compared to the monocistronic vectors. Bicistronic constructs did not allowed more than about 40% protection in the different groups of mice (data not shown) while protection was between 50% and up to 85% with the corresponding monocistronic constructs (Fig. 4H). While most preclinical and clinical studies have reported a beneficial anti-tumor activity of IL-18, depending on the cancer type and on the tumor microenvironment, IL-18 has been suggested to favor tumor growth in some context³⁹. Whether our unexpected results with the bicistronic constructs are related to the immunosuppressive functions of IL-18 production, that have been observed in the context of B16-F10 melanoma models in several studies, remain to be explored⁴⁰⁻⁴². Whatever the precise mechanism, these data suggested that the bicistronic constructs do not confer significant advantage over the monocistronic constructs in this our experimental conditions.

Intratumoral injection of cell transiently expressing the constitutively active form of GSDME ameliorates tumor control

In the last part of our comparative study, we aimed to evaluate the therapeutic potential of ICD in the context of established tumor. We focused on our best ICD executioner evaluated in this study, namely GSDME¹⁻²⁵¹, to generate cells prone to die *in vivo*. For that, B16-F10 cells were again transfected *in vitro* with the plasmid coding for GSDME¹⁻²⁵¹, harvested 5

hours later (i.e., before the first early signs of membrane permeabilization), followed by their intratumoral (i.t.) injections in established B16-F10 tumors at day 5, 7 and 9 post-tumor inoculation (Fig. 5A). In addition to the control group treated with PBS, we also used a control group that was injected with B16-F10 cells that were first transfected with the plasmid coding for the corresponding inactive mutated form (i.e., GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A), and then killed by 3 repeated freeze/thaw cycles (this control group was therefore termed F/T), before their i.t. injections at the same time points. Remarkably, while both PBS and F/T control groups showed similar melanoma growth curves and comparable survival rates (Fig. 5 B, C, E-F), injection of cells transfected with the plasmid coding for GSDME¹⁻²⁵¹ showed a significant reduction of the mean tumor volume (Fig. 5 B), associated with a delayed growth kinetic suggesting a better tumor control (Fig. 5 D). Additionally, another group has been included treated with cells transfected by the bicistronic plasmid coding for GSDME¹⁻²⁵¹ and IL-18. This group showed similar result, a demonstrated significant reduction of the mean tumor volume as compared to control groups (data not shown). However, this additional group did not show improved tumor control compared to the group treated with the monocistronic plasmid coding for GSDME¹⁻²⁵¹ alone, suggesting again the bicistronic construct do not confer significant advantage over the monocistronic construct.

In this experimental setting, mice were also monitored for a longer period to monitor the percentage of mice that remain alive. Data revealed that, while all the mice died between 25 and 32 days post-tumor inoculation in the control groups, around one third of the mice in the GSDME¹⁻²⁵¹ group survived until study endpoint at day 50 post-tumor inoculation (Fig. 5 F). Hence, our data suggest that ICD of a small fraction of the cancer cells, by releasing tumor antigens and intracellular pro-inflammatory molecules, induces anti-tumor responses that provide a better control of tumor growth even in the very aggressive and non-immunogenic B16F10 melanoma model.

Discussion:

Necroptosis and pyroptosis are newly characterized molecular pathways that have attracted recent interest in cancer with the observation for instance that GSDME represent a tumor suppressor factor involved in the induction of pyroptosis, which in turn promote anti-tumor immune responses²⁶. It has become clear in the last decade that GSDME, GSDME and MLKL, as well as the molecular pathways involved in pyroptosis and necroptosis, can be used as biomarkers to better stratify patients, or can be manipulated to increase tumor immunogenicity and/or response to treatments^{21-25,43}. However, induction of pyroptosis or necroptosis by drugs requires the presence of intact and functional pathways culminating in the proteolytic activation of GSDMD or GSDME, the key executioners of pyroptosis, or by the RIPK3-dependant phosphorylation of MLKL, the executioner of necroptosis. As escape to cell death represents one major attribute of cancer cells, these cell death pathways are often non-functional in established tumor due to epigenetic modification and/or to gene and promoter mutations^{21-26,43,44}. The strategy evaluated here, based on the vectorization of transgene coding for constitutively active forms of the GSDMD or GSDME or of MLKL, represents therefore an attractive strategy to restore pyroptosis or necroptosis even when these pathways are non-functional.

The common shared features of pyroptosis and necroptosis executioners are their ability to oligomerize, to insert into the cell membrane, to form pores, and to induce major osmotic modifications that induce cell lysis. This culminates in plasma membrane rupture and in the release of pro-inflammatory intracellular content (e.g., HMGB1, calreticulin, ATP). We hypothesized that transient expression of constitutively active forms of the pyroptosis and necroptosis executioners evaluated here may fully recapitulate this sequence of events and should lead to tumor cell death accompanied by the exposition of proinflammatory molecules considered as hallmarks of ICD. The first step of this study was therefore to evaluate the capacity of our constructs to induce cell death as well as exposition of these proinflammatory molecules upon transient in vitro transfection of B16-F10 melanoma cells. As constitutively active form of pyroptosis executioners, we selected the N-terminal domains of the GSDMD and GSDME, containing respectively the first 276 amino acids of GSDMD (GSDMD¹⁻²⁷⁶) or the first 251 amino acids of GSDME (GSDME¹⁻²⁵¹). These forms correspond to the natural forms generated upon cleavage by caspase 1 or caspase 3, respectively. For MLKL, we selected a truncated protein corresponding to the first 201 amino acids (MLKL¹⁻²⁰¹),

containing the active N-terminal 4-helical bundle domain (4HB) and brace coiled coil connecting region, but lacking the C-terminal self-inhibitory pseudokinase domain (PsKD). As negative controls, we selected mutated or truncated forms of the same protein regions and aimed to demonstrate their inability to induce membrane permeabilization. For GSDMD, modification of a phenylalanine at position 81 to an aspartic acid was described to abolish the oligomerization of the protein and thereby its ability to form a membrane pore³⁷. We thus generated a mutant carry this mutation (GSDMD¹⁻²⁷⁶ F81D) and confirmed loss of function of this variant (Fig. 1 A-B). Similarly, we confirmed that a double mutation, incorporated in the GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A resulted in complete absence of activity (Fig. 1 A, C). This double mutation was selected based on a previous report showing the retention of the double mutant in the cytoplasm, while each single mutants were still partially active⁴⁵. For MLKL, a truncated form corresponding to the first 164 amino acids (MLKL¹⁻¹⁶⁴), lacking most of the second coiled coil brace connecting region, was selected based on the importance of this region in homotrimerization⁴⁶. However, our results only show a very partial reduction, if any, of the activity of this truncated form as compared to the active MLKL¹⁻²⁰¹ form. This suggested that the first 164 amino acids that contain the active N-terminal 4-helical bundle domain may suffice, at least in our cellular model, to induce membrane permeabilization. Irrespective of the precise molecular structure and the mechanism leading to oligomerization and pore formation, this excluded MLKL¹⁻¹⁶⁴ as a valid negative control in our study and this construct was instead considered as an active MLKL form. MLKL¹⁻¹⁶⁴ was indeed found to display an almost similar activity as compared to MLKL¹⁻²⁰¹ as evaluated by membrane permeabilization (Fig. 1D), calreticulin exposure (Fig. 1H), HMGB1 release (Fig. 2E).

One of the goals of our present study was to compare *in vitro* the activity of the different constructs that we generated for their ability to induce membrane permeabilization, but also for their capacity to induce the exposition of classical ICD markers (e.g., calreticulin, HMGB1, and ATP). Upon transient transfection of the B16-F10 melanoma model with the plasmids coding for our different constructs, we first evaluated overtime incorporation of PI in membrane permeable cells and interpreted that as an early engagement into cell death. Induction of cell death is also suggested by the major changes in cell scatters, reflecting cell size and/or morphology (Fig. 1A). Remarkably, modifications of FSC and concomitant cell staining with PI was evidenced as early as 6 hours post-transfection suggesting potency of the evaluated cell-death executioners even at very low protein expression (Fig. 1B-D, and data not shown). Cell death culminated *in vitro* at 24 hours post transfection and was accompanied

as expected by calreticulin detection on the same cells (Fig. 1). Remarkably, at 24 hours post-transfection, up to 80% of the cells were stained with PI and with the anti-calreticulin antibody when the construct coding GSDME¹⁻²⁵¹ was used (Fig. 1 C, G). As the efficiency of transfection evaluated by eGFP reporter plasmid did not exceeded 80%, this suggested that all transfected cells are killed by expression of GSDME¹⁻²⁵¹. In contrast, GSDMD¹⁻²⁷⁶ induces slightly lower cell death, and MLKL¹⁻²⁰¹ even lower cell death, as compared to GSDME¹⁻²⁵¹. This indicates that these pore-forming proteins do not have the same potency to induce cell death and that GSDME¹⁻²⁵¹ appears to display the highest efficiency in our conditions. These differences in potency may be explained by differences in their oligomerization potential, or possibly by their ability to interact and insert within the phospholipid bilayer membrane. Another possibly important factor to consider is the size of the pores formed by these proteins upon their oligomerization. Pores formed upon activation of GSDMD or GSDME are composed of 16 to 28 protomers depending on the composition of the lipid bilayer in which they insert and have been estimated to have a large inner diameter of 10-20 nm⁴⁷. In contrast, pores formed upon MLKL activation are composed of, at most, 6 hexamers and are therefore smaller in size with an estimated inner diameter size of 4 nm⁴⁸. Whether differences in pores diameter influence kinetic and/or occurrence of cell death, or the nature and quantity of the proinflammatory molecules released in the extracellular milieu, remain to be fully explored. Another interesting features of GSDM family members, that is not shared by MLKL, is their ability to bind cardiolipin and thereby to mediate permeabilization of mitochondria which may also increase their capacity to induce cell death⁴⁷⁻⁴⁹.

In addition to cell death, we also explored the release of HMGB1 and ATP, as well as the exposure of calreticulin, as these molecules represent important hallmarks of ICD. Indeed, calreticulin exposure is recognized as an "eat-me signal" allowing dying cells to be taken up by phagocytic cells such as macrophages and dendritic cells facilitating the capture and presentation of tumor antigens¹⁵. Concurrently, the release of the nuclear protein HMGB1 activates dendritic cells by binding to TLR4, thereby facilitating antigen presentation to T cells⁵⁰. ATP, on the other hand, acts as a chemoattractant for phagocytic cells through its binding to P2Y2 receptors, as well as a potent activator of NLRP3-inflammasome through the stimulation of the P2X7 receptor, resulting in the maturation and release of IL-1 β and IL-18. ATP binding to the P2X7 receptor also further stimulates pores formation, cell death, and secondary release of pro-inflammatory molecules, thereby amplifying the immune response⁵¹⁻⁵³. In our present study, all evaluated constructs induced the release of HMGB1 and ATP,

and the exposure of calreticulin, albeit with different kinetic and levels (Fig. 1E-H and Fig. 2). The construct coding for GSDME¹⁻²⁵¹ appeared however to be more potent than the other 2 constructs when taking into consideration these parameters together. This was also supported by the data obtained in vivo in the vaccination models, suggesting that these ICD markers have a least some relevance to predict immunogenicity in vivo. However, several additional other markers, factors, and post-translational modifications, have been recently evaluated and may be used in future studied better predict immunogenicity in vivo⁵⁴⁻⁵⁶.

With the aim to further increase immunogenicity in vivo, we also generated and evaluated bicistronic constructs that additionally encode IL-18, a pro-inflammatory cytokine that can enhance tumor control, induce secretion of IFN- γ , and stimulate the activity of cytotoxic lymphocytes^{51,52,57}. For that, we introduced a P2A self-cleaving peptide sequence downstream of the sequences coding for GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, or MLKL¹⁻²⁰¹. A furin cleavage sequence was also added to avoid the incorporation of the P2A sequence at the C-terminus of the cell death executioner proteins which may affect oligomerization or pore formation. The in vitro evaluation of these plasmids confirmed they ability to induce cell death, and to allow the release of the ICD markers (Supp Fig. S1 and Supp. Fig S2). However, significant differences were observed in the production and release of IL-18 in the supernatant of transfected cells. Indeed, the construction coding for MLKL¹⁻²⁰¹ and IL-18 appeared to produce significantly more IL-18 than the other two constructs. This may possibly reflect the lower capacity of this construct to induced cell death, notably at early time points, resulting in a higher proportion of cells secreting IL-18. Also, as the pores formed by GSDM members have the capacity to insert into mitochondrial membrane, the energetic status of the cell may be affected at early time points limiting de novo expression of proteins. Whatever the precise mechanism, the bicistronic constructs appears anyhow limited in their capacity to secrete the downstream cytokine, due notably to early cell death, as indicated also by our in vivo data suggesting the absence of beneficial additional effect as compare to the monocistronic constructs (Supp Fig. S3 and data not shown).

ICD should result in the activation of immune responses. After validating our constructs in vitro, we turned to a in vivo vaccination model in vivo. For that, we used a "gold standard" vaccination protocol, that rely on the occurrence of ICD in vivo, as described by Humeau et al⁵⁸. This protocol involves the subcutaneous inoculation of living cells treated in vitro with

drugs or strategies to induce ICD and expected to die *in vivo* soon after their injection. Evaluation of the immunogenic potential is then evaluated by a secondary challenge with the same untreated tumor cell line, 7 days later. Tumor growth control, or tumor rejection, is then interpreted as the induction of an efficient anti-tumor immune response *in vivo* during the ICD of the first inoculated cells. We used in our study two versions of this protocol. In the first *in vivo* protocol we used the originally published experimental conditions, and in the second we inoculated more B16-F10 melanoma cells (i.e., 5×10^5 instead of 3.5×10^5 cells) during the secondary challenge, with the aim to compare the ICD potential of our constructs *in vivo* more stringently. In both type of experiments, all the evaluated constructs demonstrated their capacity to vaccinate mice, albeit at different levels, and to induce better tumor growth control. However, and in agreement with the *in vitro* data, expression of GSDME¹⁻²⁵¹ showed superior vaccination potential by allowing complete tumor rejection in the first settings and showing only 1 mouse, out of 7, displaying late tumor escape in the second more stringent conditions (Fig. 4 and Fig. 5). These results were notably compared to controls conditions where vaccine cells were instead induced to die by apoptosis (using pretreatment with Raptinal⁵⁹). All mice developed tumors in these control conditions confirming, at least, the lower ability of apoptosis to prime the immune responses *in vivo* as compared to pyroptosis and necroptosis forms of cell death.

In the last set of experiment *in vivo*, we also aimed to evaluate the curative potential of ICD in the tumor context. In these experiments, we focused on GSDME¹⁻²⁵¹ that has shown superior vaccination potential *in vivo*, and used an experimental model that relies on intratumoral injections of transfected B16-F10 cells in established tumor as described previously by Snyder et al³². Data showed that intratumoral injection of B16-F10 cells transfected with the plasmid coding for GSDME¹⁻²⁵¹ significantly delayed tumor apparition and reduced tumor growth (Fig. 5 B, D), suggesting induction of immune responses that resulted in better tumor control. However, this did not suffice to induce tumor rejections, as expected in this aggressive and poorly immunogenic melanoma model that is not responsive to immune check-point blockade used as a monotherapy. Future experiments will address whether vaccination using cell transiently expressing GSDME¹⁻²⁵¹, the most potent ICD inducer as found during the present comparative study, may be combined with immune check-point blockade, or other molecular or cellular immunotherapies, to induce complete rejection of established clod tumors.

Taken together, our results demonstrate that transient expression of constitutively active forms of GSDMD, GSDME, or MLKL, induces cell death that recapitulates the features of ICD, associated *in vitro* with exposure of pro-inflammatory molecules such as ATP, HMGB1, or calreticulin. Remarkably, ICD induced by our constructs in the context of cancer cells, potentially vaccinated the mice against secondary tumor challenges, notably when using the construct coding for GSDME¹⁻²⁵¹ which was found herein to be more immunogenic than the other two evaluated constructs (i.e., GSDMD¹⁻²⁷⁶, and MLKL¹⁻²⁰¹). The former construct was also demonstrated to induce a better tumor control in established tumors, upon direct intratumor injection of transiently transfected cells, using the poorly immunogenic B16-F10 melanoma model. Hence our data, suggest that induction of ICD in tumor context, upon intratumoral injections of ICD inducing drugs or gene therapy vectors coding for GSDME¹⁻²⁵¹, may similarly increase tumor immunogenicity and synergize with other types of immunotherapies to increase the number of patients that can benefit from these treatments, even in cold tumors.

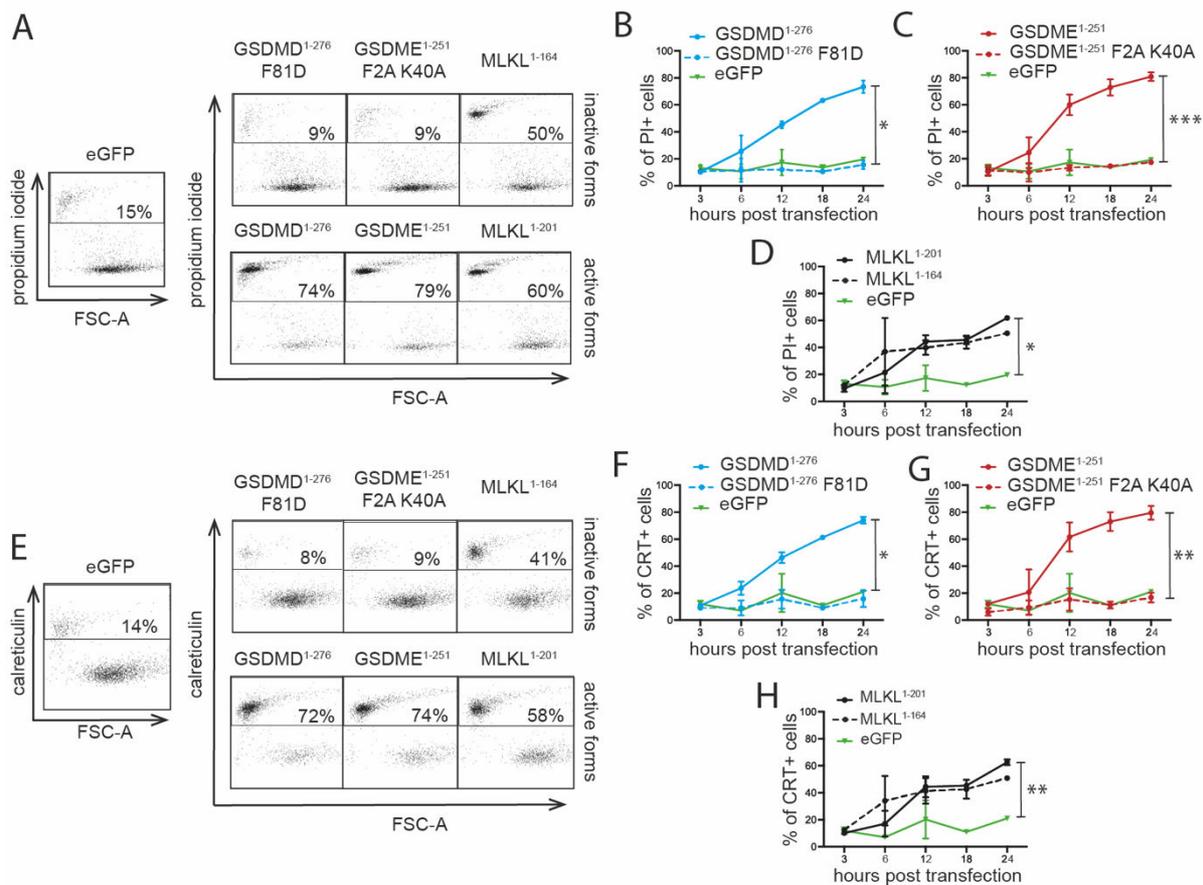


Figure 1 – Transfection with plasmids coding for active forms of pyroptosis or necroptosis executioners induce membrane permeabilization and calreticulin exposure in B16-F10 model.

A – Cell membrane permeabilization of melanoma B16-F10 cells was evaluated by incorporation of propidium iodide (PI) using flow cytometry, 24 hours post transfection with plasmids coding for eGFP or with active forms of GSDMD (GSDMD¹⁻²⁷⁶), GSDME (GSDME¹⁻²⁵¹), or MLKL (MLKL¹⁻²⁰¹). As negative controls, cells were transfected with the mutated inactive forms GSDMD¹⁻²⁷⁶ F81D, GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A, or with the truncated form of MLKL (MLKL¹⁻¹⁶⁴). Representative flow cytometry panels are shown to illustrate the data. **B-D** – kinetic of membrane permeabilisation upon transfection of B16-F10 cells with the plasmid coding for the different indicated constructs. **E** – Calreticulin (CRT) exposure on the transfected melanoma cells, evaluated by flow cytometry 24 hours post transfection with the plasmid coding for the indicated proteins. **F-H** – Kinetic of calreticulin exposure on transfected B16-F10 cells, 3 to 24 hours post transfection with the plasmid coding for the indicated proteins. Representative flow cytometry panels are shown to illustrate the data. Data are from one representative experiment out of three, performed in triplicate, with comparable results. Mean values are plotted and error bars represent SEM.

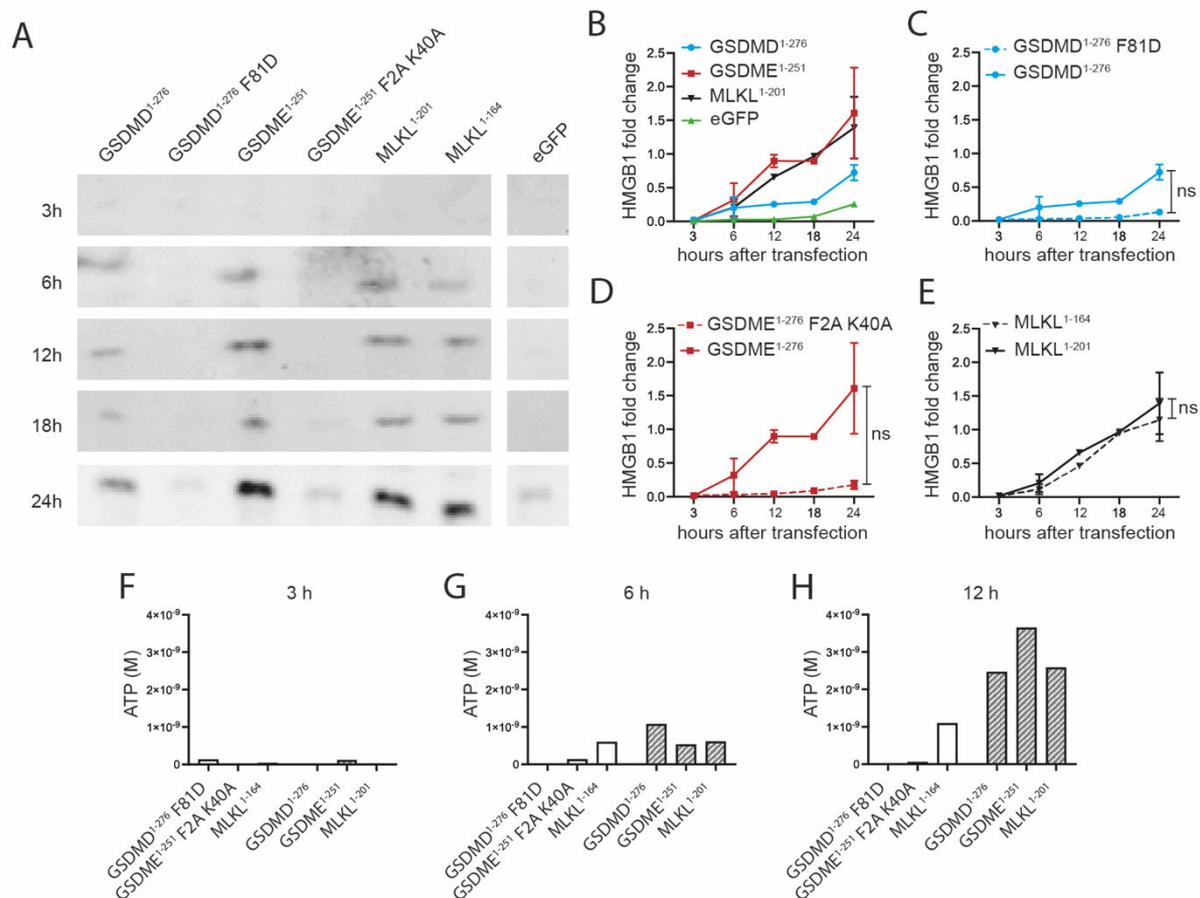


Figure 2 – HMGB1 and ATP are released in the extracellular milieu at early time points post transfection of B16-F10 with the plasmid coding for active forms of pyroptosis or necroptosis executioners.

A – Release of HMGB1 from cells was analyzed using western blot, after collection overtime of supernatant fractions in B16-F10 cells transfected with plasmids coding for eGFP or for the indicated proteins. **B-E** – Comparison following image quantification of HMGB1 release overtime in the different indicated conditions. Data are from one representative experiments out of two, performed in triplicate, and showing comparable results. Fold change have been calculated after normalization against the same internal controls. **F-H** – ATP release in the supernatant were evaluated overtime using sensitive bioluminescence assays in B16-F10 cells transfected with the plasmid coding for the indicated proteins. The data are from one experiment, out of two, showing similar results.

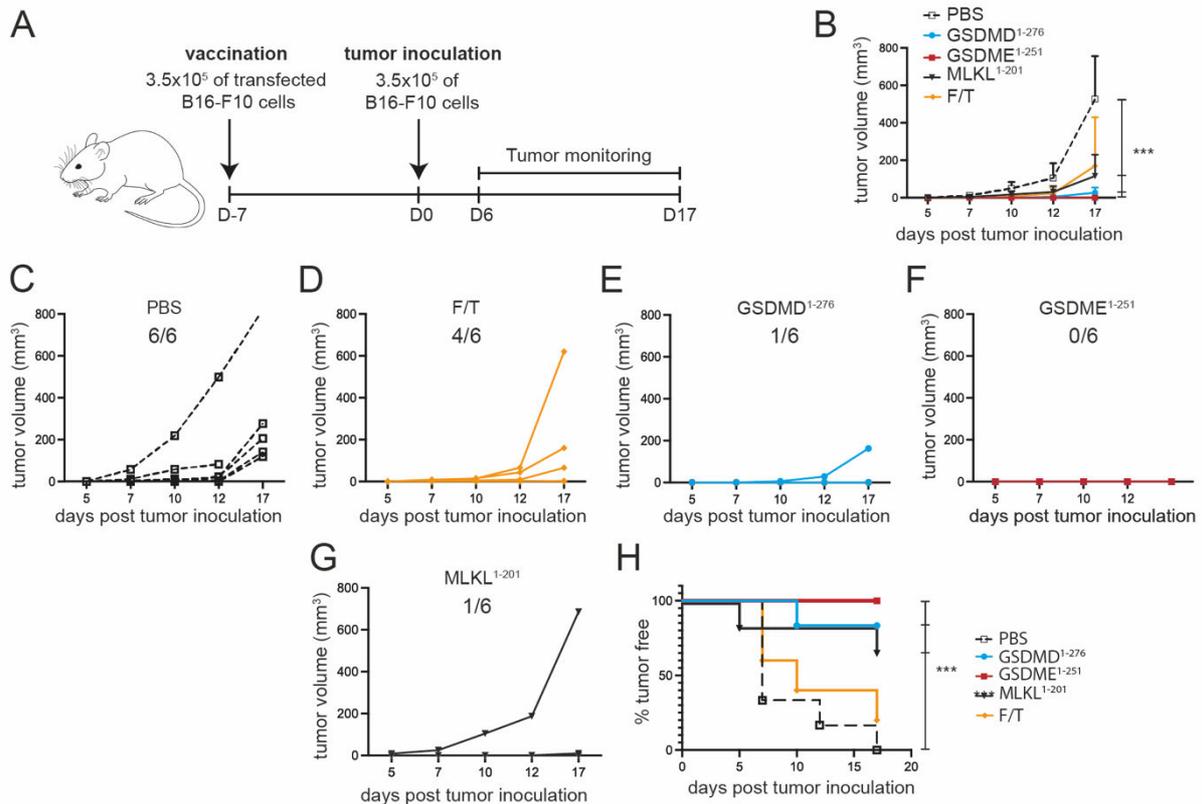


Figure 3 – Injection of B16-F10 cells transiently transfected to express GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, or MLKL¹⁻²⁰¹ vaccinates mice against a secondary tumor challenge.

A – Depiction of the protocol used here to evaluate the immunogenic potential of the B16-F10 cells transfected with the indicated plasmid construct coding for ICD executioners derived from GSDMD, GSDME, or MLKL. Subcutaneous injections of the transfected B16-F10 cells were performed in the right flanks of the animals, and tumor challenged 7 days later in the contralateral flanks. Absence of tumors in the primary site was confirmed and tumor growth in the contralateral flanks was monitored overtime. **B** – Mean tumor volumes in the different indicated groups are represented, in groups of 6 mice. **C-G** – Individual tumor growth curves in each indicated group of mice, numbers represent the number of mice that developed tumor in each group. **H** – Percentage of mice that remained tumor free overtime in each indicated group is illustrated. Data are from one representative experiment out of two, showing similar results.

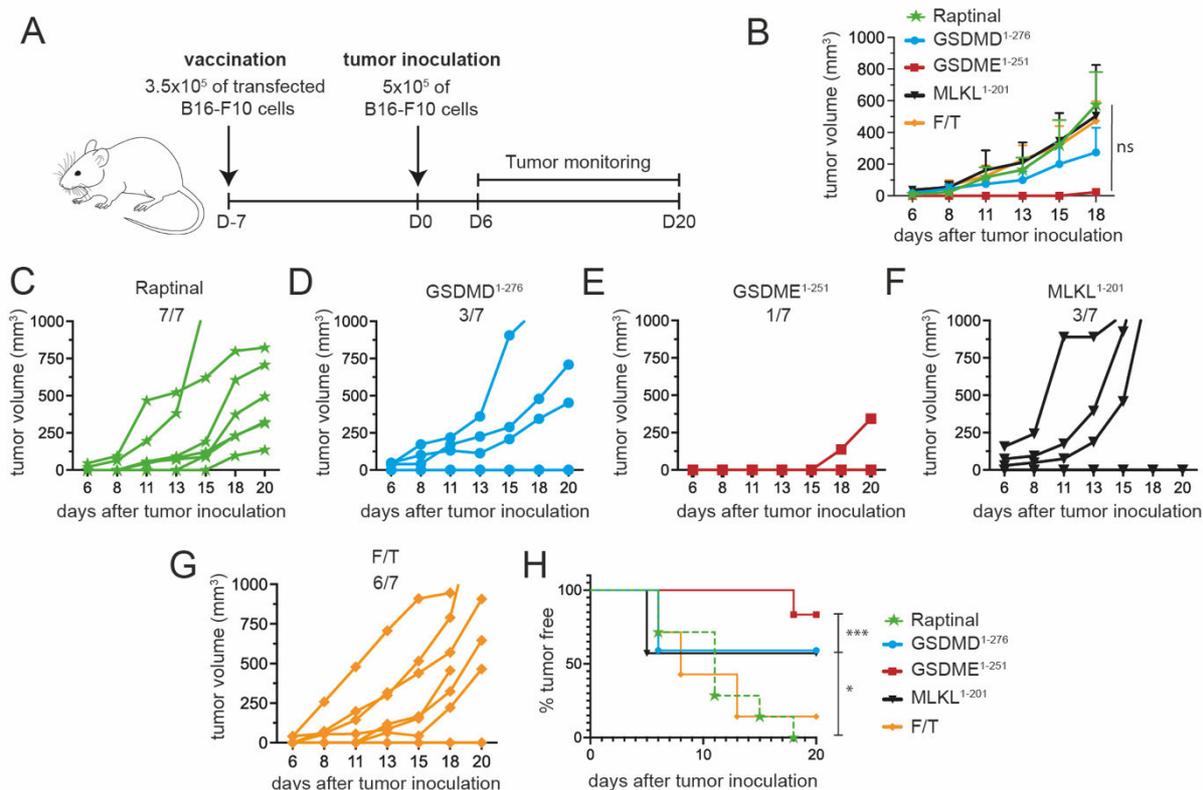


Figure 4 - Injection of B16-F10 cells transiently transfected to express GSDMD¹⁻²⁷⁶, GSDME¹⁻²⁵¹, or MLKL¹⁻²⁰¹ vaccinates mice against a secondary tumor challenge evaluated using stringent experimental conditions.

A – Depiction of the stringent protocol used here to evaluate the immunogenic potential of the B16-F10 cells transfected with the indicated plasmid construct coding for ICD executioners derived from GSDMD, GSDME, or MLKL. Subcutaneous injections of the transfected B16-F10 cells were performed in the right flanks of the animals, and tumor challenged, 7 days later, were performed using higher number of B16-F10 cells (5x10⁵ untreated B16-F10 cells), injected in the contralateral flanks. Absence of tumor in the primary site was confirmed and tumor growth in the contralateral flanks was monitored overtime. **A** – Mean tumor volumes in the different indicated groups are represented, in groups of 7 mice. **C-G** –Individual tumor growth curves in each indicated group of mice, numbers represent the number of mice that developed tumor in each group. **H** – Percentage of mice that remained tumor free overtime in each indicated group is illustrated. Data are from one representative experiment out of two, showing similar results.

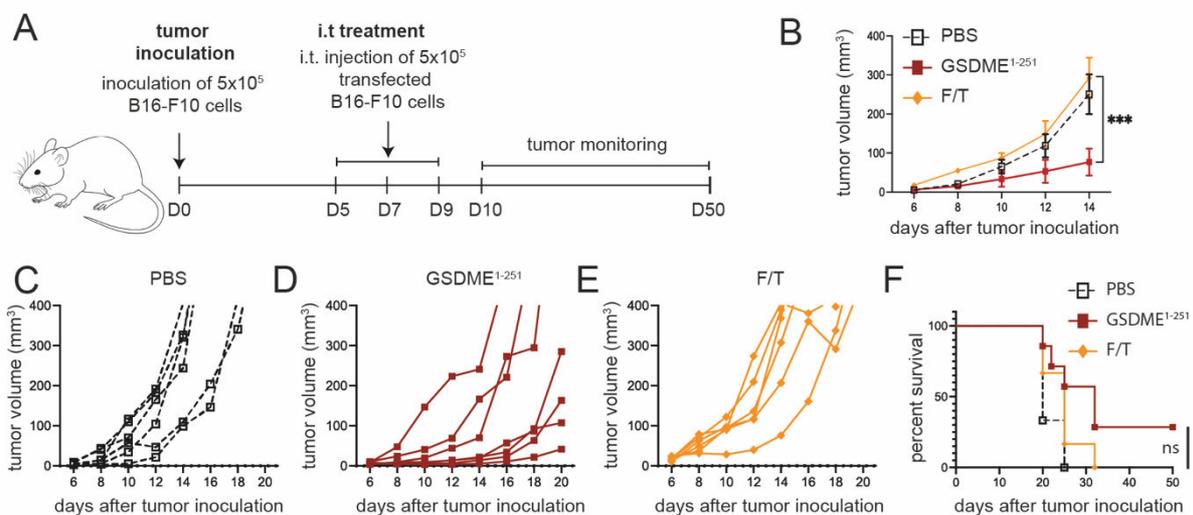
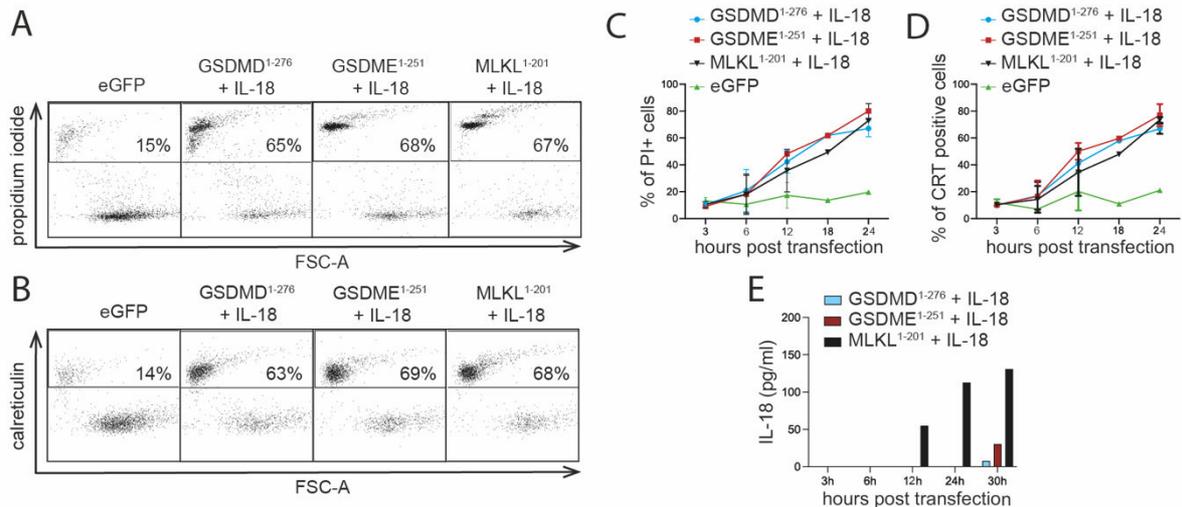


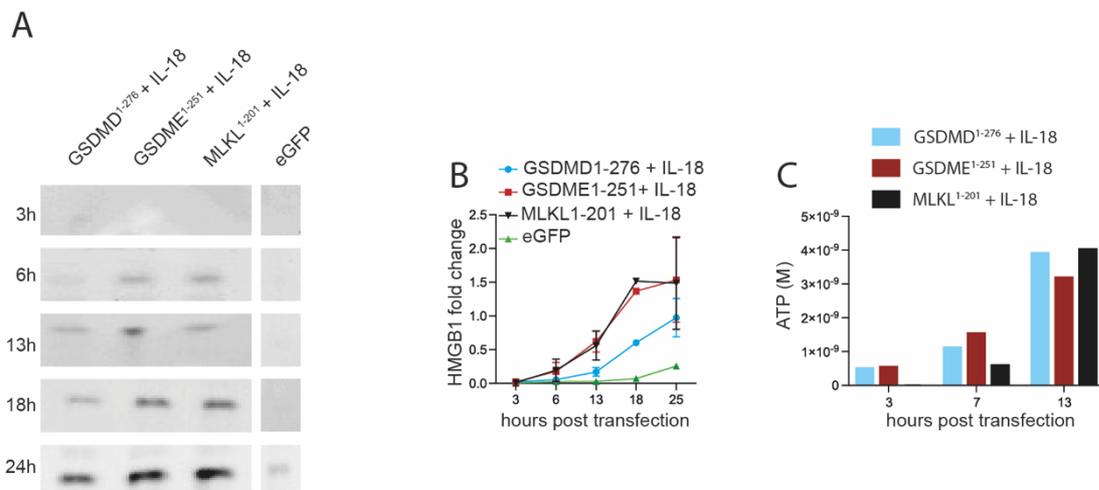
Figure 5 – Intratumoral injection of B16-F10 transiently transfected to express GSDME¹⁻²⁵¹, induce a better tumor control and improve mice survival

A – Depiction of the protocol used to evaluate the therapeutic potential of the immunogenic B16-F10 cells transfected to express GSDME¹⁻²⁵¹ and injected directly in established tumors. Intratumoral injection were performed at day 5, 7, and 9, post tumor inoculation. **A** – Mean tumor volumes in the different indicated groups are represented, in groups of 7 mice. **C-G** – Individual tumor growth curves in each indicated group of mice. **H** – Percentage of mice that remained tumor free overtime in each indicated group is illustrated. Data are form one representative experiment out of two, showing similar results.



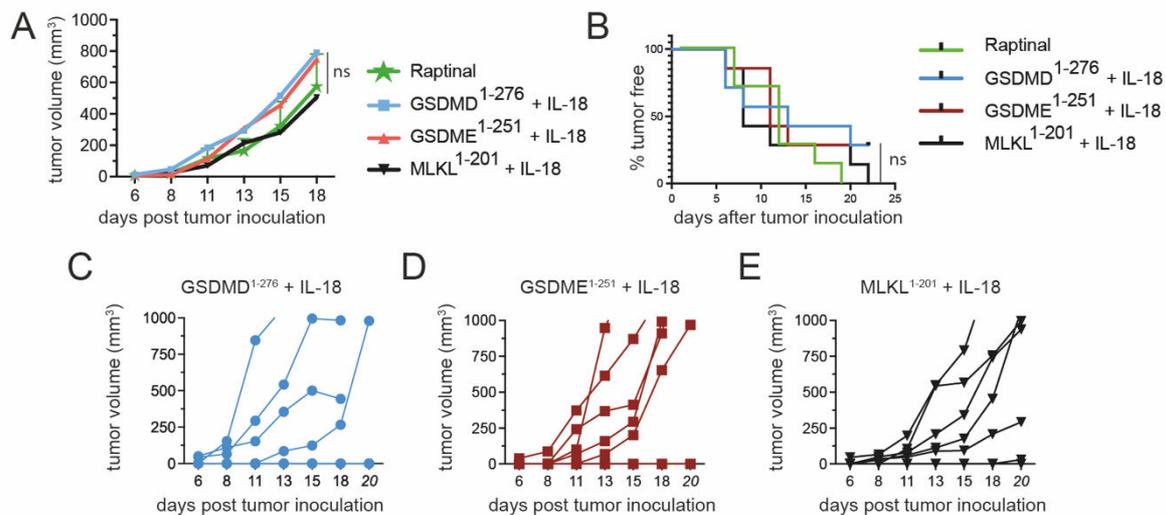
Supp. Figure S1 – Transfection of B16-F10 cells with bicitronic plasmids coding for active forms of pyroptosis or necroptosis executioners and for IL-18 induce membrane permeabilization, calreticulin exposure, and IL-18 secretion.

A – Cell membrane permeabilization of melanoma B16-F10 cells was evaluated by incorporation of propidium iodide (PI) using flow cytometry, 24 hours post transfection with indicated bicitronic plasmids coding for eGFP or for the indicated bicitronic construct coding for GSDMD¹⁻²⁷⁶ and IL-18 (GSDMD¹⁻²⁷⁶ + IL-18), GSDME¹⁻²⁵¹ and IL-18 (GSDME¹⁻²⁵¹ + IL-18), or for MLKL¹⁻²⁰¹ and IL-18 (MLKL¹⁻²⁰¹ + IL-18). Representative flow cytometry panels are shown to illustrate the data. **B** – kinetic of membrane permeabilisation upon transfection of B16-F10 cells with the plasmid coding for the different indicated constructs. **C** – Kinetic of calreticulin exposure on transfected B16-F10 cells, 3 to 30 hours post transfection with the plasmid coding for the indicated proteins. **D** – Evaluation of IL-18 concentrations in the supernatant was evaluated at different time point by ELISA. Data are from one representative experiments out of two, showing comparable results.



Supp. Figure S2 – Transfection of B16-F10 cells with bicistronic plasmids coding for active forms of pyroptosis or necroptosis executioners and for IL-18 induce the release of HMGB1 and ATP in the extracellular milieu.

(a) – Release of HMGB1 from cells was analyzed using western blot, after collection overtime of supernatant fractions of B16-F10 cells transfected with plasmids coding for eGFP or for the indicated bicistronic constructs. (b) – Comparison following image quantification of HMGB1 release overtime in the different indicated conditions. Data are from one representative experiments out of two, performed in triplicate, and showing comparable results. Fold change are evaluated after normalization against the same internal controls. (c) – ATP release in the supernatant were evaluated overtime using sensitive bioluminescence assays in B16-F10 cells transfected with the plasmid coding for the indicated bicistronic constructs. The data are from one experiment, out of two, showing similar results.



Supp Figure S3 – Injection of B16-F10 cells transfected with the bicistronic plasmids coding for active forms of pyroptosis or necroptosis executioners, concomittantly with expression for IL-18, partially vaccinates mice against a secondary tumor challenge

Mice were submitted to the vaccination protocol, as depicted in Fig. 4A, to evaluate the immunogenic potential of the B16-F10 cells transfected with the indicated bicistronic plasmids. Subcutaneous injections of the transfected B16-F10 cells were performed in the right flanks of the animals, and tumor challenged were performed 7 days later, using B16-F10 cells injected in the contralateral flanks. Absence of tumor in the primary site was confirmed and tumor growth in the contralateral flanks was monitored overtime. **(a)** – Mean tumor volumes in the different indicated groups are represented, in groups of 7 mice. **(b)** – Percentage of mice that remained tumor free overtime in each indicated group is illustrated. **(c-e)** – Individual tumor growth curves in each indicated group of mice.

Bibliography

1. Kerr, Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–257 (1972).
2. Yatim, N., Cullen, S. & Albert, M. L. Dying cells actively regulate adaptive immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 262–275 (2017).
3. Bosurgi, L., Hughes, L. D., Rothlin, C. V. & Ghosh, S. Death begets a new beginning. *Immunol. Rev.* **280**, 8–25 (2017).
4. Zychlinsky, A., Prevost, M. C. & Sansonetti, P. J. Shigella flexneri induces apoptosis in infected macrophages. *Nature* **358**, 167–169 (1992).
5. Cookson, B. T. & Brennan, M. A. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* **9**, 113–114 (2001).
6. Shi, J. *et al.* Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* **526**, 660–665 (2015).
7. Murphy, J. M. *et al.* The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity* **39**, 443–453 (2013).
8. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
9. Zitvogel, L., Kepp, O. & Kroemer, G. Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity. *Cell* **140**, 798–804 (2010).
10. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
11. Frchet, P. Calreticulin Release at an Early Stage of Death Modulates the Clearance by Macrophages of Apoptotic Cells. **8**, 1–13 (2017).
12. Michaud, M. *et al.* Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* **334**, 1573–1577 (2011).
13. De Schutter, E. *et al.* Punching Holes in Cellular Membranes: Biology and Evolution of Gasdermins. *Trends Cell Biol.* **31**, 500–513 (2021).
14. Wang, W. J. *et al.* Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Nature* **10**, 1–13 (2019).
15. Obeid, M. *et al.* Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat. Med.* **13**, 54–61 (2007).
16. Krysko, D. V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 860–875 (2012).
17. Scarpitta, A., Hacker, U. T., Büning, H., Boyer, O. & Adriouch, S. Pyroptotic and

- Necroptotic Cell Death in the Tumor Microenvironment and Their Potential to Stimulate Anti-Tumor Immune Responses. *Front. Oncol.* **11**, 1–10 (2021).
18. Man, S. M. & Kanneganti, T. D. Gasdermin D: The long-awaited executioner of pyroptosis. *Cell Res.* **25**, 1183–1184 (2015).
 19. Yu, J. *et al.* Cleavage of GSDME by caspase-3 determines lobaplatin-induced pyroptosis in colon cancer cells. *Cell Death Dis.* **10**, (2019).
 20. Jiang, M., Qi, L., Li, L. & Li, Y. The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discov.* **6**, (2020).
 21. Croes, L. *et al.* Large-scale analysis of DFNA5 methylation reveals its potential as biomarker for breast cancer. *Clin. Epigenetics* **10**, 1–13 (2018).
 22. Ibrahim, J. *et al.* Methylation analysis of Gasdermin E shows great promise as a biomarker for colorectal cancer. *Cancer Med.* **8**, 2133–2145 (2019).
 23. Kim, M. S. *et al.* Aberrant promoter methylation and tumor suppressive activity of the DFNA5 gene in colorectal carcinoma. *Oncogene* **27**, 3624–3634 (2008).
 24. Kim, M. S. *et al.* Methylation of the DFNA5 increases risk of lymph node metastasis in human breast cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **370**, 38–43 (2008).
 25. Akino, K. *et al.* Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Sci.* **98**, 88–95 (2007).
 26. Zhang, Z. *et al.* Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity. *Nature* **579**, 415–420 (2020).
 27. He, L., Peng, K., Liu, Y., Xiong, J. & Zhu, F. F. Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *Onco. Targets. Ther.* **6**, 1539–1543 (2013).
 28. Ruan, J., Mei, L., Zhu, Q., Shi, G. & Wang, H. Mixed lineage kinase domain-like protein is a prognostic biomarker for cervical squamous cell cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 15035–15038 (2015).
 29. Ertao, Z. *et al.* Prognostic value of mixed lineage kinase domain-like protein expression in the survival of patients with gastric cancer. *Tumor Biol.* **37**, 13679–13685 (2016).
 30. Koo, G. B. *et al.* Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Res.* **25**, 707–725 (2015).
 31. Nicolè, L. *et al.* Necroptosis-driving genes RIPK1, RIPK3 and MLKL-p are associated with intratumoral CD3⁺ and CD8⁺ T cell density and predict prognosis in hepatocellular carcinoma. *J. Immunother. cancer* **10**, (2022).

32. Snyder, A. G. *et al.* Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. *Sci. Immunol.* **4**, eaaw2004 (2019).
33. Chen, J., Chen, S., Li, B., Zhou, S. & Lin, H. A pyroptosis-related signature predicts prognosis and indicates immune microenvironment infiltration in glioma. *Cancer Med.* **12**, 5071–5087 (2023).
34. Chen, J. *et al.* A necroptosis-related gene signature for predicting prognosis, immune landscape, and drug sensitivity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Med.* **11**, 5079–5096 (2022).
35. Rogers, C. *et al.* Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat. Commun.* **8**, 1–14 (2017).
36. Arnež, K. H. *et al.* Analysis of the N-terminal region of human MLKL, as well as two distinct MLKL isoforms, reveals new insights into necroptotic cell death. *Biosci. Rep.* **36**, 1–7 (2016).
37. Liu, Z. *et al.* Crystal Structures of the Full-Length Murine and Human Gasdermin D Reveal Mechanisms of Autoinhibition, Lipid Binding, and Oligomerization. *Immunity* (2019). doi:10.1016/j.immuni.2019.04.017
38. Chen, R., Kang, R. & Tang, D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp. Mol. Med.* **54**, 91–102 (2022).
39. Fabbi, M., Carbotti, G. & Ferrini, S. Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 665–75 (2015).
40. Terme, M. *et al.* IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* **71**, 5393–5399 (2011).
41. Terme, M. *et al.* Cancer-induced immunosuppression: IL-18-elicited immunoablative NK cells. *Cancer Res.* **72**, 2757–2767 (2012).
42. Lim, H. X., Hong, H.-J., Cho, D. & Kim, T. S. IL-18 enhances immunosuppressive responses by promoting differentiation into monocytic myeloid-derived suppressor cells. *J. Immunol.* **193**, 5453–5460 (2014).
43. Wang, W. J. *et al.* Downregulation of gasdermin D promotes gastric cancer proliferation by regulating cell cycle-related proteins. *J. Dig. Dis.* **19**, 74–83 (2018).
44. Martens, S., Bridelance, J., Roelandt, R., Vandenabeele, P. & Takahashi, N. MLKL in cancer: more than a necroptosis regulator. *Cell Death Differ.* **28**, 1757–1772 (2021).
45. Rogers, C. *et al.* Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nat. Commun.* **8**, (2017).
46. Cai, Z. *et al.* Plasma membrane translocation of trimerized MLKL protein is required

- for TNF-induced necroptosis. *Nat. Cell Biol.* **16**, 55–65 (2014).
47. Kesavardhana, S., Malireddi, R. K. S. & Kanneganti, T. D. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Pyroptosis. *Annu. Rev. Immunol.* **38**, 567–595 (2020).
 48. Kolbrink, B., Riebeling, T., Kunzendorf, U. & Krautwald, S. Plasma Membrane Pores Drive Inflammatory Cell Death. *Front. cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
 49. Rogers, C. *et al.* Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nat. Commun.* (2019). doi:10.1038/s41467-019-09397-2
 50. Apetoh, L. *et al.* Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat. Med.* **13**, 1050–1059 (2007).
 51. Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* **15**, 1170–1178 (2009).
 52. Dupaul-Chicoine, J. *et al.* The Nlrp3 Inflammasome Suppresses Colorectal Cancer Metastatic Growth in the Liver by Promoting Natural Killer Cell Tumorcidal Activity. *Immunity* **43**, 751–763 (2015).
 53. Wang, Q. *et al.* Epigenetic Regulation of RIP3 Suppresses Necroptosis and Increases Resistance to Chemotherapy in NonSmall Cell Lung Cancer. *Transl. Oncol.* **13**, 372–382 (2020).
 54. Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
 55. Rider, P., Voronov, E., Dinarello, C. A., Apte, R. N. & Cohen, I. Alarmins: Feel the Stress. *J. Immunol.* **198**, 1395–1402 (2017).
 56. Yang, H., Wang, H., Chavan, S. S. & Andersson, U. High mobility group box protein 1 (HMGB1): The prototypical endogenous danger molecule. *Mol. Med.* **21**, S6–S12 (2015).
 57. Matamoros, J. A., da Silva, M. I. F., de Moura, P. M. M. F., Leitão, M. da C. G. & Coimbra, E. C. Reduced Expression of IL-1 β and IL-18 Proinflammatory Interleukins Increases the Risk of Developing Cervical Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **20**, 2715–2721 (2019).
 58. Humeau, J., Lévesque, S., Kroemer, G. & Pol, J. G. Gold standard assessment of immunogenic cell death in oncological mouse models. *Methods Mol. Biol.* **1884**, 297–315 (2019).
 59. Palchaudhuri, R. *et al.* A Small Molecule that Induces Intrinsic Pathway Apoptosis

with Unparalleled Speed. *Cell Rep.* **13**, 2027–2036 (2015).

Résultats non publiés

Contexte de l'étude :

Ce projet vise à explorer de nouvelles stratégies de vaccination antitumorale *in vivo* basées sur l'utilisation de vecteurs AAVs codant les formes actives de protéines clés qui déclenchent une mort cellulaire immunogène. Le but principal est de manipuler la mort cellulaire immunogène dans le MET par injection intratumorale de vecteurs AAVs sélectionnés pour stimuler le SI et le sensibiliser aux antigènes tumoraux. À cette fin, des vecteurs AAVs codant des formes actives de la Gasdermine D (GSDMD), la Gasdermine E (GSDME) et MLKL, ainsi que certaines cytokines immunostimulatoires (IL-18) seront utilisés. Cette stratégie sera évaluée seule ou en combinaison avec des immunothérapies établies ce qui pourrait élargir la réponse aux immunothérapies, en particulier dans les tumeurs dites "froides", peu immunogènes.

Méthode principale :

Dans le but d'étudier l'impact des MCI dans le cancer, nous avons injecté des AAVs directement dans des tumeurs murines B16-F10 ou MC38 codant les effecteurs de la pyroptose et de la nécroptose seuls ou en association avec l'IL-18 (seulement pour la GSDME). Dans une autre expérience, ces injections ont été combinées avec l'injection intrapéritonéale d'un anticorps dirigé contre le point de contrôle immunitaire PD-1.

Principaux résultats :

- L'injection intratumorale d'un AAV2 codant pour les effecteurs de la pyroptose ou de la nécroptose seules n'induit pas de ralentissement de la croissance tumorale dans le modèle B16-F10.
- L'injection intratumorale d'un AAV2 codant pour la GSDME dans le modèle MC38 induit un ralentissement significatif de la croissance tumorale ainsi qu'une augmentation de la survie.
- L'association d'un AAV2 codant pour la GSDME en association avec l'injection intrapéritonéale d'un anticorps dirigé contre PD-1 induit un fort ralentissement tumoral et une augmentation importante de la survie dans le modèle B16-F10.

Matériels et méthodes

Souris :

Toutes les souris sauvages C57BL/6JRj utilisées dans les expériences ont été obtenues auprès de Janvier Lab. Les souris étaient âgées de 7 semaines au début des protocoles et étaient hébergées et nourries *ab libitum* dans une installation exempte d'organisme pathogène spécifique (EOPS). Tous les protocoles expérimentaux sur animaux ont été approuvés par le Ministère français de l'Éducation et de la Recherche, après consultation du comité d'éthique (n° APAFIS#37300).

Transduction *in vitro* des cellules tumorales :

5 heures avant l'ajout de doses croissantes de vecteurs AAVs codant la GFP, $2,5 \cdot 10^4$ cellules MC8 ou $4 \cdot 10^4$ cellules B16-F10 ont étéensemencées dans une plaque 96 puits dans 40 μ l de milieu DMEM complet. Des doses croissantes d'AAVs sont ajoutés 5 heures plus tard, dilués dans un volume de 10 μ l de DMEM complet. 5 heures après l'ajout des AAVs, 100 μ l de DMEM complet sont rajoutés pour avoir un volume final de 150 μ l. 48 heures après l'ajout des AAVs, les cellules sont décollées à l'aide de 0.05% de trypsine et 0.53 mM d'EDTA, centrifugées à 400g, 5 minutes à 4°C et resuspendues dans du tampon FACS contenant 10 μ M de DAPI. La production de la GFP et/ou l'analyse de la mortalité induite est ensuite analysée par cytométrie en flux.

Modèles tumoraux :

$5 \cdot 10^5$ cellules de mélanome murin B16-F10 cellules ou de carcinome du colon MC38 ont été inoculées par voie sous-cutanée sur le flanc droit des souris. La croissance tumorale a été surveillée pendant 50 jours après l'inoculation tumorale. Les volumes tumoraux ont été mesurés à l'aide d'un pied à coulisse numérique et estimés avec la formule suivante : $V = \text{longueur} \times \text{largeur} \times [(\text{longueur} + \text{largeur}) / 2]$. La survie a été estimée lors de la mort de la souris, d'un état globale incompatible avec la continuité du protocole ou lorsque le volume tumoral était supérieur à 2000 mm³.

Production et contrôle qualité des AAVs :

Tous les AAVs ont été produits en utilisant le système d'expression baculovirus chez la cellule d'insecte Sf9, la purification et la détermination de la concentration ont été effectuées par Virovek (Hayward, Californie, États-Unis).

Injections intratumorales d'AAVs codant les effecteurs de la pyroptose ou de la nécroptose et injection de l'immunothérapie dirigée contre PD-1 :

5 jours après l'inoculation de la tumeur, lorsque que le volume tumoral atteint 50 mm³, les souris reçoivent une injection intratumorale de 1.10¹¹ AAVs dans un volume de 50 µl de PBS. Au 7^{ème} et 9^{ème} jour après l'inoculation de la tumeur, la même injection est effectuée pour que les souris aient reçu une dose globale de 3.10¹¹ AAVs par souris après un cycle de 3 injections. En parallèle de l'injection intratumorale des AAVs, un cycle d'injection (c'est-à-dire 6, 8 et 10 jours après l'inoculation de la tumeur) intrapéritonéale d'anticorps dirigés contre le point de contrôle immunitaire PD-1 est réalisée. Cette injection intrapéritonéale de 200 µg d'anticorps est réalisée dans un volume de 200 µl de PBS.

Statistiques :

Toutes les données sont représentées sous forme de moyenne avec erreur standard de la moyenne (SEM). L'ANOVA à un facteur et les tests de comparaisons multiples de Tukey ont été utilisés pour effectuer des comparaisons statistiques entre les groupes expérimentaux. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Graphpad Prism V8, (GraphPad, San Diego, Californie, États-Unis). Le seuil de signification statistique a été fixé à $p < 0,05$ (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et **** $p < 0,0001$).

Résultats

Evaluation *in vitro* de la capacité de transduction d'AAVs codant pour l'eGFP et d'AAVs codant pour les effecteurs de la MCI

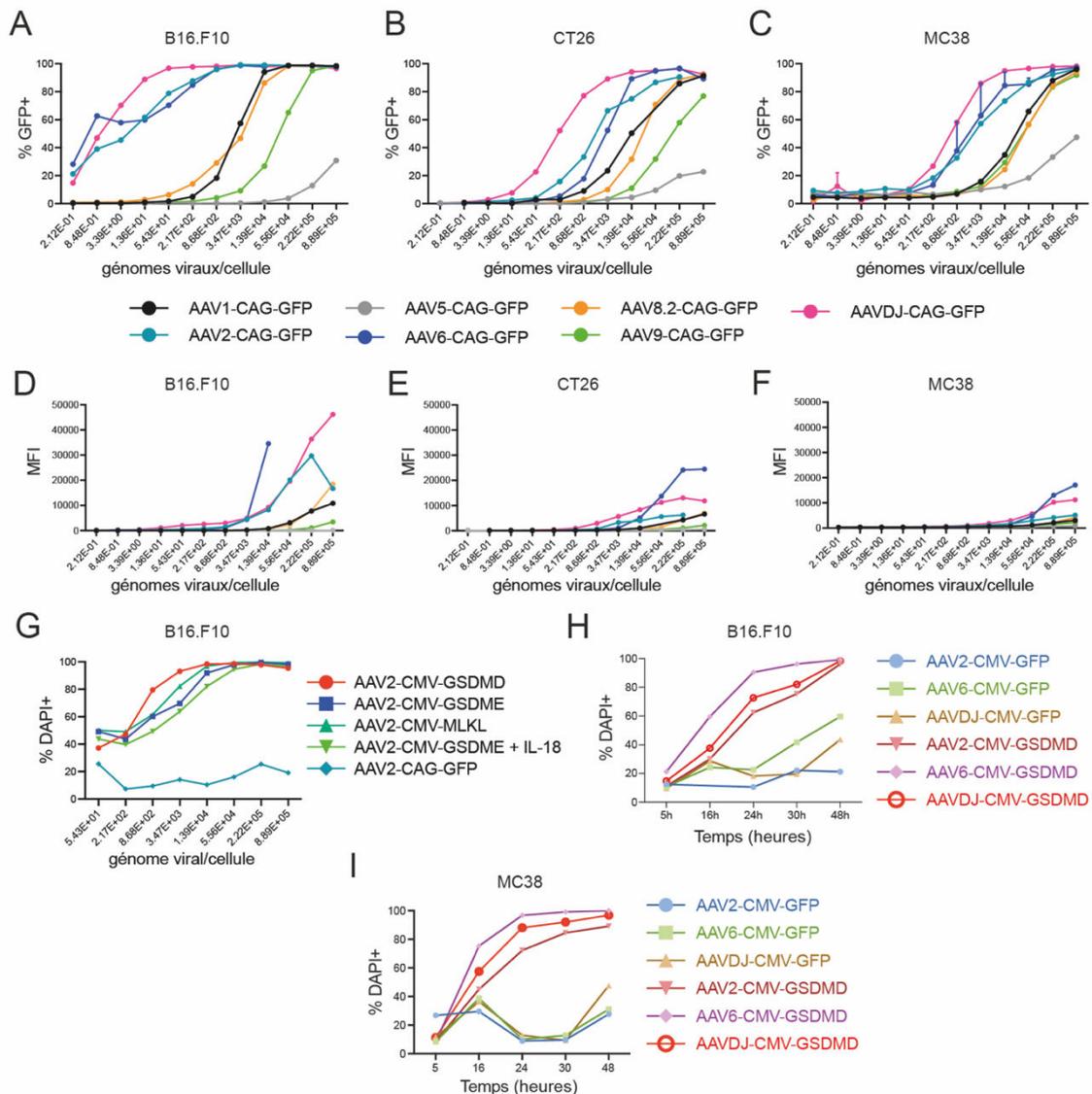


Figure 22 - Caractérisation *in vitro* de la capacité de transduction des différents sérotypes d'AAVs ainsi que la fonctionnalité d'AAVs codant pour les effecteurs de la pyroptose ou de la nécroptose dans différents modèles tumoraux

(A-C) Évaluation de la capacité de transduction de différents sérotypes codant pour la GFP dans le modèle B16-F10, MC38 et CT28 basé sur le pourcentage de cellules GFP positives en fonction d'une dose croissante de génome viral par cellule. (D-F) Évaluation de l'intensité moyenne de fluorescence des cellules préalablement incubées avec des doses croissantes d'AAVs codant pour la GFP dans différents modèles tumoraux. (G) Évaluation de la capacité d'AAVs codant pour la GSDMD, la GSDME ou MLKL à induire la mort de cellules B16-F10 évaluée par l'incorporation de DAPI en cytométrie en flux 48 heures après l'ajout de doses croissantes de vecteurs. (H-I) Cinétique d'incorporation du DAPI (après ajout de 6.10^{10} génomes viraux par cellules) par les cellules B16-F10 ou MC38 évaluée en cytométrie en flux.

Pour démarrer ce projet, nous avons choisi un AAV2 possédant un large tropisme afin de cibler le MET mais le développement de nouveaux vecteurs est aussi une partie importante de ce projet. Pour cela, l'évaluation de différents sérotypes (AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8.2, AAV9 et AAVDJ) codant pour la GFP nous a permis de montrer des capacités différentielles de transduction des vecteurs AAVs (**voir figure 22**). Effectivement, que ce soit dans le modèle B16-F10, CT26 ou dans le modèle MC38, l'AAV2, l'AAVDJ et l'AAV6 sont les sérotypes qui transduisent le mieux les cellules tumorales (**voir figure 22 A-F**). De façon intéressante, les cellules B16-F10 sont les cellules les plus sensibles aux AAVs *in vitro* car il faut un faible titre de vecteurs pour transduire la totalité des cellules tumorales avec une intensité moyenne de fluorescence plus forte (**voir figure 22 A, D**). Maintenant que nous savons que le sérotype influence grandement la capacité des AAVs à transduire les cellules tumorales, nous avons voulu savoir si la transduction des cellules tumorales avec un vecteur codant des protéines de la famille des Gasdermines (GSDMD ou GSDME) ou MLKL pouvait induire la mortalité cellulaire. Pour cela nous avons dans un premier temps incubé les cellules B16-F10 avec des doses croissantes d'AAVs codant pour la GSDME, la GSDMD ou MLKL pendant 48 heures (**voir figure 22 G**). Ces résultats nous ont montré que : i) les vecteurs codants pour les effecteurs de la MCI étaient capables d'induire la mort des cellules tumorales B16-F10 (résultat non retrouvé pour le vecteur codant pour l'eGFP) ce qui confirme leur fonctionnalité *in vitro*, ii) qu'une dose de $1,39^{E+04}$ est nécessaire pour induire la mortalité de toutes les cellules dans les expériences. Nous avons ensuite évalué la mortalité induite en cinétique (de 5 à 48 heures après ajout des vecteurs) par ces différents AAVs dans le modèle B16-F10 et MC38 (**Figure 22 H et I**). Ces résultats nous montrent que la quasi-totalité (entre 60 à 90% en fonction des protéines codées par les AAVs) des cellules meurent dans les premières 24 heures après ajout des vecteurs dans les puits de culture cellulaire. On observe aussi que les AAVs contrôles (codants pour l'eGFP) induisent une toxicité moyenne de l'ordre de 20% mais qu'une augmentation de la mortalité s'opère aux points tardifs de la cinétique (après 30 heures) sûrement à cause d'une mortalité cellulaire induite par les conditions de culture cellulaires.

Injection intratumorale d'AAVs codant pour la pyroptose ou la nécroptose dans le modèle B16-F10

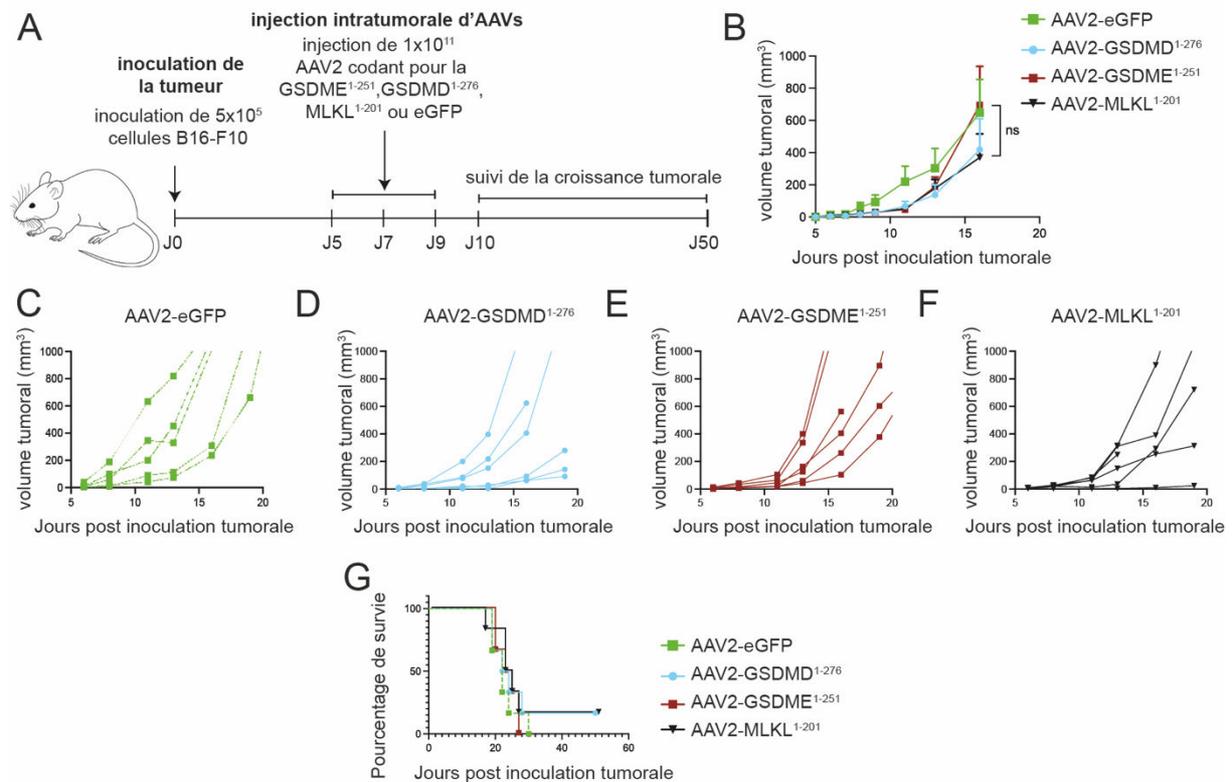


Figure 23 - L'injection intratumorale d'AAV2 codant pour la pyroptose ou la nécroptose n'induit pas de rejet de tumeur dans la lignée cellulaire B16-F10

(A) Schéma de l'expérience d'injection intratumorale d'AAVs chez la souris. 5, 7 et 9 jours après l'inoculation de la lignée cellulaire de mélanome B16-F10, des AAV2 codant pour la pyroptose ou la nécroptose ont été injectés de manière intratumorale et le volume de la tumeur et la survie ont été surveillés pendant 50 jours. (B) Courbes de croissance de la tumeur B16-F10 après l'injection intratumorale d' 1.10^{11} AAV codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹, la GSDMD¹⁻²⁷⁶, ou MLKL¹⁻²⁰¹ ou AAV témoin eGFP. N=6 souris par groupe. (C-F) Courbes de croissance individuelles de la tumeur B16-F10 après l'injection intratumorale d'AAVs. N=6 souris par groupe. (G) Courbes de survie des souris porteuses de tumeurs B16-F10 après l'injection intratumorale d'AAVs. N=6 souris par groupe. ns: non significatif. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Pour évaluer l'effet thérapeutique de l'induction de la mort cellulaire immunogène directement dans le MET, nous avons développé un AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹, la GSDMD¹⁻²⁷⁶ ou la MLKL¹⁻²⁰¹. L'injection directe de cet AAV dans la tumeur provoque la mort cellulaire immunogène des cellules transduites, la libération de molécules immunogènes stimulant la RI antitumorale. Nous avons voulu évaluer si une triple injection intratumorale d'AAV2 codant pour des protéines effectrices de la pyroptose et de la nécroptose pouvait ralentir la croissance tumorale, voire induire le rejet de la tumeur et améliorer la survie des souris traitées. Nous avons réalisé une triple injection intratumorale (aux jours 5, 7 et 10 après l'inoculation de la tumeur) de 1.10^{11} d'AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ ou eGFP comme témoin dans les

cellules de mélanome B16-F10 (**voir figure 23 A**). Cette injection intratumorale a initialement induit un ralentissement de la croissance tumorale au début du protocole expérimental, mais l'effet s'est réduit au jour 16, indépendamment de l'AAV2 utilisé (**voir figure 23 B-F**). Aucune amélioration de la survie n'a également été observée dans les groupes traités par les différents AAVs codant les effecteurs de la pyroptose ou de la nécroptose (**voir figure 23 G**).

Injection intratumorale d'un AAV2 codant pour la GSDME dans le modèle MC38 :

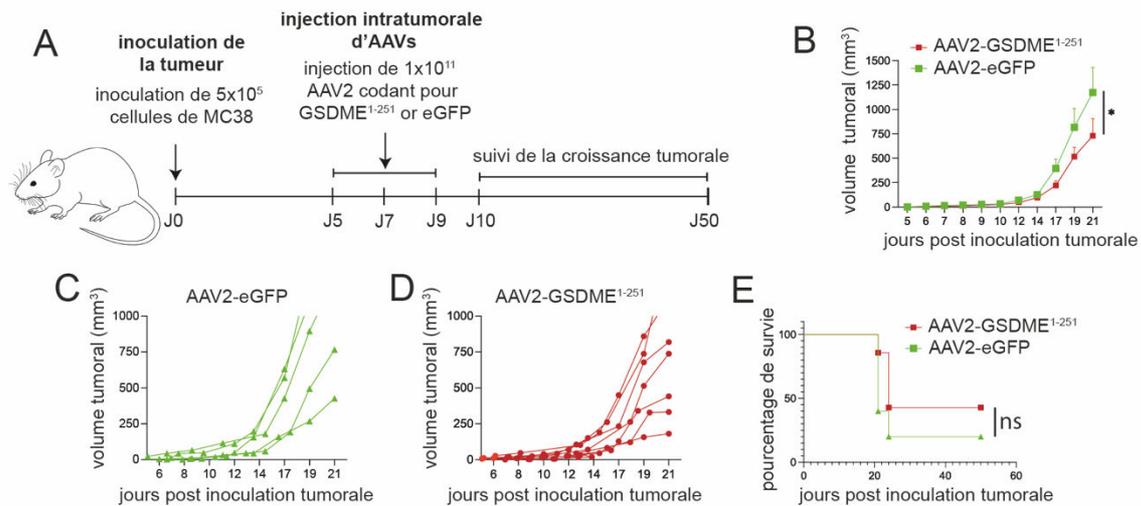


Figure 24 - L'injection intratumorale d'AAV2 codant pour GSDME¹⁻²⁵¹ réduit la croissance tumorale et le rejet de tumeur dans la lignée cellulaire MC38

(A) Schéma de l'expérience d'injection intratumorale d'AAVs chez la souris. 5, 7 et 9 jours après l'inoculation de la lignée cellulaire de carcinome colorectal MC38, l'AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ a été injecté de manière intratumorale et le volume de la tumeur et la survie ont été surveillés pendant 50 jours. (B) Courbes de croissance de la tumeur MC38 après l'injection intratumorale d'1.10¹¹ AAV codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ ou un AAV codant pour l'eGFP. N=6 souris par groupe. (C-D) Courbes de croissance individuelles de la tumeur MC38 après l'injection intratumorale d'AAVs. (E) Courbes de survie des souris porteuses de tumeurs MC38 après l'injection intratumorale d'AAVs. N=7 souris par groupe. *p<0,05. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Dans le but d'évaluer l'effet thérapeutique de l'induction de la MCI directement dans le MET, nous avons développé un AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹. L'injection de cet AAV directement dans la tumeur induira la mort cellulaire des cellules transduites et exprimant la GSDME¹⁻²⁵¹. Nous avons donc procédé à une triple injection intratumorale (à J5, J7 et J10) de 1.10¹¹ d'AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ ou l'eGFP comme contrôle dans le modèle de carcinome du colon MC38 (**voir figure 24 A**). Cette injection a permis de ralentir la croissance tumorale de façon significative (* p-value<0.05) mais aussi d'augmenter la survie des souris ayant été traités avec l'AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ (**voir figure 24 B et E**). En outre, on s'aperçoit que le nombre de souris ayant une tumeur <1 000 mm³ dans le groupe AAV2-GSDME¹⁻²⁵¹ (5/7) est beaucoup plus important que ce que l'on retrouve dans le groupe contrôle

GSDME¹⁻²⁵¹ (5/7) est beaucoup plus important que ce que l'on retrouve dans le groupe contrôle (2/5) (voir figure 24 C et D). Donc l'injection intratumorale d'un AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ réduit la croissance tumorale et augmente la survie dans le modèle de carcinome du colon MC38.

Combinaison de l'injection de la GSDME¹⁻²⁵¹ avec une immunothérapie anti-PD1

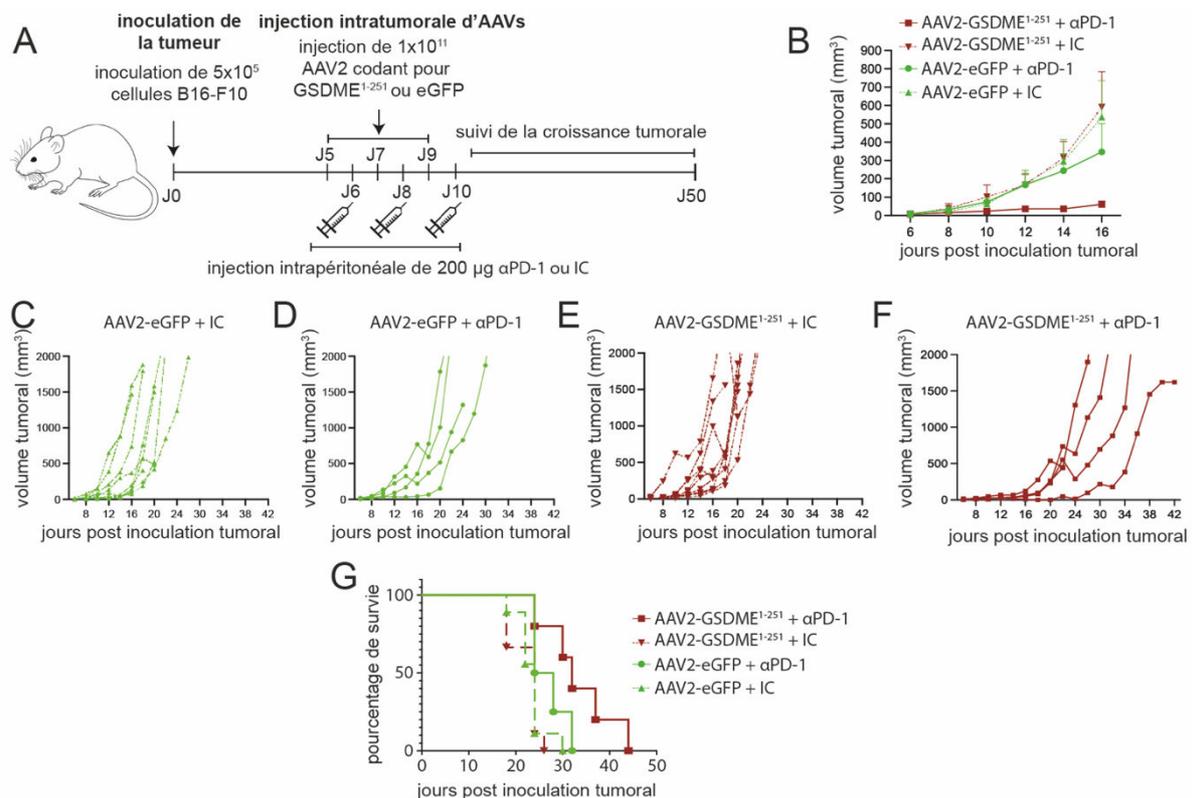


Figure 25 - L'injection intratumorale d'AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ associée à l'immunothérapie anti-PD-1 induit un fort rejet tumoral et une augmentation de la survie dans la lignée cellulaire B16-F10

(A) Schéma de l'expérience d'injection intratumorale d'AAVs chez la souris. 5, 7 et 9 jours après l'inoculation de la lignée cellulaire de carcinome colorectal B16-F10. 1.10^{11} d'AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ ont été injectés de manière intratumorale et le volume de la tumeur et la survie ont été surveillés pendant 50 jours. En parallèle, 200 µg d'anticorps anti-PD-1 ou d'isotype témoin ont été injectés de manière intrapéritonéale aux jours 6, 8 et 10. (B) Courbes de croissance tumorale de B16-F10 après injection intratumorale d' 1.10^{11} AAV codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ ou un AAV codant pour l'eGFP associé à l'anticorps anti-PD-1 ou à l'isotype témoin. (C-F) Courbes de croissance tumorale individuelles de B16-F10 après injection intratumorale d'AAVs. (G) Courbes de survie des souris porteuses de tumeurs B16-F10 après injection intratumorale d'AAVs. N=4-7 souris par groupe. Les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne.

Afin d'améliorer les résultats obtenus précédemment, nous avons combiné la triple injection intratumorale d'un AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ dans le modèle de mélanome murin B16-F10 avec une triple injection intrapéritonéale (à jour 6, jour 8 et jour 10) de 200 µg d'un anticorps dirigé contre PD-1 ou un isotype contrôle (voir figure 25 A). Cette molécule est

impliquée dans des mécanismes inhibiteurs de la RI, favorable à la croissance tumorale pouvant limiter l'impact du SI dans la RI induite par nos stratégies. Dans ce protocole expérimental, la combinaison de l'AAV codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ et de l'anticorps dirigé contre PD-1 induit un ralentissement important de la croissance tumoral comparé aux groupes contrôles à J16 (**voir figure 25 B**). Ce fort ralentissement de la croissance tumoral dans ce groupe est associé à une augmentation de la survie (**voir figure 25 G**). Dans ce protocole, il est à noter que l'association de l'AAV2-eGFP et de l'anti-PD-1 induit un faible ralentissement de la croissance tumoral mais pas aussi important qu'avec l'AAV2 codant pour la GSDME¹⁻²⁵¹ (**voir figure 25 B**). En s'intéressant aux courbes de croissance tumorales individuelles, seules les souris ayant reçues l'AAV2-GSDME¹⁻²⁵¹ et l'anti-PD-1 vont avoir des tumeurs avec un volume <2 000 mm³ après 24, ce qui n'est le cas dans aucun des autres groupes. Dans ce groupe expérimental, la croissance tumorale est fortement limitée au début du protocole et est retardée dans le temps comparés aux autres conditions expérimentales (**voir figure 25 C-F**).

Discussion générale

Résumé des résultats :

Nous avons initialement étudié l'effet de la transfection transitoire de cellules de mélanome murin B16-F10 en cinétique par des plasmides codant des protéines déjà actives de la pyroptose ou de la nécroptose. Pour ce faire nous avons sélectionné les parties N-terminales de la GSDMD (GSDMD¹⁻²⁷⁶) et de la GSDME (GSDME¹⁻²⁵¹) ainsi qu'une forme tronquée de MLKL (MLKL¹⁻²⁰¹) que nous avons associée ou non à une forme active et sécrétée de l'IL-18 murine. Des protéines inactives mutées (GSDMD¹⁻²⁷⁶ F81D ; GSDME¹⁻²⁵¹ F2A K40A) ou tronquées (MLKL¹⁻¹⁶⁴) ont aussi été utilisées dans ces expériences comme contrôles négatifs.

Comme attendu, l'expression transitoire des formes actives des protéines de la pyroptose ou de la nécroptose (seules ou en associées à l'IL-18) dans les cellules tumorales de mélanome murin permet l'incorporation de l'iodure de propidium pour toutes les constructions même si la GSDME induit une perméabilisation membranaire plus rapide et plus intense que les autres constructions (**voir tableau 8, figure 1 et S1 de l'article, page 116 et 121**). En parallèle de l'évaluation de la mortalité cellulaire, nous avons évalué l'exposition d'un autre marqueur important de la MCI qu'est l'exposition de la CRT à la membrane cellulaire. De la même façon que précédemment, les constructions codantes pour les formes actives de la pyroptose (seules ou associées à la forme active de l'IL-18) induisent une forte exposition de cette protéine à la membrane cellulaire (**voir tableau 8, figure 1 et S1 de l'article, page 116 et 121**). De surcroît, l'exposition de la CRT semble être plus intense et plus rapide quand les cellules expriment la GSDME. Nous avons également évalué la libération de la protéine nucléaire HMGB1 – une puissante protéine immunostimulatrice - dans le surnageant de ces mêmes cultures cellulaires. L'analyse par western-blot nous a permis de montrer que HMGB1 est libérée précocement dès 6 heures après la transfection pour atteindre un maximum à 24 heures. Nous notons des différences dans la quantité de HMGB1 délivrée par les cellules transfectées. En effet, les cellules exprimant la GSDME libèrent plus massivement cette molécule avec un maximum (pour toutes les constructions) à 24 heures après la transfection (**voir tableau 8, figure 2 et S2 de l'article, page 117 et 122**). La libération de l'eATP par les cellules mourantes est aussi un marqueur caractéristique de la mort cellulaire immunogénique, nous avons donc évalué sa présence dans le surnageant de culture. Ces expériences ont permis de montrer que l'eATP est libérée et détectable dès 7 heures avec un maximum 15 heures après le début des expériences

de transfection pour les constructions induisant la pyroptose et la nécroptose (voir **tableau 8, figure 2 et S2 de l'article, page 117 et 122**).

Tableau 8 - Récapitulatif des résultats obtenus *in vitro* concernant la caractérisation des constructions

Molécule	Production IL-18	Perméabilisation membranaire	Exposition de la CRT	Libération d'eATP	Libération HMGB1	Détection d'IL-18
GSDMD ¹⁻²⁷⁶	non	++	++	++	++	-
	oui	++	++	++	++	-
GSDMD ¹⁻²⁷⁶ F81D	non	-	-	-	-	-
GSDME ¹⁻²⁵¹	non	+++	+++	+++	+++	-
	oui	+++	+++	+	+++	+/-
GSDME ¹⁻²⁵¹ F2A K40A	non	-	-	-	-	-
MLKL ¹⁻²⁰¹	non	+	+	++	+++	-
	oui	+	+	++	+++	+++
MLKL ¹⁻¹⁶⁴	non	+	+	+	+++	-

Après avoir confirmé que nos plasmides induisaient les stigmates de la mort cellulaire immunogénique *in vitro*, nous avons évalué l'effet de la MCI directement *in vivo* par la réalisation d'un protocole de vaccination prophylactique. Ces expériences démontrent que les souris traitées avec les cellules transfectées par toutes les constructions induisant la MCI développent moins de tumeurs que les groupes contrôles ce qui prouve le pouvoir protecteur de ces constructions avec un effet supérieur pour les souris traitées avec les cellules transfectées avec la GSDME (voir **tableau 9 et figure 3 de l'article, page 118**).

Afin de mieux discriminer l'effet protecteur vaccinal de nos constructions, nous avons effectué un deuxième protocole plus discriminant (car on restimule les souris avec plus de cellules tumorales viables) et les avons comparés au raptinal, une drogue induisant spécifiquement l'apoptose. Cette fois, nous avons aussi bien évalué les plasmides codants pour les formes actives de la MCI seules mais aussi celles associées à l'IL-18. On retrouve d'ailleurs un pouvoir protecteur vaccinal de la GSDMD, la GSDME et MLKL avec un nombre limité de tumeurs qui se développent comparées aux groupes contrôles. La construction la plus efficace reste la GSDME avec la croissance tardive d'une seule tumeur sur l'ensemble du groupe (voir **tableau 9 et figure 4 de l'article, page 119**). Alors que nous pourrions nous attendre à un effet synergique, les souris traitées avec les plasmides codant les effecteurs de la MCI et l'IL-18

n'améliorent pas l'effet vaccinal et semble même abolir totalement l'effet obtenu en l'absence de cette cytokine (**figure S3 de l'article, page 123**). Ces multiples résultats montrent que les différentes constructions sélectionnées sont capables d'induire des MCI entraînant un effet anti-tumoral protecteur vaccinal (**voir tableau 9**).

Ensuite, nous avons évalué si la meilleure construction, la GSDME, était capable d'induire un rejet tumoral dans un modèle curatif (**voir figure 5 de l'article, page 120**). Des cellules préalablement transfectées par la GSDME ont été injectées, encore vivantes, dans la tumeur lorsque celle-ci faisait 100mm³. Ces dernières vont donc mourir *in vivo* et libérer leur contenu intracellulaire, directement au sein de l'environnement tumoral et participer ainsi à la stimulation locale du SI. Ces expériences ont permis de montrer que l'injection intratumorale de cellules soumises à la pyroptose médiée par la GSDME permettait un ralentissement significatif de la croissance tumorale mais aussi une augmentation de la survie dans un modèle de mélanome murin B16-F10 (**voir figure 5 de l'article, page 120**).

Tableau 9 - Récapitulatif des résultats obtenus *in vivo* lors des protocoles de vaccination prophylactique

Molécules	Production d'IL-18	Nombre de tumeurs développées		Pourcentage de souris sans tumeurs		Volume moyen tumoral (mm ³)	
		Première expérience	Seconde expérience	Première expérience (à J17)	Seconde expérience (à J20)	Première expérience (à J17)	Seconde expérience (à J18)
GSDMD ^{L-276}	non	1/6	3/7	84 %	57 %	27	274
	oui	/	4/7	/	43 %	/	790
GSDME ^{L-251}	non	0/6	1/7	100 %	86 %	0	23
	oui	/	5/7	/	29 %	/	745
MLKL ^{L-201}	non	1/6	3/7	84 %	57 %	116	505
	oui	/	5/7	/	29 %	/	505
Raptinal	non	/	7/7	/	0 %	/	575
F/T	non	4/6	6/7	34 %	14 %	170	472
PBS	non	6/6	/	0 %	/	527	/

Afin d'évaluer l'incidence de la MCI au sein du MET dans un modèle thérapeutique, nous avons procédé à une triple injection intratumorale (5, 7 et 10 jours après inoculation de la tumeur) d'un AAV2 codant pour la GSDME. Dans le modèle de carcinome du colon MC38, ce

protocole a freiné significativement la croissance tumorale ($p > 0.005$) en augmentant la survie des souris traitées avec l'AAV2 codant pour la GSDME (**voir tableau 10 et figure 23, page 134**). Cependant, ce même protocole effectué dans le modèle B16-F10 n'a entraîné aucun ralentissement de la croissance tumorale, ni amélioré la survie des animaux traités (**voir tableau 10 et figure 24, page 135**). Afin d'améliorer les résultats obtenus dans ce modèle de mélanome murin B16-F10, nous avons associé injection intratumorale d'AAVs codant pour la GSDME avec une injection intrapéritonéale d'un anticorps dirigé contre PD-1. Cette combinaison permet de grandement freiner la croissance tumorale mais aussi d'améliorer la survie des souris traitées comparé à l'injection seule d'un anti-PD-1 (**voir tableau 10 et figure 25, page 136**).

En parallèle des expériences *in vivo* d'induction de la MCI dans des modèles tumoraux, d'autres expérimentations ont été réalisées afin de sélectionner de nouveaux vecteurs transduisant plus efficacement les cellules du microenvironnement tumoral. Pour ce faire, nous avons à notre disposition différents sérotypes (AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV8.2, AAV9 et AAV-DJ) codant la eGFP, ce qui nous a permis d'évaluer leur capacité de transduction *in vitro* dans différentes lignées tumorales d'intérêt (B16-F10, MC38 et CT26). Les sérotypes AAV6, AAV-Dj et AAV2 se sont révélés être les sérotypes transduisant le plus efficacement les trois lignées tumorales évaluées et ont donc été retenus pour le développement de nouveaux vecteurs (**voir figure 22, page 132**).

Limites de nos stratégies :

Au début de ce projet, nous avons sélectionné la partie N-Terminale de la famille des Gasdermines et une forme tronquée de MLKL pour leur capacité à induire directement (sans signaux supplémentaires d'activation) la mort cellulaire et tuer les cellules tumorales de façon inflammatoire. Le rationnel de ce choix était d'outrepasser tous les mécanismes de résistance intrinsèques mis en place par les tumeurs (comme la perte d'expression des protéines participant à l'activation de la pyroptose ou de la nécroptose) pour limiter l'induction de la MCI. L'idée initiale était donc d'utiliser ces protéines directement actives afin de tuer les cellules tumorales de façon inflammatoire pour stimuler le SI sans que les cellules tumorales aient la possibilité d'activer des mécanismes de résistance. Récemment, il a été montré que la libération de DAMPs et la rupture de la membrane plasmique n'étaient pas un événement passif (comme il a été supposé pendant des années) mais nécessite l'action d'une protéine transmembranaire appelée NINJ-1 (Kayagaki et al., 2021). Les mécanismes associés à cette protéine restent encore incompris mais l'oligomérisation de NINJ-1 est nécessaire afin d'induire la perméabilisation

membranaire et l'induction de la MCI. D'ailleurs, le KO de NINJ-1 dans des cellules mononucléées sanguines de souris abolit totalement la libération de DAMPs après induction de la pyroptose et de la nécroptose. Cette récente découverte peut être un frein important dans nos stratégies. Il serait d'ailleurs intéressant d'évaluer l'expression de cette protéine dans les différentes lignées utilisées dans ce projet afin de mieux décortiquer les résultats obtenus. En effet, il est possible que l'induction de la MCI *in vivo* ne soit pas de la même amplitude en fonction de l'expression de NINJ-1 par les cellules tumorales. D'ailleurs, l'utilisation de lignées tumorales NINJ-1^{-/-} pourrait être un élément intéressant afin d'évaluer ce paramètre.

Tableau 10 - Résumé des expériences *in vivo* où l'injection intratumorale d'AAVs codant pour les effecteurs de la MCI ont été évalués

Lignée tumo-rale	AAVs injectés	ICIs	Expérience fig. 23	Expérience fig. 25	Expérience fig. 24	Pourcentage de souris vivantes (jour après inoculation de la tumeur)
			Volume moyen à J16 (en mm ³)	Volume moyen à J16 (en mm ³)	Volume moyen à J21 (en mm ³)	
B16-F10	AAV2-MLKL	non	369	/	/	16 % (50)
	AAV2-GSDMD	non	418	/	/	16 % (50)
	AAV2-GSDME	non	696	/	/	0 % (26)
		anti-PD-1	/	60	/	0 % (44)
		isotype control	/	590	/	0 % (26)
	AAV2-GFP	anti-PD-1	/	342	/	0 % (32)
		isotype control	/	536	/	0 % (30)
non		648	/	/	0 % (30)	
MC38	AAV2-GFP	non	/	/	1174	20 % (50)
	AAV2-GSDME	non	/	/	731	42 % (50)

Positionnement de nos stratégies vis-à-vis de la littérature :

A ce jour, bien que la capacité de la pyroptose et de la nécroptose à libérer des DAMPs ne soit plus à prouver, aucune étude n'a encore comparé quantitativement la libération de ces molécules inflammatoires entre ces deux morts cellulaires ainsi que leur capacité à stimuler les réponses immunitaires *in vivo*. L'apport principal de notre première étude a été de combler ce manque et tenter de hiérarchiser la libération des principaux DAMPs connus pour induire la MCI. Les résultats obtenus *in vitro* montrant que la GSDME est la molécule qui permet de libérer le maximum de DAMPs corrélerent avec ceux obtenus *in vivo* dans le protocole de vaccination prophylactique. En effet dans ces protocoles, la pyroptose médiée par la GSDME permet une forte protection contre la pousse d'une tumeur secondaire ce qui est moins le cas pour la GSDMD et MLKL. Ces expérimentations – faciles à mettre en place – pourraient être étendues à d'autres morts cellulaires afin de compléter cette première étude comparative. Également, il serait intéressant d'augmenter le nombre de molécules inflammatoires évaluées et d'inclure par exemple la libération d'IFN mais aussi la phosphorylation d'eIF2 α qui sont des marqueurs importants de la MCI (Bezu et al., 2018; Humeau, Leduc, et al., 2020). L'intégration de nouveaux critères pourrait aussi permettre de mieux caractériser les différences entre ces morts cellulaires et ainsi mieux déchiffrer les résultats obtenus *in vivo* (Workenhe et al., 2021). Pour aller plus loin, l'étude des modifications post-traductionnelles des molécules libérées serait un élément important à étudier car plusieurs travaux, notamment sur l'apoptose, montrent – comme dans l'apoptose – que certaines MPTs peuvent enrayer le pouvoir inflammatoire des DAMPs. Cela permettrait donc de mieux stratifier et comprendre le pouvoir immunogène différentiel de ces voies moléculaires.

Quant à l'utilisation de vecteurs AAVs codant des molécules capables d'induire la mort cellulaire des cellules tumorales, cela a déjà été investigué en utilisant des stratégies diverses et variées. De fait, *Mohr et al.* ont montré qu'une seule injection intratumorale d'un AAV2 codant TRAIL permettait de réduire la croissance de cellules tumorales colorectales chez la souris (Mohr et al., 2004). Basée sur ces résultats une autre équipe a montré que l'association de ce traitement à l'injection d'une drogue alkylante comme le cisplatine permettait d'augmenter la production de TRAIL et d'améliorer de ce fait son effet anti-tumoral (Jiang et al., 2011). En accord avec ces stratégies, *Snyder et al.* ont montré que l'injection intratumorale d'un AAV-DJ codant pour RIPK3 (molécule qui phosphoryle et active MLKL) entraîne un fort ralentissement de la croissance tumoral en synergie avec les ICI (Snyder et al., 2019). Toutefois, ce type de

méthode repose sur l'induction de voies de signalisations particulières qui doivent déjà être actives et efficaces en amont de la molécule ciblée. Or, ces voies sont pour la plupart inhibées dans les cellules tumorales ce qui cause des résistances intrinsèques à ce type de thérapie (Ertao et al., 2016; L. He et al., 2013; Pfeiffer & Singh, 2018; Ruan et al., 2015). Pour contrer ces mécanismes, d'autres équipes ont développé un AAV codant le gène suicide HSV-TK (pour « *herpès simplex virus thymidine kinase* ») - ou une forme mutée hyper active de cette enzyme – créant un métabolite toxique du ganciclovir et tuant de ce fait les cellules transduites (J. Y. Kim et al., 2011; Trepel et al., 2015). Cependant, ces stratégies nécessitent l'utilisation de drogues qui peuvent avoir des effets secondaires importants. La découverte récente de l'action cytotoxique directe des Gasdermines et de MLKL pourrait permettre d'outrepasser les phénomènes de résistances mis en place par les tumeurs mais aussi de simplifier la méthodologie utilisée. Dans une étude publiée récemment, *Lu et al.* ont produit des AAVs codant la GSDMD montrant des effets bénéfiques dans différents modèles tumoraux précliniques (Y. Lu et al., 2021). Toutefois, les Gasdermines sont des gènes qui peuvent induire une forte toxicité - lors de la production d'AAV codant pour ces molécules – réduisant de ce fait la quantité totale de vecteurs générés. Pour s'affranchir de cela, *Lu et al.* ont développé une première stratégie consistant à utiliser un promoteur spécifique de mammifère appelé CBA (pour « *CMV enhancer/chicken β -actin* ») qui empêche l'expression de la GSDMD dans les cellules d'insectes sf9 lors de la production des vecteurs et permet d'obtenir un haut titre d'AAVs codant la GSDMD (appelé rAAV-P1) (Y. Lu et al., 2021). L'utilisation d'un promoteur spécifique a d'ailleurs déjà été utilisé par d'autres équipes afin de cibler des cellules de schwannome (promoteur P0) avec des effets encourageant sur le ralentissement de la croissance tumorale (Ahmed et al., 2019). Pour éviter la toxicité pendant l'encapsidation du transgène codant la GSDMD, une deuxième stratégie développée par *Lu et al.* consiste à utiliser le système de recombinaison Cre/lox afin de produire la GSDMD uniquement après l'action d'une recombinaison Cre (Y. Lu et al., 2021). Pour ce faire, les auteurs ont produit un AAV-DJ codant pour la GSDMD génétiquement inversée bordée de deux sites Lox syntropiques. Après transduction de la même cellule par un autre AAV-DJ codant pour une recombinaison Cre, la séquence codante de la GSDMD est inversée induisant donc la production d'une GSDMD active capable d'induire une mortalité cellulaire (méthode appelée rAAV-P2). De surcroît, l'injection unique de 1.10^{10} gv de l'AAV-P2 dans le glioblastome de rat (7 jours après l'inoculation de la tumeur), dans un modèle de cancer de sein murin (6 jours après l'inoculation de la tumeur) a montré que l'injection intratumorale de ces vecteurs permettait de réduire la croissance tumorale et d'augmenter la survie (Y. Lu et al., 2021). En outre, la synergie avec une injection intrapéritonéale durant 7 jours consécutifs

d'un anticorps dirigé contre PD-L1 a entraîné un fort ralentissement de la croissance tumorale. Il a également été observé, dans ces mêmes expériences, une augmentation du nombre de cellules immunitaires infiltrant la tumeur notamment les cellules CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺ et CD49b⁺ mettant en exergue l'induction d'une RI antitumorale. Cependant, ce système Cre/lox nécessite que deux vecteurs différents transduisent une même cellule et que les deux transgènes s'expriment pour induire l'expression de la GSDMD ce qui peut être une étape limitante. Cela peut retarder dans le temps l'effet de l'induction de la MCI dans le contexte tumoral et permettre à la tumeur d'initier des mécanismes favorables à sa croissance. Dans ce projet de thèse, nous avons fait appel à l'expertise de la société Virovek qui a développé une méthode consistant à introduire un intron de mammifère dans la séquence codante des protéines toxiques. Cet intron induira la production d'un pré-ARNm dans les cellules procaryotes d'insecte sf9 aboutissant à la production d'une protéine tronquée non-fonctionnelle par création d'un codon stop prématuré. Cet intron sera retiré après l'épissage du pré-ARNm en ARNm dans les cellules de mammifère ce qui permettra la production d'une protéine fonctionnelle capable d'induire la mort de la cellule d'intérêt. Notre stratégie permet donc d'augmenter grandement la quantité de vecteurs générés tout en simplifiant les méthodes de production et d'expression du transgène comparé aux autres méthodologies déjà proposées. En effet, la transduction représente une étape limitante dans la production de la protéine d'intérêt par la cellule cible et l'utilisation d'un seul vecteur semble donc être une méthodologie de choix comparée aux autres technologies précédemment citées. Toutefois, d'autres choix intrinsèques aux propriétés des AAVs et à la cassette d'expression du transgène peuvent également permettre d'augmenter la production de la protéine par la cellule tumorale. C'est pourquoi, l'optimisation et le développement de nouveaux vecteurs fait partie intégrante des voies d'amélioration de ce projet.

Sérotypes des AAVs et promoteurs

Dans nos expériences, nous avons préalablement sélectionné un AAV2 car ce sérotype possède un large tropisme cellulaire. Cette caractéristique nous permet de cibler et tuer directement la plupart des cellules du MET incluant des cellules délétères pour la mise en place d'une RI telles que les Tregs et les MDSC. Cependant, ce large tropisme est aussi un inconvénient car ce sérotype peut potentiellement cibler et tuer des cellules du SI, telles que les cellules dendritiques et les LyT, empêchant donc la mise en place d'une réponse immunitaire efficace contre la tumeur. Pour améliorer nos protocoles, le choix du sérotype de l'AAV est donc un point important afin de cibler plus spécifiquement et d'améliorer la transduction de certaines

cellules du MET. Pour ce faire, nous avons évalué l'intérêt de différents sérotypes notamment les plus communément utilisés comme l'AAV1, l'AAV2, l'AAV6, l'AAV8.2, l'AAV9 et l'AAV-DJ. Des expériences *in vitro* utilisant ces différents sérotypes codant la GFP nous ont permis de montrer que l'AAV2, l'AAV6 et l'AAV-DJ transduisaient le mieux les cellules tumorales B16-F10, MC38 et CT26. Ces sérotypes portent donc tout notre intérêt dans le développement futur de nouveaux vecteurs. Il est important pour la suite de ce projet d'investiguer sur la transduction différentielle des cellules du MET par ces différents sérotypes afin de développer un vecteur ciblant différents compartiments du MET. Le but étant à terme d'évaluer s'il est préférable de cibler directement les cellules tumorales afin de libérer un maximum d'antigènes tumoraux en parallèle de la libération des DAMPs ou s'il est plus efficace de directement tuer les cellules immunosuppressives.

Dans la cassette d'expression du transgène, nous avons sélectionné le promoteur CMV car il s'agit d'un promoteur ubiquitaire permettant une forte expression du transgène dans le plus grand nombre de cellules. Cependant, durant cette thèse, la capacité de transduction des différents vecteurs a été évaluée en utilisant des vecteurs codant la GFP sous la coupe d'un promoteur CAG. La comparaison *in vitro* du niveau d'expression de la GFP dans les cellules tumorales transduite par un AAV2-GFP sous contrôle du promoteur CAG ou CMV a montré que ce dernier est beaucoup moins efficace que ce soit dans le modèle MC38 ou B16-F10. Ainsi, bien que le promoteur CMV soit ubiquitaire, il n'est peut-être pas le meilleur candidat pour induire une forte expression de nos protéines d'intérêt dans le MET. Le changement de promoteur dans la confection des futurs vecteurs est un point à prendre en considération afin d'obtenir des résultats optimaux.

Différences et atouts des AAVs par rapport aux vecteurs oncolytiques

L'utilisation de virus oncolytiques est une nouvelle stratégie afin de détruire spécifiquement les cellules tumorales laissant intactes les cellules non cancéreuses (Lin et al., 2023). Les virus oncolytiques vont cibler les cellules tumorales en se fixant à des récepteurs spécifiques exprimés par la tumeur et prennent avantage de la baisse d'expression de gènes impliqués dans la lutte antivirale par les cellules tumorales. La plupart des virus oncolytiques sont capables d'induire la mort cellulaire immunogénique permettant la libération de molécules inflammatoires comme les DAMPS initiant les RI antitumorales (Lin et al., 2023). Ces vecteurs peuvent aussi être génétiquement modifiés pour exprimer des gènes thérapeutiques afin d'augmenter leur action anti-tumorale. Cependant, l'efficacité du traitement peut être réduite par l'induction

d'une RI antivirale. Également, on retrouve une grande pathogénicité pour certains de ces vecteurs et la présence au préalable d'anticorps neutralisant limitent grandement l'infectivité de ces vecteurs oncolytiques (Lin et al., 2023).

En comparaison, les AAVs sont peu immunogènes, ne possèdent pas de capacité répliquative, ne s'intègrent pas dans le génome de la cellule hôte et permettent une production importante sur le long terme du gène d'intérêt. De plus, ils pénètrent plus efficacement les tumeurs solides que les adénovirus et ces vecteurs ont déjà été utilisés dans le contexte tumoral (Enger et al., 2002; Santiago-Ortiz & Schaffer, 2016; Thorsen et al., 2006). Les AAVs possèdent cependant une capacité d'encapsulation du génome viral limitée (4,7 Kb maximum) diminuant l'utilisation de certains gènes thérapeutiques de grande taille. Comme pour les AAVs, il est possible de spécifiquement changer le tropisme des vecteurs oncolytiques. Toutefois, les connaissances sur la biologie et la modification de la capsidie des AAVs sont plus étendues et permettent plus facilement de modifier le tropisme de ces vecteurs (Büning & Srivastava, 2019). Précisément, les AAVs peuvent être aisément modifiés par différentes techniques comme l'insertion de peptides dans la capsidie, la création de capsides chimériques ou par insertions de mutations spécifiques permettant de cibler préférentiellement certaines cellules. D'autres études antérieures du laboratoire ont d'ailleurs permis de produire un AAV transduisant préférentiellement les cellules dendritiques proposant un outil de choix pour cibler ces cellules dans le MET (Rossi et al., 2019).

Les vecteurs oncolytiques sont pour la plupart très fortement immunogènes ce qui est un avantage dans le cas de l'induction d'une RI antitumorale. Toutefois, ces fortes réponses limitent l'efficacité de cette thérapie en empêchant la persistance et la transduction des cellules du MET par les vecteurs oncolytiques (Lemos De Matos et al., 2020). En effet, on estime que la fenêtre thérapeutique se situe entre 1 à 2 semaines avant que le virus oncolytique ne soit éliminé par le SI (Lemos De Matos et al., 2020). Malgré la faible immunogénicité des AAVs comparé aux virus oncolytiques, l'induction d'une RI spécifique de la capsidie mais aussi du transgène sont des freins importants dans les protocoles de thérapies géniques (Ronzitti et al., 2020). La séroprévalence est la plus forte pour l'AAV2 et l'AAV1 dans la population générale ce qui entrave fortement l'utilisation de ces sérotypes en clinique (Boutin et al., 2010; Calcedo et al., 2009). D'autre part, l'AAV8 et 9 ont une faible séroprévalence mais un faible titre d'anticorps neutralisants est suffisant pour entraver la capacité de transduction de ces vecteurs (Boutin et al., 2010; Calcedo et al., 2009; Manno et al., 2006). Cependant, les motifs importants à la détection par le SI de ces vecteurs sont de mieux en mieux compris ce qui tend au développement de variants très peu immunogènes permettant une transduction plus efficace limitant

fortement la RI (Ronzitti et al., 2020). (Lemos De Matos et al., 2020)(Lemos De Matos et al., 2020) (Ronzitti et al., 2020) De plus, ces nouveaux variants pourraient permettre une injection répétée sans craindre une baisse de l'efficacité thérapeutique dans le temps à cause de l'induction d'une RI humorale et cellulaire. Concernant nos stratégies, nous n'avons pas encore évalué l'induction d'une RI humorale dirigée contre la capsid virale mais nous avons prélevé les échantillons nécessaires à l'évaluation de ce critère. C'est d'ailleurs un élément important afin de mieux comprendre si l'induction d'une RI contre le vecteur est un élément expliquant les résultats mitigés obtenus avec les AAVs dans les différents modèles tumoraux.

Limites des modèles

Le modèle de mélanome murin B16-F10 a été initialement sélectionné à partir d'un mélanome spontané de souris C57Bl/6 et pour sa capacité à coloniser le poumon après leur injection par voie intraveineuse (Nicolson et al., 1978). Une fois les métastases pulmonaires établies, cette première sélection a été appelée B16.F0 et a été réinjectée dans la veine caudale pour une seconde sélection des métastases pulmonaires. Ce processus a été répété 10 fois pour aboutir à la production des cellules B16-F10. Le temps de doublement est estimé à 2-3 jours *in vivo* pour ce modèle et offre une fenêtre de 20-25 jours en moyenne (pour les animaux non traités) afin d'évaluer l'intérêt de stratégies anticancéreuses avant que des points limites éthiques soient atteints. Ce modèle est connu pour être un modèle très faiblement immunogénique contrairement au mélanome humain (Lechner et al., 2013). Des études chez la souris mais aussi chez l'homme ont montré que l'expression du CMH de classe I par les cellules tumorales était un bon facteur prédictif de l'immunogénicité des tumeurs et plus largement de leur réponse aux différentes immunothérapies (Lechner et al., 2013). Cependant, l'expression du CMH de classe I est très faible dans ce modèle et sa réexpression est dépendante de la production d'IFN- γ par les cellules immunitaires. Ces mécanismes rendent donc difficile l'induction d'une RI antitumorale efficace. De plus, la stimulation prolongée des cellules tumorales par l'IFN- γ entraîne des altérations de l'ADN génomique qui participe à l'hétérogénéité tumorale favorisant ainsi leur croissance et leur résistance au SI (Takeda et al., 2017). Il est donc difficile d'induire une RI antitumorale au vu de tous les éléments mis en place par la tumeur pour échapper à l'action du SI. Ce modèle est d'ailleurs très peu sensible aux ICIs ce qui en fait un modèle de choix pour évaluer l'intérêt de stratégies ayant pour but d'augmenter la sensibilité des tumeurs aux ICIs.

Comme B16-F10, le modèle de carcinome du colon MC38 est l'un des plus utilisés pour la réalisation d'études précliniques dans le domaine du cancer. Il possède un fort taux mutational, est sensible aux ICIs et permet l'induction d'une réponse T CD8⁺ endogène contre des néoantigènes tumoraux (Schrörs et al., 2023). Le modèle a été établi en 1975 après une injection répétée du carcinogène diméthylhydrazine chez la souris C57BL/6. Certaines équipes ont séquencé ce modèle et révélé une multitude de néoantigènes immunogéniques pour MC38 comme Adpgk ou Rpl18 (Hos et al., 2019; Yadav et al., 2014). Cependant, ces études ont été réalisées dans une lignée MC38 particulière appelée MC-38L en rapport au laboratoire Leiden qui possède ce modèle depuis la moitié des années 1990. Dans notre étude, nous avons utilisé le modèle MC38 vendu par la société Kerafast (appelé MC38K) qui possède des caractéristiques différentes (Schrörs et al., 2023). De fait, des études *in vitro* ont montré que MC38K était incapable d'induire l'activation et l'expansion de LyT spécifiques contrairement au MC38L. Au vu de ces différences d'activation, *Schrörs et al.* ont effectué une analyse génomique et transcriptomique de ces deux lignées cellulaires. Cette étude a permis de montrer que MC38K ne disposait pas des mutations spécifiques dans les néoantigènes Adpgk et Rpl18 nécessaires à l'activation du SI (Schrörs et al., 2023) Ainsi, l'utilisation du modèle MC38L dans le cadre de notre étude aurait peut-être permis d'induire une RI plus forte et d'obtenir des différences plus marquées entre nos groupes traités et contrôle notamment avec l'AAV codant la GSDME. Il serait intéressant de comparer l'effet de l'injection de cet AAV dans les deux modèles mais aussi d'évaluer la réponse immunitaire induite.

Ces deux modèles étant faiblement immunogéniques, l'induction d'une RI semble difficile à obtenir. Cependant, cette caractéristique était nécessaire pour répondre à l'un des objectifs de ce projet qui était d'augmenter l'immunogénicité des tumeurs afin de les rendre sensibles aux ICIs. D'ailleurs, nos résultats dans le modèle B16-F10 montrent que l'injection intratumorale d'un AAV codant la GSDME avec un anticorps dirigé contre PD-1 entraîne un fort ralentissement de la croissance tumorale associée à une augmentation de la survie des souris. Nous supposons que ces effets sont dus à une modification du MET favorable à l'induction d'une RI antitumorale. Il serait nécessaire d'étudier si ce traitement accentue l'infiltrat immunitaire dans la tumeur ainsi que l'augmentation de l'activité des cellules immunitaires. Pour aller plus loin, la triple injection d'AAVs codant pour les effecteurs moléculaires de la pyroptose ou de la nécroptose dans le modèle B16-F10 n'entraîne aucun ralentissement de la croissance tumorale. Cependant, leur injection combinée avec un anticorps dirigé contre PD-1 – une

molécule exclusivement exprimée par les cellules immunitaires – enrayer fortement la croissance tumorale et augmente la survie. Cet élément est un fort argument en faveur de l'induction d'une RI antitumorale mais il est indispensable de la monitorer *in vivo*. Pour cela, l'optimisation des ELISPOTs est nécessaire, notamment en stimulant préalablement les cellules immunitaires avec de l'IL-2 afin d'augmenter la détection d'une RI spécifique d'antigènes tumoraux. En supplément, le transfert adoptif de cellules immunitaires possédant un TCR dirigé contre l'ovalbumine (cellules CD4⁺ OT2 et CD8⁺ OT1) nous permettrait d'évaluer l'impact de nos stratégies sur l'activation de ces cellules dans un modèle exprimant l'ovalbumine comme B16-F10.

Induction de la MCI avec d'autres ICI

La découverte des inhibiteurs des points de contrôles immunitaires a révolutionné le traitement des cancers même si encore peu de patients en bénéficient. Les principaux ICI utilisés en clinique sont dirigés contre CTLA-4, PD-1 et PD-L1 même si l'évaluation de l'intérêt thérapeutique d'autres molécules comme TIM-3 ou LAG-3 est en cours d'investigation.

L'utilisation des anticorps monoclonaux bloquant les points de contrôles immunitaires est une thérapie que nous avons évalué dans nos expériences en synergie avec les AAVs. Ceci a été réalisé sur le modèle B16-F10 avec un anticorps monoclonal dirigé contre PD-1. Ces résultats nous montrent que même si l'injection intratumorale d'AAVs codant la GSDME seule n'induit pas de ralentissement de la croissance tumorale, bloquer le récepteur PD-1 ralentit fortement le développement de la tumeur. L'induction d'une mort cellulaire inflammatoire comme la pyroptose n'est donc pas suffisante à elle seule pour contrebalancer les mécanismes immunosuppresseurs mis en place par la tumeur. L'adjonction d'une thérapie ciblée bloquant l'action de PD-1 permet de lever un frein moléculaire mais n'est pas suffisant pour entraîner un rejet tumoral. Dans les futures expériences, l'administration d'autres ICI est une perspective intéressante pour améliorer les résultats obtenus et aboutir au rejet tumoral. Comme CTLA-4 joue un rôle dans les phases précoces de la RI et PD-1 sur des phases plus tardives, on pourrait imaginer utiliser ces deux stratégies à des moments différents dans nos protocoles expérimentaux. Effectivement, le blocage de la voie CTLA-4 agit sur l'activation et la prolifération lymphocytaire et diminue l'activité des Tregs. Néanmoins, l'efficacité de cette thérapie dépend de la présence, au préalable, d'un profil de lymphocytes aptes à induire une RI. Or, il semble que nos modèles tumoraux soient faiblement immunogéniques avec un infiltrat immunitaire fortement immunosuppresseur. Il est donc possible que le blocage combiné de ces deux voies n'entraîne pas d'effets cumulatifs. Pour finir, comme PD-L1 se retrouve fortement exprimé dans

différents cancers, le blocage de ce récepteur est une cible de choix afin d'augmenter la sensibilité des tumeurs aux immunothérapies. Le ciblage de ce récepteur en addition à l'induction de la MCI avec les AAVs codant les effecteurs de la pyroptose ou de la nécroptose est une autre stratégie envisagée dans ce projet.

Morts immunogéniques et cytokines

Afin de modifier le MET et permettre d'établir un environnement propice au déclenchement d'une réponse antitumorale, d'autres stratégies impliquant des cytokines sont envisagées. Dans notre projet nous avons initialement choisi l'IL-18 car c'est une cytokine qui induit une production d'IFN- γ par les cellules T et NK permettant la mise en place d'une inflammation locale (Dinarelo et al., 2013). D'ailleurs la production de cette cytokine se retrouve dérégulée dans le cancer colorectal et sa diminution est associée à une plus forte croissance tumorale et la survenue de métastases (Allen et al., 2010; Daley et al., 2017; Zaki et al., 2010). Comme précédemment établi, dans le modèle B16-F10 la production d'IFN- γ est une condition nécessaire à l'expression du CMH-I permettant l'initiation des RI antitumorales. Dans ce contexte, l'utilisation de l'IL-18 nous semblait être une bonne stratégie pour déjouer ce mécanisme d'échappement tumoral. Malheureusement, dans nos expériences *in vivo* l'utilisation de cette cytokine n'a pas eu les effets escomptés. Précisément, l'utilisation d'un plasmide codant pour la GSDMD, la GSDME ou MLKL en combinaison avec l'IL-18 dans le modèle de vaccination a totalement annihilé les effets obtenus avec les effecteurs de la pyroptose ou de la nécroptose seuls. De plus, lors de l'injection intratumorale des AAVs, l'AAV codant la GSDME et l'IL-18 ne permet pas d'obtenir les mêmes effets anti-tumoraux que l'AAV codant la GSDME seule ou associée à l'anti-PD-1. Ces résultats peuvent s'expliquer de différentes manières : i) l'IL-18 est délétère dans le modèle de mélanome murin B16-F10 que ce soit dans le modèle vaccinal ou thérapeutique, ii) bien que l'amplitude de l'induction de la MCI ne semble pas être différente *in vitro*, il est possible qu'elle soit différente avec ces constructions bi-cistroniques *in vivo*, et iii) l'induction d'une MCI rapide par les effecteurs de la pyroptose ou de la nécroptose ne laisse pas le temps à la cellule de produire assez d'IL-18 pour en tirer les bénéfices. *Cho et al.* ont d'ailleurs montré que le mélanome murin et humain produisait de l'IL-18 et son récepteur. Par un mécanisme de stimulation autocrine, la tumeur exprime en retour FasL – une molécule intervenant dans la survie des lymphocytes – tuant les cellules immunitaires ce qui permet la mise en place d'un MET bénéfique à la tumeur (D. Cho et al., 2000). Pris en considération, ces différents éléments ont modifié l'approche que nous souhaitons développer. Effectivement,

nous pensons que nos constructions induisent une mortalité cellulaire trop rapidement ce qui empêche la production d'une quantité suffisante de cytokines afin d'avoir un réel effet biologique. Par conséquent, dans des expériences en cours de réalisation au laboratoire, nous souhaitons développer des AAVs codant seulement des cytokines pro-inflammatoires. *Hotz et al.* ont d'ailleurs montré que la seule injection intratumorale d'une mixture d'ARNm codant pour l'IFN- α 4, l'IL-12sc (pour « *single chain* »), l'IL-15 sushi et le GM-CSF entraînait un fort ralentissement de la croissance tumorale en synergie avec un anticorps dirigé contre PD-1 (*Hotz et al., 2021*). Nous avons donc mis au point des vecteurs AAVs codant ces quatre cytokines qui seront évalués dans le contexte tumoral mais aussi en association avec l'induction de la MCI dans le but d'augmenter les RI antitumorales et d'induire un rejet tumoral important.

Modèle translationnel chez l'homme

A ce jour, on recense seulement deux essais cliniques dans le domaine du cancer qui utilisent des vecteurs AAVs. Le premier traitement implique une injection unique de lymphocytes T cytotoxiques spécifiques de l'antigène carcinoembryonnaire (CEA) et activés par des cellules dendritiques transduites avec AAV2-CEA. Ce traitement est testé chez les patients atteints d'un cancer gastrique avancé et peut être trouvé sur ClinicalTrials.gov sous l'identifiant NCT02496273. Le deuxième traitement implique l'utilisation d'AAV2-hAQP1 et est étudié chez les patients atteints d'un cancer de la tête et du cou à cellules squameuses. Ce traitement peut être trouvé sur ClinicalTrials.gov sous l'identifiant NCT02602249. Il existe donc peu de comparaison afin d'envisager de transposer nos stratégies chez l'homme. Cependant, la première question à se poser est de savoir dans quel type de tumeur l'injection des AAVs codant pour la pyroptose ou la nécroptose serait la plus judicieuse. Premièrement, le choix d'une tumeur où les acteurs moléculaires de la pyroptose ou de la nécroptose sont réprimés peut-être un argument important afin d'imaginer ce protocole chez l'homme. De fait, si ces voies cellulaires sont réprimées c'est qu'elles possèdent des effets négatifs pour la tumeur et la réactivation de ces voies pourrait donc entraîner des effets thérapeutiques intéressants. Certaines tumeurs telles que le cancer du sein, le cancer colorectal ou la leucémie myéloïde aiguë présentent une sous-régulation des acteurs de la nécroptose ou de la pyroptose et pourrait donc être de bons candidats (*Koo et al., 2015; Z. Zhang et al., 2020*). Toutefois, l'injection des AAVs doit prendre place dans une tumeur solide car l'administration systémique de vecteurs codant des éléments hautement inflammatoires pourrait causer de forts effets secondaires délétères pour les patients.

En outre, les résultats obtenus dans des modèles précliniques pourraient ne pas être directement transposables chez l'homme. En effet, dans le modèle murin, l'injection des AAVs est réalisée dès lors que la tumeur s'installe tandis que chez l'homme ce sont des événements moléculaires établis sur plusieurs années qui entraînent l'apparition de cette dernière. Généralement, le diagnostic de cancer chez l'homme se fait avec l'apparition des symptômes au moment où la tumeur possède déjà une taille conséquente et au terme de plusieurs années d'« *immunoéditing* » tumoral. La tumeur est donc plus difficilement rejetable que certains de nos modèles murins. Bien que le modèle B16-F10 soit préalablement sélectionnée pour être fortement façonnée par le SI, on ne peut pas être sûr que les résultats soient réellement les mêmes chez l'homme et cela dépend fortement du type de tumeurs, de la qualité du microenvironnement tumoral (tumeur dite « froide » ou « chaude » d'un point de vu immunitaire) mais aussi du stade de la maladie au moment de l'injection.

Une autre possibilité pourrait consister à choisir un modèle tumoral ayant déjà éprouvé une virothérapie à titre de comparaison comme le mélanome où l'injection intratumorale d'un virus oncolytique codant pour le GM-CSF a montré des effets probants. Le mélanome à l'avantage d'être une tumeur facilement injectable car accessible chirurgicalement. Dans le cadre des autres tumeurs, une technique d'injection chirurgicale serait nécessaire mais ne me semble pas être un frein important de nos jours.

Concernant l'adjonction de différentes thérapies, nous pourrions imaginer un protocole combiné entre la chimiothérapie, l'immunothérapie par anticorps et par vecteurs AAVs. Dans un tel protocole combiné, il me semble important de séparer temporellement la chimiothérapie des deux autres thérapies. En effet, les protocoles actuels de chimiothérapie utilisent un « cocktail » de différentes drogues avec des mécanismes d'action différents et des effets secondaires importants comme l'aplasie diminuant fortement l'action du système immunitaire. L'administration des AAVs et des ICIs doit donc se faire à distance du protocole de chimiothérapie afin de stimuler le plus efficacement le système immunitaire et induire une RI antitumorale efficace.

Bibliographie

- Aglietti, R. A., Estevez, A., Gupta, A., Ramirez, M. G., Liu, P. S., Kayagaki, N., Ciferri, C., Dixit, V. M., & Dueber, E. C. (2016). GsdmD p30 elicited by caspase-11 during pyroptosis forms pores in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(28), 7858-7863. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607769113>
- Ahmed, S. G., Abdelnabi, A., Doha, M., & Brenner, G. J. (2019). Schwannoma gene therapy by adeno-associated virus delivery of the pore-forming protein Gasdermin-D. *Cancer Gene Therapy*, *26*(9-10), 259-267. <https://doi.org/10.1038/s41417-018-0077-3>
- Ahrens, S., Zelenay, S., Sancho, D., Hanč, P., Kjær, S., Feest, C., Fletcher, G., Durkin, C., Postigo, A., Skehel, M., Batista, F., Thompson, B., Way, M., Reis e Sousa, C., & Schulz, O. (2012). F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity*, *36*(4), 635-645. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2012.03.008>
- Akino, K., Toyota, M., Suzuki, H., Imai, T., Maruyama, R., Kusano, M., Nishikawa, N., Watanabe, Y., Sasaki, Y., Abe, T., Yamamoto, E., Tarasawa, I., Sonoda, T., Mori, M., Imai, K., Shinomura, Y., & Tokino, T. (2007). Identification of DFNA5 as a target of epigenetic inactivation in gastric cancer. *Cancer Science*, *98*(1), 88-95. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00351.x>
- Albert, B. M. L., Pearce, S. F. A., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., & Bhardwaj, N. (1998). Immature Dendritic Cells Phagocytose Apoptotic Cells via α . *J. Exp. Med.*, *188*(7).
- Allen, I. C., Tekippe, E. M. E., Woodford, R. M. T., Uronis, J. M., Holl, E. K., Rogers, A. B., Herfarth, H. H., Jobin, C., & Ting, J. P. Y. (2010). The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *Journal of Experimental Medicine*, *207*(5), 1045-1056. <https://doi.org/10.1084/jem.20100050>
- Alvarez, C., Casallanovo, F., Shida, C. S., Nogueira, L. V., Martinez, D., Tejuca, M., Pazos, I. F., Lanio, M. E., Menestrina, G., Lissi, E., & Schreier, S. (2003). Binding of sea anemone pore-forming toxins sticholysins I and II to interfaces—Modulation of conformation and activity, and lipid-protein interaction. *Chemistry and physics of lipids*, *122*(1-2), 97-105. [https://doi.org/10.1016/S0009-3084\(02\)00181-0](https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00181-0)
- Apetoh, L., Ghiringhelli, F., Tesniere, A., Obeid, M., Ortiz, C., Criollo, A., Mignot, G., Maiuri, M. C., Ullrich, E., Saulnier, P., Yang, H., Amigorena, S., Ryffel, B., Barrat, F. J., Saftig, P., Levi, F., Lidereau, R., Nogues, C., Mira, J. P., ... Zitvogel, L. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nature medicine*, *13*(9), 1050-1059. <https://doi.org/10.1038/NM1622>
- Arnež, K. H., Kindlova, M., Bokil, N. J., Murphy, J. M., Sweet, M. J., & Gunčar, G. (2016). Analysis of the N-terminal region of human MLKL, as well as two distinct MLKL isoforms, reveals new insights into necroptotic cell death. *Bioscience Reports*, *36*(1), 1-7. <https://doi.org/10.1042/BSR20150246>
- Au, H. K. E., Isalan, M., & Mielcarek, M. (2022). Gene Therapy Advances : A Meta-Analysis of AAV Usage in Clinical Settings. *Frontiers in Medicine*, *8*, 2746. <https://doi.org/10.3389/FMED.2021.809118/BIBTEX>
- Bainbridge, J. W. B., Smith, A. J., Barker, S. S., Robbie, S., Henderson, R., Balaggan, K., Viswanathan, A., Holder, G. E., Stockman, A., Tyler, N., Petersen-Jones, S., Bhattacharya, S. S., Thrasher, A. J., Fitzke, F. W., Carter, B. J., Rubin, G. S., Moore, A. T., & Ali, R. R. (2008). Effect of Gene Therapy on Visual Function in Leber's Congenital Amaurosis. *New England Journal of Medicine*, *358*(21), 2231-2239.

https://doi.org/10.1056/NEJMOA0802268/SUPPL_FILE/NEJM_BAIN-BRIDGE_2231SA1.PDF

- Bantel-Schaal, U., Delius, H., Schmidt, R., & zur Hausen, H. (1999). Human Adeno-Associated Virus Type 5 Is Only Distantly Related to Other Known Primate Helper-Dependent Parvoviruses. *Journal of Virology*, 73(2), 939-947. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.2.939-947.1999/AS-SET/9570655D-90B7-4A65-9E8A-20425F9EC750/AS-SETS/GRAPHIC/JV0291556006.JPEG>
- Barajas, D., Aponte-Ubillus, J. J., Akeefe, H., Cinek, T., Peltier, J., & Gold, D. (2017). Generation of infectious recombinant Adeno-associated virus in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS one*, 12(3). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0173010>
- Baroja-Mazo, A., Martín-Sánchez, F., Gomez, A. I., Martínez, C. M., Amores-Iniesta, J., Compan, V., Barberà-Cremades, M., Yagüe, J., Ruiz-Ortiz, E., Antón, J., Buján, S., Couillin, I., Brough, D., Arostegui, J. I., & Pelegrín, P. (2014). The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *Nature Immunology*, 15(8), 738-748. <https://doi.org/10.1038/ni.2919>
- Bezu, L., Sauvat, A., Humeau, J., Gomes-da-Silva, L. C., Iribarren, K., Forveille, S., Garcia, P., Zhao, L., Liu, P., Zitvogel, L., Senovilla, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2018). EIF2 α phosphorylation is pathognomonic for immunogenic cell death. *Cell death and differentiation*, 25(8), 1375-1393. <https://doi.org/10.1038/S41418-017-0044-9>
- Bhattacharya, S., Chalk, A. M., Ng, A. J. M., Martin, T. J., Zannettino, A. C., Purton, L. E., Lu, J., Baker, E. K., & Walkley, C. R. (2016). Increased miR-155-5p and reduced miR-148a-3p contribute to the suppression of osteosarcoma cell death. *Oncogene*, 35(40), 5282-5294. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.68>
- Blair, G. E., & Cook, G. P. (2008). Cancer and the immune system : An overview. *Oncogene*, 27(45), 5868. <https://doi.org/10.1038/ONC.2008.277>
- Block, M. S., & Markovic, S. N. (2009). The Tumor/Immune Interface : Clinical Evidence of Cancer Immunosurveillance, Immunoediting and Immunosubversion. *American Journal of Immunology*, 5(1), 29-49. <https://doi.org/10.3844/AJISP.2009.29.49>
- Bonaldi, T., Talamo, F., Scaffidi, P., Ferrera, D., Porto, A., Bachi, A., Rubartelli, A., Agresti, A., & Bianchi, M. E. (2003). Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO Journal*, 22(20), 5551-5560. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg516>
- Botto, M., & Walport, M. J. (2002). C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology*, 205(4-5), 395-406. <https://doi.org/10.1078/0171-2985-00141>
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M. F., & Masurier, C. (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population : Implications for gene therapy using AAV vectors. *Human gene therapy*, 21(6), 704-712. <https://doi.org/10.1089/HUM.2009.182>
- Brault, M., & Oberst, A. (2017). Controlled detonation : Evolution of necroptosis in pathogen defense. *Immunology and cell biology*, 95(2), 131-136. <https://doi.org/10.1038/ICB.2016.117>
- Büning, H., Huber, A., Zhang, L., Meumann, N., & Hacker, U. (2015). Engineering the AAV capsid to optimize vector-host-interactions. *Current opinion in pharmacology*, 24, 94-104. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2015.08.002>
- Büning, H., & Srivastava, A. (2019). Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, 12, 248-265. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.01.008>
- Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J., & Wilson, J. M. (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *The Journal of infectious diseases*, 199(3), 381-390. <https://doi.org/10.1086/595830>

- Canton, J., Bles, H., Henry, C. M., Buck, M. D., Schulz, O., Rogers, N. C., Childs, E., Zelenay, S., Rhys, H., Domart, M. C., Collinson, L., Alloatti, A., Ellison, C. J., Amigorena, S., Papayanopoulos, V., Thomas, D. C., Randow, F., & Reis e Sousa, C. (2021). The receptor DNGR-1 signals for phagosomal rupture to promote cross-presentation of dead-cell-associated antigens. *Nature immunology*, *22*(2), 140-153. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-00824-X>
- Chen, C. J., Kono, H., Golenbock, D., Reed, G., Akira, S., & Rock, K. L. (2007). Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nature Medicine*, *13*(7), 851-856. <https://doi.org/10.1038/nm1603>
- Chen, F. Y., Lee, M. T., & Huang, H. W. (2003). Evidence for membrane thinning effect as the mechanism for peptide-induced pore formation. *Biophysical journal*, *84*(6), 3751-3758. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)75103-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)75103-0)
- Chen, H. (2012). Exploiting the Intron-splicing Mechanism of Insect Cells to Produce Viral Vectors Harboring Toxic Genes for Suicide Gene Therapy. *Molecular therapy. Nucleic acids*, *1*(11), e57. <https://doi.org/10.1038/MTNA.2012.48>
- Chen, J., Chen, S., Li, B., Zhou, S., & Lin, H. (2023). A pyroptosis-related signature predicts prognosis and indicates immune microenvironment infiltration in glioma. *Cancer Medicine*, *12*(4), 5071-5087. <https://doi.org/10.1002/CAM4.5247>
- Chen, J., Kos, R., Garssen, J., & Redegeld, F. (2019). Molecular Insights into the Mechanism of Necroptosis : The Necrosome as a Potential Therapeutic Target. *Cells 2019, Vol. 8, Page 1486*, *8*(12), 1486. <https://doi.org/10.3390/CELLS8121486>
- Chen, J., Wang, H., Zhou, L., Liu, Z., Chen, H., & Tan, X. (2022). A necroptosis-related gene signature for predicting prognosis, immune landscape, and drug sensitivity in hepatocellular carcinoma. *Cancer Medicine*, *11*(24), 5079-5096. <https://doi.org/10.1002/CAM4.4812>
- Chen, K. W., Monteleone, M., Boucher, D., Sollberger, G., Ramnath, D., Condon, N. D., von Pein, J. B., Broz, P., Sweet, M. J., & Schroder, K. (2018). Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Science immunology*, *3*(26). <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAR6676>
- Chen, W., Wu, J., Li, L., Zhang, Z., Ren, J., Liang, Y., Chen, F., Yang, C., Zhou, Z., Sean Su, S., Zheng, X., Zhang, Z., Zhong, C. Q., Wan, H., Xiao, M., Lin, X., Feng, X. H., & Han, J. (2015). Ppm1b negatively regulates necroptosis through dephosphorylating Rip3. *Nature Cell Biology*, *17*(4), 434-444. <https://doi.org/10.1038/ncb3120>
- Chen, W., Zhou, Z., Li, S., Zhong, C. Q., Zheng, X., Wu, X., Zhang, Y., Ma, H., Huang, D., Li, W., Xia, Z., & Han, J. (2013). Diverse sequence determinants control human and mouse receptor interacting protein 3 (RIP3) and mixed lineage kinase domain-like (MLKL) interaction in necroptotic signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(23), 16247-16261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.435545>
- Chen, X., He, W. T., Hu, L., Li, J., Fang, Y., Wang, X., Xu, X., Wang, Z., Huang, K., & Han, J. (2016a). Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.100>
- Chen, X., He, W. T., Hu, L., Li, J., Fang, Y., Wang, X., Xu, X., Wang, Z., Huang, K., & Han, J. (2016b). Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. *Cell research*, *26*(9), 1007-1020. <https://doi.org/10.1038/CR.2016.100>
- Chiorini, J. A., Yang, L., Liu, Y., Safer, B., & Kotin, R. M. (1997). Cloning of adeno-associated virus type 4 (AAV4) and generation of recombinant AAV4 particles. *Journal of Virology*, *71*(9), 6823-6833. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.9.6823-6833.1997>
- Cho, D., Song, H., Kim Y, M., Houh, D., Hur D, Y., Park, H., Yoon, D., Pyunk K, H., Lee, W. J., Kurimoto, M., Kim Y, B., Kim Y, S., & Choi, I. (2000). *Endogenous interleukin-18 modulates*

- immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates—PubMed. Cancer Research.* <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10825144/>
- Cho, Y. S., Challa, S., Moquin, D., Genga, R., Ray, T. D., Guildford, M., & Chan, F. K. M. (2009). Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell*, *137*(6), 1112-1123. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.037>
- Chung, E. Y., Liu, J., Homma, Y., Zhang, Y., Saggese, M., Han, J., Silverstein, R., & Sella, L. (2008). Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells mediated by the TALE homeoproteins Pbx-1 and Prep-1. *NIH Public Access*, *27*(6), 952-964.
- Cideciyan, A. V., Aleman, T. S., Boye, S. L., Schwartz, S. B., Kaushal, S., Roman, A. J., Pang, J. J., Sumaroka, A., Windsor, E. A. M., Wilson, J. M., Flotte, T. R., Fishman, G. A., Heon, E., Stone, E. M., Byrne, B. J., Jacobson, S. G., & Hauswirth, W. W. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(39), 15112-15117. https://doi.org/10.1073/PNAS.0807027105/SUPPL_FILE/0807027105SI.PDF
- Colbert, L. E., Fisher, S. B., Hardy, C. W., Hall, W. A., Saka, B., Shelton, J. W., Petrova, A. V., Warren, M. D., Pantazides, B. G., Gandhi, K., Kowalski, J., Kooby, D. A., El-Rayes, B. F., Staley, C. A., Adsay, N. V., Curran, W. J., Landry, J. C., Maithel, S. K., & Yu, D. S. (2013). Pronecrotic mixed lineage kinase domain-like protein expression is a prognostic biomarker in patients with early-stage resected pancreatic adenocarcinoma. *Cancer*, *119*(17), 3148-3155. <https://doi.org/10.1002/cncr.28144>
- Colonna, L., Parry, G. C., Panicker, S., & Elkon, K. B. (2016). Uncoupling complement C1s activation from C1q binding in apoptotic cell phagocytosis and immunosuppressive capacity. *Clinical Immunology*, *163*(3), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2015.12.017>
- Croes, L., Beyens, M., Fransen, E., Ibrahim, J., Vanden Berghe, W., Suls, A., Peeters, M., Pauwels, P., Van Camp, G., & Op de Beeck, K. (2018). Large-scale analysis of DFNA5 methylation reveals its potential as biomarker for breast cancer. *Clinical Epigenetics*, *10*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0479-y>
- Dai, E., Meng, L., Kang, R., Wang, X., & Tang, D. (2020). ESCRT-III-dependent membrane repair blocks ferroptosis. *Biochemical and biophysical research communications*, *522*(2), 415-421. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.11.110>
- Daley, D., Mani, V. R., Mohan, N., Akkad, N., Balasubramania Pandian, G. S. D., Savadkar, S., Lee, K. B., Torres-Hernandez, A., Aykut, B., Diskin, B., Wang, W., Farooq, M. S., Mahmud, A. I., Werba, G., Morales, E. J., Lall, S., Wadowski, B. J., Rubin, A. G., Berman, M. E., ... Miller, G. (2017). NLRP3 signaling drives macrophage-induced adaptive immune suppression in pancreatic carcinoma. *Journal of Experimental Medicine*, *214*(6), 1711-1724. <https://doi.org/10.1084/jem.20161707>
- D'Arcy, M. S. (2019). Cell death : A review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biology International*, *43*(6), 582-592. <https://doi.org/10.1002/cbin.11137>
- Dariavach, P., Mattéi, M. -G, Golstein, P., & Lefranc, M. -P. (1988). Human Ig superfamily CTLA-4 gene : Chromosomal localization and identity of protein sequence between murine and human CTLA-4 cytoplasmic domains. *European journal of immunology*, *18*(12), 1901-1905. <https://doi.org/10.1002/EJ.1830181206>
- Daud, A. I., DeConti, R. C., Andrews, S., Urbas, P., Riker, A. I., Sondak, V. K., Munster, P. N., Sullivan, D. M., Ugen, K. E., Messina, J. L., & Heller, R. (2008). Phase I trial of interleukin-12 plasmid electroporation in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official*

- journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(36), 5896-5903.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.6794>
- De Schutter, E. (2021). *Elucidation of the role of GSDME during apoptosis-driven secondary necrosis*. Université de Gent. Faculté de pharmacie, biomédicale et sciences vétérinaires.
- De Schutter, E., Roelandt, R., Riquet, F. B., Van Camp, G., Wullaert, A., & Vandenabeele, P. (2021). Punching Holes in Cellular Membranes : Biology and Evolution of Gasdermins. *Trends in Cell Biology*, 31(6), 500-513. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.03.004>
- Degterev, A., Huang, Z., Boyce, M., Li, Y., Jagtap, P., Mizushima, N., Cuny, G. D., Mitchison, T. J., Moskowitz, M. A., & Yuan, J. (2005). Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature Chemical Biology*, 1(2), 112-119. <https://doi.org/10.1038/nchembio711>
- Demeules, M., Scarpitta, A., Abad, C., Gondé, H., Hardet, R., Pinto-Espinoza, C., Eichhoff, A. M., Schäfer, W., Haag, F., Koch-Nolte, F., & Adriouch, S. (2020). Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano). *Frontiers in oncology*, 10. <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.01699>
- de Oca, R. M., Alavi, A. S., Vitali, N., Bhattacharya, S., Blackwell, C., Patel, K., Seestaller-Wehr, L., Kaczynski, H., Shi, H., Dobrzynski, E., Obert, L., Tsvetkov, L., Cooper, D. C., Jackson, H., Bojczuk, P., Forveille, S., Kepp, O., Sauvat, A., Kroemer, G., ... Hoos, A. (2021). Belantamab Mafodotin (GSK2857916) Drives Immunogenic Cell Death and Immune-mediated Antitumor Responses In Vivo. *Molecular cancer therapeutics*, 20(10), 1941-1955. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-21-0035>
- DePeaux, K., & Delgoffe, G. M. (2021). Metabolic barriers to cancer immunotherapy. *Nature Reviews Immunology* 2021 21:12, 21(12), 785-797. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00541-y>
- de Vasconcelos, N. M., Van Opdenbosch, N., Van Gorp, H., Parthoens, E., & Lamkanfi, M. (2019a). Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death and Differentiation*, 26(1), 146-161. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0106-7>
- de Vasconcelos, N. M., Van Opdenbosch, N., Van Gorp, H., Parthoens, E., & Lamkanfi, M. (2019b). Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell death and differentiation*, 26(1), 146-161. <https://doi.org/10.1038/S41418-018-0106-7>
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN γ receptors. *Immunity*, 1(6), 447-456. [https://doi.org/10.1016/1074-7613\(94\)90087-6](https://doi.org/10.1016/1074-7613(94)90087-6)
- Dinareello, C. A., Novick, D., Kim, S., & Kaplanski, G. (2013). Interleukin-18 and IL-18 binding protein. *Frontiers in Immunology*, 4(OCT), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00289>
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D. C., & Shao, F. (2016a). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature18590>
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D. C., & Shao, F. (2016b). Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 535(7610), 111-116. <https://doi.org/10.1038/NATURE18590>
- Dombrowski, Y., Peric, M., Koglin, S., Kammerbauer, C., Göß, C., Anz, D., Simanski, M., Gläser, R., Harder, J., Hornung, V., Gallo, R. L., Ruzicka, T., Besch, R., & Schaubert, J. (2011). Cytosolic DNA triggers inflammasome activation in keratinocytes in psoriatic lesions. *Science Translational Medicine*, 3(82), 1-16. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002001>
- Dondelinger, Y., Declercq, W., Montessuit, S., Roelandt, R., Goncalves, A., Bruggeman, I., Hulpiau, P., Weber, K., Sehon, C. A., Marquis, R. W., Bertin, J., Gough, P. J., Savvides, S., Martinou, J.

- C., Bertrand, M. J. M., & Vandenabeele, P. (2014). MLKL Compromises Plasma Membrane Integrity by Binding to Phosphatidylinositol Phosphates. *Cell Reports*, 7(4), 971-981. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.04.026>
- Dong, B., Moore, A. R., Dai, J., Roberts, S., Chu, K., Kapranov, P., Moss, B., & Xiao, W. (2013). A concept of eliminating nonhomologous recombination for scalable and safe AAV vector generation for human gene therapy. *Nucleic acids research*, 41(13), 6609-6617. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT404>
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoeediting : From immunosurveillance to tumor escape. *Nature Immunology*, 3(11), 991-998. <https://doi.org/10.1038/ni1102-991>
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoeediting. *Immunity*, 21(2), 137-148. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2004.07.017>
- Egen, J. G., & Allison, J. P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity*, 16(1), 23-35. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00259-X](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00259-X)
- Elkon, K. B., & Santer, D. M. (2012). Complement, interferon and lupus. *Current Opinion in Immunology*, 24(6), 665-670. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.08.004>
- Elliott, M. R., & Ravichandran, K. S. (2010). Clearance of apoptotic cells : Implications in health and disease. *Journal of Cell Biology*, 189(7), 1059-1070. <https://doi.org/10.1083/jcb.201004096>
- Engelhard, V. H., Obeng, R. C., Cummings, K. L., Petroni, G. R., Ambakhtwala, A. L., Chianese-Bullock, K. A., Smith, K. T., Lulu, A., Varhegyi, N., Smolkin, M. E., Myers, P., Mahoney, K. E., Shabanowitz, J., Buettner, N., Hall, E. H., Haden, K., Cobbold, M., Hunt, D. F., Weiss, G., ... Slingluff, C. L. (2020). MHC-restricted phosphopeptide antigens : Preclinical validation and first-in-humans clinical trial in participants with high-risk melanoma. *Journal for immunotherapy of cancer*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/JITC-2019-000262>
- Enger, P. Ø., Thorsen, F., Lønning, P. E., Bjerkgvig, R., & Hoover, F. (2002). Adeno-associated viral vectors penetrate human solid tumor tissue in vivo more effectively than adenoviral vectors. *Human gene therapy*, 13(9), 1115-1125. <https://doi.org/10.1089/104303402753812511>
- England, H., Summersgill, H. R., Edye, M. E., Rothwell, N. J., & Brough, D. (2014). Release of interleukin-1 α or interleukin-1 β depends on mechanism of cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 289(23), 15942-15950. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.557561>
- Ertao, Z., Jianhui, C., Kang, W., Zhijun, Y., Hui, W., Chuangqi, C., Changjiang, Q., Sile, C., Yulong, H., & Shirong, C. (2016). Prognostic value of mixed lineage kinase domain-like protein expression in the survival of patients with gastric cancer. *Tumor Biology*, 37(10), 13679-13685. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5229-1>
- Evavold, C. L., Hafner-Bratkovič, I., Devant, P., D'Andrea, J. M., Ngwa, E. M., Boršič, E., Doench, J. G., LaFleur, M. W., Sharpe, A. H., Thiagarajah, J. R., & Kagan, J. C. (2021). Control of gasdermin D oligomerization and pyroptosis by the Ragulator-Rag-mTORC1 pathway. *Cell*, 184(17), 4495-4511.e19. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.028>
- Evavold, C. L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., & Kagan, J. C. (2018). The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*, 48(1), 35-44.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013>
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE2, and PAF. *Journal of Clinical Investigation*, 101(4), 890-898. <https://doi.org/10.1172/JCI1112>

- Ferguson, T. A., Herndon, J., Elzey, B., Griffith, T. S., Schoenberger, S., & Green, D. R. (2002). Uptake of Apoptotic Antigen-Coupled Cells by Lymphoid Dendritic Cells and Cross-Priming of CD8 + T Cells Produce Active Immune Unresponsiveness. *The Journal of Immunology*, *168*(11), 5589-5595. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.11.5589>
- Fernandes-Alnemri, T., Wu, J., Yu, J. W., Datta, P., Miller, B., Jankowski, W., Rosenberg, S., Zhang, J., & Alnemri, E. S. (2007). The pyroptosome: A supramolecular assembly of ASC dimers mediating inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death and Differentiation*, *14*(9), 1590-1604. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402194>
- Fink, S. L., Bergsbaken, T., & Cookson, B. T. (2008). Anthrax lethal toxin and Salmonella elicit the common cell death pathway of caspase-1-dependent pyroptosis via distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(11), 4312-4317. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707370105>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Journal of Immunology*, *202*(7), 1913-1926. <https://doi.org/10.1111/J.1462-5822.2006.00751.x>
- Flores-Romero, H., Ros, U., & Garcia-Saez, A. J. (2020). Pore formation in regulated cell death. *The EMBO journal*, *39*(23). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2020105753>
- Frank, D., & Vince, J. E. (2019). Pyroptosis versus necroptosis: Similarities, differences, and crosstalk. *Cell Death and Differentiation*, *26*(1), 99-114. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0212-6>
- Franklin, B. S., Bossaller, L., De Nardo, D., Ratter, J. M., Stutz, A., Engels, G., Brenker, C., Nordhoff, M., Mirandola, S. R., Al-Amoudi, A., Mangan, M. S., Zimmer, S., Monks, B. G., Fricke, M., Schmidt, R. E., Espevik, T., Jones, B., Jarnicki, A. G., Hansbro, P. M., ... Latz, E. (2014). The adaptor ASC has extracellular and « prionoid » activities that propagate inflammation. *Nature Immunology*, *15*(8), 727-737. <https://doi.org/10.1038/ni.2913>
- Freeman, G. J., Long, A. J., Iwai, Y., Bourque, K., Chernova, T., Nishimura, H., Fitz, L. J., Malenkovich, N., Okazaki, T., Byrne, M. C., Horton, H. F., Fouser, L., Carter, L., Ling, V., Bowman, M. R., Carreno, B. M., Collins, M., Wood, C. R., & Honjo, T. (2000). Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*, *192*(7), 1027-1034. <https://doi.org/10.1084/JEM.192.7.1027>
- Freire-De-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B. P., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., De Mello, F. G., DosReis, G. A., & Lopes, M. F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature*, *403*(6766), 199-203. <https://doi.org/10.1038/35003208>
- Fricker, N., Beaudouin, J., Richter, P., Eils, R., Krammer, P. H., & Lavrik, I. N. (2010). Model-based dissection of CD95 signaling dynamics reveals both a pro- and antiapoptotic role of c-FLIPL. *Journal of Cell Biology*, *190*(3), 377-389. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002060>
- Fucikova, J., Spisek, R., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2021). Calreticulin and cancer. *Cell research*, *31*(1), 5-16. <https://doi.org/10.1038/S41422-020-0383-9>
- Fulda, S. (2009). Tumor resistance to apoptosis. *International Journal of Cancer*, *124*(3), 511-515. <https://doi.org/10.1002/ijc.24064>
- Gaipl, U. S., Munoz, L. E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., Voll, R. E., Winkler, T., Kuhn, A., Kalden, J., Kern, P., & Herrmann, M. (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE). *Journal of Autoimmunity*, *28*(2-3), 114-121. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2007.02.005>
- Gaipl, U. S., Sheriff, A., Franz, S., Munoz, L. E., Voll, R. E., Kalden, J. R., & Herrmann, M. (2006). Inefficient clearance of dying cells and autoreactivity. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, *305*, 161-176. https://doi.org/10.1007/3-540-29714-6_8

- Galluzzi, L., Buqué, A., Kepp, O., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2017). Immunogenic cell death in cancer and infectious disease. *Nature reviews. Immunology*, *17*(2), 97-111. <https://doi.org/10.1038/NRI.2016.107>
- Galluzzi, L., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Agostinis, P., Alnemri, E. S., Altucci, L., Amelio, I., Andrews, D. W., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Antonov, A. V., Arama, E., Baehrecke, E. H., Barlev, N. A., Bazan, N. G., Bernassola, F., Bertrand, M. J. M., Bianchi, K., ... Kroemer, G. (2018). Molecular mechanisms of cell death : Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*, *25*(3), 486-541. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0012-4>
- Gao, J., Qiu, X., Xi, G., Liu, H., Zhang, F., Lv, T., & Song, Y. (2018). Downregulation of GSDMD attenuates tumor proliferation via the intrinsic mitochondrial apoptotic pathway and inhibition of EGFR/Akt signaling and predicts a good prognosis in non-small cell lung cancer. *Oncology Reports*, *40*(4), 1971-1984. <https://doi.org/10.3892/or.2018.6634>
- Garg, A. D., Dudek, A. M., Ferreira, G. B., Verfaillie, T., Vandenabeele, P., Krysko, D. V., Mathieu, C., & Agostinis, P. (2013). ROS-induced autophagy in cancer cells assists in evasion from determinants of immunogenic cell death. *Autophagy*, *9*(9), 1292-1307. <https://doi.org/10.4161/AUTO.25399>
- Georgieva, M., Buckee, C. O., & Lipsitch, M. (2019). Models of immune selection for multi-locus antigenic diversity of pathogens. *Nature reviews. Immunology*, *19*(1), 55-62. <https://doi.org/10.1038/S41577-018-0092-5>
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nature reviews. Immunology*, *20*(2), 95-112. <https://doi.org/10.1038/S41577-019-0215-7>
- Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., & Liu, C. (2019). The role of necroptosis in cancer biology and therapy. *Molecular Cancer*, *18*(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-1029-8>
- Gong, Y. N., Guy, C., Crawford, J. C., & Green, D. R. (2017). Biological events and molecular signaling following MLKL activation during necroptosis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, *16*(19), 1748-1760. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1371889>
- Gong, Y.-N., Guy, C., Olauson, H., Becker, J. U., Yang, M., Fitzgerald, P., Linkermann, A., & Green, D. R. (2017). ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences. *Cell*, *169*(2), 286-300.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.020>
- Grage, S. L., Afonin, S., Kara, S., Buth, G., & Ulrich, A. S. (2016). Membrane Thinning and Thickening Induced by Membrane-Active Amphipathic Peptides. *Frontiers in cell and developmental biology*, *4*(JUN). <https://doi.org/10.3389/FCELL.2016.00065>
- Green, D. R., Goldstein, J. C., Waterhouse, N. J., Juin, P., & Evan, G. I. (2000). The coordinate release of cytochrome c : During apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant : Article : Nature Cell Biology. *Nature Cell Biology*, *2*(3), 156-162.
- Greten, F. R., Eckmann, L., Greten, T. F., Park, J. M., Li, Z. W., Egan, L. J., Kagnoff, M. F., & Karin, M. (2004). IKK β links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*, *118*(3), 285-296. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.013>
- Griffith, T. S., Kazama, H., VanOosten, R. L., Earle, J. K., Herndon, J. M., Green, D. R., & Ferguson, T. A. (2007). Apoptotic Cells Induce Tolerance by Generating Helpless CD8 + T Cells That Produce TRAIL. *The Journal of Immunology*, *178*(5), 2679-2687. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.5.2679>
- Grootjans, S., Vanden Berghe, T., & Vandenabeele, P. (2017). Initiation and execution mechanisms of necroptosis : An overview. *Cell Death and Differentiation*, *24*(7), 1184-1195. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.65>

- Gudipaty, S. A., Conner, C. M., Rosenblatt, J., & Montell, D. J. (2018). Unconventional Ways to Live and Die : Cell Death and Survival in Development, Homeostasis, and Disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 34(1), 311-332. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060748>
- Gurda, B. L., DiMattia, M. A., Miller, E. B., Bennett, A., McKenna, R., Weichert, W. S., Nelson, C. D., Chen, W., Muzyczka, N., Olson, N. H., Sinkovits, R. S., Chiorini, J. A., Zolotutkhin, S., Kozyreva, O. G., Samulski, R. J., Baker, T. S., Parrish, C. R., & Agbandje-McKenna, M. (2013). Capsid antibodies to different adeno-associated virus serotypes bind common regions. *Journal of virology*, 87(16), 9111-9124. <https://doi.org/10.1128/JVI.00622-13>
- Hanaizi, Z., Van Zwieten-Boot, B., Calvo, G., Lopez, A. S., Van Dartel, M., Camarero, J., Abadie, E., & Pignatti, F. (2012). The European Medicines Agency review of ipilimumab (Yervoy) for the treatment of advanced (unresectable or metastatic) melanoma in adults who have received prior therapy : Summary of the scientific assessment of the Committee for Medicinal Products for Human Use. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 48(2), 237-242. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2011.09.018>
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., & Nagata, S. (2004). Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice. *Science*, 304(5674), 1147-1150. <https://doi.org/10.1126/science.1094359>
- Hangai, S., Kawamura, T., Kimura, Y., Chang, C. Y., Hibino, S., Yamamoto, D., Nakai, Y., Tateishi, R., Oshima, M., Oshima, H., Kodama, T., Moriya, K., Koike, K., Yanai, H., & Taniguchi, T. (2021). Orchestration of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment by ubiquitous cellular protein TCTP released by tumor cells. *Nature immunology*, 22(8), 947-957. <https://doi.org/10.1038/S41590-021-00967-5>
- Harris, N. L., & Ronchese, F. (1999). The role of B7 costimulation in T-cell immunity. *Immunology and cell biology*, 77(4), 304-311. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1711.1999.00835.X>
- Hastie, E., & Samulski, R. J. (2015). Adeno-associated virus at 50 : A golden anniversary of discovery, research, and gene therapy success—A personal perspective. *Human gene therapy*, 26(5), 257-265. <https://doi.org/10.1089/HUM.2015.025>
- He, L., Peng, K., Liu, Y., Xiong, J., & Zhu, F. F. (2013). Low expression of mixed lineage kinase domain-like protein is associated with poor prognosis in ovarian cancer patients. *OncoTargets and Therapy*, 6, 1539-1543. <https://doi.org/10.2147/OTT.S52805>
- He, S., Wang, L., Miao, L., Wang, T., Du, F., Zhao, L., & Wang, X. (2009). Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell*, 137(6), 1100-1111. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.05.021>
- Heath, W. R., & Carbone, F. R. (2001). Cross-Presentation, Dendritic Cells, Tolerance and Immunity. *Annual Review of Immunology*, 19(1), 47-64. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.19.1.47>
- Hecht, F., McCaw, B. K., Peakman, D., & Robinson, A. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*, 255(5505), 243-244. <https://doi.org/10.1126/science.1083317>
- Heidelberger, C. (2003). Chemical Carcinogenesis. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.bi.44.070175.000455>, Vol. 44, 79-121. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.BI.44.070175.000455>
- Hervas-Stubbs, S., Olivier, A., Boisgerault, F., Thieblemont, N., & Leclerc, C. (2007). TLR3 ligand stimulates fully functional memory CD8⁺ T cells in the absence of CD4⁺ T-cell help. *Blood*, 109(12), 5318-5326. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-10-053256>
- Hetz, C., Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2020). Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(8), 421-438. <https://doi.org/10.1038/S41580-020-0250-Z>

- Hildebrand, J. M., Kauppi, M., Majewski, I. J., Liu, Z., Cox, A. J., Miyake, S., Petrie, E. J., Silk, M. A., Li, Z., Tanzer, M. C., Brumatti, G., Young, S. N., Hall, C., Garnish, S. E., Corbin, J., Stutz, M. D., Di Rago, L., Gangatirkar, P., Josefsson, E. C., ... Silke, J. (2020). A missense mutation in the MLKL brace region promotes lethal neonatal inflammation and hematopoietic dysfunction. *Nature Communications*, *11*(1), 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16819-z>
- Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B. U., Unanue, E. R., Diamond, M. S., Schreiber, R. D., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2008a). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5904), 1097-1100. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164206>
- Hildner, K., Edelson, B. T., Purtha, W. E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B. U., Unanue, E. R., Diamond, M. S., Schreiber, R. D., Murphy, T. L., & Murphy, K. M. (2008b). Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity. *Science (New York, N.Y.)*, *322*(5904), 1097-1100. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164206>
- Hoffmann, P. R., Kench, J. A., Vondracek, A., Kruk, E., Daleke, D. L., Jordan, M., Marrack, P., Henson, P. M., & Fadok, V. A. (2005). Interaction between Phosphatidylserine and the Phosphatidylserine Receptor Inhibits Immune Responses In Vivo. *The Journal of Immunology*, *174*(3), 1393-1404. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.3.1393>
- Hos, B. J., Camps, M. G. M., Bulk, J. van den, Tondini, E., Ende, T. C. van den, Ruano, D., Franken, K., Janssen, G. M. C., Ru, A., Filippov, D. V., Arens, R., van Veelen, P. A., Miranda, N., & Ossendorp, F. (2019). Identification of a neo-epitope dominating endogenous CD8 T cell responses to MC-38 colorectal cancer. *Oncoimmunology*, *9*(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2019.1673125>
- Hotz, C., Wagenaar, T. R., Gieseke, F., Bangari, D. S., Callahan, M., Cao, H., Diekmann, J., Diken, M., Grunwitz, C., Hebert, A., Hsu, K., Bernardo, M., Karikó, K., Kreiter, S., Kuhn, A. N., Levit, M., Malkova, N., Masciari, S., Pollard, J., ... Wiederschain, D. (2021). Local delivery of mRNA-encoded cytokines promotes antitumor immunity and tumor eradication across multiple preclinical tumor models. *Science translational medicine*, *13*(610). <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABC7804>
- Hou, J., Zhao, R., Xia, W., Chang, C. W., You, Y., Hsu, J. M., Nie, L., Chen, Y., Wang, Y. C., Liu, C., Wang, W. J., Wu, Y., Ke, B., Hsu, J. L., Huang, K., Ye, Z., Yang, Y., Xia, X., Li, Y., ... Hung, M. C. (2020). PD-L1-mediated gasdermin C expression switches apoptosis to pyroptosis in cancer cells and facilitates tumour necrosis. *Nature cell biology*, *22*(10), 1264-1275. <https://doi.org/10.1038/S41556-020-0575-Z>
- Huang, J., Zhang, Y., Sheng, J., Zhang, H., Fang, W., Zhan, J., Zhou, T., Chen, Y., Liu, L., & Zhang, L. (2016). The efficacy and safety of nivolumab in previously treated advanced non-small-cell lung cancer : A meta-analysis of prospective clinical trials. *OncoTargets and therapy*, *9*, 5867. <https://doi.org/10.2147/OTT.S115262>
- Humeau, J., Leduc, M., Cerrato, G., Loos, F., Kepp, O., & Kroemer, G. (2020). Phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2 α (eIF2 α) in autophagy. *Cell death & disease*, *11*(6). <https://doi.org/10.1038/S41419-020-2642-6>
- Humeau, J., Sauvat, A., Cerrato, G., Xie, W., Loos, F., Iannantuoni, F., Bezu, L., Lévesque, S., Paillet, J., Pol, J., Leduc, M., Zitvogel, L., de Thé, H., Kepp, O., & Kroemer, G. (2020). Inhibition of transcription by dactinomycin reveals a new characteristic of immunogenic cell stress. *EMBO molecular medicine*, *12*(5). <https://doi.org/10.15252/EMMM.201911622>
- Hunig, T. (1983). T-cell function and specificity in athymic mice. *Immunology today*, *4*(3), 84-87. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(83\)90125-1](https://doi.org/10.1016/0167-5699(83)90125-1)

- Huynh, M. L. N., Fadok, V. A., & Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF- β 1 secretion and the resolution of inflammation. *Journal of Clinical Investigation*, *109*(1), 41-50. <https://doi.org/10.1172/JCI0211638>
- Hwu, W. L., Muramatsu, S. I., Tseng, S. H., Tzen, K. Y., Lee, N. C., Chien, Y. H., Snyder, R. O., Byrne, B. J., Tai, C. H., & Wu, R. M. (2012). Gene therapy for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency. *Science translational medicine*, *4*(134). <https://doi.org/10.1126/SCITRANS-LMED.3003640>
- Ibrahim, J., Op de Beeck, K., Fransen, E., Croes, L., Beyens, M., Suls, A., Vanden Berghe, W., Peeters, M., & Van Camp, G. (2019). Methylation analysis of Gasdermin E shows great promise as a biomarker for colorectal cancer. *Cancer Medicine*, *8*(5), 2133-2145. <https://doi.org/10.1002/cam4.2103>
- Igney, F. H., & Krammer, P. H. (2002). Immune escape of tumors : Apoptosis resistance and tumor counterattack. *Journal of leukocyte biology*, *71*(6), 907-920. <https://doi.org/10.1189/jlb.71.6.907>
- Ikehara, S., Pahwa, R. N., Fernandes, G., Hansen, C. T., & Good, R. A. (1984). Functional T cells in athymic nude mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(3), 886. <https://doi.org/10.1073/PNAS.81.3.886>
- Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, *54 Pt 1*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1101/SQB.1989.054.01.003>
- Janssen, E. M., Droin, N. M., Lemmens, E. E., Pinkoski, M. J., Bensinger, S. J., Ehst, B. D., Griffith, T. S., Green, D. R., & Schoenberger, S. P. (2005). CD4⁺ T-cell help controls CD8⁺ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*, *434*(7029), 88-93. <https://doi.org/10.1038/nature03337>
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., Von Herrath, M. G., & Schoenberger, S. P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature*, *421*(6925), 852-856. <https://doi.org/10.1038/nature01441>
- Jhunjhunwala, S., Hammer, C., & Delamarre, L. (2021). Antigen presentation in cancer : Insights into tumour immunogenicity and immune evasion. *Nature reviews. Cancer*, *21*(5), 298-312. <https://doi.org/10.1038/S41568-021-00339-Z>
- Jiang, M., Liu, Z., Xiang, Y., Ma, H., Liu, S., Liu, Y., & Zheng, D. (2011). Synergistic antitumor effect of AAV-mediated TRAIL expression combined with cisplatin on head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, *11*, 54. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-54>
- Jiang, M., Qi, L., Li, L., & Li, Y. (2020). The caspase-3/GSDME signal pathway as a switch between apoptosis and pyroptosis in cancer. *Cell Death Discovery*, *6*(1). <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00349-0>
- Kaczanowski, S. (2016). Apoptosis : Its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging. *Physical Biology*, *13*(3). <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>
- Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). Necroptosis : The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity*, *38*(2), 209-223. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003>
- Kaiser, W. J., Upton, J. W., Long, A. B., Livingston-Rosanoff, D., Daley-Bauer, L. P., Hakem, R., Caspary, T., & Mocarski, E. S. (2011). RIP3 mediates the embryonic lethality of caspase-8-deficient mice. *Nature*, *471*(7338), 368-373. <https://doi.org/10.1038/NATURE09857>
- Kale, J., Osterlund, E. J., & Andrews, D. W. (2018). BCL-2 family proteins : Changing partners in the dance towards death. *Cell Death and Differentiation*, *25*(1), 65-80. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.186>

- Kang, J. S., Bae, S. Y., Kim, H. R., Kim, Y. S., Kim, D. J., Cho, B. J., Yang, H. K., Hwang, Y. I., Kim, K. J., Park, H. S., Hwang, D. H., Cho, D. J., & Lee, W. J. (2009). Interleukin-18 increases metastasis and immune escape of stomach cancer via the downregulation of CD70 and maintenance of CD44. *Carcinogenesis*, *30*(12), 1987-1996. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp158>
- Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(13), 7556-7561. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.13.7556>
- Karmakar, M., Minns, M., Greenberg, E. N., Diaz-Aponte, J., Pestonjamas, K., Johnson, J. L., Rathkey, J. K., Abbott, D. W., Wang, K., Shao, F., Catz, S. D., Dubyak, G. R., & Pearlman, E. (2020). N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 β release independently of plasma membrane pores and pyroptosis. *Nature communications*, *11*(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-16043-9>
- Katayama, H., Kobayashi, M., Irajizad, E., Sevillano, A., Patel, N., Mao, X., Rusling, L., Vykoukal, J., Cai, Y., Hsiao, F., Yu, C. Y., Long, J., Liu, J., Esteva, F., Fahrman, J., & Hanash, S. (2021). Protein citrullination as a source of cancer neoantigens. *Journal for immunotherapy of cancer*, *9*(6). <https://doi.org/10.1136/JITC-2021-002549>
- Kay, M. A. (2011). State-of-the-art gene-based therapies : The road ahead. *Nature reviews. Genetics*, *12*(5), 316-328. <https://doi.org/10.1038/NRG2971>
- Kayagaki, N., Kornfeld, O. S., Lee, B. L., Stowe, I. B., O'Rourke, K., Li, Q., Sandoval, W., Yan, D., Kang, J., Xu, M., Zhang, J., Lee, W. P., McKenzie, B. S., Ulas, G., Payandeh, J., Roose-Girma, M., Modrusan, Z., Reja, R., Sagolla, M., ... Dixit, V. M. (2021). NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature*, *591*(7848), 131-136. <https://doi.org/10.1038/S41586-021-03218-7>
- Kazama, H., Ricci, J., Herndon, J. M., Hoppe, G., Green, D. R., & Ferguson, T. A. (2008). Induction of Immunological Tolerance by Apoptotic Cells Requires Caspase-Dependent Oxidation of High-Mobility Group Box-1 Protein. *Immunity*, *29*(1), 21-32. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.05.013>
- Kepp, O., Bezu, L., Yamazaki, T., Di Virgilio, F., Smyth, M. J., Kroemer, G., & Galluzzi, L. (2021). ATP and cancer immunosurveillance. *The EMBO journal*, *40*(13). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108130>
- Kepp, O., Senovilla, L., & Kroemer, G. (2014). Immunogenic cell death inducers as anticancer agents. *Oncotarget*, *5*(14), 5190-5191. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2266>
- Kerr, J., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis : A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, *26*(4), 239-257. <https://doi.org/10.1038/BJC.1972.33>
- Kim, J. H., Lee, S. Y., Oh, S. Y., Han, S. I., Park, H. G., Yoo, M. A., & Kang, H. S. (2004). Methyl jasmonate induces apoptosis through induction of Bax/Bcl-X and activation of caspase-3 via ROS production in A549 cells. *Oncology Reports*, *12*(6), 1233-1238. <https://doi.org/10.3892/or.12.6.1233>
- Kim, J. Y., Kim, J. H., Khim, M., Lee, H. S., Jung, J. H., Moon, D. H., Jeong, S., & Lee, H. (2011). Persistent anti-tumor effects via recombinant adeno-associated virus encoding herpes thymidine kinase gene monitored by PET-imaging. *Oncology Reports*, *25*(5), 1263-1269. <https://doi.org/10.3892/OR.2011.1190/HTML>
- Kim, M. S., Chang, X., Yamashita, K., Nagpal, J. K., Baek, J. H., Wu, G., Trink, B., Ratovitski, E. A., Mori, M., & Sidransky, D. (2008). Aberrant promoter methylation and tumor suppressive activity of the DFNA5 gene in colorectal carcinoma. *Oncogene*, *27*(25), 3624-3634. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1211021>

- Kim, M. S., Lebron, C., Nagpal, J. K., Chae, Y. K., Chang, X., Huang, Y., Chuang, T., Yamashita, K., Trink, B., Ratovitski, E. A., Califano, J. A., & Sidransky, D. (2008). Methylation of the DFNA5 increases risk of lymph node metastasis in human breast cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *370*(1), 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.026>
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire : What thymocytes see (and don't see). *Nature reviews. Immunology*, *14*(6), 377-391. <https://doi.org/10.1038/NRI3667>
- Kleinclauss, F., Perruche, S., Masson, E., de Carvalho Bittencourt, M., Biichle, S., Remy-Martin, J. P., Ferrand, C., Martin, M., Bittard, H., Chalopin, J. M., Seilles, E., Tiberghien, P., & Saas, P. (2006). Intravenous apoptotic spleen cell infusion induces a TGF- β -dependent regulatory T-cell expansion. *Cell Death and Differentiation*, *13*(1), 41-52. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401699>
- Klionsky, D. J., Petroni, G., Amaravadi, R. K., Baehrecke, E. H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J. M., Cadwell, K., Cecconi, F., Choi, A. M. K., Choi, M. E., Chu, C. T., Codogno, P., Colombo, M. I., Cuervo, A. M., Deretic, V., Dikic, I., Elazar, Z., Eskelinen, E., ... Pietrocola, F. (2021). Autophagy in major human diseases. *The EMBO journal*, *40*(19). <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2021108863>
- Koo, G. B., Morgan, M. J., Lee, D. G., Kim, W. J., Yoon, J. H., Koo, J. S., Kim, S. I., Kim, S. J., Son, M. K., Hong, S. S., Levy, J. M. M., Pollyea, D. A., Jordan, C. T., Yan, P., Frankhouser, D., Nicolet, D., Maharry, K., Marcucci, G., Choi, K. S., ... Kim, Y. S. (2015). Methylation-dependent loss of RIP3 expression in cancer represses programmed necrosis in response to chemotherapeutics. *Cell Research*, *25*(6), 707-725. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.56>
- Kotterman, M. A., Chalberg, T. W., & Schaffer, D. V. (2015). Viral Vectors for Gene Therapy : Translational and Clinical Outlook. *Annual review of biomedical engineering*, *17*, 63-89. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOENG-071813-104938>
- Kotterman, M. A., & Schaffer, D. V. (2014). Engineering adeno-associated viruses for clinical gene therapy. *Nature reviews. Genetics*, *15*(7), 445-451. <https://doi.org/10.1038/NRG3742>
- Kourtzelis, I., Hajishengallis, G., & Chavakis, T. (2020). Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *11*(March), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00553>
- Kovacs, S. B., & Miao, E. A. (2017a). Gasdermins : Effectors of Pyroptosis. *Trends in Cell Biology*, *27*(9), 673-684. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.005>
- Kovacs, S. B., & Miao, E. A. (2017b). Gasdermins : Effectors of Pyroptosis. *Trends in Cell Biology*, *27*(9), 673-684. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.005>
- Koyama, S., Akbay, E. A., Li, Y. Y., Herter-Sprue, G. S., Buczkowski, K. A., Richards, W. G., Gandhi, L., Redig, A. J., Rodig, S. J., Asahina, H., Jones, R. E., Kulkarni, M. M., Kuraguchi, M., Palakurthi, S., Fecci, P. E., Johnson, B. E., Janne, P. A., Engelman, J. A., Gangadharan, S. P., ... Hammerman, P. S. (2016). Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints. *Nature communications*, *7*. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS10501>
- Kroemer, G., Galassi, C., Zitvogel, L., & Galluzzi, L. (2022). Immunogenic cell stress and death. *Nature immunology*. <https://doi.org/10.1038/S41590-022-01132-2>
- Kuida, K., Lippke, J. A., Ku, G., Harding, M. W., Livingston, D. J., Su, M. S. S., & Flavell, R. A. (1995). Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 β converting enzyme. *Science*, *267*(5206), 2000-2003. <https://doi.org/10.1126/science.7535475>
- Kwak, M. S., Kim, H. S., Lee, B., Kim, Y. H., Son, M., & Shin, J. S. (2020). Immunological Significance of HMGB1 Post-Translational Modification and Redox Biology. *Frontiers in Immunology*, *11*(June), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01189>

- Lamkanfi, M., Sarkar, A., Vande Walle, L., Vitari, A. C., Amer, A. O., Wewers, M. D., Tracey, K. J., Kanneganti, T.-D., & Dixit, V. M. (2010). Inflammasome-Dependent Release of the Alarmin HMGB1 in Endotoxemia. *The Journal of Immunology*, *185*(7), 4385-4392. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1000803>
- Lauber, K., Bohn, E., Kröber, S. M., Xiao, Y. J., Blumenthal, S. G., Lindemann, R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., & Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, *113*(6), 717-730. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00422-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00422-7)
- Leach, D. R., Krummel, M. F., & Allison, J. P. (1996). Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, *271*(5256), 1734-1736. <https://doi.org/10.1126/science.271.5256.1734>
- Lebbé, C., Weber, J. S., Maio, M., Neyns, B., Harmankaya, K., Hamid, O., O'Day, S. J., Konto, C., Cykowski, L., McHenry, M. B., & Wolchok, J. D. (2014). Survival follow-up and ipilimumab retreatment of patients with advanced melanoma who received ipilimumab in prior phase II studies. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, *25*(11), 2277-2284. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDU441>
- Lechner, M. G., Karimi, S. S., Barry-Holson, K., Angell, T. E., Murphy, K. A., Church, C. H., Ohlfest, J. R., Hu, P., & Epstein, A. L. (2013). Immunogenicity of murine solid tumor models as a defining feature of in vivo behavior and response to immunotherapy. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, *36*(9), 477. <https://doi.org/10.1097/01.CJI.0000436722.46675.4A>
- Lee, C. C., Sun, Y., Qian, S., & Huang, H. W. (2011). Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophysical journal*, *100*(7), 1688-1696. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2011.02.018>
- Lemos De Matos, A., Franco, L. S., & Mcfadden, G. (2020). *Oncolytic Viruses and the Immune System : The Dynamic Duo*. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.01.001>
- Lenschow, D. J., Walunas, T. L., & Bluestone, J. A. (1996). CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annual review of immunology*, *14*, 233-258. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.IMMUNOL.14.1.233>
- Li, C., & Samulski, R. J. (2020). Engineering adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics*, *21*(4), 255-272. <https://doi.org/10.1038/S41576-019-0205-4>
- Li, D., Xu, T., Cao, Y., Wang, H., Li, L., Chen, S., Wang, X., & Shen, Z. (2015). A cytosolic heat shock protein 90 and cochaperone CDC37 complex is required for RIP3 activation during necroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(16), 5017-5022. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505244112>
- Li, P., Allen, H., Banerjee, S., Franklin, S., Herzog, L., Johnston, C., McDowell, J., Paskind, M., Rodman, L., Salfeld, J., Towne, E., Tracey, D., Wardwell, S., Wei, F. Y., Wong, W., Kamen, R., & Seshadri, T. (1995). Mice deficient in IL-1 β -converting enzyme are defective in production of mature IL-1 β and resistant to endotoxic shock. *Cell*, *80*(3), 401-411. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90490-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90490-5)
- Liao, X. X., Dai, Y. Z., Zhao, Y. Z., & Nie, K. (2022). Gasdermin E: A Prospective Target for Therapy of Diseases. *Frontiers in Pharmacology*, *13*, 1196. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2022.855828/BIBTEX>
- Lin, D., Shen, Y., & Liang, T. (2023). Oncolytic virotherapy : Basic principles, recent advances and future directions. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, *8*(1), 156. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01407-6>
- Linsley, P. S., Greene, J. A. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A., & Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*, *1*(9), 793-801. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(94\)80021-9](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(94)80021-9)

- Liu, A., Li, Y., Shen, L., Li, N., Shen, L., & Li, Z. (2022). Pan-cancer analysis of a novel indicator of necroptosis with its application in human cancer. *Aging (Albany NY)*, *14*(18), 7587. <https://doi.org/10.18632/AGING.204307>
- Liu, C., Wang, X.-L., Shen, E.-C., Wang, B.-Z., Meng, R., Cui, Y., Wang, W.-J., & Shao, Q. (2022). Bioinformatics analysis of prognosis and immune microenvironment of immunological cell death-related gemcitabine-resistance genes in bladder cancer. *Transl Androl Urol*, *11*(12), 1715-1728. <https://doi.org/10.21037/tau-22-736>
- Liu, G. Y., & Sabatini, D. M. (2020). MTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 *21*:4, 21(4), 183-203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>
- Liu, J., Kang, R., & Tang, D. (2020). ESCRT-III-mediated membrane repair in cell death and tumor resistance. *Cancer Gene Therapy* 2020 *28*:1, 28(1), 1-4. <https://doi.org/10.1038/s41417-020-0200-0>
- Liu, S., Liu, H., Johnston, A., Hanna-Addams, S., Reynoso, E., Xiang, Y., & Wang, Z. (2017). MLKL forms disulfide bond-dependent amyloid-like polymers to induce necroptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(36), E7450-E7459. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1707531114>
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016a). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, *535*(7610), 153-158. <https://doi.org/10.1038/nature18629>
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H., & Lieberman, J. (2016b). Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, *535*(7610), 153-158. <https://doi.org/10.1038/NATURE18629>
- Liu, Z., Wang, C., Yang, J., Zhou, B., Yang, R., Ramachandran, R., Abbott, D. W., & Xiao, T. S. (2019). Crystal Structures of the Full-Length Murine and Human Gasdermin D Reveal Mechanisms of Autoinhibition, Lipid Binding, and Oligomerization. *Immunity*, *51*(1), 43-49.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.017>
- Lu, B., Antoine, D. J., Kwan, K., Lundbäck, P., Wähämaa, H., Schierbeck, H., Robinson, M., Van Zoelen, M. A. D., Yang, H., Li, J., Erlandsson-Harris, H., Chavan, S. S., Wang, H., Andersson, U., & Tracey, K. J. (2014). JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *111*(8), 3068-3073. <https://doi.org/10.1073/pnas.1316925111>
- Lu, Y., He, W., Huang, X., He, Y., Gou, X., Liu, X., Hu, Z., Xu, W., Rahman, K., Li, S., Hu, S., Luo, J., & Cao, G. (2021). Strategies to package recombinant Adeno-Associated Virus expressing the N-terminal gasdermin domain for tumor treatment. *Nature Communications* 2021 *12*:1, 12(1), 1-14. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27407-0>
- Lucas, M., Stuart, L. M., Zhang, A., Hodivala-Dilke, K., Febbraio, M., Silverstein, R., Savill, J., & Lacy-Hulbert, A. (2006). Requirements for Apoptotic Cell Contact in Regulation of Macrophage Responses. *The Journal of Immunology*, *177*(6), 4047-4054. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.4047>
- MacLaren, R. E., Groppe, M., Barnard, A. R., Cottrill, C. L., Tolmachova, T., Seymour, L., Reed Clark, K., During, M. J., Cremers, F. P. M., Black, G. C. M., Lotery, A. J., Downes, S. M., Webster, A. R., & Seabra, M. C. (2014). Retinal gene therapy in patients with choroideremia: Initial findings from a phase 1/2 clinical trial. *The Lancet*, *383*(9923), 1129-1137. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(13\)62117-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)62117-0)
- Maeda, A., Schwarz, A., Kernebeck, K., Gross, N., Aragane, Y., Peritt, D., & Schwarz, T. (2005). Intravenous Infusion of Syngeneic Apoptotic Cells by Photopheresis Induces Antigen-Specific

- Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, 174(10), 5968-5976. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.174.10.5968>
- Mahdi, L. K., Huang, M., Zhang, X., Nakano, R. T., Kopp, L. B., Saur, I. M. L., Jacob, F., Kovacova, V., Lapin, D., Parker, J. E., Murphy, J. M., Hofmann, K., Schulze-Lefert, P., Chai, J., & Maekawa, T. (2020). Discovery of a Family of Mixed Lineage Kinase Domain-like Proteins in Plants and Their Role in Innate Immune Signaling. *Cell Host and Microbe*, 28(6), 813-824.e6. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2020.08.012>
- Maleckar, J. R., & Sherman, L. A. (1987). The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *The Journal of Immunology*, 138(11).
- Man, S. M., Karki, R., & Kanneganti, T.-D. (2017). Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*, 277(1), 61-75. <https://doi.org/10.1111/imr.12534>
- Manno, C. S., Arruda, V. R., Pierce, G. F., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J. F., ... Kay, M. A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nature Medicine* 2006 12:3, 12(3), 342-347. <https://doi.org/10.1038/nm1358>
- Mariathasan, S., Hewton, K., Monack, D. M., Vucic, D., French, D. M., Lee, W. P., Roose-Girma, M., Erickson, S., & Dixit, V. M. (2004). Differential activation of the inflammasome by caspase-1 adaptors ASC and Ipaf. *Nature*, 430(6996), 213-218. <https://doi.org/10.1038/nature02664>
- Martens, S., Bridelance, J., Roelandt, R., Vandenabeele, P., & Takahashi, N. (2021). MLKL in cancer : More than a necroptosis regulator. *Cell death and differentiation*, 28(6), 1757-1772. <https://doi.org/10.1038/S41418-021-00785-0>
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger and the extended family. *Annual Review of Immunology*, 12, 991-1045.
- McCoy, K. D., & Le Gros, G. (1999). The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunology and cell biology*, 77(1), 1-10. <https://doi.org/10.1046/J.1440-1711.1999.00795.X>
- Mesa-Galloso, H., Valiente, P. A., Valdés-Tresanco, M. E., Epanand, R. F., Lanio, M. E., Epanand, R. M., Alvarez, C., Tieleman, D. P., & Ros, U. (2019). Membrane Remodeling by the Lytic Fragment of SticholysinII: Implications for the Toroidal Pore Model. *Biophysical journal*, 117(9), 1563-1576. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2019.09.018>
- Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., Rello-Varona, S., Tailler, M., Menger, L., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Ghiringhelli, F., Di Virgilio, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2011a). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6062), 1573-1577. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1208347>
- Michaud, M., Martins, I., Sukkurwala, A. Q., Adjemian, S., Ma, Y., Pellegatti, P., Shen, S., Kepp, O., Scoazec, M., Mignot, G., Rello-Varona, S., Tailler, M., Menger, L., Vacchelli, E., Galluzzi, L., Ghiringhelli, F., Di Virgilio, F., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2011b). Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6062), 1573-1577. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1208347>
- Miyayashi, M., Tada, K., Koike, M., Uchiyama, Y., Kitamura, T., & Nagata, S. (2007). Identification of Tim4 as a phosphatidylserine receptor. *Nature*, 450(7168), 435-439. <https://doi.org/10.1038/nature06307>
- Mohr, A., Henderson, G., Dudus, L., Herr, I., Kuerschner, T., Debatin, K. M., Weiher, H., Fisher, K. J., & Zwacka, R. M. (2004). AAV-encoded expression of TRAIL in experimental human colorectal cancer leads to tumor regression. *Gene Therapy* 2004 11:6, 11(6), 534-543. <https://doi.org/10.1038/SJ.GT.3302154>

- Moore, R. J., Owens, D. M., Stamp, G., Arnott, C., Burke, F., East, N., Holdsworth, H., Turner, L., Rollins, B., Pasparakis, M., Kollias, G., & Balkwill, F. (1999). Mice deficient in tumor necrosis factor-alpha are resistant to skin carcinogenesis. *Nature medicine*, 5(7), 828-831. <https://doi.org/10.1038/10552>
- Mori, S., Wang, L., Takeuchi, T., & Kanda, T. (2004). Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey : Pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology*, 330(2), 375-383. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2004.10.012>
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., & Núñez, G. (2013). K+ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*, 38(6), 1142-1153. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>
- Müoz, L. E., Lauber, K., Schiller, M., Manfredi, A. A., & Herrmann, M. (2010). The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity. *Nature Reviews Rheumatology*, 6(5), 280-289. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2010.46>
- Muramatsu, S. I., Mizukami, H., Young, N. S., & Brown, K. E. (1996). Nucleotide Sequencing and Generation of an Infectious Clone of Adeno-Associated Virus 3. *Virology*, 221(1), 208-217. <https://doi.org/10.1006/VIRO.1996.0367>
- Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021). Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*, 26(3-4), 152-162. <https://doi.org/10.1007/s10495-021-01663-3>
- Murphy, J. M., Czabotar, P. E., Hildebrand, J. M., Lucet, I. S., Zhang, J. G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A. I., Young, S. N., Varghese, L. N., Tannahill, G. M., Hatchell, E. C., Majewski, I. J., Okamoto, T., Dobson, R. C. J., Hilton, D. J., Babon, J. J., ... Alexander, W. S. (2013a). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39(3), 443-453. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.018>
- Murphy, J. M., Czabotar, P. E., Hildebrand, J. M., Lucet, I. S., Zhang, J. G., Alvarez-Diaz, S., Lewis, R., Lalaoui, N., Metcalf, D., Webb, A. I., Young, S. N., Varghese, L. N., Tannahill, G. M., Hatchell, E. C., Majewski, I. J., Okamoto, T., Dobson, R. C. J., Hilton, D. J., Babon, J. J., ... Alexander, W. S. (2013b). The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism. *Immunity*, 39(3), 443-453. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.06.018>
- Murray, R. Z., & Stow, J. L. (2014). Cytokine secretion in macrophages : SNAREs, Rabs, and membrane trafficking. *Frontiers in Immunology*, 5(OCT), 1-9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00538>
- N., H., R., Z., O., M., M., T., A., A., S., V., J., B., P., S., B., S., & J., T. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, 1(6), 489-495.
- Naderer, T., & Fulcher, M. C. (2018). Targeting apoptosis pathways in infections. *Journal of leukocyte biology*, 103(2), 275-285. <https://doi.org/10.1189/JLB.4MR0717-286R>
- Nagata, S. (2018). Apoptosis and Clearance of Apoptotic Cells. *Annual Review of Immunology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-042617-053010>
- Nagata, S., & Tanaka, M. (2017). Programmed cell death and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17(5), 333-340. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.153>
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Iii, W. L. P., & Strohl, W. R. (2017). Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. <https://doi.org/10.1007/s40259-017-0234-5>
- Nicolson, G. L., Brunson, K. W., & Fidler, I. J. (1978). Specificity of arrest, survival, and growth of selected metastatic variant cell lines. *Cancer Research*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/359132/>
- Obeid, M., Tesniere, A., Ghiringhelli, F., Fimia, G. M., Apetoh, L., Perfettini, J. L., Castedo, M., Mignot, G., Panaretakis, T., Casares, N., Métivier, D., Larochette, N., Van Endert, P.,

- Ciccosanti, F., Piacentini, M., Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2007). Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nature Medicine*, *13*(1), 54-61. <https://doi.org/10.1038/nm1523>
- Oberst, A., Dillon, C. P., Weinlich, R., McCormick, L. L., Fitzgerald, P., Pop, C., Hakem, R., Salvesen, G. S., & Green, D. R. (2011). Catalytic activity of the caspase-8-FLIP(L) complex inhibits RIPK3-dependent necrosis. *Nature*, *471*(7338), 363-368. <https://doi.org/10.1038/NATURE09852>
- Op De Beeck, K., Van Laer, L., & Van Camp, G. (2012). DFNA5, a gene involved in hearing loss and cancer : A review. *The Annals of otology, rhinology, and laryngology*, *121*(3), 197-207. <https://doi.org/10.1177/000348941212100310>
- Orning, P., Lien, E., & Fitzgerald, K. A. (2019). Gasdermins and their role in immunity and inflammation. *Journal of Experimental Medicine*. <https://doi.org/10.1084/jem.20190545>
- Orozco, S., Yatim, N., Werner, M. R., Tran, H., Gunja, S. Y., Tait, S. W. G., Albert, M. L., Green, D. R., & Oberst, A. (2014). RIPK1 both positively and negatively regulates RIPK3 oligomerization and necroptosis. *Cell Death and Differentiation*, *21*(10), 1511-1521. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.76>
- Öztürk, S., Schleich, K., & Lavrik, I. N. (2012). Cellular FLICE-like inhibitory proteins (c-FLIPs) : Fine-tuners of life and death decisions. *Experimental Cell Research*, *318*(11), 1324-1331. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.01.019>
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Lujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. *EMBO reports*, *17*(10), 1374-1395. <https://doi.org/10.15252/EMBR.201642195>
- Paludan, S. R., Pradeu, T., Masters, S. L., & Mogensen, T. H. (2021). Constitutive immune mechanisms : Mediators of host defence and immune regulation. *Nature reviews. Immunology*, *21*(3), 137-150. <https://doi.org/10.1038/S41577-020-0391-5>
- Park, S., Hatanpaa, K. J., Xie, Y., Mickey, B. E., Madden, C. J., Raisanen, J. M., Ramnarain, D. B., Xiao, G., Saha, D., Boothman, D. A., Zhao, D., Bachoo, R. M., Pieper, R. O., & Habib, A. A. (2009). The Receptor Interacting Protein 1 Inhibits p53 Induction through NF-κB Activation and Confers a Worse Prognosis in Glioblastoma. *Cancer Research*, *69*(7), 2809-2816. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4079>
- Parry, R. V., Chemnitz, J. M., Frauwirth, K. A., Lanfranco, A. R., Braunstein, I., Kobayashi, S. V., Linsley, P. S., Thompson, C. B., & Riley, J. L. (2005). CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Molecular and cellular biology*, *25*(21), 9543-9553. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.21.9543-9553.2005>
- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, *517*(7534), 311-320. <https://doi.org/10.1038/nature14191>
- Paudel, Y. N., Angelopoulou, E., Piperi, C., Balasubramaniam, V. R. M. T., Othman, I., & Shaikh, M. F. (2019). Enlightening the role of high mobility group box 1 (HMGB1) in inflammation : Updates on receptor signalling. *European Journal of Pharmacology*, *858*(June), 172487. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172487>
- Penaud-Budloo, M., François, A., Clément, N., & Ayuso, E. (2018). Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production. *Molecular Therapy: Methods & Clinical Development*, *8*, 166-180. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.01.002>
- Pfeffer, C. M., & Singh, A. T. K. (2018). Apoptosis : A Target for Anticancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(2). <https://doi.org/10.3390/IJMS19020448>
- Pietrocola, F., Pol, J., Vacchelli, E., Rao, S., Enot, D. P., Baracco, E. E., Levesque, S., Castoldi, F., Jacquelot, N., Yamazaki, T., Senovilla, L., Marino, G., Aranda, F., Durand, S., Sica, V., Chery, A., Lachkar, S., Sigl, V., Bloy, N., ... Kroemer, G. (2016). Caloric Restriction Mimetics

- Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer cell*, 30(1), 147-160. <https://doi.org/10.1016/J.CCELL.2016.05.016>
- Plati, J., Bucur, O., & Khosravi-Far, R. (2008). Dysregulation of apoptotic signaling in cancer : Molecular mechanisms and therapeutic opportunities. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(4), 1124-1149. <https://doi.org/10.1002/jcb.21707>
- Platnich, J. M., Chung, H., Lau, A., Sandall, C. F., Bondzi-Simpson, A., Chen, H. M., Komada, T., Trotman-Grant, A. C., Brandelli, J. R., Chun, J., Beck, P. L., Philpott, D. J., Girardin, S. E., Ho, M., Johnson, R. P., MacDonald, J. A., Armstrong, G. D., & Muruve, D. A. (2018). Shiga Toxin/Lipopolysaccharide Activates Caspase-4 and Gasdermin D to Trigger Mitochondrial Reactive Oxygen Species Upstream of the NLRP3 Inflammasome. *Cell reports*, 25(6), 1525-1536.e7. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.09.071>
- Pozzi, C., Cuomo, A., Spadoni, I., Magni, E., Silvola, A., Conte, A., Sigismund, S., Ravenda, P. S., Bonaldi, T., Zampino, M. G., Cancelliere, C., Di Fiore, P. P., Bardelli, A., Penna, G., & Rescigno, M. (2016). The EGFR-specific antibody cetuximab combined with chemotherapy triggers immunogenic cell death. *Nature medicine*, 22(6), 624-631. <https://doi.org/10.1038/NM.4078>
- Propper, D. J., & Balkwill, F. R. (2022). Harnessing cytokines and chemokines for cancer therapy. *Nature Reviews Clinical Oncology* 2022 19:4, 19(4), 237-253. <https://doi.org/10.1038/S41571-021-00588-9>
- Quarato, G., Guy, C. S., Grace, C. R., Llambi, F., Nourse, A., Rodriguez, D. A., Wakefield, R., Frase, S., Moldoveanu, T., & Green, D. R. (2016a). Sequential Engagement of Distinct MLKL Phosphatidylinositol-Binding Sites Executes Necroptosis. *Molecular cell*, 61(4), 589-601. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2016.01.011>
- Quarato, G., Guy, C. S., Grace, C. R., Llambi, F., Nourse, A., Rodriguez, D. A., Wakefield, R., Frase, S., Moldoveanu, T., & Green, D. R. (2016b). Sequential Engagement of Distinct MLKL Phosphatidylinositol-Binding Sites Executes Necroptosis. *Molecular Cell*, 61(4), 589-601. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.011>
- Ravichandran, K. S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance : Progress and conundrums. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(9), 1807. <https://doi.org/10.1084/JEM.20101157>
- Ravichandran, K. S., & Lorenz, U. (2007). Engulfment of apoptotic cells : Signals for a good meal. *Nature Reviews Immunology*, 7(12), 964-974. <https://doi.org/10.1038/nri2214>
- Redman, J. M., Gibney, G. T., & Atkins, M. B. (2016). Advances in immunotherapy for melanoma. *BMC medicine*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/S12916-016-0571-0>
- Rehm, M., Düßmann, H., Jänicke, R. U., Tavaré, J. M., Kögel, D., & Prehn, J. H. M. (2002). Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process : Role of caspase-3. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24506-24514. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110789200>
- Rehwinkel, J., & Gack, M. U. (2020). RIG-I-like receptors : Their regulation and roles in RNA sensing. *Nature reviews. Immunology*, 20(9), 537-551. <https://doi.org/10.1038/S41577-020-0288-3>
- Restifo, N. P., Marincola, F. M., Kawakami, Y., Taubenberger, J., Yannelli, J. R., & Rosenberg, S. A. (1996). Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 88(2), 100-108. <https://doi.org/10.1093/JNCI/88.2.100>
- Rider, P., Voronov, E., Dinarello, C. A., Apte, R. N., & Cohen, I. (2017). Alarmins : Feel the Stress. *The Journal of Immunology*, 198(4), 1395-1402. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601342>
- Riley, J. L., Mao, M., Kobayashi, S., Biery, M., Burchard, J., Cavet, G., Gregson, B. P., June, C. H., & Linsley, P. S. (2002). Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28,

- ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(18), 11790-11795. <https://doi.org/10.1073/PNAS.162359999>
- Ritter, A. T., Shtengel, G., Xu, C. S., Weigel, A., Hoffman, D. P., Freeman, M., Iyer, N., Alivodej, N., Ackerman, D., Voskoboinik, I., Trapani, J., Hess, H. F., & Mellman, I. (2022). ESCRT-mediated membrane repair protects tumor-derived cells against T cell attack. *Science (New York, N.Y.)*, 376(6591). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABL3855>
- Rogers, C., Erkes, D. A., Nardone, A., Aplin, A. E., Fernandes-Alnemri, T., & Alnemri, E. S. (2019). Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09397-2>
- Rogers, C., Fernandes-Alnemri, T., Mayes, L., Alnemri, D., Cingolani, G., & Alnemri, E. S. (2017). Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. *Nature Communications*, 8, 1-14. <https://doi.org/10.1038/ncomms14128>
- Romagnoli, P. A., Premenko-Lanier, M. F., Loria, G. D., & Altman, J. D. (2013). CD8 T Cell Memory Recall Is Enhanced by Novel Direct Interactions with CD4 T Cells Enabled by MHC Class II Transferred from APCs. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056999>
- Romero, D. (2016). Immunotherapy : PD-1 says goodbye, TIM-3 says hello. *Nature reviews. Clinical oncology*, 13(4), 202-203. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2016.40>
- Ronzitti, G., Gross, D. A., & Mingozzi, F. (2020). Human Immune Responses to Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors. *Frontiers in Immunology*, 11, 670. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.00670/BIBTEX>
- Ros, U., & García-Sáez, A. J. (2015). More Than a Pore : The Interplay of Pore-Forming Proteins and Lipid Membranes. *The Journal of membrane biology*, 248(3), 545-561. <https://doi.org/10.1007/S00232-015-9820-Y>
- Rose, J. A., Hoggan, M. D., & Shatkin, A. J. (1966). Nucleic acid from an adeno-associated virus : Chemical and physical studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 56(1), 86-92. <https://doi.org/10.1073/PNAS.56.1.86>
- Rosenberg, S. A. (2014). Decade in review-cancer immunotherapy : Entering the mainstream of cancer treatment. *Nature reviews. Clinical oncology*, 11(11), 630-632. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2014.174>
- Rossi, A., Dupaty, L., Aillot, L., Zhang, L., Gallien, C., Hallek, M., Odenthal, M., Adriouch, S., Salvetti, A., & Büning, H. (2019). Vector uncoating limits adeno-associated viral vector-mediated transduction of human dendritic cells and vector immunogenicity. *Scientific reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-019-40071-1>
- Ruan, J., Mei, L., Zhu, Q., Shi, G., & Wang, H. (2015). Mixed lineage kinase domain-like protein is a prognostic biomarker for cervical squamous cell cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(11), 15035-15038.
- Ruan, J., Xia, S., Liu, X., Lieberman, J., & Wu, H. (2018). Cryo-EM structure of the gasdermin A3 membrane pore. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0058-6>
- Rühl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J. C., & Broz, P. (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science*, 362(6417), 956-960. <https://doi.org/10.1126/science.aar7607>
- Rutledge, E. A., Halbert, C. L., & Russell, D. W. (1998). Infectious Clones and Vectors Derived from Adeno-Associated Virus (AAV) Serotypes Other Than AAV Type 2. *Journal of Virology*, 72(1), 309-319. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.1.309-319.1998/ASSET/44616C98-059D-4A3D-9D37-2C5A972DD42E/ASSETS/GRAPHIC/JV0181223007.JPEG>

- Rygaard, J., & Povlsen, C. O. (1974). THE MOUSE MUTANT NUDE DOES NOT DEVELOP SPONTANEOUS TUMOURS. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology*, 82B(1), 99-106. <https://doi.org/10.1111/J.1699-0463.1974.TB02299.X>
- Sacks, J. A., & Bevan, M. J. (2008). TRAIL Deficiency Does Not Rescue Impaired CD8 + T Cell Memory Generated in the Absence of CD4 + T Cell Help. *The Journal of Immunology*, 180(7), 4570-4576. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.7.4570>
- Saijo, Y., Tanaka, M., Miki, M., Usui, K., Suzuki, T., Maemondo, M., Hong, X., Tazawa, R., Kikuchi, T., Matsushima, K., & Nukiwa, T. (2002). Proinflammatory Cytokine IL-1 β Promotes Tumor Growth of Lewis Lung Carcinoma by Induction of Angiogenic Factors : In Vivo Analysis of Tumor-Stromal Interaction. *The Journal of Immunology*, 169(1), 469-475. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.469>
- Samulski, R. J., & Muzyczka, N. (2014). AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes. *Annual review of virology*, 1(1), 427-451. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-031413-085355>
- Sansom, D. M. (2000). CD28, CTLA-4 and their ligands : Who does what and to whom? *Immunology*, 101(2), 169-177. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2567.2000.00121.X>
- Santiago-Ortiz, J. L., & Schaffer, D. V. (2016). Adeno-associated virus (AAV) vectors in cancer gene therapy. *Journal of Controlled Release*, 240, 287-301. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.01.001>
- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Stahlberg, H., Farady, C. J., Müller, D. J., Broz, P., & Hiller, S. (2016). GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO Journal*, 35(16), 1766-1778. <https://doi.org/10.15252/embj.201694696>
- Scarpitta, A., Hacker, U. T., Büning, H., Boyer, O., & Adriouch, S. (2021). Pyroptotic and Necroptotic Cell Death in the Tumor Microenvironment and Their Potential to Stimulate Anti-Tumor Immune Responses. *Frontiers in Oncology*, 11(August), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.731598>
- 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. (2015). 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 : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 33(17), 1889-1894. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.2736>
- Schneider, H., Downey, J., Smith, A., Zinselmeyer, B. H., Rush, C., Brewer, J. M., Wei, B., Hogg, N., Garside, P., & Rudd, C. E. (2006). Reversal of the TCR stop signal by CTLA-4. *Science (New York, N.Y.)*, 313(5795), 1972-1975. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1131078>
- Schneider, H., Mandelbrot, D. A., Greenwald, R. J., Ng, F., Lechler, R., Sharpe, A. H., & Rudd, C. E. (2002). Cutting edge : CTLA-4 (CD152) differentially regulates mitogen-activated protein kinases (extracellular signal-regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase) in CD4+ T cells from receptor/ligand-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(7), 3475-3479. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.169.7.3475>
- Schrörs, B., Hos, B. J., Yildiz, I. G., Löwer, M., Lang, F., Holtsträter, C., Becker, J., Vormehr, M., Sahin, U., Ossendorp, F., & Diken, M. (2023). MC38 colorectal tumor cell lines from two different sources display substantial differences in transcriptome, mutanome and neoantigen expression. *Frontiers in Immunology*, 14, 1102282. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1102282/FULL>
- Segawa, K., Kurata, S., Yanagihashi, Y., Brummelkamp, T. R., Matsuda, F., & Nagata, S. (2014). Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. *Science (New York, N.Y.)*, 344(6188), 1164-1168. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1252809>

- Seifert, L., Werba, G., Tiwari, S., Giao Ly, N. N., Alothman, S., Alqunaibit, D., Avanzi, A., Barilla, R., Daley, D., Greco, S. H., Torres-Hernandez, A., Pergamo, M., Ochi, A., Zambirinis, C. P., Pan-sari, M., Rendon, M., Tippens, D., Hundeyin, M., Mani, V. R., ... Miller, G. (2016). The necro-some promotes pancreatic oncogenesis via CXCL1 and Mincle-induced immune suppression. *Nature*, *532*(7598), 245-249. <https://doi.org/10.1038/nature17403>
- Sengupta, D., Leontiadou, H., Mark, A. E., & Marrink, S. J. (2008). Toroidal pores formed by antimicrobial peptides show significant disorder. *Biochimica et biophysica acta*, *1778*(10), 2308-2317. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2008.06.007>
- Senovilla, L., Galluzzi, L., Mariño, G., Vitale, I., Castedo, M., & Kroemer, G. (2012). Immunosurveillance against cancer-associated hyperploidy. *Oncotarget*, *3*(11), 1270-1271. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.753>
- Serhan, C. N., Chiang, N., Dalli, J., & Levy, B. D. (2015). Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *7*(2), 1-20. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016311>
- Serhan, C. N., & Levy, B. D. (2018). Resolvins in inflammation : Emergence of the pro-resolving superfamily of mediators. *Journal of Clinical Investigation*, *128*(7), 2657-2669. <https://doi.org/10.1172/JCI97943>
- Serhan, C. N., & Savill, J. (2005). Resolution of inflammation : The beginning programs the end. *Nature Immunology*, *6*(12), 1191-1197. <https://doi.org/10.1038/ni1276>
- Shangguan, F., Zhou, H., Ma, N., Wu, S., Huang, H., Jin, G., Wu, S., Hong, W., Zhuang, W., Xia, H., & Lan, L. (2021). A Novel Mechanism of Cannabidiol in Suppressing Hepatocellular Carcinoma by Inducing GSDME Dependent Pyroptosis. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.697832>
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, *410*(6832), 1107-1111. <https://doi.org/10.1038/35074122>
- Shen, X., Wang, H., Weng, C., Jiang, H., & Chen, J. (2021). Caspase 3/GSDME-dependent pyroptosis contributes to chemotherapy drug-induced nephrotoxicity. *Cell death & disease*, *12*(2). <https://doi.org/10.1038/S41419-021-03458-5>
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015a). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, *526*(7575), 660-665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015b). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, *526*(7575), 660-665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Shi, P., Tang, A., Xian, L., Hou, S., Zou, D., Lv, Y., Huang, Z., Wang, Q., Song, A., Lin, Z., & Gao, X. (2015). Loss of conserved Gsdma3 self-regulation causes autophagy and cell death. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/BJ20150204>
- Shichita, T., Ito, M., Morita, R., Komai, K., Noguchi, Y., Ooboshi, H., Koshida, R., Takahashi, S., Kodama, T., & Yoshimura, A. (2017). MAFB prevents excess inflammation after ischemic stroke by accelerating clearance of damage signals through MSR1. *Nature Medicine*, *23*(6), 723-732. <https://doi.org/10.1038/nm.4312>
- Shimada, K., Crother, T. R., Karlin, J., Dagvadorj, J., Chiba, N., Chen, S., Ramanujan, V. K., Wolf, A. J., Vergnes, L., Ojcius, D. M., Rentsendorj, A., Vargas, M., Guerrero, C., Wang, Y., Fitzgerald, K. A., Underhill, D. M., Town, T., & Arditi, M. (2012). Oxidized Mitochondrial DNA Activates the NLRP3 Inflammasome during Apoptosis. *Immunity*, *36*(3), 401-414. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.01.009>

- Shinkai, Y., Rathbun, O Gary, Lam, K. P., Oltz, E. M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., Stall, A. M., & Alt, F. W. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell*, *68*(5), 855-867. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90029-C](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90029-C)
- Sistigu, A., Yamazaki, T., Vacchelli, E., Chaba, K., Enot, D. P., Adam, J., Vitale, I., Goubar, A., Baracco, E. E., Remédios, C., Fend, L., Hannani, D., Aymeric, L., Ma, Y., Niso-Santano, M., Kepp, O., Schultze, J. L., Tüting, T., Belardelli, F., ... Zitvogel, L. (2014). Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nature medicine*, *20*(11), 1301-1309. <https://doi.org/10.1038/NM.3708>
- Smyth, M. J., Crowe, N. Y., & Godfrey, D. I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *International immunology*, *13*(4), 459-463. <https://doi.org/10.1093/INTIMM/13.4.459>
- Smyth, M. J., Thia, K. Y. T., Street, S. E. A., MacGregor, D., Godfrey, D. I., & Trapani, J. A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *The Journal of experimental medicine*, *192*(5), 755-760. <https://doi.org/10.1084/JEM.192.5.755>
- Snyder, A. G., Hubbard, N. W., Messmer, M. N., Kofman, S. B., Hagan, C. E., Orozco, S. L., Chiang, K., Daniels, B. P., Baker, D., & Oberst, A. (2019). Intratumoral activation of the necroptotic pathway components RIPK1 and RIPK3 potentiates antitumor immunity. *Science Immunology*, *4*(36), eaaw2004. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aaw2004>
- Sollberger, G., Choidas, A., Burn, G. L., Habenberger, P., Lucrezia, R. D., Kordes, S., Menninger, S., Eickhoff, J., Nussbaumer, P., Klebl, B., Krüger, R., Herzig, A., & Zychlinsky, A. (2018). Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Science immunology*, *3*(26). <https://doi.org/10.1126/SCIIMMUNOL.AAR6689>
- Spencer, S. L., Gaudet, S., Albeck, J. G., Burke, J. M., & Sorger, P. K. (2009). Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*, *459*(7245), 428-432. <https://doi.org/10.1038/nature08012>
- Sprooten, J., & Garg, A. D. (2020). Type I interferons and endoplasmic reticulum stress in health and disease. *International review of cell and molecular biology*, *350*, 63-118. <https://doi.org/10.1016/BS.IRCMB.2019.10.004>
- Steinman, R. M., Hawiger, D., & Nussenzweig, M. C. (2003). Tolerogenic dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, *21*, 685-711. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141040>
- Stowe, I., Lee, B., & Kayagaki, N. (2015). Caspase-11 : Arming the guards against bacterial infection. *Immunological Reviews*, *265*(1), 75-84. <https://doi.org/10.1111/imr.12292>
- Street, S. E. A., Cretney, E., & Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, *97*(1), 192-197. <https://doi.org/10.1182/BLOOD.V97.1.192>
- Street, S. E. A., Trapani, J. A., MacGregor, D., & Smyth, M. J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *The Journal of experimental medicine*, *196*(1), 129-134. <https://doi.org/10.1084/JEM.20020063>
- Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science (New York, N.Y.)*, *183*(4124), 534-536. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.183.4124.534>
- Stutman, O. (1979). Chemical Carcinogenesis in Nude Mice : Comparison Between Nude Mice From Homozygous Matings and Heterozygous Matings and Effect of Age and Carcinogen Dose. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *62*(2), 353-358. <https://doi.org/10.1093/JNCI/62.2.353>

- Su, L., Quade, B., Wang, H., Sun, L., Wang, X., & Rizo, J. (2014). A Plug Release Mechanism for Membrane Permeation by MLKL. *Structure*, 22(10), 1489-1500. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.07.014>
- Sun, J. C., & Bevan, M. J. (2003). Defective CD8 T Cell Memory Following Acute Infection Without CD4 T Cell Help. *Science*, 300(5617), 339-342. <https://doi.org/10.1126/science.1083317>
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., & Wang, X. (2012a). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1-2), 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>
- Sun, L., Wang, H., Wang, Z., He, S., Chen, S., Liao, D., Wang, L., Yan, J., Liu, W., Lei, X., & Wang, X. (2012b). Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase. *Cell*, 148(1-2), 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.11.031>
- Suzuki, J., Denning, D. P., Imanishi, E., Horvitz, H. R., & Nagata, S. (2013). Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6144), 403-406. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1236758>
- Takeda, K., Nakayama, M., Hayakawa, Y., Kojima, Y., Ikeda, H., Imai, N., Ogasawara, K., Okumura, K., Thomas, D. M., & Smyth, M. J. (2017). IFN- γ is required for cytotoxic T cell-dependent cancer genome immunoediting. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/ncomms14607>
- Tanzer, M. C., Matti, I., Hildebrand, J. M., Young, S. N., Wardak, A., Tripaydonis, A., Petrie, E. J., Mildenhall, A. L., Vaux, D. L., Vince, J. E., Czabotar, P. E., Silke, J., & Murphy, J. M. (2016). Evolutionary divergence of the necroptosis effector MLKL. *Cell Death and Differentiation*, 23(7), 1185-1197. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.169>
- Tao, Y., Murakami, Y., Vavvas, D. G., & Sonoda, K. H. (2022). Necroptosis and Neuroinflammation in Retinal Degeneration. *Frontiers in Neuroscience*, 16, 898. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2022.911430/BIBTEX>
- Terme, M., Ullrich, E., Aymeric, L., Meinhardt, K., Desbois, M., Delahaye, N., Viaud, S., Ryffel, B., Yagita, H., Kaplanski, G., Prévost-Blondel, A., Kato, M., Schultze, J. L., Tartour, E., Kroemer, G., Chaput, N., & Zitvogel, L. (2011). IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Research*, 71(16), 5393-5399. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-0993>
- Thorsen, F., Afione, S., Huszthy, P. C., Tysnes, B. B., Svendsen, A., Bjerkgvig, R., Kotin, R. M., Lønning, P. E., & Hoover, F. (2006). Adeno-associated virus (AAV) serotypes 2, 4 and 5 display similar transduction profiles and penetrate solid tumor tissue in models of human glioma. *The journal of gene medicine*, 8(9), 1131-1140. <https://doi.org/10.1002/JGM.939>
- Thorsson, V., Gibbs, D. L., Brown, S. D., Wolf, D., Bortone, D. S., Ou Yang, T. H., Porta-Pardo, E., Gao, G. F., Plaisier, C. L., Eddy, J. A., Ziv, E., Culhane, A. C., Paull, E. O., Sivakumar, I. K. A., Gentles, A. J., Malhotra, R., Farshidfar, F., Colaprico, A., Parker, J. S., ... Shmulevich, Ilya. (2018). The Immune Landscape of Cancer. *Immunity*, 48(4), 812. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.03.023>
- Trepel, M., Körbelin, J., Spies, E., Heckmann, M. B., Hunger, A., Fehse, B., Katus, H. A., Kleinschmidt, J. A., Müller, O. J., & Michelfelder, S. (2015). Treatment of multifocal breast cancer by systemic delivery of dual-targeted adeno-associated viral vectors. *Gene Therapy* 2015 22:10, 22(10), 840-847. <https://doi.org/10.1038/GT.2015.52>
- Tseng, Y. S., & Agbandje-McKenna, M. (2014). Mapping the AAV Capsid Host Antibody Response toward the Development of Second Generation Gene Delivery Vectors. *Frontiers in immunology*, 5(JAN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.00009>
- Tummers, B., & Green, D. R. (2017). Caspase-8 : Regulating life and death. *Immunological Reviews*, 277(1), 76-89. <https://doi.org/10.1111/imr.12541>

- Urabe, M., Ding, C., & Kotin, R. M. (2002). Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human gene therapy*, *13*(16), 1935-1943. <https://doi.org/10.1089/10430340260355347>
- Vacchelli, E., Ma, Y., Baracco, E. E., Sistigu, A., Enot, D. P., Pietrocola, F., Yang, H., Adjemian, S., Chaba, K., Semeraro, M., Signore, M., Ninno, A. D., Lucarini, V., Peschiaroli, F., Businaro, L., Gerardino, A., Manic, G., Ulas, T., Günther, P., ... Kroemer, G. (2015). Chemotherapy-induced antitumor immunity requires formyl peptide receptor 1. *Science (New York, N.Y.)*, *350*(6263), 972-978. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD0779>
- Van Den Broek, M. F., Kägi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J. M., Zinkernagel, R. M., & Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *The Journal of experimental medicine*, *184*(5), 1781-1790. <https://doi.org/10.1084/JEM.184.5.1781>
- Van Hoecke, L., Van Lint, S., Roose, K., Van Parys, A., Vandenabeele, P., Grooten, J., Tavernier, J., De Koker, S., & Saelens, X. (2018). Treatment with mRNA coding for the necroptosis mediator MLKL induces antitumor immunity directed against neo-epitopes. *Nature Communications*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05979-8>
- Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., & Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, *9*(2), 267-276. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80609-3](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80609-3)
- Vietri, M., Radulovic, M., & Stenmark, H. (2020). The many functions of ESCRTs. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *21*(1), 25-42. <https://doi.org/10.1038/S41580-019-0177-4>
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R., & Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells [9]. *Nature*, *390*(6658), 350-351. <https://doi.org/10.1038/37022>
- Walker, L. S. K. (2013). Treg and CTLA-4 : Two intertwining pathways to immune tolerance. *Journal of autoimmunity*, *45*(100), 49-57. <https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2013.06.006>
- Wang, D., & Lippard, S. J. (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, *4*(4), 307-320. <https://doi.org/10.1038/nrd1691>
- Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature reviews. Drug discovery*, *18*(5), 358-378. <https://doi.org/10.1038/S41573-019-0012-9>
- Wang, H., Sun, L., Su, L., Rizo, J., Liu, L., Wang, L. F., Wang, F. S., & Wang, X. (2014). Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular cell*, *54*(1), 133-146. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2014.03.003>
- Wang, Q., Wu, Z., Zhang, J., Firman, J., Wei, H., Zhuang, Z., Liu, L. S., Miao, L., Hu, Y., Li, D., Diao, Y., & Xiao, W. (2017). A Robust System for Production of Superabundant VP1 Recombinant AAV Vectors. *Molecular therapy. Methods & clinical development*, *7*, 146-156. <https://doi.org/10.1016/J.OMTM.2017.11.002>
- Wang, W. J., Chen, D., Jiang, M. Z., Bing, X. U., Li, X. W., Chu, Y., Zhang, Y. J., Mao, R., Liang, J., & Fan, D. M. (2018). Downregulation of gasdermin D promotes gastric cancer proliferation by regulating cell cycle-related proteins. *Journal of Digestive Diseases*, *19*(2), 74-83. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12576>
- Wang, W. J., Marinis, J. M., Beal, A. M., Savadkar, S., Wu, Y. Y., Khan, M., Taunk, P. S., Wu, N., Su, W., Wu, J. J., Ahsan, A., Kurz, E., Chen, T., Yaboh, I., Li, F., Gutierrez, J., Diskin, B., Hundayin, M., Reilly, M., ... Dixit, V. M. (2019). Necroptosis : The Release of Damage-Associated

- Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Nature*, 10(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003>
- Wang, W., Marinis, J. M., Beal, A. M., Savadkar, S., Wu, Y., Khan, M., Taunk, P. S., Wu, N., Su, W., Wu, J., Ahsan, A., Kurz, E., Chen, T., Yaboh, I., Li, F., Gutierrez, J., Diskin, B., Hundeyin, M., Reilly, M., ... Miller, G. (2018). RIP1 Kinase Drives Macrophage-Mediated Adaptive Immune Tolerance in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell*, 34(5), 757-774.e7. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.10.006>
- Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Wang, K., & Shao, F. (2017a). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 547(7661), 99-103. <https://doi.org/10.1038/NATURE22393>
- Wang, Y., Gao, W., Shi, X., Ding, J., Liu, W., He, H., Wang, K., & Shao, F. (2017b). Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. *Nature*, 547(7661), 99-103. <https://doi.org/10.1038/nature22393>
- Wang, Y., Shi, P., Chen, Q., Huang, Z., Zou, D., Zhang, J., Gao, X., & Lin, Z. (2019). Mitochondrial ROS promote macrophage pyroptosis by inducing GSDMD oxidation. *Journal of molecular cell biology*, 11(12), 1069-1082. <https://doi.org/10.1093/JMCB/MJZ020>
- Wang, Y., Yin, B., Li, D., Wang, G., Han, X., & Sun, X. (2018). GSDME mediates caspase-3-dependent pyroptosis in gastric cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 1418-1425. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.156>
- Webb, M. S., Miller, A. L., & Thompson, E. B. (2007). In CEM cells the autosomal deafness gene *dfna5* is regulated by glucocorticoids and forskolin. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 107(1-2), 15-21. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2007.02.004>
- Weinlich, R., Oberst, A., Beere, H. M., & Green, D. R. (2017). Necroptosis in development, inflammation and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 18(2), 127-136. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.149>
- West, A. P., Brodsky, I. E., Rahner, C., Woo, D. K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Walsh, M. C., Choi, Y., Shadel, G. S., & Ghosh, S. (2011). TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS. *Nature* 2011 472:7344, 472(7344), 476-480. <https://doi.org/10.1038/nature09973>
- Wolf, A. J., & Underhill, D. M. (2018). Peptidoglycan recognition by the innate immune system. *Nature reviews. Immunology*, 18(4), 243-254. <https://doi.org/10.1038/NRI.2017.136>
- Wong, R. S. Y. (2011). Apoptosis in cancer : From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 30(1), 87. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-87>
- Woo, S. Y., & Lee, H. (2017). Effect of lipid shape on toroidal pore formation and peptide orientation in lipid bilayers. *Physical chemistry chemical physics: PCCP*, 19(32), 21340-21349. <https://doi.org/10.1039/C7CP02708G>
- Workenhe, S. T., Pol, J., & Kroemer, G. (2021). Tumor-intrinsic determinants of immunogenic cell death modalities. *OncoImmunology*, 10(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2021.1893466>
- Wu, M., Wang, Y., Yang, D., Gong, Y., Rao, F., Liu, R., Danna, Y., Li, J., Fan, J., Chen, J., Zhang, W., & Zhan, Q. (2019). A PLK1 kinase inhibitor enhances the chemosensitivity of cisplatin by inducing pyroptosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *EBioMedicine*, 41, 244-255. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2019.02.012>
- Wu, X. N., Yang, Z. H., Wang, X. K., Zhang, Y., Wan, H., Song, Y., Chen, X., Shao, J., & Han, J. (2014). Distinct roles of RIP1-RIP3 hetero- and RIP3-RIP3 homo-interaction in mediating necroptosis. *Cell Death and Differentiation*, 21(11), 1709-1720. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.77>
- Wu, Z., Sun, J., Zhang, T., Yin, C., Yin, F., Van Dyke, T., Samulski, R. J., & Monahan, P. E. (2008). Optimization of self-complementary AAV vectors for liver-directed expression results in

- sustained correction of hemophilia B at low vector dose. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 16(2), 280-289. <https://doi.org/10.1038/SJ.MT.6300355>
- Xia, B., Fang, S., Chen, X., Hu, H., Chen, P., Wang, H., & Gao, Z. (2016). MLKL forms cation channels. *Cell Research*, 26(5), 517-528. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.26>
- Xie, T., Peng, W., Yan, C., Wu, J., Gong, X., & Shi, Y. (2013). Structural Insights into RIP3-Mediated Necroptotic Signaling. *Cell Reports*, 5(1), 70-78. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.044>
- Xu, Y., Lin, Z., Zhao, N., Zhou, L., Liu, F., Cichacz, Z., Zhang, L., Zhan, Q., & Zhao, X. (2014). Receptor interactive protein kinase 3 promotes cisplatin-triggered necrosis in apoptosis-resistant esophageal squamous cell carcinoma cells. *PLoS ONE*, 9(6), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100127>
- Yadav, M., Jhunjunwala, S., Phung, Q. T., Lupardus, P., Tanguay, J., Bumbaca, S., Franci, C., Cheung, T. K., Fritsche, J., Weinschenk, T., Modrusan, Z., Mellman, I., Lill, J. R., & Delamarre, L. (2014). Predicting immunogenic tumour mutations by combining mass spectrometry and exome sequencing. *Nature*, 515(7528), 572-576. <https://doi.org/10.1038/NATURE14001>
- Yamaguchi, H., Takagi, J., Miyamae, T., Yokota, S., Fujimoto, T., Nakamura, S., Ohshima, S., Naka, T., & Nagata, S. (2008). Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. *Journal of Leukocyte Biology*, 83(5), 1300-1307. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107730>
- Yamamoto, K., Venida, A., Yano, J., Biancur, D. E., Kakiuchi, M., Gupta, S., Sohn, A. S. W., Mukhopadhyay, S., Lin, E. Y., Parker, S. J., Banh, R. S., Paulo, J. A., Wen, K. W., Debnath, J., Kim, G. E., Mancias, J. D., Fearon, D. T., Perera, R. M., & Kimmelman, A. C. (2020). Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature*, 581(7806), 100-105. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2229-5>
- Yamazaki, T., Kirchmair, A., Sato, A., Buqué, A., Rybstein, M., Petroni, G., Bloy, N., Finotello, F., Stafford, L., Navarro Manzano, E., Ayala de la Peña, F., García-Martínez, E., Formenti, S. C., Trajanoski, Z., & Galluzzi, L. (2020). Mitochondrial DNA drives abscopal responses to radiation that are inhibited by autophagy. *Nature immunology*, 21(10), 1160-1171. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-0751-0>
- Yang, H., Biermann, M. H., Brauner, J. M., Liu, Y., Zhao, Y., & Herrmann, M. (2016). New insights into neutrophil extracellular traps : Mechanisms of formation and role in inflammation. *Frontiers in Immunology*, 7(AUG), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00302>
- Yang, H., Wang, H., Chavan, S. S., & Andersson, U. (2015). High mobility group box protein 1 (HMGB1) : The prototypical endogenous danger molecule. *Molecular Medicine*, 21, S6-S12. <https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00087>
- Yatim, N., Jusforgues-Saklani, H., Orozco, S., Schulz, O., Da Silva, R. B., Reis E Sousa, C., Green, D. R., Oberst, A., & Albert, M. L. (2015). RIPK1 and NF-κB signaling in dying cells determines cross-priming of CD8⁺ T cells. *Science*, 350(6258), 328-334. <https://doi.org/10.1126/science.aad0395>
- Yu, X., & He, S. (2017). GSDME as an executioner of chemotherapy-induced cell death. *Science China Life Sciences*, 60(11), 1291-1294. <https://doi.org/10.1007/s11427-017-9142-2>
- Zaki, M. H., Vogel, P., Body-Malapel, M., Lamkanfi, M., & Kanneganti, T.-D. (2010). IL-18 Production Downstream of the Nlrp3 Inflammasome Confers Protection against Colorectal Tumor Formation. *The Journal of Immunology*, 185(8), 4912-4920. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002046>
- Zelenay, S., Van Der Veen, A. G., Böttcher, J. P., Snelgrove, K. J., Rogers, N., Acton, S. E., Chakravarty, P., Girotti, M. R., Marais, R., Quezada, S. A., Sahai, E., & Reis E Sousa, C. (2015). Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell*, 162(6), 1257-1270. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2015.08.015>

- Zhang, C. cheng, Li, C. guang, Wang, Y. feng, Xu, L. hui, He, X. hui, Zeng, Q. zhen, Zeng, C. ying, Mai, F. yi, Hu, B., & Ouyang, D. yun. (2019). Chemotherapeutic paclitaxel and cisplatin differentially induce pyroptosis in A549 lung cancer cells via caspase-3/GSDME activation. *Apoptosis*, 24(3-4), 312-325. <https://doi.org/10.1007/s10495-019-01515-1>
- Zhang, D.-W., Shao, J., Lin, J., Zhang, N., Lu, B.-J., Lin, S.-C., Dong, M.-Q., & Han, J. (2009). RIP3, an Energy Metabolism Regulator That Switches TNF-Induced Cell Death from Apoptosis to Necrosis. *Science*, 325(5938), 332-336. <https://doi.org/10.1126/science.1172308>
- Zhang, X., Zhang, P., An, L., Sun, N., Peng, L., Tang, W., Ma, D., & Chen, J. (2020). Miltirone induces cell death in hepatocellular carcinoma cell through GSDME-dependent pyroptosis. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, 10(8), 1397-1413. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2020.06.015>
- Zhang, Z., Zhang, H., Li, D., Zhou, X., Qin, Q., & Zhang, Q. (2021). Caspase-3-mediated GSDME induced Pyroptosis in breast cancer cells through the ROS/JNK signalling pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 25(17), 8159-8168. <https://doi.org/10.1111/JCMM.16574>
- Zhang, Z., Zhang, Y., Xia, S., Kong, Q., Li, S., Liu, X., Junqueira, C., Meza-Sosa, K. F., Mok, T. M. Y., Ansara, J., Sengupta, S., Yao, Y., Wu, H., & Lieberman, J. (2020). Gasdermin E suppresses tumour growth by activating anti-tumour immunity. *Nature*, 579(7799), 415-420. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2071-9>
- Zhao, J., Jitkaew, S., Cai, Z., Choksi, S., Li, Q., Luo, J., & Liu, Z. G. (2012). Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5322-5327. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200012109>
- Zhao, Y., Shi, J., & Shao, F. (2018). Inflammatory caspases : Activation and cleavage of Gasdermin-D in vitro and during pyroptosis. *Methods in Molecular Biology*, 1714, 131-148. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7519-8_9
- Zitvogel, L., Galluzzi, L., Kepp, O., Smyth, M. J., & Kroemer, G. (2015). Type I interferons in anti-cancer immunity. *Nature reviews. Immunology*, 15(7), 405-414. <https://doi.org/10.1038/NRI3845>
- Zitvogel, L., Perreault, C., Finn, O. J., & Kroemer, G. (2021). Beneficial autoimmunity improves cancer prognosis. *Nature reviews. Clinical oncology*, 18(9), 591-602. <https://doi.org/10.1038/S41571-021-00508-X>
- Zou, W., & Chen, L. (2008). Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology*, 8(6), 467-477. <https://doi.org/10.1038/NRI2326>

Annexes

Publication 2

Revue portant sur la pyroptose et la nécroptose et l'impact de ces voies moléculaires dans le contexte tumoral.



Pyroptotic and Necroptotic Cell Death in the Tumor Microenvironment and Their Potential to Stimulate Anti-Tumor Immune Responses

Allan Scarpitta¹, Ulrich T. Hacker², Hildegard Büning^{3,4}, Olivier Boyer^{1,5} and Sahil Adriouch^{1*}

¹ UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative Therapies, Normandie University, Rouen, France, ² Department of Oncology, Gastroenterology, Hepatology, Pulmonology, and Infectious Diseases, University Cancer Center Leipzig (UCCL), University of Leipzig Medical Center, Leipzig, Germany, ³ Institute of Experimental Hematology, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ⁴ REBIRTH Research Center for Translational Regenerative Medicine, Hannover Medical School, Hannover, Germany, ⁵ Department of Immunology and Biotherapy, Rouen University Hospital, Rouen, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Christopher James Pirozzi,
Duke University, United States

Reviewed by:

Irina Balalaeva,
Lobachevsky State University of
Nizhny Novgorod, Russia
Karol M. Prieto,
Pontifical Javeriana University,
Colombia

*Correspondence:

Sahil Adriouch
sahil.adriouch@univ-rouen.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Molecular and Cellular Oncology,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 27 June 2021

Accepted: 27 July 2021

Published: 19 August 2021

Citation:

Scarpitta A, Hacker UT, Büning H,
Boyer O and Adriouch S (2021)
Pyroptotic and Necroptotic Cell Death
in the Tumor Microenvironment and
Their Potential to Stimulate Anti-Tumor
Immune Responses.
Front. Oncol. 11:731598.
doi: 10.3389/fonc.2021.731598

Cancer remains the second most common cause of death worldwide affecting around 10 million patients every year. Among the therapeutic options, chemotherapeutic drugs are widely used but often associated with side effects. In addition, toxicity against immune cells may hamper anti-tumor immune responses. Some chemotherapeutic drugs, however, preserve immune functions and some can even stimulate anti-tumor immune responses through the induction of immunogenic cell death (ICD) rather than apoptosis. ICD stimulates the immune system by several mechanisms including the release of damage-associated molecular patterns (DAMPs) from dying cells. In this review, we will discuss the consequences of inducing two recently characterized forms of ICD, i.e., pyroptosis and necroptosis, in the tumor microenvironment (TME) and the perspectives they may offer to increase the immunogenicity of the so-called cold tumors and to stimulate effective anti-tumor immune responses.

Keywords: immunogenic cell death and anti-tumor immunity, pyroptosis, necroptosis, anti-tumor immune responses, tumor immune microenvironment, inflammation and immunity

INTRODUCTION

The term apoptosis was already proposed in 1972 to describe a form “of controlled cell deletion” associated with cytoplasmic condensation and cell fragmentation (1). Later, apoptosis was recognized as the archetypal form of programmed cell death involved in the main physiological processes such as

Abbreviations: DAMPs, damage-associated molecular patterns; GSDMD, gasdermin D; GSDME, gasdermin E; ICD, immunogenic cell death; MLKL, mixed lineage kinase domain-like; PAMPs, pathogen-associated molecular patterns; PRRs, pattern-recognition receptors; TME, tumor microenvironment

embryonic development, morphogenesis, or cell turnover (2). Apoptosis is now largely described and characterized at the cellular and molecular levels. It involves the activation of initiator caspases (e.g., caspase 8, caspase 9), primarily responsible for the activation of downstream effector caspases (e.g., caspase 3) that propagate the death signal by cleaving specific cellular substrates, leading to a controlled dismantling of the cell. Morphological hallmarks associated with apoptosis include cell shrinkage, cell blebbing, formation of apoptotic bodies, and their rapid engulfment by neighboring phagocytic cells. Therefore, apoptosis has been early considered as a regulated and controlled process that avoids inflammation and, therefore, remains immunologically silent. This was opposed to the well-known necrosis, considered instead as a passive, non-programmed form of cell death, resulting in the uncontrolled release of the intracellular content which contains pro-inflammatory molecules that can initiate immune responses. Apoptosis *versus* necrosis have long been regarded as the only conceptual model, even if “unclassical forms” of cell death were reported. It was only recently that the spectrum of cell death mechanism has been deciphered into its broader diversity including notably pyroptosis and necroptosis that constitute the focus of this review. They represent, as for apoptosis, programmed and controlled forms of cell death, but share with necrosis the ability to release pro-inflammatory intracellular molecules that initiate immune responses. Apart from apoptosis, pyroptosis, and necroptosis, other forms of programmed cell death have been described as ferroptosis, parthanatos, autophagy-dependent cell death, lysosome-dependent cell death, NETosis, or entosis. They will however not be discussed here even if some of them are immunogenic. Also, ICD can also be induced by mechanical or physical treatment and not necessarily from programmed forms of cell death.

First generation chemotherapeutic drugs interfere with cell cycle progression and most of them induce apoptosis in a wide range of cells (3). Consequently, rapidly dividing non-cancer cells, akin to hematopoietic and immune cells, are killed and, due to the induction of apoptosis, anti-tumor immune responses are not induced which represents as what we know now an important risk factor for relapse.

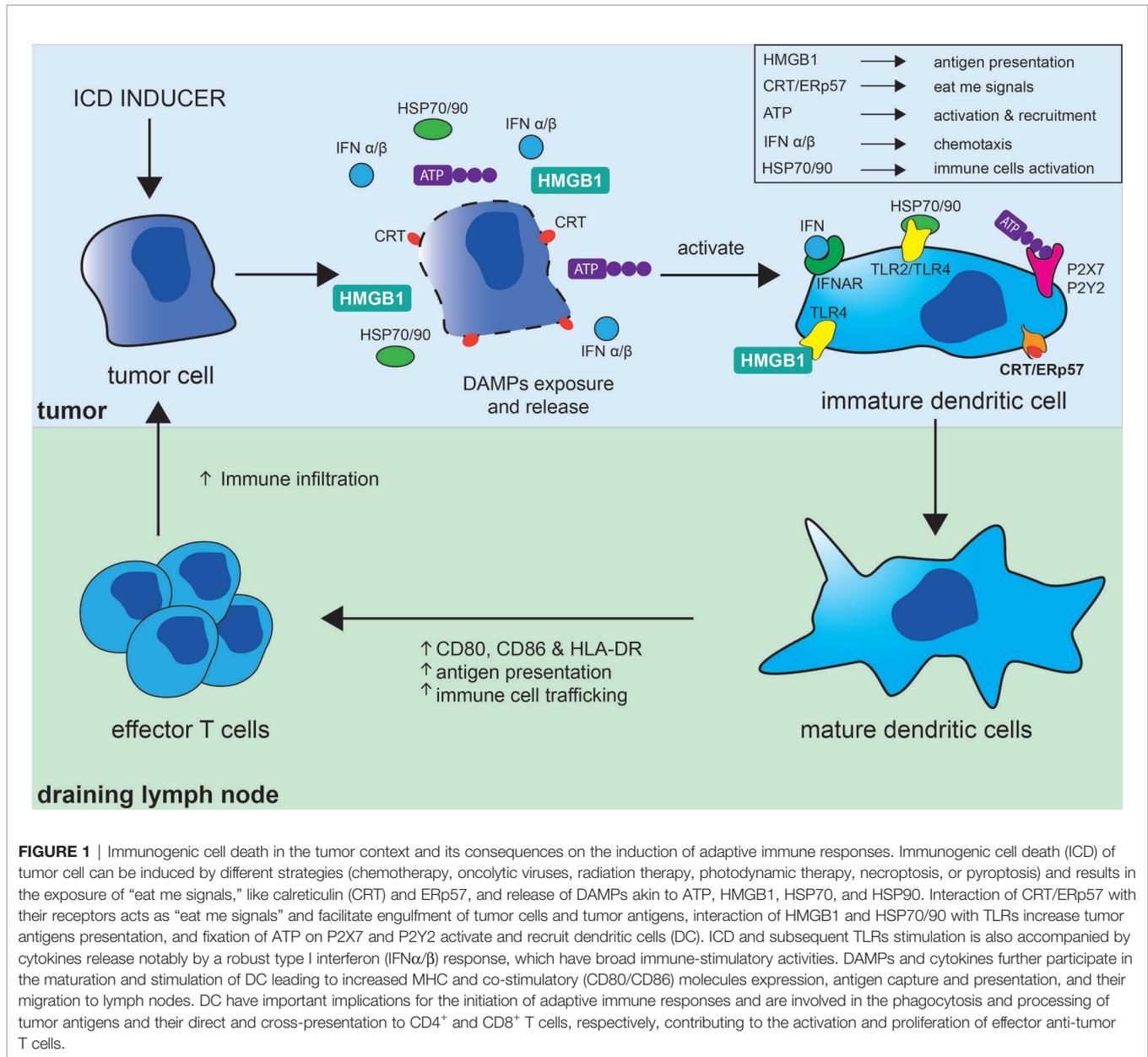
With the advent of the pyroptosis and necroptosis concept, extensive efforts have been made to identify amongst current anti-cancer treatment strategies which include next generation chemotherapeutic drugs, irradiation as well as targeted anti-cancer approaches, those that induce a non-apoptotic cell death. Specifically, the concept emerged that through immunogenic cell death (ICD) accompanied by the release of intracellular adjuvant-like molecules known as damage-associated molecular patterns (DAMPs), a potent anti-tumor adaptive immune response is induced (4).

Immunogenic Cell Death Is Associated With the Release of Danger Signals That Act as Potent Pro-Inflammatory Immune Adjuvants

In 1994, Polly Matzinger proposed the “danger” model, hypothesizing that the immune system is able to distinguish innocuous circumstances (e.g., commensal bacteria) from

threatening situations that are associated with cell death and release of “danger signals” (5). Danger signals encompass, by definition, any molecule invisible to immune cells in normal conditions, which could be liberated or exposed at the cell membrane to alert the immune system in situation of cellular stress, infection, or upon rupture of the cytoplasmic membrane when cells are dying or after a tissue injury. Numerous molecules that are normally present in the intracellular compartment effectively act as danger signals and behave as potent pro-inflammatory adjuvants when released in the extracellular space. A number of molecules have been found to comply to this definition of DAMPs such as, for instance, mitochondrial or nuclear DNA, mitochondrial formylated peptides, heat shock proteins (HSP), F-actin, histones, ATP, or HMGB1 (6).

Not surprisingly, the release of some of these DAMPs has been used to document the occurrence of ICD and have become the molecular hallmarks associated with ICD. The best characterized DAMPs associated with ICD are CRT/ERp57, HMGB1, HSP 70/90, and extracellular ATP (**Figure 1**). During ICD, the ER-associated molecules CRT and ERp57 re-localize to the outer cytoplasmic membrane and provide an “eat me” signal that promotes phagocytosis by macrophage and dendritic cells. Additionally, exposed CRT represents a specific antigen that can be targeted by cytotoxic T cells. CRT exposure has been suggested to dictate the immunogenicity of dying cancer cells, allowing the capture of tumor antigens by dendritic cells (7). In parallel, the release of the nuclear protein HMGB1 activates dendritic cells notably through its interaction with TLR4 and facilitates the processing and presentation of antigens. Exposition of HSP 70/80 has also immunostimulatory effects mediated by TLR4 and CD14 and can facilitate antigens cross-presentation that is necessary for the presentation of captured tumor-antigens on MHC class I molecules and for the subsequent activation of CD8⁺ cytotoxic immune responses (8). ATP release on the extracellular space is regarded as a potent “find me” signal that is able to exert chemoattractant effects on dendritic cells through the P2Y2 receptor, as well as a potent activator of inflammasome assembly through the stimulation of the P2X7 receptor leading to IL-1 β /IL-18 maturation and release (9). The exposition and/or release of these ICD-associated immunostimulatory molecules stimulate adaptive immune responses and possibly potent anti-tumor responses (10). ICD and the subsequent TLR stimulation are also accompanied by the release of cytokines notably by a robust type I interferon (i.e., IFN- α and IFN- β) response. IFN α / β have a wide range of immune-stimulatory activities and participate in the upregulation of major histocompatibility (MHC) molecules on myeloid cells, activation of natural killer (NK) cells, and stimulation and differentiation of effector T cells. Stimulation of dendritic cells has important implications for the initiation of adaptive immune responses and is associated with phagocytosis and processing of tumor antigens, migration towards the draining lymph nodes, upregulation of MHC as well as costimulatory molecules (CD80, CD86), all contributing to an efficient presentation of engulfed tumor antigens to T cells (11) (**Figure 1**).



As mentioned earlier, multiple compounds including classical chemotherapeutic agents, targeted cancer drugs, or irradiation have been recognized to induce ICD under certain conditions. The definition of the molecular hallmarks of ICD has slowly contributed to a shift in the methods used to screen chemotherapeutic drugs for their capacity to induce ICD and to release DAMPs. On the same line, immunocompetent animal models and guidelines to evaluate the immunogenicity of tumor cells exposed to chemotherapy drugs (12) are now replacing animal models based on human tumors engrafted in immunodeficient mice (as recommended by the US National Cancer Institute guidelines), which did not allow to evaluate immunostimulatory effects that some chemotherapeutic drugs may have. This consensual method is based on the evaluation of the ability of drug-exposed killed tumor cells to vaccinate

immunocompetent mice and prevent tumor formation elicited by a secondary injection of the same living tumor cell line.

A new field in cancer research has emerged during recent years aiming at a better understanding and eliciting ICD in the tumor context with the aim to favorably manipulate its occurrence, to favor the stimulation of anti-tumor immune responses, and to improve treatment outcomes and overall survival. Given the importance of ICD in other pathophysiological context such as infection as well as in the antigenicity of tumors, studies were performed to characterize ICD morphologically and molecularly.

Mechanisms Leading to the Induction of Pyroptosis and Necroptosis

In the context of an infection, pyroptosis can be triggered by sensing distinct components of the pathogen, causing

inflammasome assembly, caspase-1 activation, and cleavage of Gasdermin family proteins. These activities are eventually leading to pore formations allowing the release of mature IL-1 β and IL-18 cytokines (13). Thus, pyroptosis can be defined as an inflammatory cell death involved in host defense against pathogens. It was firstly described in 1992 in infected macrophages (14). The name pyroptosis was, however, given later, after the observation that bacteria-infected macrophages undergo a lytic form of programmed cell death, dependent of caspase-1 activity, and associated with the release of pro-inflammatory IL-1 β (15). It appeared, therefore, as a programmed form of cell death, akin to apoptosis, but appeared morphologically more related to necrosis, leading to membrane rupture and to the release of pro-inflammatory molecules. In the infectious context, pyroptosis is triggered by cell-derived DAMPs and/or pathogen-associated molecular

patterns (PAMPs) sensed by specific and multiple membrane and cytoplasmic pattern-recognition receptors (PRRs) expressed by innate immune cells. Cytoplasmic sensors of DAMPs and PAMPs include, but are not restricted to, NOD-like receptors (NLRs), the absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors, and proteins of the pyrin family. Upon binding to their specific cell- or pathogen-derived ligands, these cytoplasmic sensors (such as NLRP1b, NLRP3, NLRC4, AIM2, and pyrin) assemble into an inflammasome multimeric protein complex, containing or not the adaptor proteins ASC, further leading to the recruitment and activation of pro-caspase-1 (**Figure 2A**). Mature active caspase-1 plays a central role in the induction of cell death and liberation of pro-inflammatory molecules. Indeed, caspase-1 not only cleaves the cytoplasmic leaderless pro-IL-1 β and pro-IL-18 cytokines, leading to their maturation, but also cleaves Gasdermin D (GSDMD), the recently identified pyroptosis executioner (16).

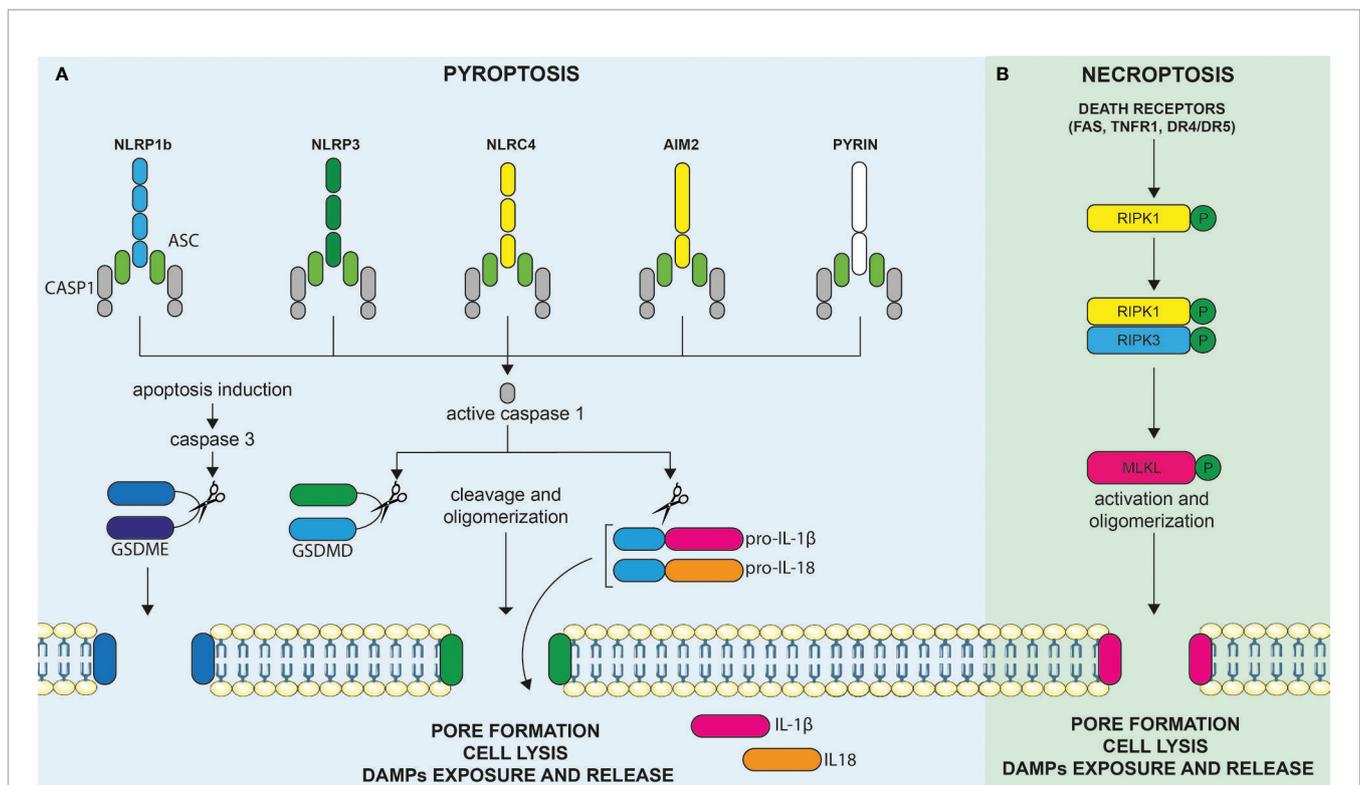


FIGURE 2 | Molecular mechanisms leading to the induction of pyroptosis and necroptosis. **(A)** Cytoplasmic sensors of DAMPs and PAMPs include, but are not restricted to, NOD-like receptors (NLRs), the absent in melanoma-2 (AIM2)-like receptors, and proteins of the pyrin family. Upon binding to their specific DAMPs or PAMPs ligands, these cytoplasmic sensors, such as NLRP1b, NLRP3, NLRC4, AIM2, and pyrin, assemble into an inflammasome multimeric protein complex, containing or not the adaptor proteins ASC, further leading to the recruitment and activation of pro-caspase-1. Activated caspase-1 can cleave and activate the leaderless cytoplasmic cytokines pro-IL-1 β and pro-IL-18, leading to their maturation. Active caspase-1 (an others inflammatory caspases) also cleaves gasdermin D (GSDMD), the recently identified pyroptosis executioner, resulting in the liberation of its N-terminal pore forming domain (N-GSDMD) from the auto-inhibitory C-terminal domain. Liberation of the N-GSDMD induces its auto-oligomerization and translocation to the cell membrane to form a non-selective pore that contributes to cell lysis, mature IL-1 β /IL-18 release, as well as to the liberation of DAMPs in the extracellular milieu. GSDME, another member of the gasdermin family, is not cleaved by inflammatory caspases but can be cleaved by activated caspase-3 upon induction of apoptosis. Hence, the level of expression of GSDME directly determines the cellular fate between apoptosis or GSDME mediated-pyroptosis. **(B)** Necroptosis represents another inflammatory form of cell death and is mediated by Mixed lineage kinase domain-like (MLKL). Necroptosis can be triggered by the same death receptors (DRs) that are known to induce extrinsic apoptosis (e.g., FAS, TNFR1, DR4/DR5) but occur only when the initiator caspase-8 is blocked, as for instance in tumor or infected cells. In these circumstances, activation of death receptors results in the phosphorylation of RIPK1, RIPK3, and, finally, MLKL. Phosphorylation of MLKL culminates, as for pyroptosis, in the formation of membrane pores (although of smaller size as compared to pyroptosis). Membrane permeabilization to cations further induces cell swelling and osmolysis, ultimately leading to membrane rupture and release of proinflammatory DAMPs in the extracellular milieu, triggering immune stimulation.

Liberation of the N-terminal pore-forming domain of GSDMD (N-GSDMD) induces its auto-oligomerization and translocation to the cell membrane to form a non-selective pore of 10–14 nm inner diameter. This further causes massive ion influx, osmotic cell swelling, and membrane rupture, allowing the release of not only mature IL-1 β cytokine (that can directly exit through the pore) but also other pro-inflammatory intracellular contents (17–19). Other mechanisms leading to pyroptosis have also been described. For instance, inflammatory murine caspase-11 was found to directly bind cytoplasmic LPS, leading to its oligomerization and auto-activation (13). In what has been termed as the “non-canonical inflammasome” pathway, activated caspase-11 and, similarly, inflammatory human caspases-4/5 cleave GSDMD directly and induce pyroptosis independently of caspase-1 (16). Apart from GSDMD, other Gasdermin family members display a similar structure, composed of a pore forming N-terminal domain and an auto-inhibitory C-terminal domain. However, the presence of a caspase-1/4/5/11 cleavage site in the long loop linking these domains is unique to GSDMD, indicating that other mechanisms might be involved in the activation of the other family members. Apart from GSDMD, one of the best characterized members of this protein family is GSDME. Interestingly, caspase-3, a well-known executioner of apoptosis, was discovered to cleave and activate GSDME and trigger pyroptosis. As discussed below, this may have important implications for cancer as numerous tumor cells were found to harbor loss-of-function mutations and/or reduced expression of GSDME suggesting a tumor suppressor function. In these cells, the overexpression of GSDME was found to convert apoptosis to pyroptosis and was associated with anti-tumor immune responses (20).

Necroptosis is an inflammatory cell death mediated by mixed lineage kinase domain-like (MLKL) (21). Necroptosis, can be triggered by the same death receptors (DRs) that are known to induce extrinsic apoptosis (e.g., FAS, TNFR1, DR4/DR5) but occurs only when the initiator caspase-8 is blocked, as for instance in tumor or infected cells (22). It is considered as an alternative suicide pathway that triggers caspase-independent death when initiation of apoptosis is inhibited and, therefore, represents an additional backup mechanism to avoid cell subversion during infection or malignant transformation (18). Downstream of DRs, the molecular pathway, involves the phosphorylation of MLKL by the RIPK1/RIPK3 complex resulting in its oligomerization and its association to the inner leaflet of the plasma membrane (**Figure 2B**). MLKL is the only effector protein known to be able to trigger necroptosis. Phosphorylation of MLKL culminates, as for pyroptosis, eventually in the formation of membrane pores (although of smaller size as compared to pyroptosis). Membrane permeabilization to cations further induces cell swelling and osmolysis (17). Ultimately, this induces the membrane rupture and release of proinflammatory DAMPs into the extracellular milieu, triggering immune stimulation as previously outlined (23).

Complex Role of Pyroptosis in the TME

GSDMD and GSDME are playing a complex role in TME. Depending on the tumor type and possibly other factors, their

expression and function were associated with either tumor regression or tumor progression. As a first example of a possible detrimental role of GSDMD, its expression was found to be upregulated in malignant cells compared to adjacent tissues in non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) (24). This was reported for both lung adenocarcinoma (LUAD) and lung squamous cell carcinoma (LUSC) subtypes. Multivariate analyses showed that patients with the highest GSDMD expression in the LUAD group have a lower overall survival, suggesting its potential value as a prognostic factor. This is not the case in patients with LUSC, highlighting the differential role of GSDMD in different tumor contexts. Furthermore, RNA-interference mediated knockdown of GSDMD in tumor NSCLC cell lines attenuates tumor proliferation *in vitro*, as well as *in vivo* in xenografted immunodeficient mice. Moreover, the knockdown of GSDMD favored apoptosis rather than pyroptosis in response to inflammasome activators, displayed lower production of IL-1 β , and lower stimulation of the PI3K-Akt pathway (24). Whether GSDMD can regulate the pro-tumorigenic PI3K-Akt pathway in a cell intrinsic manner, directly or indirectly, remains to be explored. These data, however, underscore the detrimental effect of chronic IL-1 β liberation in the TME, which is known to recruit myeloid derived suppressor cells (MDSC) and promote neo-angiogenesis. Intriguingly, these tumor cells were indeed found to express not only GSDMD, but also the upstream NLRP3-inflammasome components, akin to myeloid cells, and to display spontaneous signs of inflammasome activation and IL-1 β production. Inflammasome activation is known to have detrimental effects in some cancer and associated with a poor prognosis, partly through the unfavorable role of the chronic liberation of IL-1 β and IL-18 (25–27). In pancreatic cancer, for instance, NLRP3 signaling has been associated with the recruitment of MDSC and establishment of an immune-suppressive TME (28).

Downstream of inflammasome and GSDMD activation, IL-1 β and IL-18 can also have a beneficial effect as they play a pivotal role in the activation of dendritic and natural killer (NK) cells, respectively, and can, thereby, promote anti-tumor immune responses. In line with this notion, the dysregulation of inflammasome signaling and/or consequent reduction of IL-1 β and IL-18 production were associated with tumor growth and metastasis in colorectal cancer (28–31). GSDMD, expressed by tumor cells or by cells from the TME, might therefore also be linked to positive effects in some circumstances. In agreement, GSDMD expression in gastric cancer was found to be lower in tumor biopsies compared to adjacent tissues, and its forced lentiviral re-expression in corresponding tumor cells lines was associated with a decrease proliferation *in vitro* as well as *in vivo* following their engraftment in nude mice (32). This suggested that GSDMD expression could limit tumor cell intrinsic proliferation in this type of tumor and sensitize the cells to a pyroptotic cell death. However, the consequence that this may have on the antitumor immune responses obviously could not be evaluated in this immunodeficient mouse model.

As the induction of pyroptosis in tumor cells and cells of the TME hold promise not only to kill tumor cells, but also to induce ICD and anti-tumor responses, a direct induction of pyroptosis using viral vectors encoding the pore forming N-GSDMD

represents an interesting perspective. However, the production of viral vectors encoding lytic proteins cause difficulties and generally cell death of the producing cells and a poor viral vector yield. This has, however, been overcome in a first proof-of-principle study by using a specific promoter to control the expression of the toxic gene. This study reported the use of an adeno-associated virus (AAV) vector coding for the pore forming N-GSDMD protein under the control of the P0 Schwann-cell specific promoter. Injection of the corresponding AAV1 vectors in mouse or human Schwannoma tumor implanted, respectively, into immunocompetent and immunodeficient mouse models lead to the significant decrease of tumor growth with no conspicuous signs of toxicity (33). Although immunocompetent mice were used in the syngeneic tumor model, the authors did not evaluate the precise mechanisms leading to the better tumor control and potential immune responses against the tumor.

GSDMD activation is associated with the maturation and liberation of IL-1 β with the potentially detrimental effects mentioned earlier. Unlike GSDMD that is cleaved by inflammatory caspases subsequent to inflammasome activation, GSDME is activated by caspase-3. This implies that GSDME-induced pyroptosis is, in principle, not linked to the liberation of IL-1 β and may thereby be associated with improved anti-tumor effects. However, a recent study demonstrated that in macrophage cell lines deficient for GSDMD, and that express low levels of GSDME, inflammasome activation can secondarily activate GSDME to form a conduit for IL-1 β release without inducing pyroptotic cells death (34). Whether this newly discovered mechanism has any relevance for myeloid cells or tumor cells of the TME remains to be explored.

Caspase-3-dependant apoptosis can be converted to pyroptosis in cells that express sufficient levels of GSDME. This, in essence, holds the potential to convert any pro-apoptotic signal into pyroptosis providing that GSDME is expressed and functional. In agreement, GSDME expression is inactivated in most tumor cells through two complementary mechanisms: downregulation of expression based on epigenic hypermethylation of the promoter, or loss-of-function mutations resulting in an inactive protein unable to form a membrane pore (35–39). Furthermore, methylation of CpG motifs outside the promoter region and within the GSDME gene has been described and a growing body of evidence suggests that such methylation patterns might be useful as diagnostic cancer biomarkers. On the other hand, data on GSDME expression levels between cancer and normal samples are controversial: while the majority of translational studies have found downregulated levels of GSDME in cancer compared to normal tissue, others have not found such differences. Even more puzzling, there was no clear correlation between GSDME methylation and GSDME expression levels in a number of studies (40). Overall, however, GSDME appears to represent a potent tumor suppressor gene (20). This has been evidenced in primary breast cancer and colorectal cancer using data from the cancer genome atlas database, and GSDME downregulation has been associated with a decrease of overall survival (20). In tumor cell lines, knockout of the corresponding gene in EMT6 and CT26

cells that express GSDME enhances tumor growth. Conversely, lentiviral-mediated expression of full length GSDME decreases the tumor growth of 4T1 and B16 tumor cell lines when grafted into immunocompetent mice. Analysis of immune cell infiltrates underlined the importance of GSDME expression in promoting anti-tumor immune responses characterized notably by tumor-infiltrating NK and CD8⁺ cytotoxic T cells. Interestingly, Granzyme B (GrzB) contained in the cytotoxic granules of NK cells and cytotoxic T cells, and known to represent an important killing mechanism employed by immune cells, was found to directly cleave and activate GSDME independently of caspase-3 activation. Hence, this might be involved in a feedforward mechanism to amplify pyroptosis in the tumor context. In this scenario, a first pro-apoptotic signal induced, for example, by a chemotherapeutic agent would serve as a trigger to initiate pyroptosis in GSDME expressing cells, and secondary recruitment of cytotoxic immune cells would further amplify pyroptosis through the liberation of GrzB and, consequently, the direct activation of GSDME. Some chemotherapeutic drugs are indeed now well described to induce caspase-3 dependent pyroptosis in GSDME expressing tumors (41–43). This may, in part, explain the decreased survival of patients harboring a low GSDME expression in their tumor, which might be more resistant to pyroptotic cell death, and to secondary amplification and protection by the immune responses.

Necroptosis: Detrimental and Beneficial Consequences in the Tumor Context

In the context of cancer, necroptosis can be considered as a double-edged sword since both positive and negative effects on tumor cell growth and invasion/metastasis have been described in different preclinical models. Components of the necroptosis signaling pathway have been found to be downregulated in some cancers, and this is associated with a poor prognosis (44–47). In agreement, expression of RIPK3, one of the major components of the necrosome complex upstream of MLKL, is repressed by epigenetic mechanisms, and, notably, by methylation of the region surrounding the transcription start site. This was found to be the case in tumor cell lines, in tumor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML), as well as in primary breast cancer (47). In the latter type of cancer, RIPK3 expression is reduced in all subtypes analyzed, including in 73% of luminal A group samples, 84% of luminal B, 90% in triple-negative, and in 95% Her2-positives samples. This suggests that the expression of RIP3 is negatively selected during oncogenic transformation, or during tumor growth, and that its down modulation correlates with resistance to chemotherapy. In line with this notion, hypomethylating agents like 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) restore RIP3 protein expression in about 70% of the tumor cell lines tested, and could sensitize refractory cell lines to TNF α induced necroptosis as well as to several chemotherapeutic agents in a RIP3-dependent manner (47). Interestingly, this was also studied *in vivo* in a xenograft tumor model where the combination of 5-AZA with doxorubicin was more effective than either treatment alone. However, the impact that this may have on an immunocompetent animal model on the stimulation of the

anti-tumor immune response has not been addressed in this humanized model.

Although apoptosis remains the main form of cell death induced by chemotherapeutic agents, accumulating evidences suggest that some drugs, like cisplatin, also induces necroptosis (48). Interestingly, the induction of necroptosis can influence the efficacy and therapeutic effects in some circumstances. Recent works demonstrate that the expression of RIPK3 in esophageal cancer cell lines contribute to cisplatin sensitivity when the apoptotic pathway is deficient or absent (49). In this *in vitro* model, cisplatin treatment induces autocrine production of TNF α , a well-known inducer of the extrinsic apoptotic pathway through the TNFR1. Again, this situation illustrates the notion that blockade of apoptosis triggers necroptosis when the components of the necroptosis pathway are present. Hence, the expression of TNFR1 and of RIPK1/RIPK3/MLKL proteins by tumor cells, in conjunction with the production of TNF α in the tumor microenvironment, could represent novel biomarkers for cisplatin sensitivity in apoptosis-resistant tumors. This may not only be limited to cisplatin as other chemotherapeutic molecules have been described to induce necroptosis by different mechanisms such as shinokin and staurosporin in leukemia or refisibufogenin and 5-FU in colorectal cancer (50, 51).

Regarding the expression of the molecular effectors of necroptosis in tumors, some studies reported a decreased expression of RIPK3, but not RIPK1, in AML (52, 53), while deficiency of both RIPK3/RIPK1 has been reported in colon cancer as compared to non-malignant adjacent tissues (54). In osteosarcoma, overexpression of miR-155-5p has been reported as the mechanism leading to the inhibition of RIPK1 expression and was associated with poor prognosis and increased tumor growth (55). MLKL, the molecular executioner of necroptosis, has also been found to be downregulated in several types of cancer. In gastric, cervical squamous, and ovarian cancers, a lower expression of MLKL has been correlated with a poor prognosis (44–46). Moreover, MLKL expression has been suggested to represent a potential predictive biomarker in gastric cancer, cervical squamous cancer, and early stage pancreatic adenocarcinoma (45, 46, 56). Taken together, these data suggest that down modulation of RIPK1, RIPK3, or MLKL is associated with poorer prognosis and/or increased tumor aggressiveness, supporting the notion that necroptosis acts as a tumor suppressor and that its repression represents a mechanism for cancer cells to evade cell death.

However, as often in cancer, evidences also exist to suggest the negative consequences associated with the expression of the main actors of necroptosis. For instance, RIPK1 expression in glioblastoma (GBM) has been correlated with a poorer prognosis. The underlying mechanism involves the activation of NF- κ B by RIPK1, further leading to the inhibition of P53 activity, thereby, promoting tumor growth (57). In another important study, in the context of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDA), contradictory effects of necroptosis were reported when studied *in vitro* and *in vivo*. While, *in vitro* inhibition of the formation of the RIPK1/RIPK3 necrosome complex promoted cancer cell proliferation and aggressiveness, in line with their above-mentioned tumor suppressor role. This was not the case *in vivo* where this was associated instead with tumor rejection (58). These apparently

conflicting results were attributed to a negative influence of necroptosis on the composition of the tumor microenvironment. In the mouse model used in this study, based on a genetically inducible tissue specific Kras-dependent oncogenesis, intact RIPK1/RIPK3 signaling favored the recruitment of an immunosuppressive tumor microenvironment (58). Mechanistically, this was dependent on a necroptosis-dependent expression of the CXCL1 chemokine, on the recruitment of myeloid cells, and on their conversion to immunosuppressive and tumorigenic cells by necroptosis-dependent exposition of the nuclear SAP130 protein and consequent activation of the Mincle receptor on myeloid cells. RIPK3 deletion in this PDA model or pharmacological inhibition of RIPK1 induce the recruitment of activated immune cells and favored tumor rejection (58). Hence, in this *in vivo* mouse model, necroptosis seems to promote a chronic, low grade pro-inflammatory response that favors the constitution of immunosuppressive TME. In line with this study, a another report have demonstrated the positive effect *in vivo* of a novel selective small-molecule RIPK1 inhibitor, developed by the GSK company, in a similar mouse model of PDA as well as in organoid human models (59). In this study, RIPK1 was demonstrated to be upregulated in immunosuppressive tumor-associated macrophages (TAM). Its inhibition reprogrammed TAM towards an immunogenic phenotype, induced T cell activation and T helper differentiation into anti-tumoral Th1/Th17 phenotypes, and improved anti-tumor immunity.

These studies highlight the importance of studying necroptosis consequences not only in the tumor cells themselves but also on the cells of the TME and on the induction of anti-immune responses. As evoked earlier, necroptosis leads to the release of DAMPs and stimulation of immune cells by different molecular pathways. However, recent studies show that the release of DAMPs upon necroptosis induction is not sufficient alone to induce efficient cross-priming of CD8⁺ T cells and robust adaptive immunity (60). Instead, this seems to require complex and coordinated molecular signaling pathways that involve the RIPK1-dependant activation of NF- κ B and transcriptional activity, despite the rapid entry into cell death, that results in the parallel expression of pro-inflammatory genes and cytokines (57, 58). Interestingly, the direct intratumoral induction of necroptosis using an AAV vector encoding for a constitutively active form of RIPK3 induce necroptosis in a part of the tumor cells, improves tumor immunogenicity, and synergizes with immune checkpoint blockade to promote a durable tumor clearance (61). In a similar strategy, the direct intratumoral delivery of mRNA coding for the necroptosis executioner MLKL, followed by *in vivo* electroporation at the injection site, reduced tumor growth and metastasis, synergized with immune checkpoint blockade, and improved antitumor immunity in murine melanoma and colon carcinoma models (62). In this study, MLKL mRNA electroporation *in vivo* was demonstrated to induce CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses directed against tumor antigens that were responsible for tumor control. Taken together, these data in mouse models indicate that fostering necroptosis directly in tumor cells may represent an attractive novel strategy to promote tumor antigens release, their efficient presentation, and the induction of immune responses against tumor cells. Whether favoring the induction of necroptosis rather than apoptosis is

associated with the induction of anti-tumor immune responses and/or better treatment outcomes in patients with established tumors remain to be fully explored.

PERSPECTIVES

Pyroptosis and necroptosis play complex and multifaceted roles, depending on the cancer type and tumor context. Yet, the majority of the mutations in the gene coding for GSDME found in tumor tissues corresponds to the loss of functions mutations, suggesting a tumor suppressor role (20). The main proteins involved in the induction of necroptosis are also found to be dysregulated in different human cancers suggesting that necroptosis represent another important factor that contributes to tumor clearance and/or to the restriction of their malignancy. As pyroptosis and necroptosis are both involved in the induction of ICD within the TME, it is tempting to speculate that they contribute to the induction of anti-tumor immune responses. The strongest evidences that the immune system can be beneficial to treat or even cure cancers come from the success of immune checkpoint blockade using monoclonal antibodies directed against CTLA-4 or PD-1/PD-L1 (63, 64). Importantly, the treatment approach is most efficient in cancers that are highly immunogenic (i.e., melanoma, renal cell carcinoma, and others). Combinatorial approaches to increase the efficacy of immune checkpoint blockade in less immunogenic and immunologically “cold” tumors are currently being tested in both preclinical and clinical trials. Given the long-term beneficial effect of the induction of anti-tumor immune responses and their potential amplification with anti-immune checkpoints, several therapeutic strategies aim to stimulate ICD rather than the tolerogenic apoptotic forms of cell death. This comprises the selection of chemotherapeutic molecules that induce ICD rather than apoptosis, the evaluation of nanoparticles based-treatments, advanced physical techniques, as well as the development of oncolytic viruses (11). Manipulation of pyroptosis or necroptosis in cancer, in conjunction with the preservation of immune functions, could represent a novel promising option to

induce tumor cell death, acute inflammation, tumor antigens release, their capture and presentation by mature dendritic cells, and eventually to trigger an efficient stimulation of adaptive anti-tumor T cells. This has, at least, been proven in proof-of-concept studies in animal models, using, for instance, AAV vectors coding for the constitutively active form of RIPK3. This study elegantly demonstrates that the intratumoral induction of necroptosis using this strategy promotes effective immune responses and durable tumor clearance in combination with immune checkpoints blockade (61). Similarly, induction of pyroptosis using AAV vectors coding for the pore forming N-GSDMD protein under the control of a tumor specific promoter leads to the significant decrease of tumor growth in a schwannoma model (33). Additionally, induction of pyroptosis or necroptosis of cells that constitute the tumor microenvironment might potentially be used to rewire immunosuppressive TME and reduce tumor resistance to established therapies. However, some recent works also highlighted the potential negative consequences of pyroptosis/necroptosis in the tumor context stressing the need to further study the consequences of this strategy when used alone or in combination with other cancer treatments.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

AS and SA: writing – original draft. AS, UH, HB, OB, and SA: writing – review and editing. UH, HB, OB, and SA: funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by grants from the Agence Nationale de la Recherche (ANR) to OB and SA (ANR-20-CE92-0011) and the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) to UTK and HB (BU1310/9-1).

REFERENCES

- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon With Widespread Implications in Tissue Kinetics. *Br J Cancer* (1972) 26:239–57. doi: 10.1038/bjc.1972.33
- Nagata S, Tanaka M. Programmed Cell Death and the Immune System. *Nat Rev Immunol* (2017) 17:333–40. doi: 10.1038/nri.2016.153
- Wong RSY. Apoptosis in Cancer: From Pathogenesis to Treatment. *J Exp Clin Cancer Res* (2011) 30:87. doi: 10.1186/1756-9966-30-87
- Fucikova J, Kepp O, Kasikova L, Petroni G, Yamazaki T, Liu P, et al. Detection of Immunogenic Cell Death and Its Relevance for Cancer Therapy. *Cell Death Dis* (2020) 11:1013. doi: 10.1038/s41419-020-03221-2
- Matzinger P. Tolerance, Danger and the Extended Family. *Annu Rev Immunol* (1994) 12:991–1045. doi: 10.1146/annurev.iy.12.040194.005015
- Dorward DA, Lucas CD, Chapman GB, Haslett C, Dhaliwal K, Rossi AG, et al. The Role of Formylated Peptides and Formyl Peptide Receptor 1 in Governing Neutrophil Function During Acute Inflammation. *Am J Pathol* (2015) 185:1172–84. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.01.020
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini JL, et al. Calreticulin Exposure Dictates the Immunogenicity of Cancer Cell Death. *Nat Med* (2007) 13:54–61. doi: 10.1038/nm1523
- Tesniere A, Panaretakis T, Kepp O, Apetoh L, Ghiringhelli F, Zitvogel L, et al. Molecular Characteristics of Immunogenic Cancer Cell Death. *Cell Death Differ* (2008) 15:3–12. doi: 10.1038/sj.cdd.4402269
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, et al. Autophagy-Dependent Anticancer Immune Responses Induced by Chemotherapeutic Agents in Mice. *Science* (2011) 334:1573–7. doi: 10.1126/science.1208347
- Workenhe ST, Pol J, Kroemer G. Tumor-Intrinsic Determinants of Immunogenic Cell Death Modalities. *Oncoimmunology* (2021) 10:1. doi: 10.1080/2162402X.2021.1893466
- Zhou J, Wang G, Chen Y, Wang H, Hua Y, Cai Z, et al. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy: Present and Emerging Inducers. *J Cell Mol Med* (2019) 23:4854–65. doi: 10.1111/jcmm.14356
- Kepp O, Senovilla L, Vitale I, Vacchelli E, Adjemian S, Agostinis P, et al. Consensus Guidelines for the Detection of Immunogenic Cell Death. *Oncoimmunology* (2014) 3:e955691. doi: 10.4161/21624011.2014.955691

13. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: Mechanism of Assembly, Regulation and Signalling. *Nat Rev Immunol* (2016) 16:407–20. doi: 10.1038/nri.2016.58
14. Zychlinsky A, Prevost MC, Sansonetti PJ. Shigella Flexneri Induces Apoptosis in Infected Macrophages. *Nature* (1992) 358:167–9. doi: 10.1038/358167a0
15. Cookson BT, Brennan MA. Pro-Inflammatory Programmed Cell Death. *Trends Microbiol* (2001) 9:113–4. doi: 10.1016/S0966-842X(00)01936-3
16. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Determines Pyroptotic Cell Death. *Nature* (2015) 526:660–5. doi: 10.1038/nature15514
17. Chen X, He WT, Hu L, Li J, Fang Y, Wang X, et al. Pyroptosis Is Driven by Non-Selective Gasdermin-D Pore and Its Morphology Is Different From MLKL Channel-Mediated Necroptosis. *Cell Res* (2016) 26(9):1007–20. doi: 10.1038/cr.2016.100
18. Frank D, Vince JE. Pyroptosis Versus Necroptosis: Similarities, Differences, and Crosstalk. *Cell Death Differ* (2019) 26:99–114. doi: 10.1038/s41418-018-0212-6
19. Heilig R, Dick MS, Sborgi L, Meunier E, Hiller S, Broz P, et al. The Gasdermin-D Pore Acts as a Conduit for IL-1 β Secretion in Mice. *Eur J Immunol* (2018) 48:584–92. doi: 10.1002/eji.201747404
20. Zhang Z, Zhang Y, Xia S, Kong Q, Li S, Liu X, et al. Gasdermin E Suppresses Tumour Growth by Activating Anti-Tumour Immunity. *Nature* (2020) 579:415–20. doi: 10.1038/s41586-020-2071-9
21. Murphy JM, Czabotar PE, Hildebrand JM, Lucet IS, Zhang JG, Alvarez-Diaz S, et al. The Pseudokinase MLKL Mediates Necroptosis via a Molecular Switch Mechanism. *Immunity* (2013) 39:443–53. doi: 10.1016/j.immuni.2013.06.018
22. Tummers B, Green DR. Caspase-8: Regulating Life and Death. *Immunol Rev* (2017) 277:76–89. doi: 10.1111/imr.12541
23. Kaczmarek A, Vandenebeele P, Krysko DV. Necroptosis: The Release of Damage-Associated Molecular Patterns and Its Physiological Relevance. *Immunity* (2013) 38:209–23. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.003
24. Gao J, Qiu X, Xi G, Liu H, Zhang F, Lv T, et al. Downregulation of GSDMD Attenuates Tumor Proliferation via the Intrinsic Mitochondrial Apoptotic Pathway and Inhibition of EGFR/Akt Signaling and Predicts a Good Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncol Rep* (2018) 40:1971–84. doi: 10.3892/or.2018.6634
25. Terme M, Ullrich E, Aymeric L, Meinhardt K, Desbois M, Delahaye N, et al. IL-18 Induces PD-1-Dependent Immunosuppression in Cancer. *Cancer Res* (2011) 71:5393–9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0993
26. Kang JS, Bae SY, Kim HR, Kim YS, Kim DJ, Cho BJ, et al. Interleukin-18 Increases Metastasis and Immune Escape of Stomach Cancer via the Downregulation of CD70 and Maintenance of CD44. *Carcinogenesis* (2009) 30:1987–96. doi: 10.1093/carcin/bgp158
27. Saijo Y, Tanaka M, Miki M, Usui K, Suzuki T, Maemondo M, et al. Proinflammatory Cytokine IL-1 β Promotes Tumor Growth of Lewis Lung Carcinoma by Induction of Angiogenic Factors: *In Vivo* Analysis of Tumor-Stromal Interaction. *J Immunol* (2002) 169:469–75. doi: 10.4049/jimmunol.169.1.469
28. Daley D, Mani VR, Mohan N, Akkad N, Balasubramania GSD, Pandian S, et al. NLRP3 Signaling Drives Macrophage-Induced Adaptive Immune Suppression in Pancreatic Carcinoma. *J Exp Med* (2017) 214:1711–24. doi: 10.1084/jem.20161707
29. Zaki MH, Vogel P, Body-Malapel M, Lamkanfi M, Kanneganti T-D. IL-18 Production Downstream of the Nlrp3 Inflammasome Confers Protection Against Colorectal Tumor Formation. *J Immunol* (2010) 185:4912–20. doi: 10.4049/jimmunol.1002046
30. Allen IC, Tekippe EME, Woodford RMT, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, et al. The NLRP3 Inflammasome Functions as a Negative Regulator of Tumorigenesis During Colitis-Associated Cancer. *J Exp Med* (2010) 207:1045–56. doi: 10.1084/jem.20100050
31. Williams TM, Leeth RA, Rothschild DE, Coutermarsh-Ott SL, McDaniel DK, Simmons AE, et al. The NLRP1 Inflammasome Attenuates Colitis and Colitis-Associated Tumorigenesis. *J Immunol* (2015) 194:3369–80. doi: 10.4049/jimmunol.1402098
32. Wang WJ, Chen D, Jiang MZ, Bing XU, Li XW, Chu Y, et al. Downregulation of Gasdermin D Promotes Gastric Cancer Proliferation by Regulating Cell Cycle-Related Proteins. *J Dig Dis* (2018) 19:74–83. doi: 10.1111/1751-2980.12576
33. Ahmed SG, Abdelnabi A, Doha M, Brenner GJ. Schwannoma Gene Therapy by Adeno-Associated Virus Delivery of the Pore-Forming Protein Gasdermin-D. *Cancer Gene Ther* (2019) 26:259–67. doi: 10.1038/s41417-018-0077-3
34. Zhou B, Abbott DW. Gasdermin E Permits Interleukin-1 Beta Release in Distinct Sublytic and Pyroptotic Phases. *Cell Rep* (2021) 35:108998. doi: 10.1016/j.celrep.2021.108998
35. Croes L, Beyens M, Fransen E, Ibrahim J, Vanden Berghe W, Suls A, et al. Large-Scale Analysis of DFNA5 Methylation Reveals Its Potential as Biomarker for Breast Cancer. *Clin Epigenet* (2018) 10:1–13. doi: 10.1186/s13148-018-0479-y
36. Ibrahim J, Op de Beek K, Fransen E, Croes L, Beyens M, Suls A, et al. Methylation Analysis of Gasdermin E Shows Great Promise as a Biomarker for Colorectal Cancer. *Cancer Med* (2019) 8:2133–45. doi: 10.1002/cam4.2103
37. Kim MS, Chang X, Yamashita K, Nagpal JK, Baek JH, Wu G, et al. Aberrant Promoter Methylation and Tumor Suppressive Activity of the DFNA5 Gene in Colorectal Carcinoma. *Oncogene* (2008) 27:3624–34. doi: 10.1038/sj.onc.1211021
38. Kim MS, Lebron C, Nagpal JK, Chae YK, Chang X, Huang Y, et al. Methylation of the DFNA5 Increases Risk of Lymph Node Metastasis in Human Breast Cancer. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) 370:38–43. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.03.026
39. Akino K, Toyota M, Suzuki H, Imai T, Maruyama R, Kusano M, et al. Identification of DFNA5 as a Target of Epigenetic Inactivation in Gastric Cancer. *Cancer Sci* (2007) 98:88–95. doi: 10.1111/j.1349-7006.2006.00351.x
40. De Schutter E, Croes L, Ibrahim J, Pauwels P, Op de Beek K, Vandenebeele P, et al. GSDME and Its Role in Cancer: From Behind the Scenes to the Front of the Stage. *Int J Cancer* (2021) 148:2872–83. doi: 10.1002/ijc.33390
41. Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, et al. Chemotherapy Drugs Induce Pyroptosis Through Caspase-3 Cleavage of a Gasdermin. *Nature* (2017) 547:99–103. doi: 10.1038/nature22393
42. Jiang M, Qi L, Li L, Li Y. The Caspase-3/GSDME Signal Pathway as a Switch Between Apoptosis and Pyroptosis in Cancer. *Cell Death Discov* (2020) 6:112. doi: 10.1038/s41420-020-00349-0
43. Wang Y, Yin B, Li D, Wang G, Han X, Sun X, et al. GSDME Mediates Caspase-3-Dependent Pyroptosis in Gastric Cancer. *Biochem Biophys Res Commun* (2018) 495:1418–25. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.156
44. He L, Peng K, Liu Y, Xiong J, Zhu FF. Low Expression of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Is Associated With Poor Prognosis in Ovarian Cancer Patients. *Onco Targets Ther* (2013) 6:1539–43. doi: 10.2147/OTT.S52805
45. Ruan J, Mei L, Zhu Q, Shi G, Wang H. Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Is a Prognostic Biomarker for Cervical Squamous Cell Cancer. *Int J Clin Exp Pathol* (2015) 8:15035–8.
46. Ertao Z, Jianhui C, Kang W, Zhijun Y, Hui W, Chuangqi C, et al. Prognostic Value of Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Expression in the Survival of Patients With Gastric Cancer. *Tumor Biol* (2016) 37:13679–85. doi: 10.1007/s13277-016-5229-1
47. Koo GB, Morgan MJ, Lee DG, Kim WJ, Yoon JH, Koo JS, et al. Methylation-Dependent Loss of RIP3 Expression in Cancer Represses Programmed Necrosis in Response to Chemotherapeutics. *Cell Res* (2015) 25:707–25. doi: 10.1038/cr.2015.56
48. Wang D, Lippard SJ. Cellular Processing of Platinum Anticancer Drugs. *Nat Rev Drug Discov* (2005) 4:307–20. doi: 10.1038/nrd1691
49. Xu Y, Lin Z, Zhao N, Zhou L, Liu F, Cichacz Z, et al. Receptor Interactive Protein Kinase 3 Promotes Cisplatin-Triggered Necrosis in Apoptosis-Resistant Esophageal Squamous Cell Carcinoma Cells. *PLoS One* (2014) 9:1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0100127
50. Gong Y, Fan Z, Luo G, Yang C, Huang Q, Fan K, et al. The Role of Necroptosis in Cancer Biology and Therapy. *Mol Cancer* (2019) 18:1–17. doi: 10.1186/s12943-019-1029-8
51. Fu Z, Deng B, Liao Y, Shan L, Yin F, Wang Z, et al. The Anti-Tumor Effect of Shikonin on Osteosarcoma by Inducing RIP1 and RIP3 Dependent Necroptosis. *BMC Cancer* (2013) 13:1–10. doi: 10.1186/1471-2407-13-580
52. Nuges AL, El Bouazzati H, Hétiuin D, Berthon C, Loyens A, Bertrand E, et al. RIP3 Is Downregulated in Human Myeloid Leukemia Cells and Modulates Apoptosis and Caspase-Mediated P65/RelA Cleavage. *Cell Death Dis* (2014) 5:1–12. doi: 10.1038/cddis.2014.347

53. Höckendorf U, Yabal M, Herold T, Munkhbaatar E, Rott S, Jilg S, et al. RIPK3 Restricts Myeloid Leukemogenesis by Promoting Cell Death and Differentiation of Leukemia Initiating Cells. *Cancer Cell* (2016) 30:75–91. doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.002
54. Moriwaki K, Bertin J, Gough PJ, Orłowski GM, Chan FKM. Differential Roles of RIPK1 and RIPK3 in TNF-Induced Necroptosis and Chemotherapeutic Agent-Induced Cell Death. *Cell Death Dis* (2015) 6:e1636–11. doi: 10.1038/cddis.2015.16
55. Bhattacharya S, Chalk AM, Ng AJM, Martin TJ, Zannettino AC, Purton LE, et al. Increased miR-155-5p and Reduced miR-148a-3p Contribute to the Suppression of Osteosarcoma Cell Death. *Oncogene* (2016) 35:5282–94. doi: 10.1038/onc.2016.68
56. Colbert LE, Fisher SB, Hardy CW, Hall WA, Saka B, Shelton JW, et al. Pronecrotic Mixed Lineage Kinase Domain-Like Protein Expression Is a Prognostic Biomarker in Patients With Early-Stage Resected Pancreatic Adenocarcinoma. *Cancer* (2013) 119:3148–55. doi: 10.1002/cncr.28144
57. Park S, Hatanpaa KJ, Xie Y, Mickey BE, Madden CJ, Raisanen JM, et al. The Receptor Interacting Protein 1 Inhibits P53 Induction Through NF- κ B Activation and Confers a Worse Prognosis in Glioblastoma. *Cancer Res* (2009) 69:2809–16. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4079
58. Seifert L, Werba G, Tiwari S, Giao NN, Ly S, Alothman D, et al. The Necrosome Promotes Pancreatic Oncogenesis via CXCL1 and Mincle-Induced Immune Suppression. *Nature* (2016) 532:245–9. doi: 10.1038/nature17403
59. Wang W, Marinis JM, Beal AM, Savadkar S, Wu Y, Khan M, et al. RIP1 Kinase Drives Macrophage-Mediated Adaptive Immune Tolerance in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell* (2018) 34:757–74.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2018.10.006
60. Yatim N, Jusforgues-saklani H, Orozco S, Schulz O, Barreira da Silva R, Reis e Sousa C, et al. RIPK1 and NF- κ B Signaling in Dying Cells Determines Crosspriming of CD8⁺ T Cells. *Science* (2016) 350:328–34. doi: 10.1126/science.aad0395
61. Snyder AG, Hubbard NW, Messmer MN, Kofman SB, Hagan CE, Orozco SL, et al. Intratumoral Activation of the Necroptotic Pathway Components RIPK1 and RIPK3 Potentiates Antitumor Immunity. *Sci Immunol* (2019) 4:eaaw2004. doi: 10.1126/sciimmunol.aaw2004
62. Van Hoecke L, Van Lint S, Roose K, Van Parys A, Vandenabeele P, Grooten J, et al. Treatment With mRNA Coding for the Necroptosis Mediator MLKL Induces Antitumor Immunity Directed Against Neo-Epitopes. *Nat Commun* (2018) 9:3417. doi: 10.1038/s41467-018-05979-8
63. Leach DR, Krummel MF, Allison JP. Enhancement of Antitumor Immunity by CTLA-4 Blockade. *Science* (1996) 271:1734–6. doi: 10.1126/science.271.5256.1734
64. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced Expression of PD-1, A Novel Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death. *EMBO J* (1992) 11:3887–95. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x

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.

Copyright © 2021 Scarpitta, Hacker, Büning, Boyer and Adriouch. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). 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.

Publication 3

Ces travaux ne sont pas en lien direct avec les travaux de ce doctorat mais font partie de travaux auxquels j'ai activement participé.



Evaluation of P2X7 Receptor Function in Tumor Contexts Using rAAV Vector and Nanobodies (AAVnano)

Mélanie Demeules¹, Allan Scarpitta¹, Catalina Abad¹, Henri Gondé¹, Romain Harget¹, Carolina Pinto-Espinoza², Anna Marei Eichhoff², Waldemar Schäfer², Friedrich Haag², Friedrich Koch-Nolte² and Sahil Adriouch^{1*}

¹ Normandie University, UNIROUEN, INSERM, U1234, Pathophysiology, Autoimmunity, Neuromuscular Diseases and Regenerative THERapies, Rouen, France, ² Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

OPEN ACCESS

Edited by:

Lin-Hua Jiang,
University of Leeds, United Kingdom

Reviewed by:

Claudio Coddou,
Catholic University of the North,
Coquimbo, Chile

Ben J. Gu,
Florey Institute of Neuroscience
and Mental Health, University
of Melbourne, Australia

*Correspondence:

Sahil Adriouch
sahil.adriouch@univ-rouen.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Pharmacology of Anti-Cancer Drugs,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 12 January 2020

Accepted: 30 July 2020

Published: 11 September 2020

Citation:

Demeules M, Scarpitta A,
Abad C, Gondé H, Harget R,
Pinto-Espinoza C, Eichhoff AM,
Schäfer W, Haag F, Koch-Nolte F and
Adriouch S (2020) Evaluation of P2X7
Receptor Function in Tumor Contexts
Using rAAV Vector and Nanobodies
(AAVnano). *Front. Oncol.* 10:1699.
doi: 10.3389/fonc.2020.01699

Adenosine triphosphate (ATP) represents a danger signal that accumulates in injured tissues, in inflammatory sites, and in the tumor microenvironment. Extracellular ATP is known to signal through plasma membrane receptors of the P2Y and P2X families. Among the P2X receptors, P2X7 has attracted increasing interest in the field of inflammation as well as in cancer. P2X7 is expressed by immune cells and by most malignant tumor cells where it plays a crucial yet complex role that remains to be clarified. P2X7 activity has been associated with production and release of pro-inflammatory cytokines, modulation of the activity and survival of immune cells, and the stimulation of proliferation and migratory properties of tumor cells. Hence, P2X7 plays an intricate role in the tumor microenvironment combining beneficial and detrimental effects that need to be further investigated. For this, we developed a novel methodology termed AAVnano based on the use of Adeno-associated viral vectors (AAV) encoding nanobodies targeting P2X7. We discuss here the advantages of this tool to study the different functions of P2X7 in cancer and other pathophysiological contexts.

Keywords: P2X7, tumor, Adeno-associated virus, Nanobodies (VHH), animal models

INTRODUCTION

Adenosine triphosphate (ATP) released into the extracellular space represents a well-known danger signal that can signal through two main families of plasma membrane receptors: G protein-coupled receptors, named P2Y receptors, and ATP-gated ion channels termed P2X receptors (1). Among the latter family, P2X7 (also known as P2RX7) forms a homotrimeric receptor that has attracted much interest in the fields of inflammation and cancer. Activation of P2X7 by relatively high concentrations of extracellular ATP leads to Na⁺ and Ca²⁺ influx, and K⁺ efflux. This triggers not only major changes in the cellular ionic content, but also signaling and metabolic pathways involved in cell activation, survival and fate. Prolonged activation of P2X7 leads to the opening of a membrane pore allowing the entry of large molecules of up to 900 Da (2). Whether this membrane permeabilization is due to dilation of the P2X7 channel itself, or the activation of non-selective pores like pannexin-1, gasdermin-D, or anoctamin-6, may depend on the cellular

Publication 4

Ces travaux ne sont pas en lien direct avec les travaux de ce doctorat mais font partie de travaux auxquels j'ai activement participé.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Zahra Sharifzadeh,
Pasteur Institute of Iran, Iran

REVIEWED BY
Xiongwen Lv,
Anhui Medical University, China
Michael Sitkovsky,
Northeastern University, United States

*CORRESPONDENCE
Sahil Adriouch
sahil.adriouch@univ-rouen.fr

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Cancer Immunity
and Immunotherapy,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

RECEIVED 05 August 2022
ACCEPTED 03 October 2022
PUBLISHED 19 October 2022

CITATION
Demeules M, Scarpitta A, Hardet R,
Gondé H, Abad C, Blandin M,
Menzel S, Duan Y, Rissiek B, Magnus T,
Mann AM, Koch-Nolte F and
Adriouch S (2022) Evaluation of
nanobody-based biologics targeting
purinergic checkpoints in tumor
models *in vivo*.
Front. Immunol. 13:1012534.
doi: 10.3389/fimmu.2022.1012534

COPYRIGHT
© 2022 Demeules, Scarpitta, Hardet,
Gondé, Abad, Blandin, Menzel, Duan,
Rissiek, Magnus, Mann, Koch-Nolte and
Adriouch. 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.

Evaluation of nanobody-based biologics targeting purinergic checkpoints in tumor models *in vivo*

Mélanie Demeules¹, Allan Scarpitta¹, Romain Hardet¹,
Henri Gondé¹, Catalina Abad¹, Marine Blandin¹,
Stephan Menzel^{2,3,4}, Yinghui Duan⁵, Björn Rissiek⁵,
Tim Magnus⁵, Anna Marei Mann², Friedrich Koch-Nolte²
and Sahil Adriouch^{1*}

¹University of Rouen, INSERM, U1234, Pathophysiology Autoimmunity and Immunotherapy (PANTHER), Normandie Univ, Rouen, France, ²Institute of Immunology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ³Core Facility Nanobodies, University of Bonn, Bonn, Germany, ⁴Mildred Scheel Cancer Career Center HaTriCS4, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany, ⁵Department of Neurology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Adenosine triphosphate (ATP) represents a danger signal that accumulates in injured tissues, in inflammatory sites, and in the tumor microenvironment. ATP promotes tumor growth but also anti-tumor immune responses notably via the P2X7 receptor. ATP can also be catabolized by CD39 and CD73 ecto-enzymes into immunosuppressive adenosine. P2X7, CD39 and CD73 have attracted much interest in cancer as targets offering the potential to unleash anti-tumor immune responses. These membrane proteins represent novel purinergic checkpoints that can be targeted by small drugs or biologics. Here, we investigated nanobody-based biologics targeting mainly P2X7, but also CD73, alone or in combination therapies. Blocking P2X7 inhibited tumor growth and improved survival of mice in cancer models that express P2X7. P2X7-potentialiation by a nanobody-based biologic was not effective alone to control tumor growth but enhanced tumor control and immune responses when used in combination with oxaliplatin chemotherapy. We also evaluated a bi-specific nanobody-based biologic that targets PD-L1 and CD73. This novel nanobody-based biologic exerted a potent anti-tumor effect, promoting tumor rejection and improving survival of mice in two tumor models. Hence, this study highlights the importance of purinergic checkpoints in tumor control and open new avenues for nanobody-based biologics that may be further exploited in the treatment of cancer.

KEYWORDS

P2X7, purinergic signaling, tumor microenvironment (TME), anti-tumor immune responses, nanobody, nanobody-based biologics, AAV vectors

Résumés

Résumé en français :

Les vecteurs adéno-associés recombinants (AAVs) représentent un outil sûr et efficace pour la thérapie génique *in vivo*. L'objectif de ce travail est d'utiliser les AAVs pour manipuler la tumeur et son microenvironnement afin d'augmenter l'immunogénicité de la tumeur. A cet effet, nous avons développé des AAVs capables d'induire une mort cellulaire immunogénique (MCI), notamment la pyroptose et la nécroptose. Comme récemment démontré, la MCI repose sur l'activation des effecteurs de la pyroptose tels que la gasdermine D (GSDMD) ou la gasdermine E (GSDME) et l'effecteur de la nécroptose tel que MLKL, entraînant la mort cellulaire et la libération de signaux pro-inflammatoires intracellulaires. Dans notre projet, nous avons développé des AAVs capables d'induire directement la MCI en exprimant des formes déjà actives de GSDMD, de GSDME et de MLKL contournant ainsi la résistance tumorale intrinsèque. Nos résultats ont d'abord démontré que les plasmides codant pour nos formes actives des effecteurs de la MCI induisent en effet une mort rapide et efficace des cellules de mélanome B16-F10 transfectées dans les premières 24 heures, ainsi que la libération de molécules pro-inflammatoires prototypiques associées à la mort cellulaire immunogène (telles que la calréticuline, l'ATP et le HMGB1). De plus, la vaccination *in vivo* en utilisant des cellules de mélanome transfectées avec nos constructions induit une protection contre un second rechallenge tumoral, démontrant que la libération *in vivo* des antigènes tumoraux et des signaux pro-inflammatoires par les cellules mourantes favorise l'immunité anti-tumorale. Ensuite, l'injection intratumorale d'AAV2 codant pour la GSDME, la GSDMD ou MLKL seule n'est pas suffisante pour induire un rejet tumoral fort, mais l'association de la GSDME avec l'anti-PD1 dans la lignée cellulaire B16-F10 induit un rejet tumoral significatif. Il reste cependant à évaluer la réponse immunitaire associée induite par nos stratégies et la synergie avec d'autres immunothérapies ou chimiothérapies.

Résumé en anglais :

Recombinant adeno-associated vectors (AAVs) represent a safe and efficient tool for *in-vivo* gene therapy. The aim of the project is to use AAVs to manipulate the tumor and its microenvironment with the aim to increase tumor immunogenicity. For that, we have developed AAV able to induce immunogenic cell death (ICD), namely pyroptosis and necroptosis. As recently demonstrated, ICD rely on the activation of pyroptosis executioners like gasdermin D (GSDMD), GSDME (GSDME), necroptosis executioner like MLKL and resulting in cell death and the release of intracellular pro-inflammatory signals. In our project, we have developed AAV that have the capacity to directly induce ICD, by expressing already active forms of GSDMD, GSDME or MLKL, thereby bypassing intrinsic tumor resistance. Our results have first demonstrated that the plasmids coding for our active forms of ICD-executioners indeed induce rapid and efficient death of transfected B16-F10 melanoma cells within the first 24 hours, and the release of prototypical proinflammatory molecules associated with immunogenic cell death (as calreticulin, ATP and HMGB1). Furthermore, *in vivo* vaccination using melanoma cells transfected with our constructs induce protection against a secondary tumor challenge, demonstrating that *in vivo* release of tumor antigens and proinflammatory signal by the dying cells promote anti-tumor immunity. Next, intratumoral injection of AAV2 coding for GSDME, GSDMD or MLKL alone is not sufficient to induce strong tumor rejection but association with anti-PD1 in B16-F10 cell line induce a significative tumor rejection. The next ongoing step is now to evaluate the associate immune response induced by our strategies and the synergy with other immunotherapy or chemotherapy.